

TESIS DE MÁSTER

“Puesta a punto de la cuantificación
mediante PCR a tiempo real de la
expresión génica de marcadores
miogénicos”

Laura Ruiz Ripa

Curso 2013-14

Directora: Dra. Ana Arana Navarro

ÍNDICE

RESÚMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Tejido adiposo.....	3
1.1.1. Características del tejido adiposo.....	3
1.1.2. Importancia del tejido adiposo en los animales domésticos: El tejido adiposo intramuscular.....	4
1.1.3. Adipogénesis.....	5
1.2. Tejido muscular.....	7
1.2.1. Características del tejido muscular.....	7
1.2.2. Miogénesis.....	7
1.2.3. Regulación molecular de la miogénesis.....	9
1.2.3.1. Factores de regulación miogénica (MRFs).....	9
1.2.3.1.1. MYF5, MYOD y MYOG.....	12
1.3. Relación entre tejido adiposo y tejido muscular: Células Madre Mesenquimales.....	13
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAL Y MÉTODOS	16
3.1. Material animal y toma de muestras.....	16
3.2. Obtención del ARNm.....	17
3.2.1. Extracción del ARN del tejido muscular.....	17
3.2.2. Cuantificación del ARN.....	18
3.2.3. Tratamiento con DNAsas.....	18
3.3. Obtención de cDNA: Reacción de la Transcriptasa inversa.....	18
3.4. Amplificación de los marcadores miogénicos mediante PCR cualitativa.....	19
3.4.1. Diseño de los cebadores.....	19
3.4.2. PCR cualitativa.....	20
3.5. Clonación de los productos amplificados.....	20
3.6. Curvas estándar y cálculo de las eficiencias de amplificación de los cebadores.....	22

3.7.	Cuantificación mediante PCR a tiempo real del nivel de expresión de muestras colectivas.....	24
3.8.	Análisis de los resultados de la expresión de los marcadores miogénicos.....	24
4.	RESULTADOS.....	27
4.1.	Puesta a punto de los marcadores miogénicos.....	27
4.1.1.	Amplificación de los marcadores miogénicos mediante PCR cualitativa y clonación de los productos amplificados.....	27
4.1.2.	Comprobación del inserto en el plásmido extraído.....	27
4.1.3.	Curvas estándar y cálculo de las eficiencias de amplificación de los cebadores.....	28
4.2.	Cuantificación del nivel de expresión de muestras colectivas.....	28
5.	DISCUSIÓN.....	31
5.1.	Puesta a punto de los marcadores miogénicos.....	31
5.2.	Nivel de expresión de los marcadores miogénicos en los diferentes músculos.....	31
6.	CONCLUSIONES.....	34
	BIBLIOGRAFÍA.....	35

RESÚMEN

Uno de los retos del sector de vacuno de carne es producir carne de calidad lo que implica que presente una cantidad suficiente de grasa intramuscular ya que influye de forma positiva en las propiedades sensoriales de la carne.

Los mecanismos implicados en el desarrollo del tejido adiposo intramuscular no se conocen en su totalidad, por lo que el estudio de los factores involucrados en la miogénesis podría ayudar a entender mejor el desarrollo de la grasa intramuscular ya que está constatado que existe una competencia por la determinación celular a partir de las Células Madre Mesenquimales entre miocitos, adipocitos y fibroblastos.

En este Trabajo Fin de Máster se ha puesto a punto la metodología, utilizando la PCR a tiempo real, para analizar el nivel de expresión génica de los principales Factores de Regulación Miogénica (MRFs): *myogenic factor-5* (MYF5), *myogenic differentiation* (MYOD) y *myogenin* (MYOG). De esta forma, el estudio de los niveles de ARN mensajero podría dar lugar a la identificación de los elementos implicados en el desarrollo del tejido muscular.

Por otro lado, se ha realizado una primera experiencia en la que mediante PCR a tiempo real se cuantifica el nivel de expresión de los MRFs en cuatro músculos (*Longissimus dorsi*, *Semitendinoso*, *Masseter* y *Sternomandibularis*) en terneros de la raza Pirenaica. Los resultados muestran la existencia de diferencias significativas en el nivel de expresión de estos factores de transcripción en los músculos, que podrían relacionarse con las características específicas de cada uno en relación con el contenido de grasa, fibras musculares y la actividad metabólica. Los músculos que presentan un menor contenido de grasa, *Longissimus dorsi* y *Semitendinosus*, cuentan con un mayor nivel de expresión de los MRFs. Por el contrario, el músculo *Masseter* cuenta con niveles de expresión menores de estos factores de transcripción ya que al tener un mayor contenido de fibras de tipo oxidativo presenta una mayor deposición de grasa.

ABSTRACT

One of the challenges of the beef cattle industry is to produce meats of high eating quality, which means that the meat must contain enough amount of intramuscular fat, as it positively influences sensory properties of the meat.

The mechanisms involved in the development of intramuscular adipose tissue are not completely understood, therefore, the study of the factors involved in myogenesis could help to better understand the development of intramuscular fat. It has been shown that a competition for cell determination from Mesenchymal Stem cells to myocytes, adipocytes and fibroblasts exist.

In this work it has been optimized the methodology, using real-time PCR, to analyze the gene expression levels of the main Myogenic Regulatory Factors (MRFs): myogenic factor-5 (MYF5), myogenic differentiation (MYOD) and myogenin (MYOG). Thus, the study of mRNA levels might lead to the identification of factors involved in the muscle tissue development.

On the other hand, a first experiment using real-time PCR has been performed and quantified the level of expression of the MRFs in four muscles (*Longissimus dorsi*, *Semitendinosus*, *Masseter* and *Sternomandibularis*) in Pyrenean breed calves. The results showed significant differences in the expression of these transcription factors in the four muscles. This fact might be related to the specific characteristics of each muscle in relation to the fat content, muscle fibers and metabolic activity. Muscles with a lower fat content, *Longissimus dorsi* and *Semitendinosus*, presented a higher level of expression of MRFs. Conversely, levels of expression of these transcription factors were lower in *Masseter* muscle because it has higher content of oxidative muscle fibers.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Tejido adiposo

1.1.1. Características del tejido adiposo

El tejido adiposo o tejido graso constituye una forma especial de tejido conectivo que está formado por células especializadas en el almacenamiento de energía en forma de lípidos denominadas adipocitos (Bonnet *et al.*, 2010). Además del almacenamiento de energía, el tejido adiposo también se ocupa de la movilización de la energía en forma de ácidos grasos cuando es necesario (Lee *et al.*, 2014) y cumple funciones de protección térmica y física de los diferentes órganos corporales. También es considerado como un órgano endocrino ya que es el encargado de secretar un tipo de hormonas denominadas adipoquinas, mediante las cuales se regula el balance energético de todo el cuerpo (Sanchez-Gurmaches and Guertin, 2014).

El tejido adiposo está ampliamente distribuido por todo el organismo y comprende alrededor del 5-35% de la masa del animal, dependiendo de la edad, el genotipo y la nutrición. El desarrollo de este tejido se produce por hiperplasia, aumento del número de células adiposas, e hipertrofia, aumento del volumen de estas células (Bonnet *et al.*, 2010).

Existen dos tipos de tejido adiposo con diferentes funciones y características: el tejido adiposo blanco y el tejido adiposo marrón o pardo. El tejido adiposo blanco es el depósito básico de almacenamiento de energía y más abundante en el organismo, mientras que el tejido marrón o pardo está especializado en el gasto de energético (Bonnet *et al.*, 2010). Las células de tejido adiposo blanco son poliédricas y contienen solamente una gota lipídica que ocupa todo el citoplasma. El tejido adiposo blanco se acumula de forma preferente en el depósito subcutáneo. Las células del tejido adiposo marrón tienen forma poligonal y tienen un tamaño menor que las del tejido adiposo blanco. Además contienen varias gotas lipídicas de diferente tamaño distribuidas por todo el citoplasma (Moreno-Aliaga and Martinez, 2002).

1.1.2. Importancia del tejido adiposo en el ganado: El tejido adiposo intramuscular

Existen 4 depósitos principales de tejido adiposo en los animales: visceral, subcutáneo, intermuscular e intramuscular (Du *et al.*, 2013).

Un reto importante del sector de vacuno de carne, en relación con la calidad de la misma y la eficiencia de producción, es producir animales que cuenten con la proporción deseable de grasa y carne magra, lo que es resultado de la relación entre el número y tamaño de las células musculares y el de las células adiposas (Bonnet *et al.*, 2010). Ya que la calidad de la carne está determinada en gran medida por el contenido de grasa intramuscular, un mayor contenido de grasa intramuscular influye de forma positiva tanto en las cualidades sensoriales de la carne, como el sabor o la ternura, como en las consideraciones saludables (Hocquette *et al.*, 2010). Así, de forma general los niveles bajos de grasa intramuscular van a dar lugar a una carne menos sabrosa habiéndose estimado que son necesarios niveles de al menos un 2,5% (Jurie *et al.*, 2007), aunque existen estudios que demuestran que los rasgos de calidad sensorial solo se detectan cuando las variaciones en el contenido de grasa intramuscular son muy altas (Hocquette *et al.*, 2010).

La grasa intramuscular (IMF) se define como la cantidad de grasa que se encuentra dentro de los músculos y está compuesta químicamente por fosfolípidos, triglicéridos y colesterol. El contenido de grasa intramuscular presenta una gran variación entre las especies y razas de animales e incluso entre los diferentes músculos en animales de la misma raza. Estas diferencias se deben a que existen diversos factores involucrados en la cantidad de grasa intramuscular como puede ser el sexo, la edad y el tipo de alimentación generando así diferencias relacionadas principalmente con el número y el tamaño de los adipocitos intramusculares (Hocquette *et al.*, 2010).

Desde el punto de vista metabólico, en el caso del ganado bovino al igual que en otros vertebrados, la cantidad de grasa intramuscular es un balance entre la absorción, la síntesis y la degradación de los triglicéridos, lo que implica un gran número de rutas

metabólicas relacionadas tanto con los adipocitos intramusculares como con las miofibras. De esta forma, la cantidad de tejido adiposo intramuscular no depende solo de la variación durante el desarrollo del número y de la actividad metabólica intrínseca de los adipocitos intramusculares, sino que también depende del crecimiento muscular y de la actividad metabólica de otros tejidos. Así, está aceptado de forma general que una alta masa muscular va asociada con una menor cantidad de grasa en la canal y por lo tanto menor cantidad de grasa intramuscular (Hocquette *et al.*, 2010).

