



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA  
SALUD ANIMAL  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
GENÉTICA MOLECULAR

**"CONSTRUCCIÓN DE UNA VACUNA DE ADN CONTRA MIOSTATINA"**  
TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA

VIANEY RAMÍREZ ANDONEY

TUTORES ROGELIO A. ALONSO MORALES FMVZ-UNAM  
ÁLVARO AGUILAR SETIÉN IMSS  
EUGENIO QUIROZ ROTHE FMVZ-UNAM

MÉXICO, D.F., ENERO 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIAS

Para mis padres Carlota, Federico y mi hermano Alejandro por su interminable apoyo, por confiar en mí y apoyar todos mis sueños y metas. Me han enseñado a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi perseverancia, mi empeño, y todo ello con una gran dosis de amor y sin pedir nunca nada a cambio.

Para mis abuelos Roque y María siempre presentes en cada momento y paso de mi vida. Por su sabios consejos, por el amor que le tiene un abuelo a un nieto, por ver en sus rostros que el tiempo pasa y no perdona, y en sus manos lo mucho que trabajaron y se esforzaron para sacar a delante a mis padres y darles un mejor futuro.

A mis amigos, los que han pasado y los que se han quedado; Betty, Laura y León, porque todos ustedes han sido tantas veces parte aguas de mi vida, la han marcado de alguna forma pese a la distancia y me han abierto los ojos al mundo; Amanda, Mario, Pablo, Rodrigo, Luz, Zoalli, Jorge, Toiber, Eduardo, Alex, Mario H., sin ustedes el laboratorio sería aburridísimo!!! Javier, Julio y Yotzan; gracias por enseñarme que la amistad no es limitada, que los amigos pueden encontrarse en todas las etapas de la vida y en todos los lugares posibles "Four for one".

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Genética y Bioestadística en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM. y CONACyT por todo el apoyo brindado para la culminación de esta Tesis.

Me gustaría agradecer sinceramente a mi director y tutor de Tesis, Doctor Rogelio A. Alonso Morales su esfuerzo y dedicación. Sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su persistencia, su paciencia y su motivación han sido fundamentales para mi formación como investigadora. Él ha inculcado en mí un sentido de seriedad, responsabilidad y rigor académico sin los cuales no podría tener una formación completa. A su manera, ha sido capaz de ganarse mi lealtad y admiración, así como sentirme en deuda con él por todo lo recibido durante el periodo de tiempo que ha durado esta Tesis.

A las enseñanzas prácticas de la técnico del Laboratorio de Genética Molecular la Bióloga Amanda Gayosso Vázquez. El ambiente de trabajo creado es simplemente perfecto, y su visión, motivación y optimismo me han ayudado en momentos muy críticos de la Tesis. Su calor humano me enriquece.

Al apoyo de mis amigos y compañeros de trabajo que son las personas que han estado más cerca de mí en estos años apoyándome y regañándome cuando era necesario, y haciéndome pasar momentos inolvidables.

## Contenido

RESUMEN .....	7
ABSTRACT .....	8
LISTA DE CUADROS .....	9
LISTA DE FIGURAS .....	10
ABREVIATURAS Y SIGLAS USADOS .....	11
INTRODUCCIÓN .....	13
REVISIÓN DE LA LITERATURA .....	14
Historia y estado actual de miostatina .....	14
Estructura del gen y de la miostatina .....	15
Mecanismo de acción biológica de miostatina .....	18
Regulación de la miostatina .....	20
Características productivas y reproductivas en la mutación del gen de la miostatina .....	21
Aspectos comparados entre varias especies. ....	21
Estudios de miostatina en bovinos .....	22
Manipulación de miostatina: aplicaciones clínicas .....	23
Historia de la vacunación con ADN. ....	26
Estructura de las vacunas de ADN.....	27
Métodos de inoculación.....	30
Mecanismos de la respuesta inmune por vacunas de ADN .....	31
Ventajas y desventajas de las vacunas de ADN .....	33
Objetivos .....	36
Objetivo General.....	36
Objetivos particulares .....	36

Hipótesis .....	36
Justificación .....	36
METAS.....	37
MATERIAL Y MÉTODOS.....	38
Extracción de ADN .....	38
Cuantificación de ADN genómico .....	38
Amplificación del gen que codifican para miostatina. ....	39
Optimización de las condiciones de PCR.....	39
Purificación de los insertos .....	40
Clonación en pGEM®-T.....	40
Transformación de bacterias competentes.....	40
Selección de clonas recombinantes .....	41
Obtención de ADN a pequeña escala.....	41
Digestión de ADN plasmídico .....	41
Clonación en pCI-neo.....	42
Secuenciación de las clonas obtenidas.....	42
Maxi preparación de ADN de los plásmidos recombinantes.....	43
Esquema de inmunización en ratones.....	44
Evaluación estadística .....	44
RESULTADOS.....	46
Construcción de los plásmidos vacunales .....	46
Extracción y cuantificación de ADN genómico .....	46
Diseño de iniciadores .....	46
Producción de ADN vacunal.....	48

Inmunización con las construcciones vacunales .....	49
Evaluación del efecto de la inmunización.....	50
Ganancia de peso. ....	50
Evaluación de la canal.....	51
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....	54
PERSPECTIVAS .....	57
REFERENCIAS .....	58
ANEXOS .....	68

## RESUMEN

La miostatina es un miembro de la familia de factores de crecimiento transformante- $\beta$ , que actúa como un regulador negativo del crecimiento muscular y se expresa durante el desarrollo embrionario y en la vida postnatal. Mutaciones en el gen de la miostatina provocan hiperplasia e hipertrofia del músculo esquelético, así como una menor acumulación de grasa, estas mutaciones naturales se han seleccionado en algunas razas hipermusculadas de bovinos y ovejas. El presente trabajo tiene como finalidad construir y evaluar diferentes vacunas de DNA contra la miostatina. Se obtuvieron cuatro diferentes construcciones genéticas que incluyen la región bioactiva de miostatina por si sola o fusionada a uno o ambos epítomos de la toxina tetánica (P2 y P30) en la región amino y carboxilo respectivamente. Con cada construcción genética (1. Miostatina, 2. P2 Miostatina, 3. Miostatina P30, 4. P2 Miostatina P30 y un control) se inmunizaron 5 grupos de 6 ratones BALB/c con 100  $\mu$ g de ADN en el día 0, 14, 28, 42 y fueron sacrificados el día 70. Al sacrificio diferentes regiones corporales se pesaron: la canal, región caudal, región craneal, miembros anteriores, miembros posteriores, tríceps, cuádriceps y cabeza. La vacunación de miostatina modificada con epítomos inmunoestimulantes, resultó en el aumento significativo del tejido muscular en la región craneal, caudal, miembros posteriores, tríceps, cuádriceps y cabeza. En general, en comparación al grupo control, con todas las construcciones genéticas se encontró un aumento significativo en los pesos de las diferentes regiones corporales, menos en la construcción con miostatina sin modificar, la cual mostro una reducción. De forma notable, se encontró que la construcción P2-P30 tuvo un mejor efecto. La mejora funcional del músculo por la vacuna de ADN contra miostatina, proporciona así una nueva estrategia para mejorar el rendimiento de la canal.

Palabras clave: Miostatina, Vacuna de ADN, Epítomo inmunoestimulante, Autoinmunidad

## ABSTRACT

Myostatin is a member of the family of transforming growth factors- $\beta$ , which acts as a negative regulator of muscle growth and is expressed during embryonic development and postnatal life. Mutations in the myostatin gene causes hyperplasia and hypertrophy of skeletal muscle and decreased fat accumulation, these natural mutations were selected hipermusculadas some breeds of cattle and sheep. This paper aims to construct and evaluate different DNA vaccines against myostatin. We obtained four different genetic constructs that include the bioactive region of myostatin by itself or fused to one or both epitopes of tetanus toxin (P2 and P30) in the amino and carboxyl groups respectively. Each genetic construct (1. Myostatin, 2. P2 Myostatin, 3. Myostatin P30, 4. P2 and P30 Myostatin a control) were immunized 5 groups of 6 BALB / c mice with 100 ug of DNA on day 0, 14, 28, 42 and were sacrificed on day 70. At slaughter weighed different body regions: the canal, caudal, cranial region, forelimbs, hindlimbs, triceps, quadriceps and head. Vaccination of myostatin modified immunostimulatory epitopes, resulted in the significant increase of muscle tissue in the cranial, caudal, hindlimb, triceps, quadriceps and head. In general, compared to the control group, with all genetic constructs found a significant increase in the weights of the different body regions, less in construction without modifying myostatin, which showed a reduction. Notably, it was found that the P2-P30 construction had a better effect. Functional improvement of muscle by myostatin DNA vaccine, thus provides a new strategy to improve the performance of the channel.

Keywords: Myostatin, DNA vaccine, Epitope immunostimulant, Autoimmunity

## **LISTA DE CUADROS**

Cuadro 1. Características de las vacunas empleadas en la actualidad y su comparación con las vacunas de ADN.

Cuadro 2. Promedio de los pesos y las desviaciones estándar de las diferentes regiones corporales en los grupos de ratones inmunizados.

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Características generales del gen y la proteína de la miostatina bovina.

Figura 2. Estructura de la proteína miostatina.

Figura 3. Secreción, activación y actividad de miostatina.

Figura 4. Mapa del vector pCIneo.

Figura 5. Ubicación de primers para la amplificación de miostatina.

Figura 6. Estructura de las construcciones vacunales de miostatina.

Figura 7. Construcción de los plásmidos vacunales.

Figura 8. Evaluación del rendimiento de la purificación.

Figura 9. Calendario de vacunación contra miostatina en ratones BALB/c.

Figura 10 Ganancia de peso semanal.

Figura 11. Ganancia de peso por regiones.

Figura 12. Evaluación a la canal de los plásmidos vacunales.

## **ABREVIATURAS Y SIGLAS USADOS**

TGFb's. Factores de crecimiento transformantes

PCR. Reacción en cadena polimerasa.

GDF-8. Factor de crecimiento y diferenciación 8.

BMP-6. Proteína ósea morfogénica 6.

GDF-9. Factor de crecimiento y diferenciación 9.

GDF11. Factor de diferenciación de crecimiento 11.

ARN. Ácido ribonucleico.

ACTRII. Receptor de activina II.

Smad 2. Proteína 2 trasductora de señales extracelulares.ligadas al factor de crecimiento transformante  $\beta$ .

Smad 3. Proteína 3 trasductora de señales extracelulares.ligadas al factor de crecimiento transformante  $\beta$ .

Smad 4. Proteína 4 trasductora de señales extracelulares.ligadas al factor de crecimiento transformante  $\beta$ .

MyoD. proteína 1 de diferenciación miogénica.

Cdk. Ciclina

(BMP)/tolloid. receptor de la proteína morfogenética ósea 1

FLRG. proteína de unión a activina.

GASP- 1. factor de crecimiento y diferenciación asociada al suero de proteína-1.

ACVR2B. Receptor de activina tipo 2B.

HDAC. Histona deacetilasa

ARNi. ARN de interferencia.

miRNA. . Micro ARN.

siRNA. ARN de interferencia.

MHC. Complejo mayor de histocompatibilidad.

APC. Células presentadoras de antígenos.

CMV. Citomegalovirus.

BMP-6. Proteína morfogenética ósea 6

## INTRODUCCIÓN

El fenotipo doble musculo es un carácter descrito en algunas razas bovinas que se manifiesta como un incremento de la masa muscular. El origen de este fenotipo se encuentra en mutaciones en el gen de la miostatina, que codifica para una proteína perteneciente a la familia de los TGFb's (Factores de crecimiento transformantes) que actúa como regulador negativo del crecimiento muscular.

Estudios previos concuerdan en que la miostatina regula el número final de fibras en el músculo durante el desarrollo, bloqueando la proliferación y diferenciación de mioblastos; regula el tamaño de la fibra muscular manteniendo las células satélites en un estado pasivo e inhibiendo la síntesis de proteína. De esta forma, es posible que estas moléculas y con las que interactúa pueden ser blancos terapéuticos para incrementar el crecimiento muscular. Así, se ha demostrado que la administración de anticuerpos dirigidos contra la miostatina induce un aumento en las masas musculares.

