



UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO

" Inactivación funcional de miostatina en distintas etapas del desarrollo del Pez Cebra (*Danio rerio*)"

TESIS ENTREGADA A LA UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN BIOCIENCIAS MOLECULARES

Cristina Paola Navarro Valenzuela

Director de tesis: **Dr. Alfredo Iván Molina Sirguiado**

Santiago, Chile

2013

RESUMEN

Los factores de crecimiento (GFs), cuya función es activar la proliferación y diferenciación celular, en coordinación con inhibidores del crecimiento tejido específicos, regulan de forma organizada el crecimiento de los diferentes tejidos de un organismo durante su desarrollo embrionario y toda su vida adulta. En este sentido, en 1997 se descubrió una nueva proteína que regula negativamente el crecimiento muscular, la miostatina (MSTN), también denominada factor de crecimiento y diferenciación 8 (GDF8).

En peces el crecimiento muscular está dado por un incremento en el tamaño (hipertrofia) y en el número de fibras musculares (hiperplasia). Estudios previos en peces demostraron que la inactivación de MSTN es capaz de inducir un adelanto en el desarrollo temprano del animal y un aumento en la masa muscular en peces adultos, asociados a procesos hiperplásicos e hipertróficos.

Considerando que la pérdida de función de la miostatina resulta en un importante incremento en el desarrollo de la masa muscular de los peces, avanzar en el conocimiento básico acerca de la relación entre pérdida de función y fenotipo, aportará al desarrollo de tecnologías para mejorar la producción del cultivo intensivo de peces de importancia comercial. Por esta razón el objetivo de esta tesis ha sido estudiar el efecto de la inactivación de la MSTN en distintos estadios del desarrollo de los peces sobre el fenotipo del tejido muscular y analizar el rol de la expresión diferencial de genes relacionados con miogénesis y crecimiento utilizando como modelo el pez cebra. Consecuentemente, nuestra hipótesis de trabajo postula que *“la pérdida de función de la miostatina durante distintas etapas del desarrollo del pez*

cebra, provoca un efecto fenotípico diferencial en el tejido muscular mediado por alteraciones en la expresión de genes relacionados con miogénesis y crecimiento”.

Para determinar si el crecimiento en la fibra muscular del pez cebra es dependiente del momento en el que se inactiva la función de MSTN, se generó en paralelo dos estrategias de pérdida parcial de la función de esta proteína. En la primera se realizaron pulsos de inactivación parcial de MSTN utilizando el dominante negativo LAPD76A en diferentes estadios de desarrollo (embrionario, larval y juvenil), y en la segunda se reprimió la función de la MSTN en la línea transgénica que expresa el dominante negativo MSTNR265G durante toda la vida del pez. Ambas estrategias generaron un aumento significativo del tamaño y peso de los peces, pero de manera diferencial. Por un lado, mientras la pérdida parcial de la función de MSTN vía la expresión transitoria del dominante negativo LAPD76A en embriones, indujo un aumento del crecimiento por hiperplasia de las fibras musculares, la represión de MSTN con LAPD76A recombinante en estadios post-embriónicos (larvas y juveniles) indujo un aumento del crecimiento por hipertrofia de las fibras musculares. Por otro lado, la línea transgénica MSTNR265G no sólo presentó un crecimiento hipertrófico, si no también una tasa de crecimiento mayor respecto de las otras dos estrategias experimentales. Junto a lo anterior se analizaron los mecanismos involucrados en el aumento de la masa muscular mediante el análisis de la expresión de genes claves para el crecimiento y diferenciación del tejido muscular. Así, la represión transiente de la MSTN favorece los procesos de miogénesis regulados por *myf5*, *myod* y *miogenina*. En cambio, la represión de la MSTN durante todo el desarrollo del pez, junto con favorecer los procesos miogénicos, también potenció las vías endocrinas del sistema

gh/igf1 asociadas al crecimiento.

En conclusión, nuestros resultados indican que MSTN regula el número y tamaño de las fibras musculares del pez cebra, de manera dependiente del estadio de desarrollo, favoreciendo los procesos miogénicos de forma coordinada y mediante una fina regulación en la expresión de los MRFs y factores involucrados en el crecimiento del pez.

ABSTRACT

Growth factors (GFs), whose role is to activate cell proliferation and differentiation, in coordination with specific tissue growth inhibitors regulate the growth of different tissues of an organism during its embryonic development and adulthood. Thus, in 1997, a new protein was discovered that negatively modulates muscle growth, myostatin (MSTN), also known as growth and differentiation factor 8 (GDF8).

Growth in fish is produced by an increase in size (hypertrophy) and number of muscle fibers (hyperplasia). In previous studies using fish as experimental model, it was shown that inactivation of myostatin can induce an enhancement in the early development of the animal and an increase in muscle mass in adult fish associated with hyperplastic and hypertrophic processes.

Whereas the loss of myostatin function may result in a significant increase in muscle mass of fish, gaining basic knowledge about the relationship between loss of function and phenotype, can certainly contribute to the development of new technologies for improved production of intensive commercial cultured fish. Therefore, the aim of this thesis was to study the effect of MSTN inactivation, at different developmental stages of fish, on the phenotype of muscle tissue and to analyze the differential expression of genes related to myogenesis and growth. Consequently our working hypothesis postulates that *"loss of myostatin function during different stages of zebrafish development, results in a differential phenotypic effect in muscle tissue mediated by differences in the expression of genes related to myogenesis and growth"*.

To determine whether the growth in zebrafish muscle fiber is dependent on the moment at which the function of MSTN is inactivated, we designed two parallel strategies where partial loss of function of this protein was evaluated. The first strategy was based on partial inactivation of MSTN using a dominant negative LAPD76A at different stages of the development (embryonic, larval and juvenile). The second strategy assessed the function of MSTN when suppressed in a transgenic line expressing the dominant negative MSTNR265G throughout the life of the fish. Both strategies led to a significantly increased size and weight of fish differently. First, while the partial loss of function of MSTN via transient expression of a dominant negative LAPD76A in embryos, induced an increased growth accompanied with hyperplasia of muscle fibers, MSTN suppression with recombinant LAPD76A in post-embryonic stages (larvae and juveniles) induced increased growth by hypertrophy of muscle fibers. Second, the transgenic line MSTNR265G not only presented a hypertrophic growth, but also showed a higher growth rate compared to the other two experimental strategies. Finally the molecular mechanisms involved in muscular mass growth were analyzed following the expression of key genes for growth and differentiation of muscle tissue. In this regard, transient repression of MSTN favors the process of myogenesis regulated by *myf5*, *myod* and *myogenin*. Instead, the suppression of MSTN throughout development of fish enhances the myogenic processes, also powers the endocrine gh/igf1 system associated to growth.

The conclusion of this thesis is that MSTN regulates the number and size of muscle fibers in the zebrafish, depending on the stage of development, favoring the myogenic processes in a coordinated manner and by fine regulation in the expression

of the MRFs and factors involved in the growth of the fish.