El tejido adiposo intramuscular es indispensable para conferir el sabor a la carne y el desarrollo fetal es la etapa principal de generación de adipocitos intramusculares los cuales van a proveer el lugar de acumulación de grasa intramuscular (Du *et al.*, 2010). Sin embargo, no se conocen bien los mecanismos que están implicados en el desarrollo de este tipo de tejido adiposo lo que proporcionaría numerosas ventajas en la producción de vacuno de carne amentando así su calidad y características sensoriales.

1.1.3. Adipogénesis

La adipogénesis es el proceso por el cual las Células Madre Mesenquimales (MSC) se determinan en el linaje adipogénico y se diferencian en adipocitos (Tang and Lane, 2012). De esta forma, la adipogénesis está dividida en dos etapas: la determinación y la diferenciación. En la determinación se produce la conversión de las MSC en preadipocitos y en la diferenciación tiene lugar la conversión de preadipocitos en adipocitos maduros (Du *et al.*, 2013), adquiriendo la capacidad para la síntesis y transporte de lípidos y la secreción de proteínas propias de las células adiposas (Rosen and MacDougald, 2006).

En la fracción estromo-vascular del tejido adiposo es donde se encuentran las MSC que darán lugar a los adipocitos. El proceso de adipogénesis comienza por un consumo excesivo de energía y una elevada captación de glucosa durante un periodo prolongado. Este estado metabólico genera señales que inducen a que las MSC se determinen hacia el linaje adipogénico dando lugar a la hiperplasia y a la conversión de estas células en preadipocitos. Existen varios factores que actúan como inductores o

inhibidores de la conversión de las MSC en el linaje adipogénico. Por ejemplo miembros de la familia BMP (*Bone Morphogenetic Protein*) como BMP4 y BMP2 actúan como activadores, mientras que la señalización de Hh (*Hedgehog*) actúa como inhibidor. Por otro lado la vía de señalización Wnt parece tener un papel tanto activador de la determinación adipogénica como inhibidor en la diferenciación de los adipocitos (Tang and Lane, 2012). De esta forma la determinación hacia el linaje adipogénico está regulada por diferentes factores de señalización que al final inciden en los promotores de los factores de transcripción del linaje adipogénico.

La diferenciación de preadipocitos en adipocitos comienza con la parada de la proliferación de los preadipocitos produciéndose una expansión clonal mediante sucesivas divisiones mitóticas que están inducidas por señales hormonales. Después, la división celular se detiene y comienza la expresión de genes característicos de los adipocitos y como consecuencia la acumulación lipídica. La morfología del adipocito se alcanza durante la diferenciación terminal cuando se induce la transcripción de los genes específicos de los adipocitos maduros. Este proceso de diferenciación está regulado por una cascada de factores de transcripción donde el receptor nuclear PPAR γ y varios miembros de la familia de factores de transcripción C/EBP tienen funciones muy importantes para la diferenciación (Esteve Ràfols, 2014).

La adipogénesis no se produce al mismo tiempo en los depósitos de tejido adiposo visceral, subcutáneo, intermuscular e intramuscular, como se muestra en la Figura 1. La adipogénesis en el tejido intramuscular se produce en último lugar, en la etapa fetal-neonatal. Este hecho proporciona una ventaja para aumentar la formación de adipocitos intramusculares sin afectar a otros depósitos de forma que no aumentaría la cantidad de grasa general del animal (Du *et al.*, 2013).

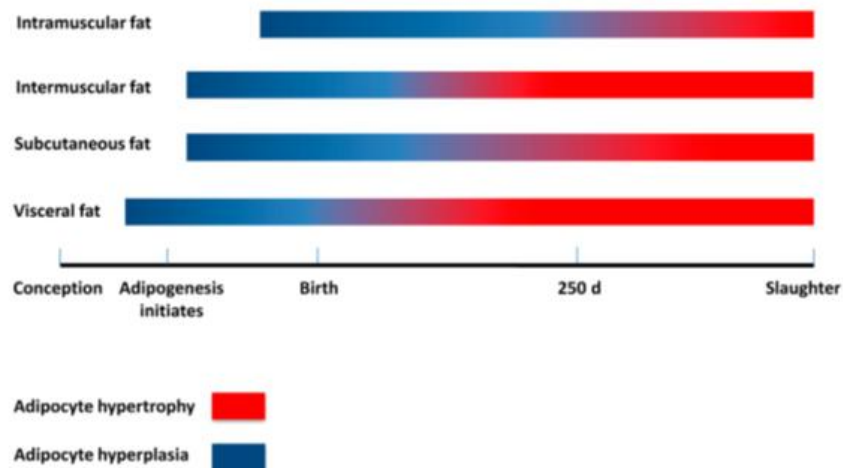


Figura 1. Adipogénesis secuencial en los cuatro depósitos de tejido adiposo (Hocquette *et al.*, 2010).

1.2. Tejido muscular

1.2.1. Características del tejido muscular

El músculo esquelético es un tejido complejo que está formado por células multinucleadas llamadas fibras musculares o miofibras. Estas fibras musculares contienen unidades contráctiles denominadas sarcómeros formados por proteínas (actina y miosina) que confieren al tejido muscular la capacidad de contraerse produciendo movimiento mediante gasto energético (Mok and Sweetman, 2011).

En los mamíferos el tejido muscular constituye alrededor del 55% del cuerpo, determinado por el número y tamaño de las fibras musculares. Las fibras musculares se originan en la etapa fetal y tanto su fisiología como su morfología presentan características heterogéneas (Bonnet *et al.*, 2010).

1.2.2. Miogénesis

La miogénesis es el proceso de determinación y formación de las células del músculo (Bonnet *et al.*, 2010). Se inicia durante la etapa embrionaria por unas determinadas señales moleculares desde los tejidos vecinos que inducen a que una parte de las MSC se determinen hacia el linaje miogénico (Buckingham, 2001).

En primer lugar en la formación y el desarrollo del músculo esquelético, como muestra la Figura 2, se produce la determinación de las MSC en mioblastos debido a la activación y expresión de unos factores de transcripción específicos de la miogénesis. Posteriormente estos mioblastos proliferan y se fusionan para formar unas células multinucleadas denominadas miotubos y produciéndose además un gran incremento de la expresión de los genes que son necesarios para la funcionalidad y desarrollo del músculo (Lodish *et al.*, 2008). Posteriormente los miotubos maduros darán lugar a fibras musculares altamente especializadas (Brand-Saber, 2005).

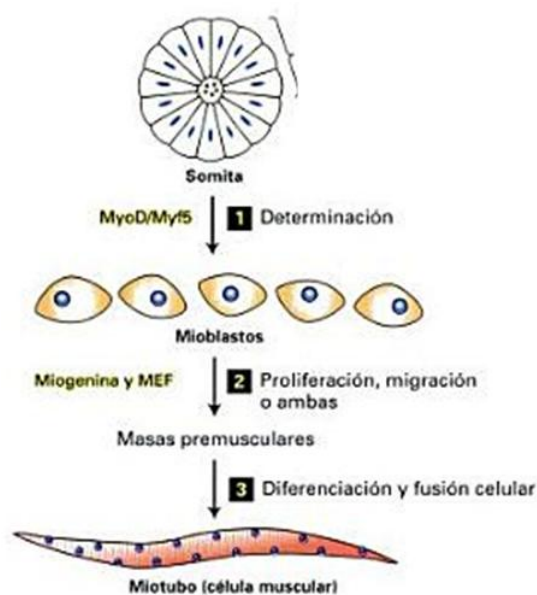


Figura 2. Proceso de formación del músculo esquelético (Lodish *et al.*, 2008).

El desarrollo del músculo esquelético se puede dividir en 3 etapas: embrionaria, fetal y adulta. Las etapas embrionaria y fetal son conocidas como etapa prenatal, en la cual se produce la formación de las fibras musculares. En esta etapa la miogénesis se divide en miogénesis primaria y miogénesis secundaria. La miogénesis primaria tiene lugar durante la etapa embrionaria, la cual crea la base para la posterior miogénesis secundaria, la cual se produce durante la fase fetal con el aumento del número de fibras musculares. El crecimiento postnatal se debe principalmente al aumento del tamaño de las fibras musculares (Du *et al.*, 2013). Así, la etapa prenatal es fundamental para el desarrollo del músculo esquelético. Además hay que destacar que la nutrición y la condición fisiológica materna tienen una gran influencia sobre la proliferación y abundancia de las células miogénicas y por lo tanto en la formación de fibras

musculares ya que éstas son el resultados de la fusión de células miogénicas (Du *et al.*, 2013).

En la etapa postnatal el crecimiento se produce casi en su totalidad solo por el aumento del tamaño de las fibras musculares a cargo de las células satélite de músculo. Por tanto, si durante la etapa prenatal no hay suficiente formación de fibras musculares el crecimiento muscular postnatal se verá muy limitado ya que el tamaño de las fibras musculares no puede exceder ciertos límites para que se produzca un intercambio eficiente de metabolitos y nutrientes (Du *et al.*, 2013).

1.2.3. Regulación molecular de la miogénesis

A nivel molecular, la especificación y determinación y la diferenciación miogénica, tanto en la etapa prenatal como postnatal, está regulada y controlada por la actividad de varios factores de transcripción (Sartorelli and Caretti, 2005).

Los factores de regulación miogénica (MRFs) son los elementos más importantes implicados en la regulación molecular de la miogénesis. Estos MRFs junto con la familia de proteínas MEF2 y otros factores específicos del músculo, son los encargados de coordinar la actividad de un amplio rango de coactivadores y corepresores, dando lugar así al control de la expresión génica durante la miogénesis (Berkes and Tapscott, 2005).

1.2.3.1. Factores de regulación miogénica (MRFs)

Los factores de regulación miogénica son unos factores de transcripción encargados de la regulación transcripcional que controla la determinación y diferenciación de las células del músculo esquelético (Megeney and Rudnicki, 1995) siendo el núcleo de la cascada que da lugar a su desarrollo (Moncaut *et al.*, 2013) y totalmente necesarios para su diferenciación (Mok and Sweetman, 2011). Estos factores de transcripción son: myogenic factor-5 (MYF5), myogenic differentiation 1 (MYOD) myogenin (MYOG) y myogenic factor 6 (MRF4).