Investigaciones actuales sugieren que los animales con mayor número de fibras musculares de tamaño moderado, producen una mayor cantidad y calidad de la carne. Durante la miogénesis, el grado de multiplicación de las células musculares determina en gran medida el número de fibras musculares que se forman. Por lo tanto, el número de fibras musculares está determinado principalmente por factores genéticos y ambientales que son capaces de influir en la miogénesis. El crecimiento posnatal del músculo esquelético se determina por el aumento en la longitud y grosor de las fibras musculares, pero no, con algunas excepciones, por los aumentos en número de las fibras musculares. La hiperplasia de las fibras musculares en los mamíferos se completa en gran medida durante la gestación y se fija aproximadamente en el momento del nacimiento, mientras que muchos factores postnatales afectarán el tamaño de las fibras musculares.

## REVISIÓN DE LA LITERATURA

### *Historia y estado actual de miostatina*

En 1997, Mc Pherron *et al.*, identificaron en ratón, mediante PCR degenerativa, un nuevo miembro de la superfamilia de los TGFb's: GDF-8 (Factor de crecimiento y diferenciación 8) denominada así originalmente por su capacidad de producir fenotipos transformantes en ciertos cultivos celulares, y por su papel en la regulación de la proliferación de distintas líneas celulares. Esta proteína comparte varias características en su estructura primaria con otros miembros de los Factores de crecimiento transformantes  $\beta$  (TGF $\beta$ ) por lo que puede suponerse una estructura y un procesamiento semejantes. McPherron *et al.*, (1997) no ubican a esta proteína en ninguna de las subfamilias conocidas y sólo la relacionan con la proteína morfogenética ósea 6 (BMP-6), en cuanto a su mayor homología aminoacídica entre la primera cisteína conservada y el final de la cadena C-terminal (45%); Massagué (1992) la clasifica en un grupo de miembros intermedios en cuanto a la homología de su secuencia activa, junto a GDF-9, sin embargo, estas moléculas carecen de alguna de las 9 cisteínas del patrón característico de la miostatina. Finalmente, el TGFb's más semejante en estructura primaria a la miostatina es el GDF-11 o BMP-11 (Gamer *et al.*, 1999; McPherron *et al.*, 1999; Nakashima *et al.*, 1999), factor descubierto posteriormente a la miostatina y que se expresa en embrión en el tejido nervioso dorsal, en las extremidades y la cola, y en el adulto en la pulpa dental y cerebro. Con este factor existe una identidad aminoacídica en su región C-terminal del 90%.

La secuencia de miostatina tiene todas las características presentes en los miembros de la familia, incluyendo una secuencia N-terminal, un sitio de procesamiento proteolítico, y un dominio C-terminal, que contiene nueve residuos de cisteína (McPherron *et al.*, 1997, Gamer *et al.*, 1999, Nakashima *et al.*, 1999). Durante la embriogénesis, se expresa en las células del miotoma; en etapas posteriores de desarrollo y en los animales adultos, se expresa en diferentes niveles en los músculos esqueléticos de todo el cuerpo, pero a niveles no

detectables en todos los demás tejidos y limita el crecimiento de las fibras musculares (McPherron *et al.*, 1997). El aumento de la masa muscular en ratones knock-out de miostatina se observan desde una edad temprana y continúan siendo mantenidos toda la vida (McPherron y Lee, 2002). Significativamente, los ratones heterocigotos también se ven afectados, aunque en menor medida, los músculos de los ratones heterocigotos pesan aproximadamente un 25% más que los de los ratones de tipo salvaje, lo que sugiere que el efecto de la miostatina es dosis dependiente.

Análisis de los músculos de ratones mutantes homocigotos mostraron que este aumento de la masa muscular resulta de una combinación de hiperplasia (aumento del número de fibras musculares) y hipertrofia (aumento de tamaño de la fibra). Existen evidencias de que miostatina es específica de un tipo de fibras (Carlson *et al.*, 1999). Así pues, la miostatina podría modular la expresión del gen que controla el tipo de fibra muscular.

### **Estructura del gen y de la miostatina**

La secuencia codificante de la miostatina está constituida por tres exones interrumpidos por dos intrones (Grobet *et al.*, 1997).

Intrón 1. El intrón 1 se localiza entre las bases 5460 y 7285. Se puede decir que el intrón 1 es un intrón de fase 1, ya que interrumpe un codon serina entre la base uno y dos. En la región en 3' del intrón se encuentra una zona rica en pirimidinas y a 67 pb. del exón 2. En ella hay una adenina situada en un consenso apropiado (UUGAU) para constituir el punto de formación del lazo, en el proceso de corte y empalme de los intrones (Keller y Noon, 1984).

Intrón 2. Los límites identificados siguen la regla GT-AG. Este intrón es de fase 0, ya que interrumpe la secuencia codificante entre dos codones adyacentes. La zona inmediatamente anterior al extremo 3' del intrón se caracteriza por una secuencia rica en pirimidinas. Existe una adenina en un contexto apropiado (UUAAC) situada a -23 pb. del límite 3' del exón, constituyendo el posible lugar de

formación del lazo para la maduración del ARN mensajero por corte y empalme (Keller y Noon, 1984).

Se han identificado dos posibles lugares de inicio de la transcripción, situados aproximadamente 110 pb. (Inicio1) y 137 pb. (Inicio2) delante del codón de iniciación.

El sitio Inicio1 corresponde aproximadamente al lugar de iniciación identificado en ratón por McPherron *et al.*, 1997. Royo 2003, identificó 4 posibles lugares de poliadenilación situados a 612 pb., 959 pb., 1.438 pb. y 1.509 pb. a partir del codón stop (Figura 1).

### Características generales del gen y la proteína de la miostatina bovina

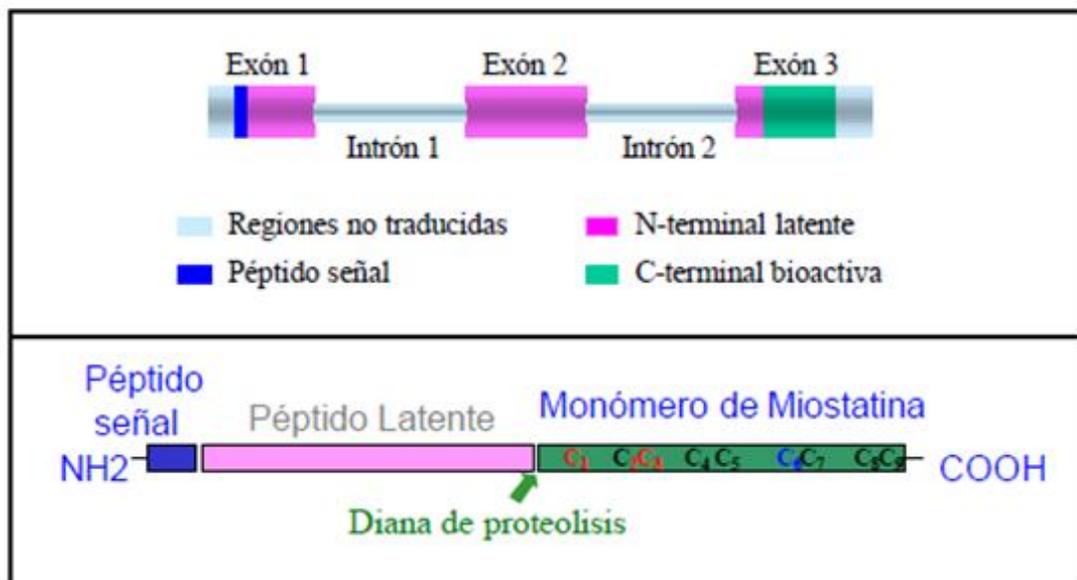


Figura 1. Esquema de la estructura del gen de miostatina bovina y regiones codificantes para la proteína.

El promotor de la miostatina es un promotor dirigido por una TATA-box, situada a 21 pb del punto de inicio2 de la transcripción. Además contiene una CAAT-box a -65 pb. del punto de inicio2, situadas en una región con una alta homología de secuencias (Royo, 2003).

La proteína miostatina está formada por un péptido señal, un péptido latente, y un dominio carboxilo-terminal caracterizado por la existencia de nueve residuos cisteína, teóricamente involucrados en la formación de puentes disulfuro intra- e intercatenarios. Se sintetiza como una preproteína, que se procesa proteolíticamente, para dejar libres las moléculas bioactivas, que formarán dímeros del dominio carboxilo-terminal, unidos por puentes disulfuro (Massague, 1992; McPherron y Lee, 1996).

Su estructura típica (McPherron y Lee, 1996) se caracteriza por:

Un grupo de aminoácidos hidrofóbicos cerca del extremo N-terminal que funciona como señal para la secreción.

Una forma precursora que es proteolíticamente procesada, liberando un fragmento carboxiterminal bioactivo y otro aminoterminal. Al fragmento aminoterminal se le denomina péptido asociado latente, y mientras permanece unido, de forma no covalente, mantiene al TGF- $\beta$  en un estado latente.

Una región carboxiterminal muy conservada entre los miembros de la familia, que contiene 9 residuos de cisteína localizados en lugares característicos.

La molécula bioactiva está formada por un dímero de fragmentos carboxiterminales unidos por puentes disulfuro. En la mayoría de los casos esta forma activa está formada por homodímeros de la zona C-terminal, aunque existen casos de heterodímeros entre diferentes miembros de la familia, que presentan actividades biológicas distintas a aquellas de sus homodímeros correspondientes (Figura 2).

## Estructura de la proteína miostatina

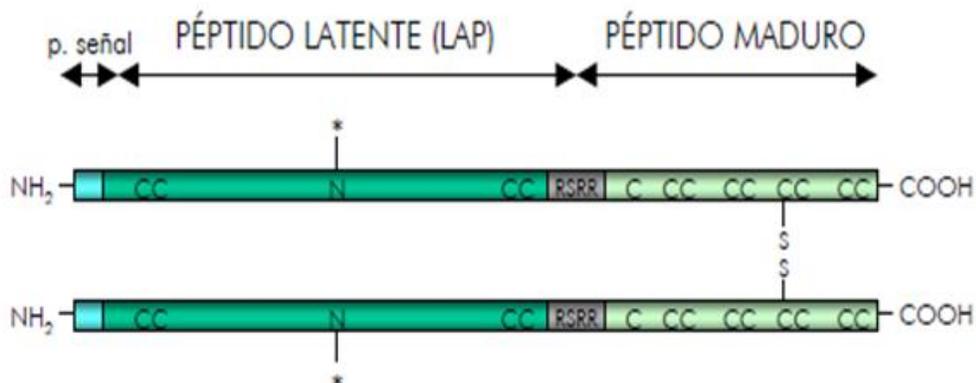


Figura 2. Miostatina está formada por un péptido señal, un péptido latente, y un dominio carboxi-terminal y un sitio de proteólisis (RSS). La molécula bioactiva está formada por un dímero de fragmentos carboxilales unidos por puentes disulfuro (S) y nueve residuos de cisteína (C).

### Mecanismo de acción biológica de miostatina

La miostatina se expresa fundamentalmente en músculo esquelético y se secreta en plasma (Gonzalez-Cadavid *et al.*, 1998). Probablemente actúa como una señal secretada por la célula muscular esquelética que provoca un *feed-back* negativo, directo (señal paracrina) o indirecto en las células precursoras musculares, ejerciendo una regulación de la masa muscular.

Durante el procesamiento, el propéptido se escinde de la región madura y se forma un complejo con dos péptidos maduros conectados por enlaces disulfuro y unidos covalentemente a dos propéptidos. Cuando el complejo está unido, las proteínas maduras permanecen inactivas. Las modificaciones de los propéptidos causan la liberación de un dímero de la proteína madura capaz de unirse a los receptores de activina (principalmente ACTRII) en la superficie de las células diana. La unión de la miostatina a los receptores inicia una vía de señalización que implica la fosforilación de las moléculas de señalización Smad 2 y Smad 3. Estos a su vez se combinan con Smad 4, para formar un factor de transcripción

competente, capaz de entrar en el núcleo y la inducción de la expresión de cualquier gen flanqueado por la secuencia de reconocimiento normativo adecuado. Dentro de la célula, miostatina inhibe la expresión de factores de regulación miogénica, como MyoD y estimulantes de la quinasa dependiente de ciclina (Cdk), tales como p21 (Figura 3).