La expresión de los MRFs es capaz de inducir la diferenciación miogénica incluso en células no musculares, como fibroblastos o adipocitos (Mok and Sweetman, 2011).

Los MRFs forman parte de una familia de factores de transcripción con dominios básicos “hélice-bucle-hélice”. Los genes de los MRFs codifican para fosfoproteínas nucleares que contienen un motivo formado por dos hélices separadas por un bucle (Megeny and Rudnicki, 1995) que es responsable de la capacidad de heterodimerización, confiriéndoles la actividad miogénica (Singh and Dilworth, 2013). Además poseen un dominio conservado que es esencial para la unión a secuencias específicas del ADN (Sabourin and Rudnicki, 2000). La actividad de los MRFs comienza cuando se produce la interacción de éstos con unas proteínas pertenecientes a su misma familia denominadas proteínas E. El heterodímero formado se une al reconocer la secuencia específica CANTNTG regulando la expresión de las cajas E (Sartorelli and Caretti, 2005), un motivo que se encuentra en potenciadores y promotores de muchos genes específicos del músculo esquelético de forma que le confiere la capacidad de activarlos (Berkes and Tapscott, 2005).

Las cajas E están muy extendidas por el genoma y se ha demostrado que los MRFs se unen a un gran número de estas secuencias aunque algunas de ellas no son funcionales en inducir la expresión génica (Mok and Sweetman, 2011). Por otro lado, se han identificado una serie de proteínas que actúan de forma antagónica a los MRFs al unirse a las proteínas E o directamente a los MRFs bloqueando la capacidad de los factores de regulación miogénica para unirse a las cajas E. Muchas de estas proteínas inhibitoras van a formar parte de la misma familia “hélice-bucle-hélice” como Id, Twist, MYOR o Mist- 1 (Berkes and Tapscott, 2005).

A diferencia de otros factores de transcripción involucrados en la miogénesis, los MRFs se expresan específicamente en el músculo esquelético (Brand-Saberi, 2005). La expresión de estos factores de transcripción está estrictamente controlada de forma espacial y temporal donde, generalmente, el primer factor que se expresa es MYF5, seguido de MYOD, MYOG y MRF4 como muestra la Figura 3. Esta secuencia de

expresión depende de cada tipo de músculo y por otro lado no todos los músculos expresan todos los MFRs. La activación de uno de los MFR a menudo provocará la expresión de los otros, lo que probablemente sirva para inactivar otros programas de diferenciación. La excepción es MYF5, que parece actuar en la parte superior de la cascada de expresión miogénica por lo que su activación no depende de la expresión de otros MFRs sino que está controlada por múltiples potenciadores (Mok and Sweetman, 2011).

Se han realizado análisis filogenéticos que sugieren que los cuatro factores de regulación miogénica han evolucionado a partir de un único gen ancestral común. De esta forma, por diferentes eventos de duplicaciones y mutaciones se produjo la divergencia de secuencias que permitió la regulación y el desarrollo de la compleja musculatura de los vertebrados (Singh and Dilworth, 2013). Esto ha permitido que estos factores de transcripción mantengan una cierta redundancia funcional pero que cada uno de ellos haya desarrollado unas funciones específicas en el proceso de la miogénesis (Mok and Sweetman, 2011).

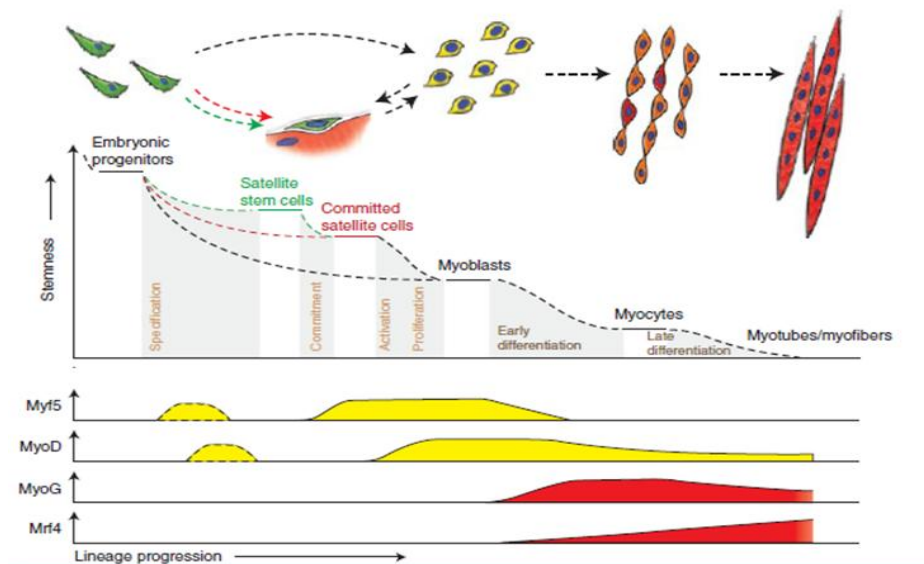


Figura 3. Expresión temporal de los Factores de Regulación Miogénica (Bentzinger *et al.*, 2012).

1.2.3.1.1. MYF5, MYOD y MYOG

MYOD y MYF5 actúan determinando que las MSC diverjan en el linaje miogénico, ya que se ha demostrado que la interrupción de estos dos genes se traduce en una ausencia de mioblastos o miofibras (Berkes and Tapscott, 2005), produciendo así una letalidad postnatal (Singh and Dilworth, 2013). Además en el caso de que se interrumpa la expresión de solo uno de los dos genes se produce un desarrollo muscular normal, por lo que MYOD y MYF5 parecen tener funciones solapadas durante la miogénesis (Berkes and Tapscott, 2005). De esta forma, la ausencia de unos de estos genes se ve compensada aumentando y prolongando la expresión del otro (Bentzinger *et al.*, 2012). Aunque la ausencia de expresión de uno de estos factores de transcripción puede ser suplida por el otro, existen estudios que demuestran que MYF5 y MYOD determinan distintas poblaciones miogénicas en el miotoma, ya que la ausencia de MYF5 produce un retraso en la miogénesis en el miotoma epiaxial mientras que la ausencia de MYOD produjo un retraso en el miotoma hipoaxial (Berkes and Tapscott, 2005).

Cuando existe ausencia de miogenina se desarrolla el tejido muscular de forma normal hasta llegar a la etapa de formación de mioblastos (Singh and Dilworth, 2013). Así se ha determinado que la carencia de miogenina produce trastornos en la diferenciación de los mioblastos y en la formación de la fibra muscular, por lo que su función es actuar como factor de diferenciación en el proceso miogénico (Singh and Dilworth, 2013). La miogenina no tiene funciones redundantes con los genes MYF5 y MYOD, sino que actúa después (Singh and Dilworth, 2013) siendo necesaria para la expresión del fenotipo muscular terminal establecido anteriormente por MYOD y MYF5 (Berkes and Tapscott, 2005).

De esta forma MYF5 y MYOD son considerados factores de determinación del linaje miogénico mientras que MYOG es un factor de diferenciación terminal de las miofibras (Berkes and Tapscott, 2005). Además existe otro factor de transcripción de la miogénesis, MRF4, que puede actuar tanto como factor de determinación como de diferenciación. Por esto, estudios genéticos han establecido que son necesarios al menos

dos MRFs para generar una musculatura funcional durante el desarrollo, uno que determine el linaje muscular y otro que permita la diferenciación terminal (Singh and Dilworth, 2013).

1.3.Relación entre adipogénesis y miogénesis: Células Madre Mesenquimales (MSC)

Las Células Madre Mesenquimales (MSC) son células progenitoras multipotentes, que tienen la capacidad de inducir a la determinación y la diferenciación en adipocitos, miocitos, condrocitos y osteocitos (Tang and Lane, 2012). La diferenciación de las MSC se produce durante el desarrollo embrionario con la expresión del conjunto de genes específicos de cada tipo celular (Olson, 1990). Esta diferenciación de las MSC en células miogénicas, adipogénicas o fibrogénicas está determinada por factores genéticos, la nutrición materna y el estado fisiológico (Du *et al.*, 2013). De esta forma, las células adiposas y las células musculares están relacionadas de manera que se produce una competición o priorización por la diferenciación, lo que va a determinar el número y el tamaño de cada tipo de tejido (Bonnet *et al.*, 2010).

Durante el desarrollo del músculo esquelético, en primer lugar las MSC divergen en células progenitoras miogénicas o fibro-adipogénicas. Después, las células progenitoras miogénicas darán lugar a fibras musculares o a células satélite, mientras que las células progenitoras fibro-adipogénicas desarrollarán la fracción estromovascular del músculo esquelético maduro donde residen los adipocitos, los fibroblastos y las células progenitoras fibro-adipogénicas (Du *et al.*, 2013), como se muestra en la Figura 4.

Uno de los factores de transcripción que regula el balance entre la adipogénesis y la miogénesis es el sistema de señalización Wnt/ β -catenina (Prestwich and MacDougald, 2007) el cual tiene una gran influencia en la determinación del tipo de linaje celular a partir de las MSC (Kléber and Sommer, 2004) ya que suprime la adipogénesis promoviendo la miogénesis. Este sistema actúa bloqueando el Receptor Activado de Proliferación de Peroxisomas (PPAR γ) y las proteínas de unión a

CCAAT/enhancer (C/EBPs), que son factores de transcripción necesarios para la adipogénesis (Jeong *et al.*, 2013).