### Secreción, activación y actividad de miostatina

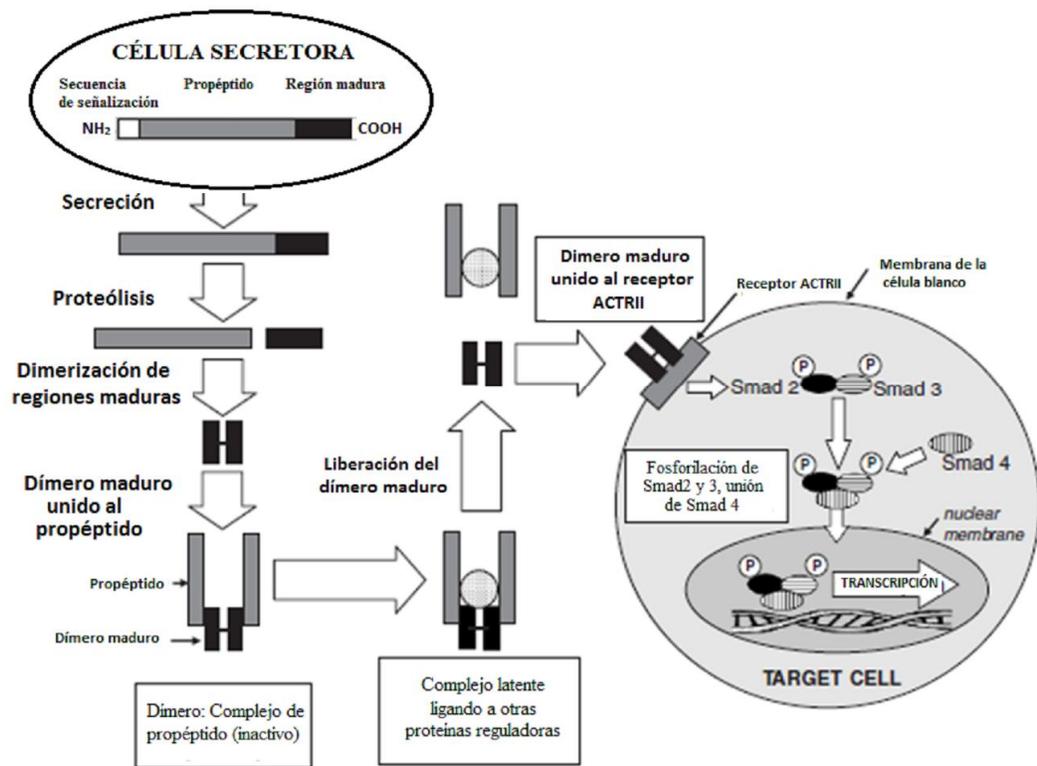


Fig. 3. Adaptado de McNally (2004), Lee y McPherron (2001) y Joulia-Ekaza y Cabello (2006). El propéptido puede inhibir la señalización de miostatina uniéndose a él directamente. El dímero activo de miostatina (miostatina madura se une se al receptor ACTRIIB el cual recluye y activa por transfosforilación al receptor ACTRII/TβRI. Smad2 y Smad3 son subsecuentemente activados y forman un complejo con Smad4 después son traslocados al núcleo activando el gen blanco de expresión.

## Regulación de la miostatina

La existencia de múltiples proteínas capaces de vincularse a miostatina e inhibir su actividad plantea muchas preguntas sobre el papel específico que juega cada proteína en la regulación de la actividad de la miostatina.

Uno de los mecanismos de activación de miostatina es la escisión proteolítica del propéptido. Miembros de las metaloproteinasas (BMP)-/tolloid son capaces de escindir el propéptido N-terminal de inmediato a aspartato 76, la importancia de estas proteasas radica en la regulación de miostatina *in vivo*. Esto explica que las mutaciones del propéptido de miostatina lo hacen resistente a la proteólisis provocando un aumento en el crecimiento muscular de aproximadamente un 25%. La interpretación más simple de esto es que el propéptido mutante es capaz de formar complejos latentes con miostatina que son resistentes a la activación de las proteasas. Este grupo de proteasas se ha demostrado previamente que desempeña un papel análogo en la regulación de las actividades de algunos miembros de la familia TGF- $\beta$  (Blader *et al.*, 1997, Piccolo *et al.*, 1997, Marques *et al.*, 1997, Scott *et al.*, 1999, Pappano *et al.*, 2003)

Además de las metaloproteasas, se ha demostrado que otras proteínas son capaces de unirse e inhibir la actividad del dímero C-terminal de miostatina. Uno de ellos es folistatina, que se puede unir a una serie de miembros de la familia TGF $\beta$ 's (Nakamura *et al.*, 1990, Yamashita *et al.*, 1995, Fainsod *et al.*, 1997). Estudios previos sugieren que folistatina funciona como un potente antagonista de la miostatina y se expresa en las células del miotoma (Amthor *et al.*, 1996, 2002), la sobreexpresión de folistatina en los músculos puede causar un aumento dramático en el crecimiento muscular (Lee y McPherron 2001) y, por el contrario, la pérdida de folistatina disminuye la masa muscular (Matzuk *et al.*, 1995).

Otras dos proteínas, FLRG y GASP-1, también parecen estar implicadas en la regulación de la actividad de miostatina (Hill *et al.*, 2002, 2003), ambos FLRG y

GASP-1 se ha demostrado que pueden unirse con alta afinidad a la miostatina e inhibir su actividad. Curiosamente, GASP-1 también puede unirse directamente al propéptido en ausencia del dímero C-terminal y FLRG ha demostrado ser capaz de bloquear la actividad de la familia TGF- $\beta$  (Hayette *et al.*, 1998, Tsuchida *et al.*, 2000).

### **Características productivas y reproductivas en la mutación del gen de la miostatina**

Los animales hipermusculados poseen al nacimiento casi el doble de fibras musculares que los animales normales (Gerrard *et al.*, 1991). También se ha encontrado que tienen un contenido menor en tejido conectivo (Uytterhaegen *et al.*, 1994).

Las canales de los animales hipermusculados, presentan menos grasa intramuscular y un color más pálido. Boyajeau *et al.*, (1971) al revisar las características de las canales de animales que presentan hipertrofia muscular hereditaria, observaron un mayor porcentaje de rendimiento a la canal (+8% en valor relativo), una amplia reducción del hígado, corazón y pulmón (hasta un -12%), de la piel y el aparato digestivo (-13%), y una mayor proporción de músculo en la canal (+17% en valor relativo), especialmente si se compara con las reducciones en hueso y grasa de la canal (-14 % y -44 % en valor relativo respectivamente).

La característica más negativa es su influencia sobre los caracteres reproductivos y maternales de las vacas de cría ya que presentan mayor dificultad al parto, descenso de la producción de leche y menor precocidad sexual (Ménissier, 1982).

### **Aspectos comparados entre varias especies.**

El gen de la miostatina se ha analizado en un gran número de especies diferentes, las secuencias de miostatina muestran que en el dominio C-terminal es

idéntico entre los seres humanos, ratones, ratas, cerdos, pollos, pavos, conejos, cerdos y bovinos. La conservación de la secuencia de miostatina en todas estas especies sugiere la conservación de la función (Grobet *et al.*, 1997; Kambadur *et al.*, 1997; McPherron y Lee, 1997).

Miostatina también se han identificado en un número de diferentes especies de peces (McPherron y Lee 1997, Maccatrozzo *et al.*, 2001, Ostbye *et al.*, 2001, Roberts y Goetz 2001, Rodgers y Weber 2001, Rodgers *et al.*, 2001, Kocabas *et al.*, 2002). Sin embargo, las secuencias de la proteína predicha en los peces son bastante divergentes de los de otros vertebrados. Estas comparaciones de secuencias, junto con la observación de que estos genes se expresan en una gama mucho más amplia de los tejidos en los peces, han llevado a la sugerencia de que la divergencia de la miostatina y GDF-11 se produjo después de que el origen del pescado y que las funciones de la miostatina y GDF-11 en los peces se llevan a cabo por los genes que representan el precursor ancestral original (Ostbye *et al.*, 2001).

### **Estudios de miostatina en bovinos**

El estudio de miostatina está ampliamente enfocado al ganado bovino los bovinos con mutaciones en miostatina denominados “doble musculatura” se caracterizan por la hipertrofia de los músculos en las regiones de la zona proximal anteriores y cuartos traseros, y protrusión muscular con límites intermuscular y surcos bien visibles bajo la piel (Menissier, 1982). El análisis genético de la raza Belgian Blue llamados "dobles músculos", reveló que este rasgo es de herencia semidominante en la especie bovina (Hanset y Michaux, 1985, Charlier *et al.*, 1995), al analizarlo en un gran número de animales se han identificado al menos siete mutaciones diferentes, incluyendo codones de paro, mutaciones de bases, y mutaciones puntuales en residuos altamente conservados de aminoácidos en el cromosoma 2 (Grobet *et al.*, 1997; Kambadur *et al.*, 1997; McPherron y Lee 1997; Cappucio *et al.*, 1998; Marchitelli *et al.*, 2003).

## **Manipulación de miostatina: aplicaciones clínicas**

Existen enormes incentivos humanitarios y comerciales para desarrollar medicamentos basados en miostatina para el tratamiento de enfermedades musculares como la distrofia muscular, miopatías inflamatorias, caquexia (atrofia muscular asociada con enfermedades crónicas como el SIDA), y la sarcopenia (relacionada con la edad la pérdida de músculo) (González- Cadavid *et al.*, 1998). Tratamientos que estimulan el crecimiento muscular sin ejercicio serían especialmente útiles para personas con movilidad reducida o confinados a la cama por períodos prolongados (Zachwieja *et al.*, 1999). Existen una serie de estrategias para la inhibición de la miostatina en la actualidad bajo investigación clínica o preclínica. Que van desde la supresión de la actividad de la miostatina a la inhibición de la producción de miostatina.

Anticuerpos anti-miostatina. La inyección de anticuerpos anti-miostatina en ratones adultos jóvenes provocó la hipertrofia muscular (Bogdanovich *et al.*, 2002). En los ratones adultos normales, las inyecciones semanales de un anticuerpo monoclonal anti-miostatina indujo un aumento hipertrófico del 13-30% de la masa de músculos y un 10% de aumento en la fuerza (Whittemore *et al.*, 2003). En 2005, Wyeth Pharmaceuticals comenzó la Fase I / II de ensayos clínicos para investigar el uso de un anticuerpo (MYO-029) que se une e inhibe miostatina para el tratamiento de las distrofias musculares (Sunada, 2006).

Competencia por los receptores. Otro enfoque terapéutico es la introducción de una versión soluble del receptor de activina tipo IIB (ACVR2B) que compite con el receptor natural por la miostatina circulante lo que reduce su actividad. Este tipo de inhibición causa un drástico aumento de la masa muscular (hasta un 60% en 2 semanas) cuando se inyectan en ratones de tipo salvaje (Lee *et al.*, 2005). Se especula que ACVR2B puede ser eficaz en el tratamiento de la distrofia muscular (Hooper, 2005).

El propéptido miostatina. La miostatina circulante se activa cuando el propéptido se escinde por la proteasa BMP-1/tolloid (Wolfman *et al.*, 2003), por lo tanto la inhibición de estas enzimas proteolíticas podrían bloquear la actividad de miostatina. Sin embargo esta estrategia sería muy arriesgada ya que las proteasas BMP-1/TLD están involucrados en una variedad de sistemas de desarrollo (Ge y Greenspan, 2006). Una estrategia alternativa, que implique un propéptido sintético modificado para ser resistente a la ruptura es una estrategia más probable. Los ratones inyectados con una proteína modificada tuvieron un incremento del 27% de la masa muscular en un mes (Wolfman *et al.*, 2003), sin efectos negativos reportados. La sobre-expresión del propéptido de miostatina en ratones transgénicos suprimió la acumulación de grasa y estimulo el crecimiento muscular (45 a 115%, dependiendo del músculo) (Zhao *et al.*, 2005).

Miostatina trunca. El tratamiento con anti-miostatina ha demostrado mejorar efectivamente la regeneración muscular en ratones viejos después de la lesión y el desgaste muscular relacionado con la edad (Siriatt *et al.*, 2007). Inyecciones subcutáneas de anti-miostatina, aumentan la miogénesis. Si resultados similares se pueden lograr en los seres humanos, este tratamiento podría aumentar la masa muscular y velocidad de reparación.

Folistatina y histona deacetilasa (HDAC). Folistatina juega un papel fundamental en el crecimiento y la regeneración de las células adultas del músculo esquelético. Varios estudios han demostrado claramente la función de folistatina como un potente antagonista en la vía de señalización de miostatina (Matzuk *et al.*, 1995;. Lee y McPherron, 2001;. Zimmers *et al.*, 2002) y la variación genética en el gen de folistatina contribuyen a la variación de la masa y fuerza muscular en humanos. Aunque todavía no hay en ensayos clínicos en humanos, la sobre-expresión de folistatina resulta en un aumento significativos en la masa muscular de ratones transgénicos (Lee y McPherron, 2001). Un método alternativo para bloquear la miostatina puede ser a través de la inducción de folistatina mediante la administración de la HDAC. Los inhibidores de HDAC, impiden que las histonas se

unan al ADN y por lo tanto permiten que se produzca la transcripción de folistatina. Recientemente, se ha demostrado que los inhibidores de HDAC, activan la expresión de folistatina en las células del músculo esquelético y en los músculos lesionados (Lezzi *et al.*, 2004).

Inhibición del RNA de miostatina (siRNA). Un proceso natural, selectivo y específico para desactivar genes es el RNA de interferencia (ARNi). Son pequeños fragmentos de RNA que se unen fragmentos más grandes que codifican para proteínas, haciendo que estos sean objeto de destrucción. El RNA de interferencia (siRNA), son los equivalentes sintéticos de miRNA y son ampliamente utilizados como herramientas de investigación para estudiar la función génica. La ubicuidad y la especificidad de la maquinaria de RNAi sugiere que la regulación terapéutica de los genes basada en siRNA podría ser desarrollada por cualquier gen en cualquier tejido. En mamíferos, los experimentos in vivo en ratas mostrarán una disminución significativa en el ARNm de miostatina y de la expresión de la proteína, así como un aumento en el peso muscular y el tamaño de la fibra (Acosta *et al.*, 2005).

Suplementos herbarios "anti-miostatina. Aunque lejos de la sofisticación de los métodos descritos anteriormente, los suplementos de hierbas que se dice "inhiben" la miostatina y aumentan la masa muscular se comercializan actualmente. Mientras que los sitios web comerciales, Wikipedia y blogs suelen ser transitorios, parciales y poco fiables por los rigurosos estándares de la investigación científica, son una fuente principal de información para muchos atletas y deben ser controlados en la búsqueda de evidencia de las tendencias de desarrollo en el dopaje. Usando el motor de búsqueda de Google, uno de los éxitos más comunes al buscar la miostatina" son los anuncios de un producto como Myo-blast/CSP3 (un "hiper-avanzada fórmula mejora muscular"), que supuestamente neutraliza la miostatina. El ingrediente activo de estas es el alga *Cystoseira canariensis*, que contiene polisacáridos sulfatados que se han demostrado que se une a la miostatina (Ramazanov *et al.*, 2003) sin embargo; al

evaluar la acción de *Cystoseira canariensis* en el crecimiento muscular no reportaron ni un efecto inhibitorio sobre miostatina en suero, ni ningún efecto sobre la fuerza muscular o la masa en personas no entrenadas.

Vacuna de DNA contra miostatina. El desarrollo de una vacuna de ADN específica contra miostatina mostro una mejoría funcional en el crecimiento muscular en los ratones inmunizados (Tang *et al.*, 2007). La masa muscular de los ratones inmunizados con la vacuna de ADN se encontró un aumento significativo en relación con el grupo control, y lo más importante una mejora funcional de la resistencia muscular incrementando la masa muscular. Se encontró hipertrofia de las fibras musculares, pero no hiperplasia, en contraste con los controles negativos. Estudios adicionales que incluyan evaluar la fuerza muscular, así como investigar los efectos a largo plazo de la autoinmunidad inducida, son necesarios para confirmar que la mejora funcional de los músculos de la vacuna contra la miostatina ADN es una estrategia farmacológica válida y segura.

### ***Historia de la vacunación con ADN.***

La vacunación mediante el empleo de ADN plasmídico tuvo sus inicios en las observaciones de Jon A. Wolff, quien inicialmente intentó utilizar ADN plasmídico como control negativo en experimentos de transferencia genética en ratones. El resultado, sin embargo, fue la demostración de que las células musculares son capaces de expresar genes como consecuencia de la inyección de ADN plasmídico “desnudo”, sin la necesidad de utilizar vectores virales o ADN encapsulado en liposomas. Sus resultados lo llevaron a plantear la posibilidad de que la transferencia genética mediante ADN plasmídico podría ser utilizada para el desarrollo de vacunas (Wolff *et al.*, 1990).

Posteriormente, se reportó la generación de anticuerpos contra dos proteínas, la hormona de crecimiento humano (hGH) y la  $\alpha$  1-antitripsina (hAAT) mediante la inoculación de ADN codificante para ambas, demostrando la

posibilidad de realizar una inmunización genética mediante bombardeo de partículas de oro cubiertas con ADN (Tang *et al.*, 1992). Más adelante, el campo de la vacunación con ADN quedó firmemente establecido tras la demostración de que la inyección de vectores codificantes para proteínas del virus de la influenza protegían a animales ante un reto mortal con el virus (Ulmer *et al.*, 1993). A partir de estos primeros experimentos se inició un tremendo ímpetu en la investigación tanto en sectores académicos como a nivel privado para el desarrollo de vacunas basadas en ADN, lo cual ha llevado al desarrollo de vacunas hacia una gran cantidad de enfermedades de origen viral, bacterianas y parasitarias; así como dirigidas al tratamiento de otras patologías como cáncer, enfermedades autoinmunes y alérgicas (Reyes-Sandoval y Ertl, 2001).

### **Estructura de las vacunas de ADN**

Las vacunas de ADN están compuestas por un plásmido bacteriano o vector en el cual se ha insertado una secuencia de ADN que codifica el antígeno de interés o proteína transgénica. Los plásmidos bacterianos son básicamente los mismos que se utilizan en experimentos que involucran la expresión de proteínas en cultivos celulares.

De manera funcional, el vector plasmídico empleado para vacunas de ADN está compuesto por una unidad transcripcional y el esqueleto plasmídico; el vector comúnmente empleado como vacuna para mamíferos es pCI-neo (Figura 4).

## Mapa del vector pCI-neo

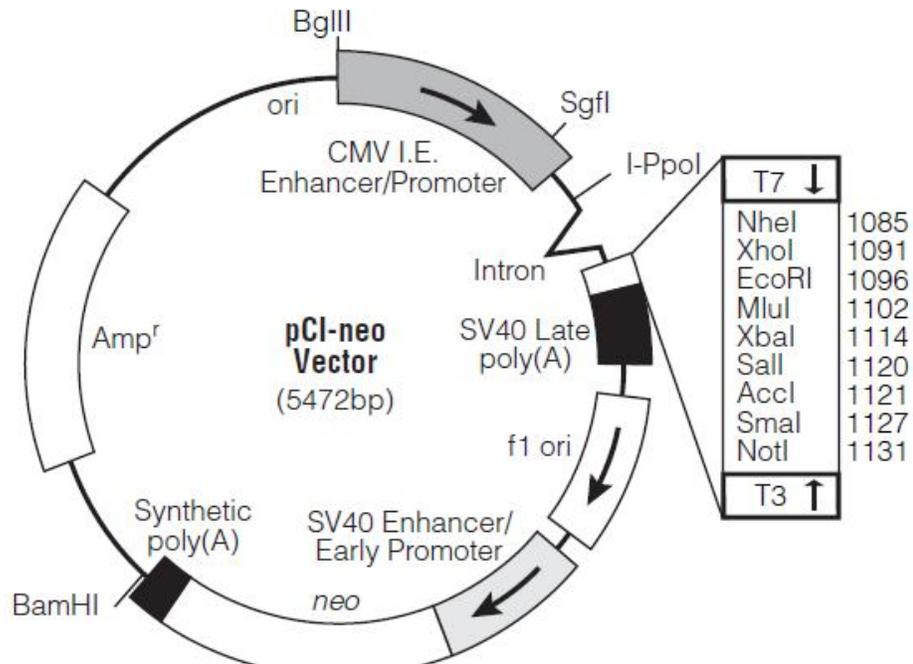


Fig. 4. El vector de expresión pCI-neo contiene el promotor temprano de citomegalovirus (CMV) que promueve la expresión constitutiva de los insertos de ADN clonados en células de mamífero, el gen de la neomicina fosfotransferasa para seleccionar células de mamífero, un gen de resistencia a ampicilina ( $Amp^r$ ) y los promotores T7 y T3 RNA que flanquean el sitio múltiple de clonación; estos promotores pueden ser usados para sintetizar ARN a partir de cantidad sentido y antisentido del inserto de ADN clonado.

La unidad transcripcional incluye un promotor, un intrón un ADN que codifica para el antígeno y una secuencia de terminación de la transcripción.

Promotor. En la actualidad, la mayoría de las vacunas de DNA contienen el promotor de la región inmediata temprana de Citomegalovirus (CMV/IE), el cual permite altos niveles de transcripción de manera constitutiva en una gran variedad de células eucarióticas (Montgomery *et al.*, 1993; Bohm *et al.*, 1996; Hartikka *et al.*, 1996). La inclusión de la secuencia del intrón A del CMV (CMV-IA) ha permitido una mejoría en la expresión de cDNAs microbianos (Chapman *et al.*, 1991).

Secuencia de terminación de la transcripción. La terminación de la transcripción en las vacunas de ADN se realiza mediante secuencias de terminación y poliadenilación ubicada en la región 3' del ADN que codifica para el antígeno. Estas se conocen como regiones 3' no traducidas (3'-UTR). Las secuencias de terminación/poliadenilación dan estabilidad a la molécula de mRNA y están formadas por una secuencia ubicua AATAAA seguida de una secuencia rica en GT o en T, los cuales bajo condiciones óptimas se encuentran separados por 22 ó 23 nucleótidos (Levitt *et al.*, 1989).

El esqueleto plasmídico, contiene el origen de replicación, un sitio múltiple de clonación que facilita la inserción del gen, un gen de resistencia a antibióticos y las secuencias CpG inmunoestimuladoras que funcionan como un adyuvante interno en la misma vacuna (Kowalczyk y Ertl, 1999)

Origen de replicación (ori). El origen de replicación comúnmente utilizado en las vacunas de ADN es el ColE1, con el cual se obtienen grandes cantidades de ADN plasmídico debido a que permite la presencia de hasta 20 copias de ADN por célula (Azevedo *et al.*, 1999).

Sitio múltiple de clonación. La mayoría de los plásmidos poseen una serie de sitios de clonación sintéticos con secuencias que son reconocidas por enzimas de restricción utilizadas de manera común en ensayos de clonación, los cuales no se presentan en el resto del plásmido (Sambrook, 1989). De esta manera es posible clonar secuencias de ADN que codifican para el antígeno de interés y que han sido obtenidas mediante PCR con cebadores que poseen idénticos sitios de restricción que las secuencias blanco, o mediante restricción con enzimas a partir de otros plásmidos.

Gen de resistencia a antibióticos. Los vectores plasmídicos utilizados como vacunas de ADN se obtienen mediante transformación de bacterias competentes como *E. coli* cepa DH5 $\alpha$  previamente tratadas con una mezcla de cationes divalentes que las hacen permeables temporalmente a pequeñas moléculas de

ADN. La pequeña población de bacterias que adquieren el plásmido es identificada mediante marcadores selectivos que confieren resistencia a antibióticos. Un buen número de vacunas de ADN poseen marcadores que codifican para  $\beta$ -lactamasa y confieren resistencia a ampicilina.

Secuencias inmunoestimuladoras. Si una secuencia contra la que se quiere inducir una respuesta inmune está presente en el individuo no se reconoce como patógeno, 1975). En vacunas de ADN se utilizan diversos adyuvantes que incrementan la respuesta inmunológica (Krieg y Wagner., 2000). Datos previos indican que los epítomos universales de la toxina tetánica P2 y P30 pueden ser utilizados eficientemente para aumentar la eficacia de una vacuna de ADN.