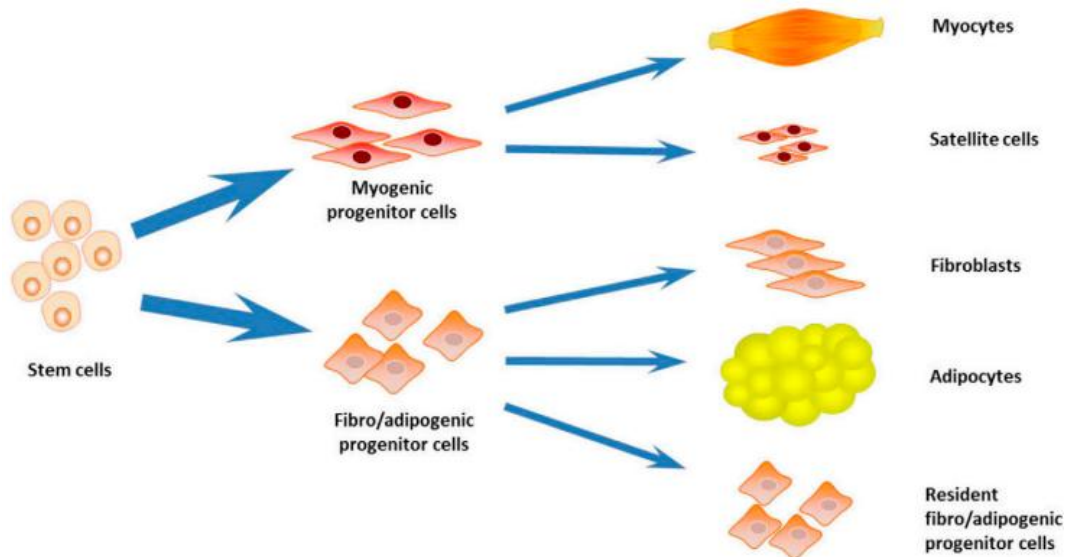


Figura 4. Divergencia de las Células Madre Mesenquimales en el linaje miogénico y fibro-adipogénico durante el desarrollo muscular fetal (Du *et al.*, 2013).

Debido a que los adipocitos intramusculares provienen de las Células Madre Mesenquimales al igual que las células miogénicas, explorar los implicados en la determinación de las MSC en células del linaje miogénico o fibro-adipogénico conducirá a obtener un mayor conocimiento sobre los procesos de determinación celular en orden a identificar estrategias que ayuden a promover una mayor diferenciación del tejido adiposo intramuscular, mejorando con ello la calidad de la carne (Du *et al.*, 2013).

2. OBJETIVOS

Existen evidencias de la posible implicación de los factores de la regulación de la miogénesis en el desarrollo de la grasa intramuscular en vacuno de carne. De esta forma el estudio de los niveles de ARN mensajero podría dar lugar a la identificación de los factores miogénicos implicados en el desarrollo del tejido adiposo intramuscular. Por esto, el objetivo principal de este Trabajo Fin de Máster es la puesta a punto de la metodología utilizando la PCR a tiempo real, para analizar el nivel de expresión génica de los principales factores de la regulación de la miogénesis (MRFs): *myogenic factor-5* (MYF5), *myogenic differentiation* (MYOD) y *myogenin* (MYOG).

Además, un segundo objetivo que se pretende alcanzar es realizar una primera experiencia con objeto de determinar si se observa una expresión diferencial en función del tipo músculo que pueda relacionarse con las características específicas de cada uno. Para ello, mediante PCR a tiempo real se cuantificará el nivel de expresión de estos factores de regulación miogénica en cuatro músculos diferentes (*Longissimus dorsi*, *Semitendinoso*, *Masseter* y *Sternomandibularis*) en terneros de la raza local Pirenaica.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material animal y toma de muestras

Se han utilizado cuatro terneros machos de la raza Pirenaica seleccionados en colaboración con la Asociación de Criadores de Ganado Vacuno Pirenaico de Navarra (ASPINA) teniendo en cuenta que la edad de sacrificio y el peso correspondieran con los parámetros habituales para esta raza. Así, en el momento del sacrificio los terneros tenían aproximadamente 1 año de edad y el peso canal medio fue de 323,3 kg \pm 35,3 kg.

Tras el sacrificio de los terneros, llevado a cabo en el matadero comercial La Protectora siguiendo los métodos estándar (European Parliament and the Council of the European Union, 2010), se tomaron muestras de los siguientes músculos, resaltados en la Figura 5:

- Músculo *Longissimus thoracis* entre las vértebras 5ª y 6ª.
- Músculo *Semitendinosus*.
- Músculo *Masseter*.
- Músculo *Sternomandibularis*.

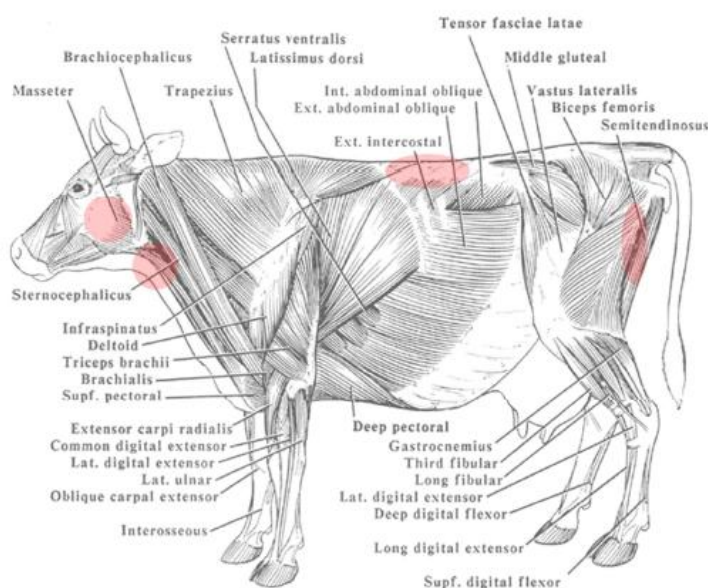


Figura 5. Músculos de los terneros donde aparecen resaltados los que fueron muestreados.

Las muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y posteriormente a -80°C hasta el momento de su utilización.

3.2. Obtención del ARNm

3.2.1. Extracción del ARN del tejido muscular

Para la extracción del ARN total se ha utilizado el kit *RNeasy MinElute Cleanup* (Qiagen). Cuando se trabaja con ARN es necesario ser cuidadoso para evitar las posibles contaminaciones y degradación del ARN utilizando material esterilizado.

Para la preparación del tejido, en primer lugar se corta y desmenuza una pequeña cantidad del tejido muscular y se añade nitrógeno líquido para ayudar a pulverizarla. Se pesan 200 mg de muestra en un tubo eppendorf, rápidamente se añaden 1 ml de TRIZOL Reagent (solución de fenol, isocianato de guanidinio y otros componentes; *Life Technologies*) y se mezcla de tal forma que la muestra se disuelva totalmente. Después se incuba a temperatura ambiente durante 5 minutos y se centrifuga durante 10 minutos a 12.000 g y 4 °C. Se transfiere la fase acuosa a un nuevo tubo, se añaden 200 µl de cloroformo y se agita durante 15 segundos. La mezcla se incuba 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga durante 15 minutos a 12.000 g y 4°C. Después se transfiere la fase acuosa a otro tubo eppendorf y se añade un volumen igual de etanol 70%.

Para la extracción del ARN se pipetea 700 µl de la mezcla del filtrado y etanol a una columna de 2 ml y se centrifuga a 12.000 g durante 15 segundos. Se desecha el líquido conservando la columna y centrifuga el resto de la mezcla en las mismas condiciones. Se pipetea 500 µl de la solución de lavado 1 (*Wash Solution 1*) en la columna y se centrifuga a 12.000 g durante 30 segundos. Se transfiere la columna a un nuevo tubo eppendorf y se pipetea 500 µl de la solución de lavado 2 previamente diluida (*Wash Solution 2 Concentrate*). Se centrifuga a 12.000 g durante 30 segundos y se desecha el filtrado, conservando el eppendorf. Se pipetea 500 µl de la solución de lavado 2 (*Wash Solution 2 Concentrate*) en la columna y se centrifuga a 12.000 g durante 2 minutos. Por último, se transfiere un eppendorf nuevo, se pipetea 50 µl de la

solución de lavado 3 (*Elute*) en la columna y se centrifuga a 12.000 g durante 1 minuto para eluir el ARN.

3.2.2. Cuantificación del ARN

Para medir la concentración y pureza del ARN se utiliza un espectrofotómetro *Thermo Scientific NanoDrop 2000*. Se utiliza 1 μ l de la muestra para medir la concentración del ARN y la absorbancia. La lectura a 260 nm permite calcular la concentración de ácidos nucleicos de la muestra, de forma que una densidad óptica de 1 corresponde aproximadamente con 40 μ g/ml de ARN. La relación de la absorbancia a 260 y 280 nm (DO_{260}/DO_{280}) proporciona una estimación de la pureza del ácido nucleico, donde los valores ideales están entre 1,8 y 2.

3.2.3. Tratamiento con DNasas

Se necesita eliminar el posible ADN que contengan las muestras para que este no interfiera con el ARN. Para esto se utiliza el kit *RQ1 RNase-Free DNase* (Promega) donde la cantidad de ARN necesario de cada muestra para la reacción se calcula usando la concentración obtenida con la cuantificación, de forma que se tratarán 750 ng de ARN.

Para cada reacción se mezclan 8 μ l del extracto de ARN en agua DEPC, 1 μ l de buffer RQ1 Dnasa libre de Rnasas 10x y 1 μ l de la enzima RQ1 Dnasa libre de Rnasas. Las muestras se incuban a 37°C durante 30 minutos, pasado ese tiempo se añade 1 μ l de RQ1 DANase Stop Solution, para cada 10 μ l de reacción, y se incuba a 65°C durante 10 minutos.

3.3. Obtención de cDNA: Reacción de la Transcriptasa inversa

Mediante la retrotranscripción, usando la enzima Transcriptasa inversa, se obtiene ADN complementario de doble cadena a partir del ARN que ha sido extraído y tratado. Para esta reacción, se ha utilizado el kit *PrimeScript RT* (Takara).

Las condiciones de la reacción de retrotranscripción son las siguientes: 2µl de Buffer PrimeScript 5X, 0,5 µl de PrimeScript RT Enzyme Mix, 0,5 µl de Oligo dT Primer (50 µM), 0.5 µl de Random 6 mers (100 µ M) y 6,5 µl de ARN en agua libre de RNasas. La reacción se lleva a cabo en un termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems) donde las muestras se incuban a 37°C durante 15 minutos para que se produzca la retrotranscripción y después se aumenta la temperatura a 85°C durante 5 segundos para inactivar la actividad de la enzima Transcriptasa Reversa.