### **Métodos de inoculación**

La respuesta a las vacunas de ADN ha sido determinada mediante diferentes rutas de inoculación, incluyendo intramuscular, intradérmica, intravenosa, intraperitoneal, epidérmica mediante escarificación de la piel, oral, intranasal y vaginal. De todas estas formas, las que han dado mejores resultados y más reproducibles son la inoculación intramuscular y en los diferentes estratos de la piel mediante agujas hipodérmicas, así como el bombardeo de partículas mediante pistolas genéticas en piel y en mucosas.

Las cantidades de ADN necesario van de 10 a 100  $\mu$ g de ADN en inyecciones intramusculares en ratones y hasta 1 mg en primates no humanos para inducir la aparición de anticuerpos y linfocitos citotóxicos; mientras que las dosis empleadas mediante bombardeo de partículas van de 0.1 a 10  $\mu$ g en ratones y de 0.1 a 100  $\mu$ g en primates para generar respuestas inmunes de similar magnitud (Robinson y Torres, 1997). En un estudio en el que se compararon diferentes métodos de inmunización se determinó que la dosis de ADN necesaria para proteger animales de la infección por el virus de la influenza era de 100  $\mu$ g en inyecciones intramusculares, y tan sólo 0.4  $\mu$ g del mismo ADN cuando la inoculación se realizó por bombardeo de partículas (Fynan *et al.*, 1993). Por ello,

ésta última metodología es la más eficiente desde el punto de vista de la cantidad de ADN utilizada.

### **Mecanismos de la respuesta inmune por vacunas de ADN**

Un aspecto que aún no se comprende del todo consiste en la interacción de la vacuna de ADN con el sistema inmune. Las cantidades del antígeno que se producen cuando se administra el vector están en el orden de los picogramos o nanogramos. Estos niveles relativamente pequeños de antígeno hacen pensar que la respuesta inmune tan fuerte y sostenida se debe a las propiedades adyuvantes que posee el ADN y al tipo de células presentadoras de antígeno transfectadas.

Hay tres mecanismos principales por el que el antígeno es procesado y presentado al sistema inmune tras la vacunación con ADN

1. Transfección de células presentadoras de antígeno (APC). Se sabe que éste tipo de células se encuentran presentes en pequeñas cantidades en músculo y que constituyen un potente estímulo para el sistema inmune. Adicionalmente, se conoce que pueden ser transfectadas in vivo por ADN para generar una fuerte respuesta por linfocitos T citotóxicos (Condon *et al.*, 1996). Tan sólo se requieren 100 APCs para activar al sistema inmune, y ésta cantidad no es difícil de transfectar si consideramos que 8% de las células en la epidermis corresponden a células dendríticas, se han realizado experimentos en modelos de ratón quiméricos en los que ha quedado claro que la presentación del antígeno se lleva a cabo principalmente por células provenientes de la médula ósea, es decir, células presentadoras de antígeno (Doe *et al.*, 1996).

2. Activación de la respuesta inmune por transfección de células carentes de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II. La mayor parte de las células transfectadas tras la inyección de ADN consisten en células musculares y queratinocitos. Ambos participan de manera importante en la inducción de la

respuesta inmune a la proteína transgénica, aunque es difícil pensar que lo hacen mediante la presentación de antígeno de manera directa a linfocitos, ya que carecen del MHC de clase II así como de moléculas coestimuladoras del tipo de CD80 y CD86 necesarias para activar el sistema inmune. El papel que éstas células desempeñan lo hacen a través de la síntesis y secreción de proteínas que aumenta la magnitud de la respuesta inmune (Klinman *et al.*, 1997).

3. Activación cruzada o "cross-priming". Es generalmente aceptado que los péptidos adquiridos de manera exógena por las APCs son presentados por medio del MHC clase II. Aunque se considera que éste tipo de proteínas son excluidas del MHC clase I, existe evidencia de que éste fenómeno puede ocurrir *in vivo* (Harding y Song, 1994). Durante la activación cruzada, las APCs introducen péptidos o proteínas sintetizados por otras células, y los presentan a linfocitos a través del MHC clases I y II. Esto permite que las células somáticas actúen como reservorios de antígeno, contribuyendo a aumentar la respuesta inmune hacia la proteína transgénica.

Los mecanismos antes mencionados ayudan a explicar las características de la respuesta inmune generada por las vacunas de ADN. La activación del sistema inmune por la inyección de un vector plasmídico es un proceso lento, en el que se detectan anticuerpos a las dos semanas de vacunación y se alcanza un máximo en la respuesta alrededor de la semana 10 (Xiang *et al.*, 1995). Su expresión, sin embargo se sostiene durante un largo período de tiempo lo cual podría permitir que otras APCs que lleguen a la zona de inoculación adquieran la proteína. Esto generaría un proceso de activación "en olas" y de manera continua, lo cual permitiría que la respuesta inmune se mantenga por un largo período de tiempo, dando lugar a la generación de memoria inmunológica durante años característica de las vacunas basadas en microorganismos atenuados y en ADN.

## **Ventajas y desventajas de las vacunas de ADN**

Entre las diferentes propuestas para clasificar a las vacunas que se utilizan en la actualidad, una de ellas toma en cuenta si el microorganismo se encuentra atenuado y por lo tanto vivo, o si éste se encuentra inactivado o muerto (Estrada-Parra, 1996; Ertl y Xiang, 1996). Las primeras constituyen las vacunas tradicionales elaboradas con microorganismos atenuados seleccionados por mantener su inmunogenicidad aunque desprovistos de su patogenicidad, en este grupo se incluyen las vacunas hechas a partir de microorganismos recombinantes que son virus o bacterias que expresan antígenos heterólogos provenientes de otros microorganismos. Por su parte, las vacunas inactivadas consisten en microorganismos muertos o proteínas aisladas nativas o recombinantes las cuales se conocen como vacunas de subunidades. Las principales características, así como las ventajas y desventajas se resumen en la Tabla 1.

Para entender mejor el papel que los diferentes tipos de vacunas existentes pueden jugar, algunas de las características deseables en toda vacuna se mencionan a continuación:

Seguridad. Las vacunas no deben producir efectos secundarios o causar enfermedad alguna. Las vacunas basadas en virus atenuados pueden revertir a su forma virulenta, llevando de manera inherente un riesgo potencial en su utilización. Aunque la posibilidad de que esto suceda es muy baja en la actualidad, el riesgo potencial no desaparece. El mejor ejemplo de vacuna viral preparada con microorganismos atenuados es la vacuna oral anti-poliomielítica tipo Sabin, la cual se considera segura y es utilizada a nivel mundial. Sin embargo, se han reportado algunos casos de poliomiелitis por la reversión a la forma virulenta de los virus atenuados tipo dos y tres que son constituyentes de esta vacuna. Por su parte, las vacunas de ADN carecen de este riesgo, y tal vez la principal preocupación en términos de seguridad sea la posibilidad de integración del ADN al genoma del individuo, provocando la activación de proto-oncogenes o inactivación de genes supresores de tumores. Hasta la fecha, se ha observado que el ADN permanece

en forma episomal, descartando la posibilidad de integración genómica (Nichols *et al.*, 1995).

Métodos de inoculación. Esta característica va estrechamente ligada a la seguridad de la vacuna. El método de aplicación de ésta no debe de presentar riesgo alguno a los individuos que la reciben o que la aplican. La utilización de jeringas y agujas constituye un riesgo sobre todo por la generación de desechos en lugares con poco control sobre ellos permitiendo su reutilización. Por lo anterior, las vacunas de administración oral resultan ideales en cuanto a seguridad. La inmunización con ADN ha sido realizada con éxito mediante este tipo de administración, así como mediante pistolas genéticas, las cuales se consideran también seguras.

Memoria inmunológica. Una de las características más deseadas en cualquier vacuna es la generación de una respuesta inmune duradera. Las vacunas basadas en microorganismos atenuados son bastante efectivas en este aspecto, ya que con menos aplicaciones se puede lograr una respuesta que dure años. Las vacunas con microorganismos inactivados requieren de varias inmunizaciones para producir el mismo efecto. Por su parte, las vacunas de ADN generan respuestas capaces de durar toda la vida cuando se han probado en ratones. Esta característica se ha observado en la respuesta humoral basada en anticuerpos, en la generación de linfocitos T cooperadores y de células T citotóxicas, para las cuales las vacunas de ADN se consideran el más potente estímulo.

Costos. La elaboración de vacunas tradicionales requieren de una infraestructura costosa, por lo que las formas alternativas que puedan reducir este precio son siempre deseables. Las técnicas empleadas para clonación de genes en nuevos vectores para vacunación con ADN son bastante simples, rápidas y no requieren del mismo tipo de instalaciones necesarias para producir virus recombinantes. Las vacunas con microorganismos atenuados son menos estables que las que se preparan con microorganismos inactivados, por lo que requieren cuidados especiales como el mantenimiento a temperaturas bajas durante todo el

proceso que culmina en la administración al individuo. Por su parte, las vacunas de ADN son estables a temperatura ambiente lo cual contribuye a la disminución significativa de los costos de producción.

**Cuadro 1. Características de las vacunas empleadas en la actualidad y su comparación con las vacunas de ADN**

	Vacunas de DNA	Vacunas recombinantes con microorganismos vivos	Vacunas con microorganismos atenuados (vivos)	Vacunas con microorganismos inactivados (muertos) o de subunidades
Presentación de antígeno a través del MHC clase I	Si	Si	Si	No
Presentación de antígeno a través del MHC clase II	Si	Si	Si	Si
Inclusión de todo el espectro de antígenos	Potencialmente	Potencialmente	Si	Si (excepto en vacunas de subunidades) No aplicable
Respuesta anti-vector (permitiendo una utilización repetida)	No	Si	No aplicable	No aplicable
Competencia entre vector y antígeno	No	Si	No	No
Seguridad al utilizar en pacientes inmunocomprometidos	Si	No	No	Si
Riesgo de reversión del microorganismo a su forma virulenta	No	Si	Si	No
Riesgo de contaminación por otros agentes	No	Si	Si	No
Facilidad en la preparación	Si	No	No	No
Termoestabilidad	Si	No	No	Si
Costo de producción	Bajo	Alto	Alto	Alto

Reyes S., Pinto R; 2002

## **Objetivos**

### ***Objetivo General***

Desarrollar una vacuna de ADN que inmunice contra miostatina para incrementar las masas musculares

### ***Objetivos particulares***

Elaborar diferentes vacunas de ADN con el gen que codifica para la miostatina modificándola con los epítomos P2 y P30 de la toxina tetánica.

Evaluar en grupos de ratones, el efecto de la inmunización con las diferentes construcciones vacunales contra la miostatina, en el peso de diferentes regiones corporales.

## **Hipótesis**

La inmunización con una vacuna de ADN del gen de la miostatina modificada con los epítomos P2 y P30 de la toxina tetánica inducirá la producción de anticuerpos específicos contra la miostatina que inhibirán su actividad induciendo un aumento de las masas musculares de los individuos.

## **Justificación**

Las mutaciones descritas en el gen de la miostatina han aparecido de forma natural y se han seleccionado de forma independiente en algunas razas de bovinos y ovejas. Sin embargo, estas mutaciones no se han descrito en el cerdo, aves ú otras especies de interés en la industria cárnica. De forma que la oportunidad de explotar en estas especies esta vía de aumento muscular solo puede obtenerse por métodos transgénicos o por terapia genética. Por otro lado, se ha visto que la expresión de la miostatina se mantiene durante el periodo postnatal por lo que su inhibición lleva a un aumento de las masas musculares, esto se ha explotado experimentalmente en el desarrollo de terapias en displasias musculares de forma alentadora. Sin embargo, la inhibición inmunológica de la

actividad de la miostatina con fines de lograr un mayor rendimiento en la producción y calidad de la carne en animales de consumo no se ha explorado. Por lo anterior, el propósito de este trabajo es desarrollar una vacuna de ADN contra la miostatina que pueda aplicarse en los animales de abasto y evaluar su efecto inicialmente en ratones.

## **METAS**

Se clono la región del péptido bioactivo del gen de miostatina a partir del DNA genómico de pollo. Empleando PCR, el gen se modificó antigénicamente incorporándole los epítopes P2 y P30 provenientes de la toxina tetánica. Se obtuvieron 4 diferentes construcciones genéticas: 1) La miostatina nativa; 2) miostatina modificada fusionada con el epítopo P2 en el extremo aminoterminal, 3) miostatina fusionada a P30 en el extremo carboxilo; 4) miostatina fusionada a P2 y P30 en los extremos amino y carboxilo, respectivamente. Estas construcciones contenían sitios XbaI. Estas construcciones fueron clonadas inicialmente en un vector T. El ADN de las clonas recombinantes para cada construcción del vector T se digirieron con la enzima XbaI, esto libero el fragmento de las construcciones con los extremos cohesivos compatibles al vector de expresión celular pCIneo. Este vector había sido previamente digerido con la misma enzima y desfosforilado. EL vector digerido y los fragmentos de las construcciones se ligaron y las clonas obtenidas se caracterizaron por PCR para identificar aquellas correctamente orientadas. Estas clonas se amplificaron obteniendo ADN plasmídico libre de endotoxinas el cual se empleó en experimentos de inmunización en grupos de 6 ratones/construcción. Después de 4 inmunizaciones con 100ug de ADN de las construcciones vacunales a los días 0, 14, 28 y 42, se evaluó el peso de diferentes regiones corporales. Se analizaron los datos estadísticamente en comparación a controles negativos y controles en donde se administró una vacuna génica con el gene de miostatina sin modificar.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### ***Extracción de ADN***

La técnica usada para la recuperación del material genético a partir de muestras de tejido (embrión de pollo) fue la reportada por Manuelidis *et al* en 1977 y modificada en el laboratorio de genética molecular. En un mortero se fracciono 1 gramo de tejido y se pulverizó con nitrógeno líquido, se adicionaron 10 volúmenes solución de lisis (0.05 M Tris-HCl pH 8, 0.1 M EDTA, 0.5% Sarkosyl) y se trato con RNasa [15 µg/ml] y proteinasa K [100 µg/ml], incubando por 60 min. Posteriormente, se adiciono NaCl a 2M final. Se centrifugo 15 minutos a 3000 rpm, se recupero el sobrenadante y precipito con 2 volúmenes de etanol, se centrifugo a 4,500 rpm/15 min/4°C, la pastilla se resuspendió en 3ml de solución de lisis mezclando con un volumen de fenol- cloroformo-Alcohol isoamílico (25:24:1); posteriormente se centrifugo a 4,500 rpm/20 min/4°C y se recuperó el sobrenadante mezclándolo con un volumen de cloroformo-Alcohol isoamílico (24:1), se centrifugó en las mismas condiciones y se precipito nuevamente con un volumen de isopropanol y centrifugo a 4,500 rpm/20 min/4°C. Finalmente se lavo la pastilla con etanol al 70%, decanto, secó y resuspendio en 350 µl de ddH<sub>2</sub>O estéril.

### ***Cuantificación de ADN genómico***

La concentración y calidad de ADN se midió en un espectrofotómetro con lecturas de absorbancia a 260nm y 280nm (PerkinElmer Lambda Bio 10). La concentración de ADN se determino con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (ng/}\mu\text{l)} = (\text{Abs } 260\text{nm})(\text{Factor de dilución})(\text{Factor de conversión})$$

Donde:

$$\text{Abs } 260\text{nm} = \text{Absorbancia a } 260\text{nm}$$

$$\text{Factor de dilución} = (\text{Volumen de TE 1X} + \text{Volumen de la muestra}) / (\text{Volumen de la muestra})$$

$$\text{Factor de conversión} = 50 \mu\text{g/ml para un ADN de doble cadena}$$



### ***Purificación de los insertos***

La purificación de los productos de amplificación por PCR así como los fragmentos clonados digeridos; se realizó por adsorción a perlas de sílice. Las bandas correspondientes al peso esperado del gen se recortaron del gel. Cada uno de estos trozos de agarosa se pesó y mezclaron con 3 volúmenes de NaI 6M, se incubaron 10 minutos a 55°C para disolver la agarosa. Inmediatamente se le agregaron 20µl de perlas de sílice y se incubaron 30 minutos a 4°C. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 12000 rpm por 4 minutos y las pastillas se lavaron 2 veces con 500µl de solución de lavado (NaCl 50mM, Tris HCl pH7.5 10mM, EDTA 2.5mM, etanol 50% v/v). La pastilla se seco y resuspendió en 30µl de H<sub>2</sub>O y el ADN se eluyó de las perlas por incubación durante 10 minutos a 55°C. La suspensión se centrifugo por 3 minutos, se recupero el sobrenadante y se almaceno a -20°C hasta su uso. Las muestras de ADN se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 3%.

### ***Clonación en pGEM®-T***

Los fragmentos de ADN obtenidos de la purificación se clonaron de forma independiente en el vector pGEM®-T. Las reacciones de ligación se hicieron en una relación molar inserto: vector 3:1, se utilizó 100ng de ADN del plásmido vector y 30 ng del fragmento purificado, agregando 1 unidad de T4-ligasa en su amortiguador específico; el volumen final de las reacciones fue de 10 µl. Las mezclas se incubaron por 16 horas a 4°C. Posteriormente se almacenaron a -20°C hasta que los productos de ligación se utilizaron para transformar bacterias competentes.

### ***Transformación de bacterias competentes***

Para transformar las bacterias de *E. coli* con los plásmidos, 100µl de las bacterias competentes DH5α se mezclaron con 25ng de la ligación y se dejaron incubar 30 minutos en hielo, posteriormente 1 minuto a 42°C, después se les adiciono 900µl de medio LB y se incubaron 1 hora a 37°C en agitación. Al término

de la incubación, el cultivo se sembró sobre medio LB con 100µg/ml de ampicilina para pCl-neo y Xgal (266µg/ml), IPTG (266µg/ml) para pGEM®-T. Las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche y al siguiente día se almacenaron a 4°C.

### ***Selección de clonas recombinantes***

Para la selección de recombinantes se escogieron 16 colonias al azar y se les hizo PCR con los iniciadores de los plásmidos M13 para pGEM®-T y T3-T7 para pClneo. Aquellas clonas positivas a PCR se crecieron en medio LB para obtener ADN plasmídico.

### ***Obtención de ADN a pequeña escala***

Para la obtención de ADN plasmídico a pequeña escala se utilizó un método de ebullición (Silhavy et al., 1984) modificado en el laboratorio de genética molecular. Las colonias bacterianas se sembraron en 9ml de LB con 100µg/ml de ampicilina y se incubaron toda la noche a 37°C en agitación. Al día siguiente se centrifugaron a 3,500 rpm por 6 min, decantaron y resuspendieron en 600 µl de solución de lisis (8% Sacarosa, 5% Tritón X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8), y se trataron con lisozima (1.25 µg/µl). Posteriormente se hirvió en baño de agua por 1min, centrifugaron 10 minutos a 12,000rpm; recupero el sobrenadante y trato con RNAsa (15µg/ml) y proteinasa K (50 µg/ml). Se precipitaron con 2 volúmenes de etanol absoluto e incubaron 30 minutos, transcurrido este tiempo se centrifugaron 10min a 14,000 rpm. Finalmente se lavo la pastilla con etanol al 70%, decanto, secó por calor y resuspendio en 50µl de ddH2O estéril. Las muestras de DNA se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%.

### ***Digestión de ADN plasmídico***

Para obtener el fragmento con extremos cohesivos y asegurar su correcta ligación al vector de expresión pClneo; se digirieron 20µl del ADN obtenido a pequeña escala con la enzima de restricción XbaI. La digestión se realizó durante 16 horas a 37°C en un volumen final de 200µl y las soluciones amortiguadoras correspondientes a la enzima. Pasadas las 16 horas, 5µl de las muestras de ADN

se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% con TAE. Cuando se verifico que el vector estaba linearizado; las muestrase precipitaron con 2 volúmenes de etanol absoluto e incubaron 30 minutos a -20°C, transcurrido este tiempo se centrifugaron 10min a 14,000 rpm. Finalmente se lavo la pastilla con etanol al 70%, decanto, secó, resuspendio en 20µl de ddH2O estéril y finalmente se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 3%.

### ***Clonación en pCI-neo***

Para la construcción de los plásmidos vacúnales se empleo el vector de expresión pCI-neo que lleva el promotor temprano de citomegalovirus (CMV para promover la expresión constitutiva de los insertos de ADN clonados en células de mamífero), previamente digerido con la enzima de restricción XbaI. Las reacciones de ligación se hicieron en una relación molar inserto: vector 3:1, se utilizó 1µl de T4-ligasa en su amortiguador específico; el volumen final de las mezclas reacción fue de 20 µl, las mezclas se incubaron durante 16 horas a 4°C. Posteriormente se almacenaron a -20°C hasta que los productos de las reacciones se utilizaron para su transformación en células competentes.

### ***Secuenciación de las clonas obtenidas***

Para la secuencia de las clonas candidatas se obtuvo ADN de los plásmidos recombinantes a pequeña escala, se evaluaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se cuantificaron por espectrofotometría. Una vez evaluadas todas las muestras, se calculo el volumen necesario de muestra para colocar 2-3µg de ADN por muestra en la reacción.

Para la reacción de secuencia se utilizo el kit comercial BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit de Applied biosystems™ de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

### ***Maxi preparación de ADN de los plásmidos recombinantes***

Una vez verificadas las secuencias de las clonas recombinantes, se obtuvieron grandes cantidades de ADN de los plásmidos recombinantes miostatina, miostatina p2, miostatina p30 y miostatina p2-p30 respectivamente, mediante el uso de columnas del kit comercial Quiagen EndoFree Plasmid Mega Kit. Se tomo una colonia bacteriana transformada con cada uno de los plásmidos y se inoculó de forma independiente en 5ml de medio LB- ampicilina (100µg/ml). El precultivo se colocó en una incubadora a 37°C en agitación (220 rpm) durante 8 horas y una vez crecido se tomo 1 ml para inocular 500 ml de medio LB- ampicilina. A su vez este cultivo se incubó en las mismas condiciones y se le permitió crecer durante 16 horas. Al término de este tiempo, las bacterias se cosecharon por centrifugación a 3600xg durante 15 minutos a 4°C, la pastilla celular se resuspendió en 50 ml de amortiguador P1 (Tris-HCL 50mM pH 8, EDTA 10 mM y RNAsa a 100 µg/ml) y a continuación se le adicionaron 50ml de amortiguador P2 (NaOH 200mM y SDS 1%), se mezcló por inversión y se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente. A la mezcla se le agregó 50 ml de amortiguador P3 (acetato de potasio 3M pH 5.5), se mezcló por inversión e introdujo en el cartucho QUIAfilter dejando reposar 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se filtro con una bomba de vacío. Se añadieron 50 ml del amortiguador FWB2 al cartucho y de nuevo se filtro con bomba de vacío. Al lisado filtrado se le añadieron 12.5 ml del amortiguador ER, se mezcló por inversión y se incubó en hielo 30 minutos.

Se utilizó una columna para cada plásmido previamente equilibrada con 35ml de amortiguador QBT (NaCl 750mM, MOPS 50 mM pH 7, isopropanol 15% y Tritón X-100 0.15%), posteriormente se adiciono el lisado filtrado y cuando paso totalmente, se procedió a lavar la columna con 200ml de amortiguador QC (NaCl 1M, MOPS 50mM pH 7 e isopropanol 15%). Finalmente el ADN se eluyó con 35ml de amortiguador QN (NaCl 1.6M, MOPS 50mM pH 7 e isopropanol 15%). El ADN contenido en el eluido se precipito con 24.5 ml de isopropanol, se mezcló y se

centrifugó a 10 000 xg durante 30 minutos a 4°C. las pastilla se lavó con 7ml de etanol al 70% libre de endotoxinas, se centrifugó a 10 000 xg durante 10 minutos, se seco a 60°C aproximadamente 10 minutos. Transcurrido este tiempo, el ADN se resuspendió en 1 ml de Amortiguador TE libre de endotoxinas. La pureza y concentración del ADN obtenido se analizó por análisis espectrofotométrico picogreen. La purificación y el rendimiento del ADN también se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 1%.

### ***Esquema de inmunización en ratones***

Se utilizaron ratones BALB/c machos de 21 días de edad, con los cuales se formaron 5 grupos de 6 ratones cada uno. Las inmunizaciones se realizaron de forma subcutánea. En todos los casos los inóculos tuvieron un volumen de 50 µl que contenían 100 µg de ADN y se aplicaron los días 0, 14, 28 y 42; los ratones fueron sacrificados en el día 74 postinmunización.