3.4. Amplificación de los marcadores miogénicos mediante PCR cualitativa

3.4.1. Diseño de los cebadores

El diseño de los cebadores es un parámetro clave para el buen funcionamiento y amplificación de la PCR. Según Chuang *et al.*, (2013) para diseñar los cebadores hay que tener en cuenta diferentes aspectos que pueden afectar a la eficiencia de la reacción como la longitud del cebador, la temperatura de anillamiento o la especificidad.

Para la amplificación de los genes MYOD y MYOG se han seleccionado los cebadores que utilizaron Duarte *et al.*, (2013). En el caso del gen MYF5, al no encontrar bibliografía en la que aparecieran cebadores ya diseñados, se ha utilizado el programa informático Primer3 para diseñar una pareja de cebadores basándonos en la secuencia del gen del GeneBank. Las secuencia cebadores utilizados se ilustran en la Tabla 1.

Número de acceso	Nombre del gen	Secuencia de los cebadores	Tamaño del amplicón (pb)
NM_001040478	Myogenic Differentiation 1 (MYOD)	FW: 5'-TTCCGACGGCATGATGGACTAC-3' RV: 5'-TAAGTGCGGTCGTAGCAGTTCC-3'	72
NM_174116	Myogenic factor 5 (MYF5)	FW: 5'-AGACGCCTGAAGAAGGTCAA-3' RV: 5'-TGCCATCAGAGCAACTTGAG-3'	220
NM_001111325	Myogenin o Myogenic factor 4 (MYOG)	FW: 5'-TACAGACGCCCAATCTGCAC-3' RV: 5'-AGCGACATCCTCCACTGTGATG-3'	67

Tabla 1. Secuencia de los cebadores utilizados para realizar las amplificaciones de los genes MYOD, MYF5 y MYOG, junto con el tamaño del amplicón resultante.

3.4.2. PCR cualitativa

Para comprobar que se realiza una amplificación correcta de los genes con los cebadores que se han seleccionado, se lleva a cabo una PCR cualitativa para cada uno de los genes miogénicos. Además esta reacción de PCR también es necesaria para obtener las bandas que serán utilizadas para la clonación de los diferentes fragmentos.

Para cada amplificación se mezclan 2,5 µl de Tampón 10X, 0,5 µl de dNTPs (10mM), 0,75 µl de Cl₂Mg (50 mM), 0,5 µl de Primer Forward (10 µM), 0,5 µl de Primer Reverse (10 µM), 1,25µl de Taq polimerasa (1u/µl), 18 µl de H₂O DEPC y 1µl de cDNA. La reacción de amplificación se lleva a cabo en un termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems) con un programa que incluye las siguientes condiciones:

- Etapa de desnaturalización inicial del ADN: 5 minutos a 95° C.
- Etapa de 40 ciclos de hibridación de los cebadores y amplificación:
 - o Fase de desnaturalización: 30 segundos a 95° C.
 - o Fase de anillamiento: 30 segundos a 60° C.
 - o Fase de extensión: 30 segundos a 72° C.
- Etapa de extensión: 10 minutos a 72°C.

3.5. Clonación de los productos amplificados

Para comprobar que la amplificación se realiza de forma correcta se prepara un gel de agarosa al 2%, se incluye el producto de la amplificación y se realiza la electroforesis. Con un transiluminador de luz ultravioleta se corta la banda específica del gel de agarosa que pertenece al marcador de interés y se purifica mediante el kit *NucleoSpin Extract II* (Macherey-Nagel).

En primer lugar para degradar el gel se añaden 200 µl de Buffer NT por cada 100 mg de gel y se incuba a 50°C hasta que se disuelva todo el gel. Para que se produzca la unión del ADN se coloca la muestra en un tubo eppendorf con columna, se centrifuga durante 1 minuto a 11000 g y se descarta el eluido. Se añade 600 µl del buffer NT3, se centrifuga durante 1 minuto a 11000 g y se descarta el eluido. Se vuelve

a centrifugar la muestra a 11000 g durante 2 minutos para eliminar todos los restos del buffer NT3. Para la eluir el ADN se pone la columna en un nuevo eppendorf y se añaden 30 µl del buffer de elución NE y se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos. Por último se centrifuga la muestra a 11000 g durante 1 minuto de forma que se obtiene el ADN en un volumen de 30 µl.

Después se realiza la ligación de cada fragmento amplificado con el vector *PGEM-T easy* (Promega) de forma que el fragmento de interés se inserta dentro del plásmido, el cual cuenta con 3015 pares de bases. Para la ligación se mezcla 1 µl del plásmido, 5 µl de 2x Rapid Ligation Buffer, 1 µl de T4 DNA Ligasa (3u/µl) y 3 µl del producto de PCR. La ligación se incuba durante toda la noche, alrededor de 14 horas, a 4°C.

Para la transformación de las bacterias se mezclan 25 µl de las células de *Escherichia coli* electrocompetentes con 4 µl del producto de la ligación. Esta mezcla se introduce en una cubeta y se electropora a 1,25 V, de forma que mediante este pulso eléctrico se altera la carga de las membranas de las bacterias permitiendo que el plásmido se introduzca dentro de ellas. Además también se cuenta con un control negativo para comprobar que no ha habido contaminaciones. El producto de la electroporación se recupera en 500 ml de LB líquido y se mantienen las células electroporadas a 37°C en agitación. Una hora después se siembran en placas con 25 ml de LB que contienen 50 µl de Ampicilina, 250 µl de IPTG y 50 µl de X-GAL y se mantienen en la estufa a 37°C durante 24 horas. Las colonias que han sido transformadas son blancas ya que tienen el gen β-galactosidasa de vector *PGEM-T easy* no funcional por la inserción de un fragmento de DNA dentro del mismo y por lo tanto no son capaces de hidrolizar el X-GAL.

Se seleccionan 4 colonias blancas por cada electroporación y se siembran en un medio de cultivo que contiene 25 ml LB y 50 µl de ampicilina para facilitar que haya elevadas concentraciones de transformantes. Se incuban a 37°C y después de 24 horas se selecciona una colonia aislada y se introduce en un tubo con 5 ml de LB y 5 µl de ampicilina incubándola a 37°C durante toda la noche. Además se realiza una PCR de las

colonias que se han seleccionado para comprobar que lleva el inserto utilizando los cebadores específicos que amplifican cada gen.

Posteriormente se extrae el plásmido de las células electrocompetentes mediante el kit *plasmidPrep Mini Spin* (Illustra) por duplicado. Se vierten 2 ml del cultivo de bacterias en un tubo eppendorf y se centrifuga durante 30 segundos a 16000 g. Se elimina el sobrenadante y se añaden 200 µl de tampón de lisis (tipo 7) resuspendiendo el precipitado. Se añaden 200 µl del tampón de lisis (tipo 8) y 400 µl del tampón de lisis (tipo 9) y se invierte el eppendorf suavemente. Se centrifugan las muestras durante 4 minutos a 16.000 g y se transfiere el sobrenadante a una columna. Se centrifugan durante 30 segundos a 16.000 g, se desecha el eluido y se vuelven a añadir 400 µl del tampón de lisis (tipo 9). Se centrifuga durante 30 segundos a 16.000 g y se elimina el eluido para después añadir 400 µl del Buffer Wash (tipo 1). Se centrifuga durante 1 minuto a 16.000 g y se transfiere la columna a un nuevo eppendorf añadiendo 50 µl del tampón de elución. Se deja reposar 5-10 minutos a temperatura ambiente y por último se centrifuga durante 1 minuto a 16.000 g para obtener el ADN plasmídico purificado.

Para comprobar que el inserto se encuentra dentro del plásmido extraído se realiza una PCR con los cebadores específicos de cada gen o una digestión con la enzima de restricción *Eco RI* (Invitrogen) la cual libera el inserto del plásmido. Para la digestión se mezclan 1 µl de la enzima Eco RI, 2 µl de 10 X H Buffer, 4 µl de ADN y 13 µl de agua destilada. Tras una hora de incubación a 37° C, se añade tampón de carga para detener la reacción enzimática y se visualiza el producto de la digestión por electroforesis en gel de agarosa.

3.6. Curvas estándar y cálculo de las eficiencias de amplificación de los cebadores

La cuantificación de la concentración de moléculas de los productos clonados se realiza utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ moléculas}/\mu\text{l} = [\text{ADN}](\text{ng}/\mu\text{l}) \times 1(\text{g})/10^9 \times 1(\text{mol})/ \text{PM} \times \text{N}^{\circ} \text{ de Avogadro}/1(\text{mol})$$

Donde [ADN] es la concentración obtenida en la cuantificación del producto clonado utilizando un espectrofotómetro; N° de Avogadro es el número de moléculas que hay en un mol, que es 6.023×10^{23} ; y PM es el peso molecular del plásmido más el inserto, que resulta de multiplicar el tamaño del inserto más el plásmido en pares de bases por el peso medio de una base nitrogenada (326,95 g/mol).

Una vez que se conoce la concentración de moléculas para cada marcador, se realizan diluciones seriadas 1:10 en ARN transferente.

Para calcular las curvas estándar de los marcadores miogénicos se lleva a cabo una PCR a tiempo real para la cual se utilizan las diluciones del plásmido purificado, todas por triplicado para minimizar los errores.

La mezcla de reacción para la qPCR consiste en 5 μ l de Sybr Green, 0,2 μ l de Primer Forward, 0,2 μ l de Primer Reverse, 2,6 μ l de agua DEPC y 2 μ l de la dilución del producto clonado. La reacción de PCR a tiempo real se lleva a cabo en un termociclador *CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System* (Biorad). Las condiciones de la reacción de amplificación son las siguientes:

- Etapa de iniciación de 30 segundos a 95°C.
- Etapa de amplificación de 40 ciclos:
 - o 5 segundos a 95° C
 - o 30 segundos a 60° C
- Etapa de disociación:
 - o 10 segundos a 95°C
 - o 5 segundos a 65°C

Finalizada la amplificación se comprueba que las amplificaciones que se han producido son las deseadas mediante el análisis de la curva de disociación. Para realizar las curvas estándar de cada marcador se representa en un gráfico la dilución (en el eje de las X) frente al valor medio de Ct para cada dilución. Si la pendiente de la recta presenta un valor en torno a -3,34 y el índice de determinación, R^2 , se encuentra entre 0,97 y 1, nos estaría indicando que las curvas estándar presentan unas buenas características.

El valor de la pendiente de la curva, s , se utiliza para calcular la eficiencia de amplificación de los cebadores la cual debe ser superior al 90% para que puede ser considerada como aceptable. La eficiencia de amplificación se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\%EFICIENCIA = [(10^{-1/s}) - 1] \times 100$$

3.7. Cuantificación mediante PCR a tiempo real del nivel de expresión de muestras colectivas

Con objeto de realizar un primer análisis para comprobar la metodología puesta a punto que determina el nivel de expresión génica de marcadores miogénicos, se utilizan muestras de cuatro músculos de cuatro terneros de raza Pirenaica. Estos músculos son *Longissimus dorsi*, *Semitendinoso*, *Masseter* y *Sternomandibularis*.

Las condiciones de la reacción de qPCR fueron similares a las descritas para el cálculo de las eficiencias de los cebadores. Se realizan muestras colectivas o *pools* para cada músculo con diluciones 1/5 del cDNA de los cuatro terneros de forma que contamos con 5 muestras colectivas. Para la cuantificación del nivel de expresión de los marcadores miogénicos se utiliza la cuantificación relativa, es decir basándonos en la comparación con el nivel de expresión de genes de referencia. Los genes de referencia seleccionados son β -actina y Top2B ya que cuentan con una expresión estable constatada en las condiciones estudiadas.

3.8. Análisis de los resultados de la expresión de los marcadores miogénicos

La cuantificación del nivel de expresión de los genes MYF5, MYOD y MYOG se realiza utilizando una cuantificación relativa mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, basado en comparar los valores de Ct. El valor de Ct es el número de ciclos donde el producto amplificado se eleva por encima de un umbral determinado, de los genes de estudio con los genes de referencia.

Para ello se calcula en primer lugar la diferencia en el valor de Ct del gen de estudio con los genes de referencia. La amplificación de muestra colectiva para un determinado gen se realiza por triplicado y se utiliza el promedio de los Ct de los triplicados como resultado del gen problema. En el caso de los genes de referencia ocurre lo mismo pero además contamos con dos genes de referencia por lo que se realiza la media geométrica del promedio de los Ct de cada gen de referencia para cada muestra colectiva. Así la diferencia entre los valores de Ct se calcula:

$$\Delta Ct = Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ genes referencia}$$

Con objeto de comparar la expresión de los 4 músculos para cada marcador consideramos uno de los grupos como calibrador. Este grupo se utiliza para comparar la diferencia del Ct entre el gen problema y el gen referencia frente a la diferencia del Ct entre el calibrador y el gen de referencia. En este caso se ha utilizado como grupo calibrador el *pool* del músculo *Masseter*. Con el grupo calibrador se calcular el $\Delta\Delta Ct$:

$$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ calibrador})$$

Por último para determinar el nivel de expresión de los genes problema en los diferentes músculos se calcula:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ calibrador})}$$

Mediante este método se han analizado los niveles de expresión de los genes MYF5, MYOD y MYOG para los cuatro músculos.

Para comparar estadísticamente los valores de la expresión de los genes analizados en los cuatro músculos estudiados los resultados se analizaron con el programa estadístico SPSS 21.0 utilizando el test de ANOVA de un factor, donde el modelo es el siguiente.

$$Y_{ij} = \mu + Li + e_{ij}$$

Donde Y_{ij} son los parámetros medios; μ la media de la población considerada; L_i el efecto del músculo ($i_1= \text{Masseter}$, $i_2= \text{Longissimus dorsi}$, $i_3= \text{Semitendinoso}$, $i_4= \text{Sternomandibularis}$); y e_{ij} es el error residual aleatorio.

Además se realizó un estudio de comparaciones múltiples utilizando el test HSD de Tukey para determinar la existencia de diferencias significativas en la expresión de un determinado gen en los diferentes músculos. El nivel de significación a utilizar es del 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. Puesta a punto de los marcadores miogénicos

4.1.1. Amplificación de los marcadores miogénicos mediante PCR cualitativa y clonación de los productos amplificados

La amplificación de los tres genes por PCR cualitativa y la comprobación de la presencia del inserto en las colonias se realizaron de forma satisfactoria ya que las bandas observadas en los geles de agarosa se corresponden con el tamaño del amplicón de los cebadores que han sido utilizados.

4.1.2. Comprobación del inserto en el plásmido extraído

Para comprobar que el inserto deseado se encuentra en el plásmido extraído se realiza una digestión con la enzima de restricción Eco RI, la cual libera el inserto del plásmido. De esta forma contamos con dos bandas, la específica del inserto y la del plásmido de 3015 pares de bases. En la Figura 6, se incluye como ejemplo el caso del gen MYF5 donde el tamaño del inserto es de 220 pares de bases.

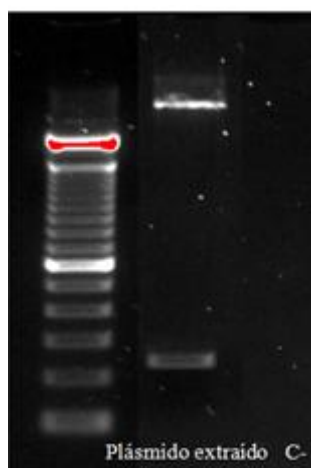


Figura 6. Producto de la digestión de plásmido extraído de MYF5 con la enzima de restricción Eco RI.

4.1.3. Curvas estándar y cálculo de las eficiencias de amplificación de los cebadores

Se cuantifica el producto de clonación para los tres marcadores, calculando a partir de esos datos el número de moléculas presentes en las muestras. Las curvas estándar obtenidas por qPCR utilizando las diferentes diluciones de cada uno de los productos clonados se muestran en la Figura 7.

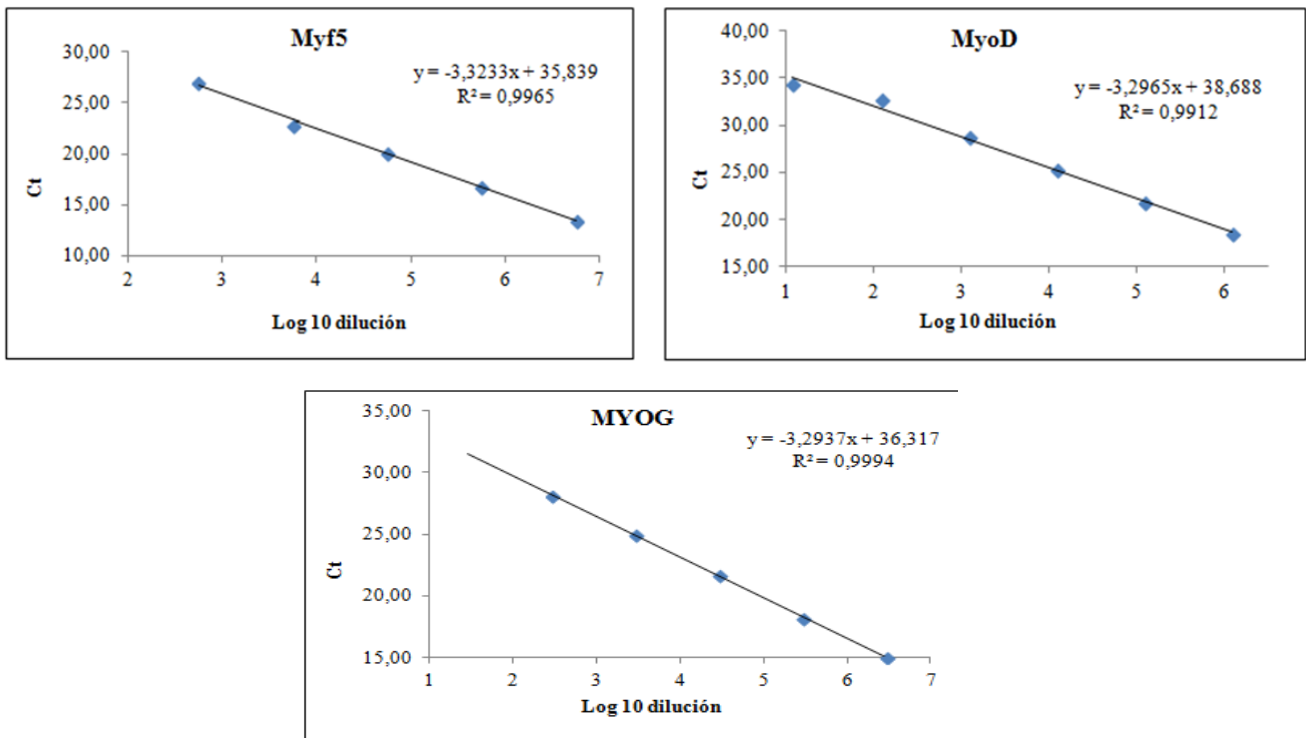


Figura 7. Curvas estándar para los genes MYF5, MYOD y MYOG.

A partir de la pendiente y del coeficiente de determinación, R^2 , de las curvas estándar se calculan las eficiencias de cada pareja de cebadores, las cuales se muestran en la Tabla 2.

Genes	Eficiencia (%)
MYF5	99,94
MYOD	99,05
MYOG	101,55

Tabla 2. Eficiencias de amplificación de los cebadores para cada gen.

4.2. Cuantificación del nivel de expresión de muestras colectivas

Los resultados correspondientes a la expresión del factor de transcripción MYF5 muestran que el tipo de músculo da lugar a un efecto en la expresión de este factor ($p = 0,07$). En la Figura 8 se muestra el nivel de expresión relativa del gen MYF5 en los diferentes músculos. Como se puede ver el nivel de expresión de este gen en el músculo *Masseter* es significativamente menor que en los músculos *Longissimus dorsi* y *Semitendinoso* ($p < 0,05$), mientras que no se observan diferencias significativas con el músculo *Sternomandibularis* ($p < 0,05$).