Cada grupo experimental sirvió para evaluar cada vacuna recombinante: miostatina, miostatina p2, miostatina p30, miostatina p2 p30 y un grupo control inoculado con 50 µl de PBS.

Los ratones se manipularon conforme a las especificaciones de la NOM-062-ZOO-1999 y se registraron los siguientes pesos: peso al sacrificio, peso a la canal (eviscerados, retirada la piel y las patas), cabeza, región craneal (patas anteriores unidas al torso. Corte a nivel de la 1ª lumbar), región caudal (corte a nivel de la base de la cadera), miembros anteriores, miembros posteriores, tríceps y cuádriceps.

### ***Evaluación estadística***

Los datos fueron evaluados con una prueba de normalidad y homogeneidad de varianzas para saber si los datos tenían una distribución normal. Se realizó una prueba de Shapiro Wilk para saber si los datos tenían una distribución normal y la

prueba de Levene para ver evaluar homogeneidad de varianzas, con esto se demostró que los datos tenían una distribución normal lo que permitió hacer un análisis de varianza y evaluar por la prueba de Tukey cuál de los grupos era diferente. La significancia aceptada fue 0.05.

## RESULTADOS

### *Construcción de los plásmidos vacunales*

#### Extracción y cuantificación de ADN genómico

Se purifico ADN a partir de embrión de pollo de 15 días de incubación. Se verificó la integridad del ADN por electroforesis y se evaluó su grado de pureza por espectrofotometría a 260 y 280nm. El rendimiento calculado del ADN fue de 920µg de ADN por gramo de tejido con un relación 260/280 de 1.70.

#### Diseño de iniciadores

Para el diseño de iniciadores se alinearon las secuencias de miostatina de diferentes especies (bovino, cerdo, pollo, ratón en nucleótidos y aminoácidos, donde se ubicaron los diferentes exones así como las regiones de la proteína (Anexo 2); al verificar una homología del 87 a 98% y del 99% respectivamente en la región bioactiva se diseñaron los iniciadores universales para la amplificación de miostatina (figura 5) y los que incluían los epítomos inmunoestimulantes P2 y P30 (figura 6).

#### Primers para la amplificación de miostatina

```

                                MbioF ▶
                                GATTTGGC CTGACTGTG ATG
aaccatttt tagaggtcag agttacagac acacogaaac ggtccocgag agattttggc cttgactgtg atgagcaact aacggaatcc ogatgttgc gctaccogct gacagtggat ttogaagcct ttggatggga
ttgggtaaaa atctccagtc tcaatgtctg tgtggctttg ccaagggcgtc tctaaaaccg gaactgacac tactcgtgag ttgccttagg gctacaacag cgatggggca ctgtcaacta aagcttcgaa aacctaccc
>>.....MIOSTATINA Exon 3 Gallus gallus.....>>
n p f l e v r v t d t p k r s r r d f g l d c d e h s t e s r c c r y p l t v d f e a f g w
ctggattata gcaactaaaa gatacaaaag caattactgc tccggagaat gogaatttgg gttctctacag aaataccocg aactcaactc ggtacaccaa gcaaatccca gaggtcagc aggccttgc tgcacacca
gacctaatat cgtggatttt ctatgcttgc gtaaatgacg agccctotta cgcttaaaca caaagatgct tttatggcgc tgtgagtga ccatgtggtt cgtttaggtt ctcogagtgc tccggaaacg acgtgtgggt
>.....MIOSTATINA Exon 3 Gallus gallus.....>>
d w i i a p k r y k a n y c s g e c e f v f l q k y p h t h l v h q a n p r g s a g p c c t p
                                ◀ Mir
                                CAT CTAGCgAcC CCACGAGTAC T...
coaagatgc cccataaac atgctgtatt tcaatggaaa agaacaata atatatggaa agataccagc catggttga gatcgttgc ggtgctcatg a
ggttctacag gggatatttg tacgacataa agttaccttt tctgtttat tatataacct tctatggtgc gtaaccaat ctagcaacgc ccaagagtac t
>.....MIOSTATINA Exon 3 Gallus gallus.....>>
t k m s p i n m l y f n g k e q i i y g k i p a m v v d r c g c s -

```

Figura 5. Ubicación de los primers para amplificar miostatina bioactiva.

### Estructura de las diferentes construcciones vacunales

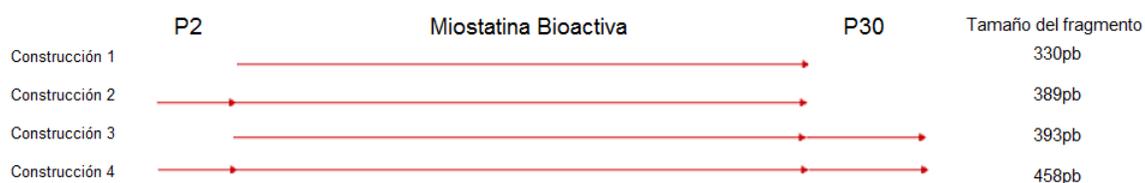


Figura 6. Esquema de las diferentes construcciones genéticas en donde se muestra la posición de los epítomos inmunostimulantes P2 y P30

La estrategia seguida para la clonación y modificación del gen de la miostatina consistió en amplificar inicialmente el gen estandarizando las condiciones óptimas de PCR en un gradiente de temperaturas. Los productos amplificados se separaron por electroforesis; después del corrimiento electroforético (Fig. 7a), se purificaron por perlas de sílice (Fig. 7b), y se ligaron al Vector T pGEMt. Se transformaron 25 ng del producto de ligación en bacterias competentes de *E. coli* cepa DH5 $\alpha$  y por PCR se verificó si las clonas eran positivas con los iniciadores del vector (M13) (Fig. 7c), las clonas que resultaron positivas se les extrajo el ADN del plásmido recombinante mediante una purificación por lisis alcalina para digerirlo con la endonucleasa XbaI (Fig. 7d). El fragmento liberado se recuperó del gel y se ligó al vector pCneo, el cual previamente había sido digerido con la misma enzima y desfosforilado. EL ADN ligado se empleó para transformar células competentes de *E. coli* cepa DH5 $\alpha$ . Las clonas recombinantes se identificaron por PCR empleando los iniciadores que se asientan en el vector (T3, T7). Se obtuvo ADN de los plásmidos recombinantes y se comprobó su identidad mediante secuenciación de nucleótidos, verificando que las clonas estaban correctamente orientadas.

## Construcción de los plásmidos vacunales

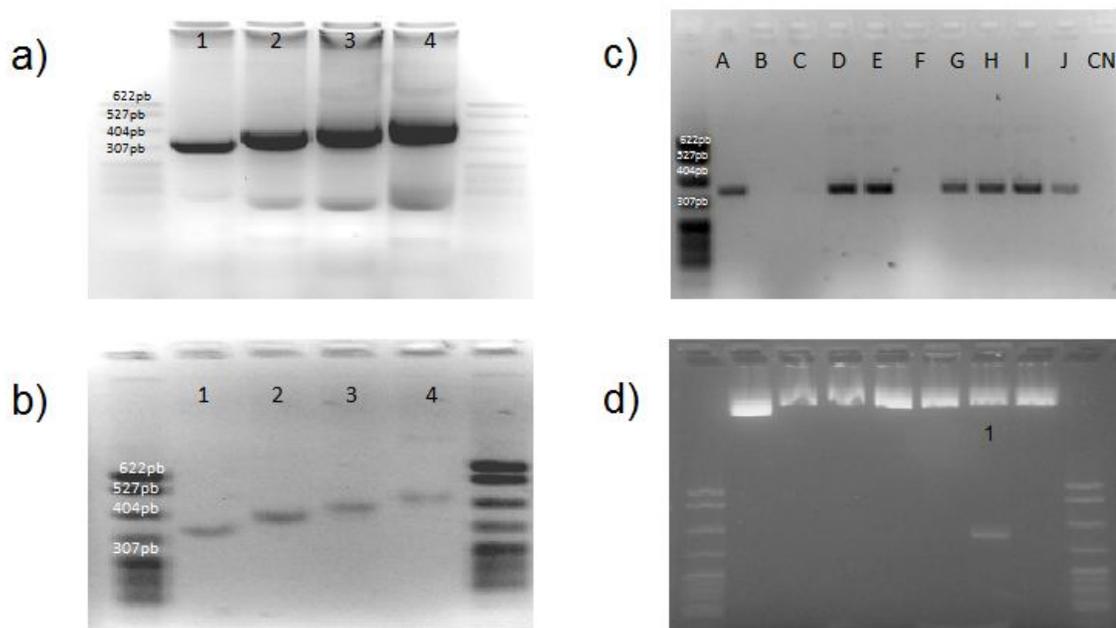


Fig. 7. a) Amplificación de miostatina y sus diferentes variables. b) Fragmentos recuperados con NaI y perlas de sílice del gel de agarosa, c) Verificación de clonas recombinantes en el vector pGEM®-T, d) Digestión de clonas candidatas con la enzima de restricción XbaI. Geles de agarosa al 3% teñidos con bromuro de etidio 100µg/ml. (1. Miostatina 2. Miostatina P2, 3. Miostatina P30, 4. Miostatina P2-P30 A,B,C.....J identificación de las clonas).

### Producción de ADN vacunal

Se purifico ADN de cada uno de los plásmidos vacunales a partir de un crecimiento bacteriano de 1 litro. El ADN se obtuvo con columnas de intercambio ionico empleando el kit comercial Qiagen EndoFree Plasmid Mega Kit. El rendimiento de la purificación de los plásmidos se evaluó por electroforesis y por espectrofotometría (Figura 8).

## Evaluación del rendimiento de purificación

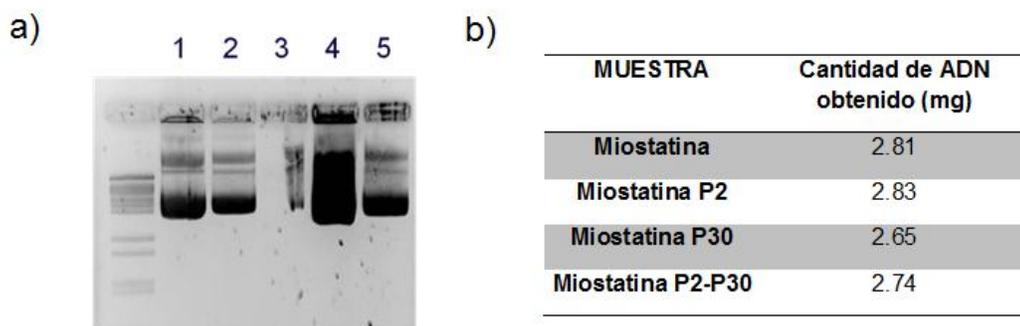


Figura 8. a) Electroforesis en agarosa al 1% en donde se separo el ADN de plásmido en los diferentes pasos de purificación. Carril 1.-Lisado crudo de cultivo bacteriano; 2.- Filtrado. Material que pasó por la columna y no fue retenido; 3.- Buffer empleado para lavar la columna.; 4.- Eluido. Material liberado de la columna 5.- DNA de plásmido purificado. b) Cantidad de ADN obtenido para las diferentes construcciones vacunales a partir de 1 litro de crecimiento bacteriano

### ***Inmunización con las construcciones vacunales***

Para cada construcción se establecieron grupos de 6 ratones machos BALB/C, de 4 semanas de edad. Estos fueron inmunizados por vía subcutánea con 100µg a los días 0, 14, 28 y 42. Al día 84 se sacrificaron y se colecto el suero. En la figura 9 se muestra el esquema de inmunización).