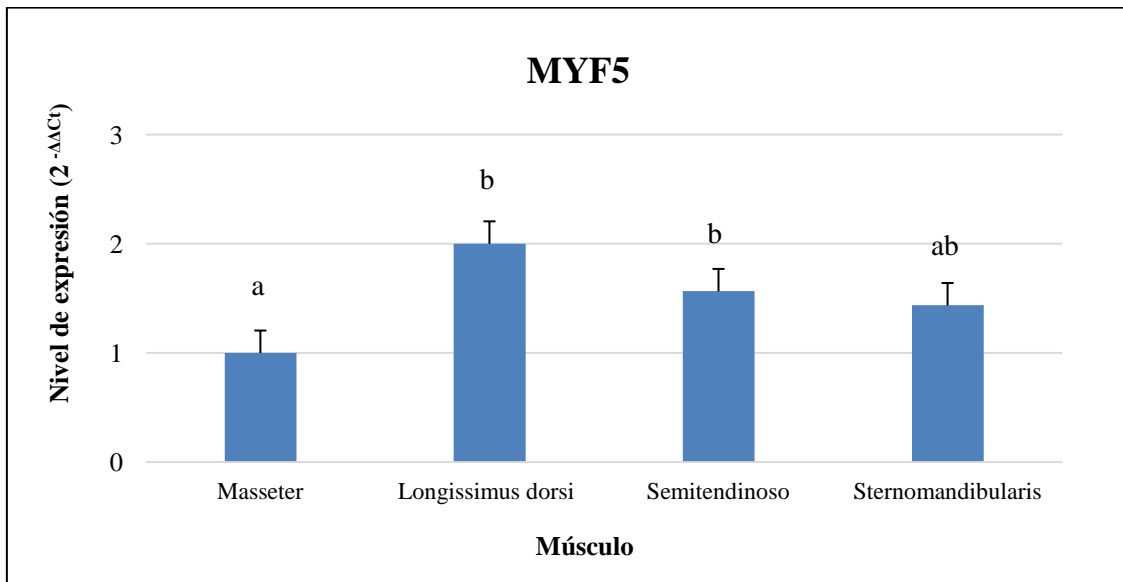


Figura 8. Nivel de expresión del gen MYF5 (media y error estándar) en los músculos *Longissimus dorsi*, *Semitendinoso*, *Masseter* y *Sternomandibularis* mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

En el caso del gen MYOD, también existe un efecto músculo en el nivel de expresión de este gen ($p < 0,01$). Como muestra la Figura 9, el músculo *Masseter* cuenta con el nivel de expresión más bajo existiendo diferencias significativas entre éste y los demás músculos ($p < 0,05$). *Longissimus dorsi* y *Semitendinoso* presentan los niveles más altos de expresión sin existir diferencias significativas entre ambos ($p < 0,05$). El músculo *Sternomandibularis* tiene un nivel de expresión medio difiriendo significativamente de los músculos *Longissimus dorsi* y *Semitendinoso* ($p < 0,05$).

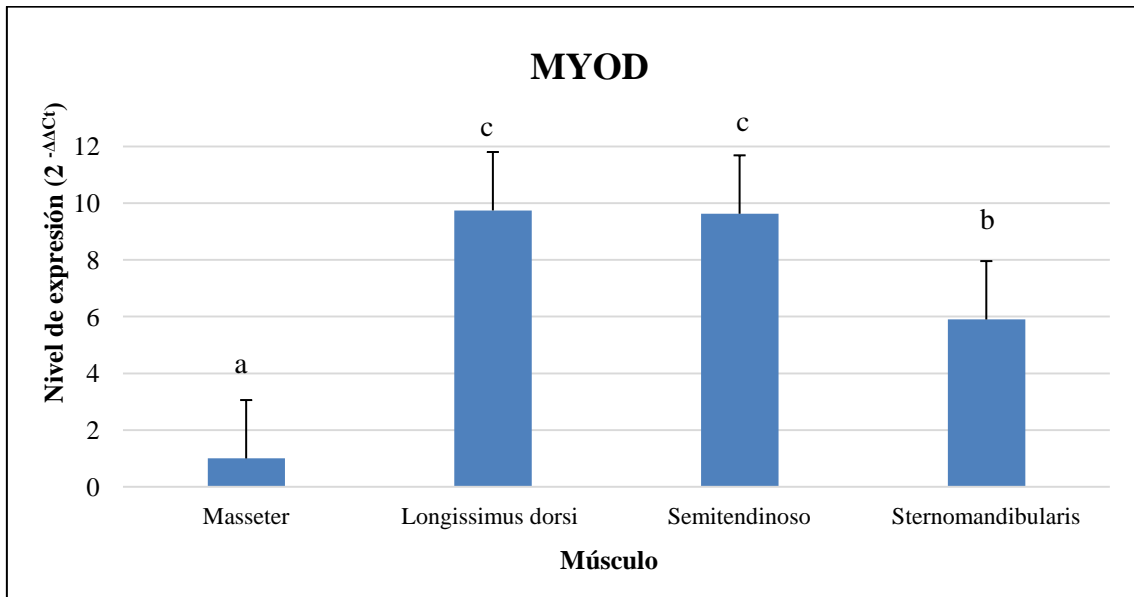


Figura 9. Nivel de expresión del gen MYOD (media y error estándar) en los músculos *Longissimus dorsi*, *Semitendinoso*, *Masseter* y *Sternomandibularis* mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Para el gen MYOG, los resultados muestran que también existe un efecto del músculo en el nivel de expresión de este gen ($p = 0,014$). Como se puede observar en la Figura 10, los niveles de expresión son más homogéneos que en los casos anteriores aunque hay que destacar que se observan diferencias significativas en los niveles de expresión del músculo *Masseter* con los músculos *Longissimus dorsi* y *Semitendinoso* ($p < 0,05$).

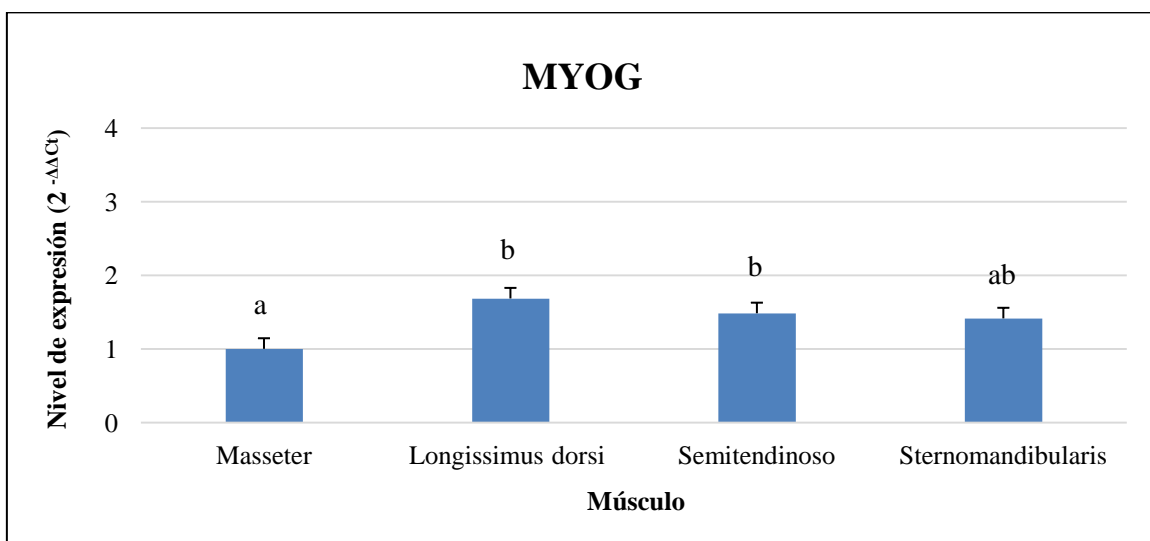


Figura 10. Nivel de expresión del gen MYOG (media y error estándar) en los músculos *Longissimus dorsi*, *Semitendinoso*, *Masseter* y *Sternomandibularis* mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

5. DISCUSIÓN

5.1. Puesta a punto de los marcadores miogénicos

La puesta a punto de la metodología para analizar el nivel de expresión génica de los principales factores de la regulación de la miogénesis (MRFs) se ha realizado de forma satisfactoria. Las eficiencias de amplificación de los marcadores han presentado valores de 99,94%, 99,05% y 101,55% y los índices de determinación (R^2) 0,9965, 0,9912 y 0,994 para MYF5, MYOD y MYOG, respectivamente.

Según Taylor *et al.*, (2010) la eficiencia de amplificación de los cebadores tiene que estar cercana a 100%, entre 90–110% son valores aceptables, y los índices de determinación tienen que ser superiores que 0,98. Teniendo en cuenta estos parámetros las curvas estándar presentan unas buenas características y las eficiencias de amplificación también son adecuadas.

5.2. Nivel de expresión de los marcadores miogénicos en los diferentes músculos

Los resultados obtenidos muestran que la expresión de los factores de regulación miogénica MYOD, MYOG y MYF5 en los músculos *Longissimus dorsi* y *Semitendinosus* son similares en ambos músculos siendo superior al *Masseter*. La expresión de los MRFs es intermedia el en músculo *Sternomandibularis* mientras que el *Masseter* muestra los valores de menor cuantía. Estos resultados indican que aunque se observan diferencias en el nivel de expresión de cada gen en los diferentes músculos, la expresión de estos factores de transcripción sigue un patrón similar en los diferentes músculos estudiados.

El efecto del músculo que existe en el nivel de expresión de estos factores de transcripción podría estar relacionado con las características específicas de estos músculos ya que de forma general los músculos difieren es su composición físico-química (cantidad de grasa y de fibras musculares) y en su actividad metabólica (Ba *et*

al., 2014). Los músculos están formados por una mezcla heterogénea de fibras con características diferentes debido a las propiedades contráctiles y metabólicas (Sudre *et al.*, 2005). El tipo de músculo, además de por otras causas como la selección genética o las condiciones de cría del ganado, influyen en las características de las fibras musculares (Hocquette *et al.*, 2012).

Además, los músculos esqueléticos están compuestos por fibras de tipo rápido o glucolíticas y de tipo lento u oxidativas., las cuales tienen diferentes propiedades fisiológicas (Chikuni *et al.*, 2010). Según Oe *et al.*, (2011) los músculos *Semitendinosus* y *Masseter* son representativos de los tipos musculares rápidos y lentos respectivamente, en función del contenido de fibras musculares de cada tipo. En el presente trabajo estos músculos presentan niveles de expresión de los factores de regulación miogénica muy diferentes que quizás sean debidos a la diferente constitución en el tipo de fibras musculares.

Por otro lado, la tendencia a la deposición de grasa o al desarrollo de adipocitos de cada músculo es otro factor que podría influir en el nivel de expresión de estos factores de transcripción. Hocquette *et al.*, (2003) demostraron, mediante la comparación de diferentes tipos musculares, que la deposición de grasa se produce en mayor medida en los músculos oxidativos que en los músculos glucolíticos. Además observaron que el músculo *Semitendinosus* de diferentes razas de vacuno presenta un contenido de triacilglicerol más de tres veces menor que los músculos *Rectus abdominis* y *Longissimus thoracis*. El triacilglicerol es el componente principal de la grasa y se almacena principalmente dentro de los adipocitos intramusculares. También observaron que los niveles de la proteína A-FABP, la cual tiene expresión específica en los adipocitos, era significativamente menor que en los demás músculos.

Por tanto, el hecho de que los resultados del presente Trabajo Fin de Máster hayan revelado que el músculo *Masseter* haya presentado una menor expresión de los MRFs estaría relacionado con el hecho de que es un músculo con un alto contenido en fibras de tipo oxidativo y un mayor nivel de deposición de grasa en comparación con los restantes músculos analizados. La menor expresión de los factores miogénicos en este

tipo de fibras, podría haber influido en la determinación del linaje celular entre miocitos y adipocitos, provocando una mayor diferenciación de células adiposas en este músculo. El proceso contrario se habría producido en los músculos *Longissimus dorsi* y *Semitendinosus* los cuáles mostraron un mayor nivel de expresión de los MRFs.

Al comparar las diferencias entre músculos en la expresión de los tres MRFs se observa que MYOD presenta una expresión relativa más alta en todos los músculos. Como se ha comentado anteriormente, tanto MYOD como MYF5 actúan en el proceso de determinación de las MSC en el linaje miogénico de forma que tienen funciones redundantes donde la expresión menor de uno de ellos se ve compensada por la sobreexpresión del otro.

Por tanto, las diferencias observadas en los niveles de expresión de los factores de transcripción MYF5, MYOD y MYOG podrían estar relacionadas con las características específicas de cada músculo en relación con el contenido de grasa y de fibras musculares y con la actividad metabólica. Los músculos que cuentan con un menor contenido de grasa, *Longissimus dorsi* y *Semitendinosus*, presentarían un mayor nivel de expresión de los MRFs. Por el contrario el músculo *Masseter* cuenta con niveles de expresión menores de estos factores de transcripción miogénicos ya que al tener un mayor contenido de fibras de tipo oxidativo conduce a una mayor deposición de grasa.

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se han obtenido tras la realización de este trabajo son:

1. En relación con el objetivo principal, se ha puesto a punto de la metodología para analizar el nivel de expresión génica de los principales factores de la regulación de la miogénesis (MRFs): *myogenic factor-5* (MYF5), *myogenic differentiation* (MYOD) y *myogenin* (Myogenin). Las eficiencias de amplificación para los tres marcadores son de 99,94%, 99,05% y 101,55%, siendo los índices de determinación (R^2) de las curvas estándar 0,9965, 0,9912 y 0,994, respectivamente. Estos parámetros son indicativos de la validez del análisis ya que se encuentran dentro de los rangos establecidos.

2. Respecto al objetivo secundario se han cuantificado los niveles de expresión de los marcadores MYF5, MYOD y MYOG en los músculos *Longissimus dorsi*, *Semitendinoso*, *Masseter* y *Sternomandibularis* en terneros de la raza local Pirenaica. Los resultados muestran que existe un efecto músculo ya que se observan diferencias en la expresión de estos factores de transcripción que parecen seguir un patrón similar en los cuatro músculos. Estas diferencias en los niveles de expresión podrían deberse a las características de cada uno en relación con el tipo de fibras musculares, el contenido de grasa, y la actividad metabólica. De esta forma los músculos *Semitendinosus* y *Longissimus dorsi* presentarían un mayor contenido de fibras de tipo glucolítico y menor contenido de grasa que explicaría el mayor nivel de expresión de los MRFs. Por el contrario, el músculo *Masseter* cuenta con una mayor proporción de fibras de tipo oxidativo y presenta una mayor deposición de grasa y muestra menor expresión de estos factores de transcripción. Por último, el músculo *Sternomandibularis* presenta valores de expresión intermedios de estos factores de transcripción.

7. BIBLIOGRAFIA

Ba H.V., Park K., Dashmaa D., and Hwang I. (2014) Effect of muscle type and vacuum chiller ageing period on the chemical compositions, meat quality, sensory attributes and volatile compounds of korean native cattle beef. *Animal Science Journal* **85**: 164-173.

Bentzinger C.F., Wang Y.X., and Rudnicki M.A. (2012) Building muscle: Molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**: 10.1101/cshperspect.a008342.

Berkes C.A., and Tapscott S.J. (2005) MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Seminars in cell & developmental biology* **16**: 585-595.

Bonnet M., Cassar-Malek I., Chilliard Y., and Picard B. (2010) Ontogenesis of muscle and adipose tissues and their interactions in ruminants and other species. *Animal* **4**: 1093-1109.

Buckingham M. (2001) Skeletal muscle formation in vertebrates. *Curr Opin Genet Dev* **11**: 440-448.

Chikuni K., Oe M., Sasaki K., Shibata M., Nakajima I., Ojima K., and Muroya S. (2010) Effects of muscle type on beef taste-traits assessed by an electric sensing system. *Animal Science Journal* **81**: 600-605.

Chuang L., Cheng Y., and Yang C. (2013) Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnol Lett* **35**: 1541-1549.

Du M., Huang Y., Das A.K., Yang Q., Duarte M.S., Dodson M.V., and Zhu M.J. (2013) Meat science and muscle biology symposium: Manipulating mesenchymal progenitor cell differentiation to optimize performance and carcass value of beef cattle. *J Anim Sci* **91**: 1419-1427.

Du M., Tong J., Zhao J., Underwood K.R., Zhu M., Ford S.P., and Nathanielsz P.W. (2010) Fetal programming of skeletal muscle development in ruminant animals. *J Anim Sci* **88**: E51-60.

Duarte M.S., Paulino P.V., Das A.K., Wei S., Serao N.V., Fu X., *et al.* (2013) Enhancement of adipogenesis and fibrogenesis in skeletal muscle of wagyu compared with angus cattle. *J Anim Sci* **91**: 2938-2946.

Esteve Ràfols M. (2014) Tejido adiposo: Heterogeneidad celular y diversidad funcional. *Endocrinología Y Nutrición* **61**: 100-112.

European Parliament and the Council of the European Union. (2010) Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official J Eur Union* **276**.

Hocquette J., Cassar-Malek I., Jurie C., Bauchart D., Picard B., and Renand G. (2012) Relationships between muscle growth potential, intramuscular fat content and different indicators of muscle fibre types in young charolais bulls. *Animal Science Journal* **83**: 750-758.

Hocquette J., Gondret F., Baéza E., Médale F., Jurie C., and Pethick D. (2010) Intramuscular fat content in meat-producing animals: Development, genetic and nutritional control, and identification of putative markers. *Animal* **4**: 303-319.

Hocquette J., Jurie C., Ueda Y., Boulesteix P., Bauchart D., and Pethick D. (2003) The relationship between muscle metabolic pathways and marbling of beef. *Publication-European Association for Animal Production* **109**: 513-516.

Jeong J., Kim J., Nguyen T., Lee H., and Baik M. (2013) Wnt/ β -catenin signaling and adipogenic genes are associated with intramuscular fat content in the Longissimus dorsi muscle of korean cattle. *Anim Genet* **44**: 627-635.

Jurie C., Picard B., Hocquette J., Dransfield E., Micol D., and Listrat A. (2007) Muscle and meat quality characteristics of holstein and salers cull cows. *Meat Sci* **77**: 459-466.

Kléber M., and Sommer L. (2004) Wnt signaling and the regulation of stem cell function. *Curr Opin Cell Biol* **16**: 681-687.

Lee Y., Mottillo E.P., and Granneman J.G. (2014) Adipose tissue plasticity from WAT to BAT and in between. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* **1842**: 358-369.

Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C.A., Krieger M., Scott M.P., *et al.* (2008) Biología celular y molecular. Médica Panamericana.

Megeney L.A., and Rudnicki M.A. (1995) Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. *Biochemistry and Cell Biology* **73**: 723-732.

Mok G.F., and Sweetman D. (2011) Many routes to the same destination: Lessons from skeletal muscle development. *Reproduction* **141**: 301-312.

Moreno-Aliaga M.J., and Martinez J.A. (2002) El tejido adiposo: Órgano de almacenamiento y órgano secretor. .

Oe M., Ohnishi-Kameyama M., Nakajima I., Muroya S., Shibata M., Ojima K., *et al.* (2011) Proteome analysis of whole and water-soluble proteins in masseter and semitendinosus muscles of holstein cows. *Animal Science Journal* **82**: 181-186.

Prestwich T.C., and MacDougald O.A. (2007) Wnt/ β -catenin signaling in adipogenesis and metabolism. *Curr Opin Cell Biol* **19**: 612-617.

Rosen E.D., and MacDougald O.A. (2006) Adipocyte differentiation from the inside out. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**: 885-896.

Sabourin L.A., and Rudnicki M.A. (2000) The molecular regulation of myogenesis. *Clin Genet* **57**: 16-25.

Sanchez-Gurmaches J., and Guertin D.A. (2014) Adipocyte lineages: Tracing back the origins of fat. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* **1842**: 340-351.

Sartorelli V., and Caretti G. (2005) Mechanisms underlying the transcriptional regulation of skeletal myogenesis. *Curr Opin Genet Dev* **15**: 528-535.

Singh K., and Dilworth F.J. (2013) Differential modulation of cell cycle progression distinguishes members of the myogenic regulatory factor family of transcription factors. *FEBS Journal* **280**: 3991-4003.

Sudre K., Cassar-Malek I., Listrat A., Ueda Y., Leroux C., Jurie C., *et al.* (2005) Biochemical and transcriptomic analyses of two bovine skeletal muscles in charolais bulls divergently selected for muscle growth. *Meat Sci* **70**: 267-277.

Tang Q.Q., and Lane M.D. (2012) Adipogenesis: From stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem* **81**: 715-736.

Taylor S., Wakem M., Dijkman G., Alsarraj M., and Nguyen M. (2010) A practical approach to RT-qPCR—publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods* **50**: S1-S5.