### **Calendario de vacunación contra miostatina en ratones BALB/c**

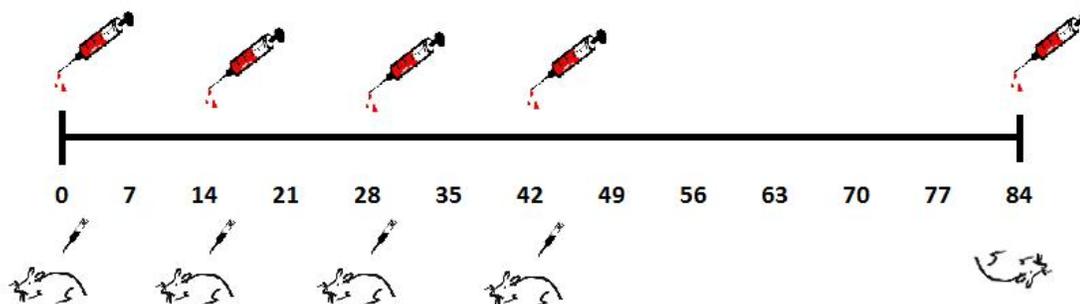


Fig. 9. Calendario de vacunación de las diferentes construcciones contra miostatina en ratones BALB/c. Antes de la inoculación se tomarón muestras de sangre para su posterior evaluación de anticuerpos.

## Evaluación del efecto de la inmunización

En cada uno de los individuos, se tomaron pesos por 12 semanas (84 días). Se obtuvo el peso al sacrificio, peso de la canal (eviscerada, sin piel y sin patas), cabeza, la región craneal (miembros anteriores unidos al torso sin cabeza,, corte a nivel de la 1ª lumbar), la región caudal (corte a nivel de la base de la cadera, conservando miembros posteriores), los miembros anteriores, miembros posteriores, tríceps y cuádriceps. Los valores obtenidos se analizaron estadísticamente.

### Ganancia de peso.

La ganancia de peso corporal de los diferentes grupos a lo largo del estudio no fue significativamente superior ( $p \geq 0.05$ ) entre los grupos inoculados con las diferentes construcciones vacúnales y respecto al control (Fig. 10).

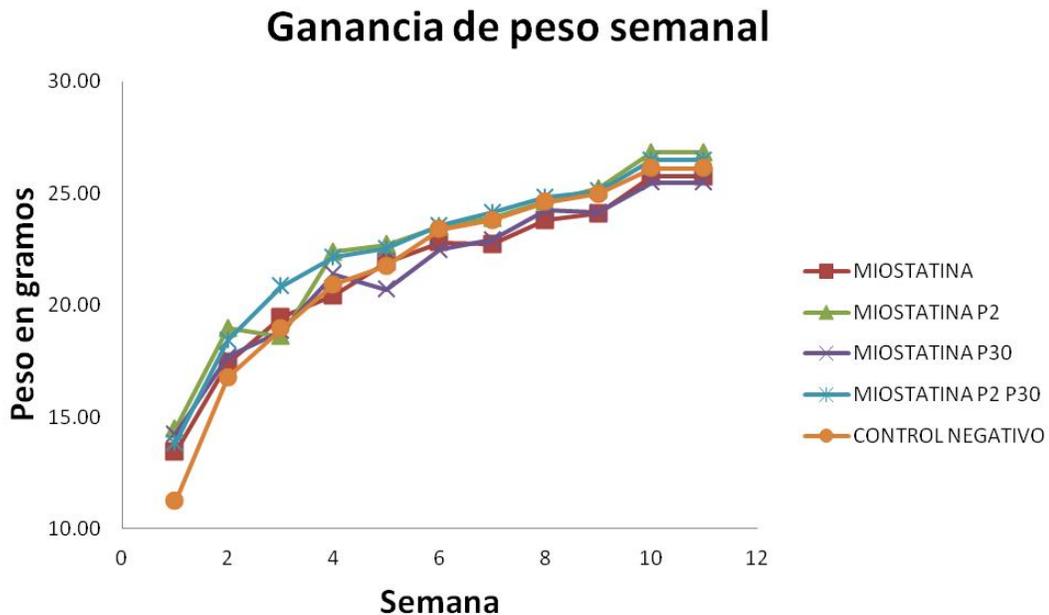


Fig.10. Ganancia de peso semanal en los diferentes tratamientos.

## Evaluación de la canal

Para evaluar la canal de las diferentes construcciones vacunales se pesaron diferentes regiones corporales (canal, región craneal, caudal miembros anteriores, miembros posteriores, tríceps, cuádriceps y cabeza). En el cuadro 2 se muestran los promedios y la desviación estándar de las mediciones de los pesos en diferentes regiones corporales y los resultados de la prueba de significancia de Tukey. Se aprecia que entre los grupos, el peso al sacrificio no hubo diferencias. Sin embargo, en general la vacunación con la miostatina modificada con los dos epítomos inmunoestimulantes resultó en un aumento del tejido muscular. Algo notable es que el grupo tratado con miostatina sin modificar mostró una aparente reducción en las masas musculares.

Cuadro 2. Promedio de los pesos y las desviaciones estándar de las diferentes regiones corporales en los grupos de ratones inmunizados.

VARIABLES	1	2	3	4	5
Peso al sacrificio	25.75 ± 0.55 <sup>a</sup>	26.81 ± 0.86 <sup>a</sup>	25.53 ± 0.51 <sup>a</sup>	26.46 ± 0.63 <sup>a</sup>	26.11 ± 0.70 <sup>a</sup>
Peso de la canal	11.49 ± 0.95 <sup>a</sup>	12.26 ± 0.85 <sup>ab</sup>	12.50 ± 0.61 <sup>ab</sup>	12.70 ± 0.71 <sup>b</sup>	11.96 ± 1.13 <sup>ab</sup>
Región craneal	7.26 ± 0.69 <sup>a</sup>	7.33 ± 0.65 <sup>a</sup>	7.46 ± 0.60 <sup>a</sup>	7.98 ± 0.85 <sup>a</sup>	7.33 ± 0.17 <sup>a</sup>
Región caudal	4.84 ± 0.43 <sup>a</sup>	5.48 ± 0.66 <sup>ab</sup>	5.56 ± 0.42 <sup>ab</sup>	5.78 ± 0.54 <sup>b</sup>	5.32 ± 0.37 <sup>ab</sup>
Miembros anteriores	1.06 ± 0.16 <sup>a</sup>	1.34 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.37 ± 0.31 <sup>a</sup>	1.56 ± 0.66 <sup>a</sup>	1.18 ± 0.11 <sup>a</sup>
Miembros posteriores	2.41 ± 0.15 <sup>a</sup>	3.42 ± 0.62 <sup>b</sup>	3.70 ± 0.55 <sup>b</sup>	3.60 ± 0.65 <sup>b</sup>	2.49 ± 0.25 <sup>a</sup>
Tríceps	0.78 ± 0.13 <sup>a</sup>	1.06 ± 0.18 <sup>ab</sup>	1.30 ± 0.27 <sup>b</sup>	1.40 ± 0.47 <sup>b</sup>	0.78 ± 0.13 <sup>a</sup>
Cuádriceps	1.65 ± 0.83 <sup>a</sup>	2.25 ± 0.27 <sup>b</sup>	2.35 ± 0.3 <sup>b</sup>	2.20 ± 0.19 <sup>b</sup>	1.68 ± 0.14 <sup>a</sup>
Cabeza	2.03 ± 0.45 <sup>ab</sup>	2.20 ± 0.76 <sup>bc</sup>	2.23 ± 0.73 <sup>c</sup>	2.70 ± 0.21 <sup>d</sup>	1.94 ± 0.07 <sup>a</sup>
M. anteriores s/cabeza	5.22 ± 0.66 <sup>a</sup>	5.13 ± 0.7 <sup>ab</sup>	5.23 ± 0.63 <sup>ab</sup>	5.26 ± 0.71 <sup>ab</sup>	5.39 ± 0.21 <sup>b</sup>

Promedios con letras distintas dentro de una misma fila son estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ).  
1: Miostatina; 2: Miostatina P2; 3: Miostatina P30; 4: Miostatina P2-P30; 5: Control.

En la Figura 11 se grafican los promedios de los pesos (y la desviación estándar) obtenidos en cada grupo inmunizado. Se aprecia que, en comparación al grupo 1 y al grupo 5 (control), se logró un aumento en los pesos de diversas regiones.

## Peso de las diferentes regiones evaluadas

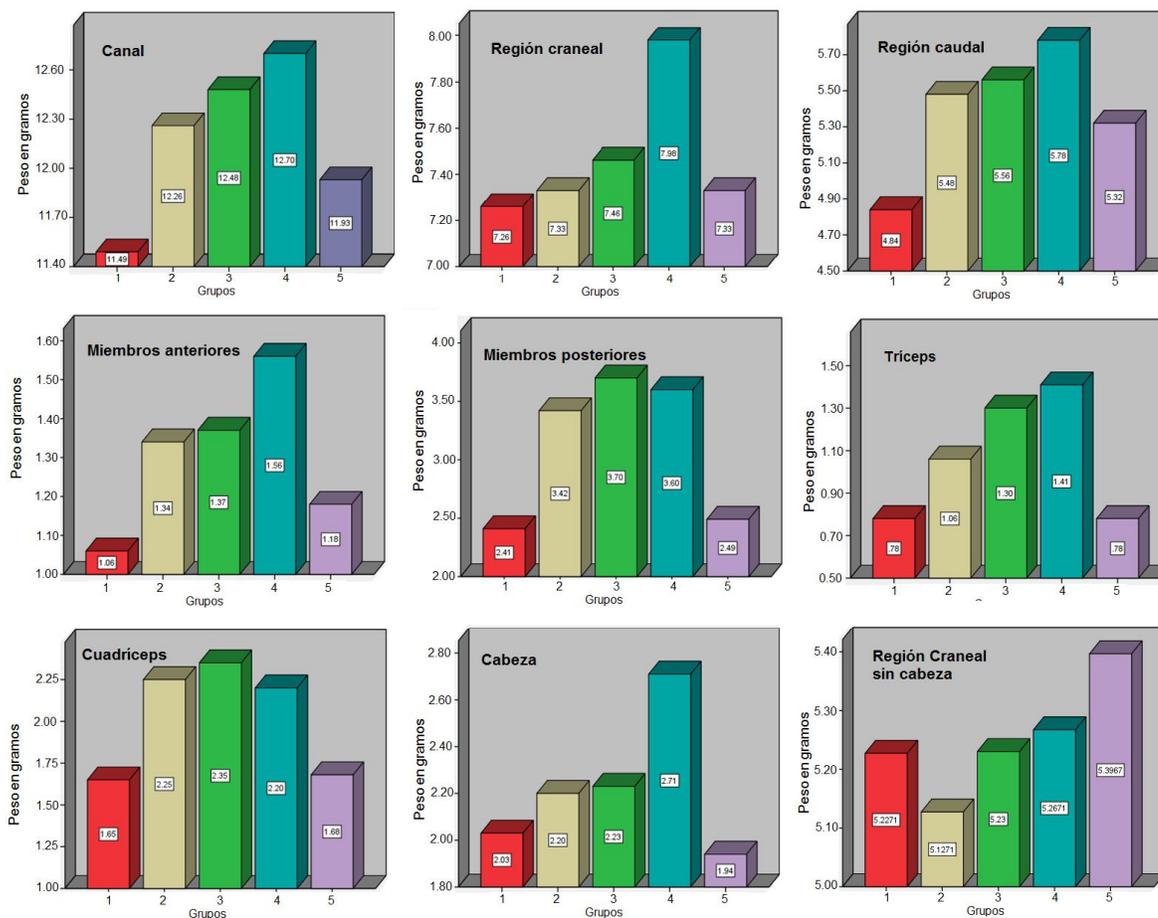


Fig. 11. Peso de las diferentes regiones evaluadas por grupo.  
Grupo 1. Miostatina, 2. Miostatina P2, 3. Miostatina P30, 4. Miostatina P2-P30, 5. Grupo control.

Para mostrar más evidentemente las diferencias entre grupos se restó el promedio del grupo control a los valores de cada grupo inmunizado con las diferentes construcciones. Las evaluaciones realizadas de las canales muestran diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en el aumento de peso en la región craneal, caudal, miembros posteriores, tríceps, cuádriceps y cabeza de la construcción de miostatina con los epítomos P2 y P30; sin embargo en el peso a la canal, miembros anteriores y región craneal sin cabeza; no se encontraron diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ). En los miembros posteriores y cuádriceps las construcciones de miostatina P2 y miostatina P30 también mostraron un aumento

significativo ( $p \leq 0.05$ ) en el peso y la construcción de p30 en el peso de los tríceps (Figura 12).

### Promedio de los pesos de las diferentes regiones evaluadas

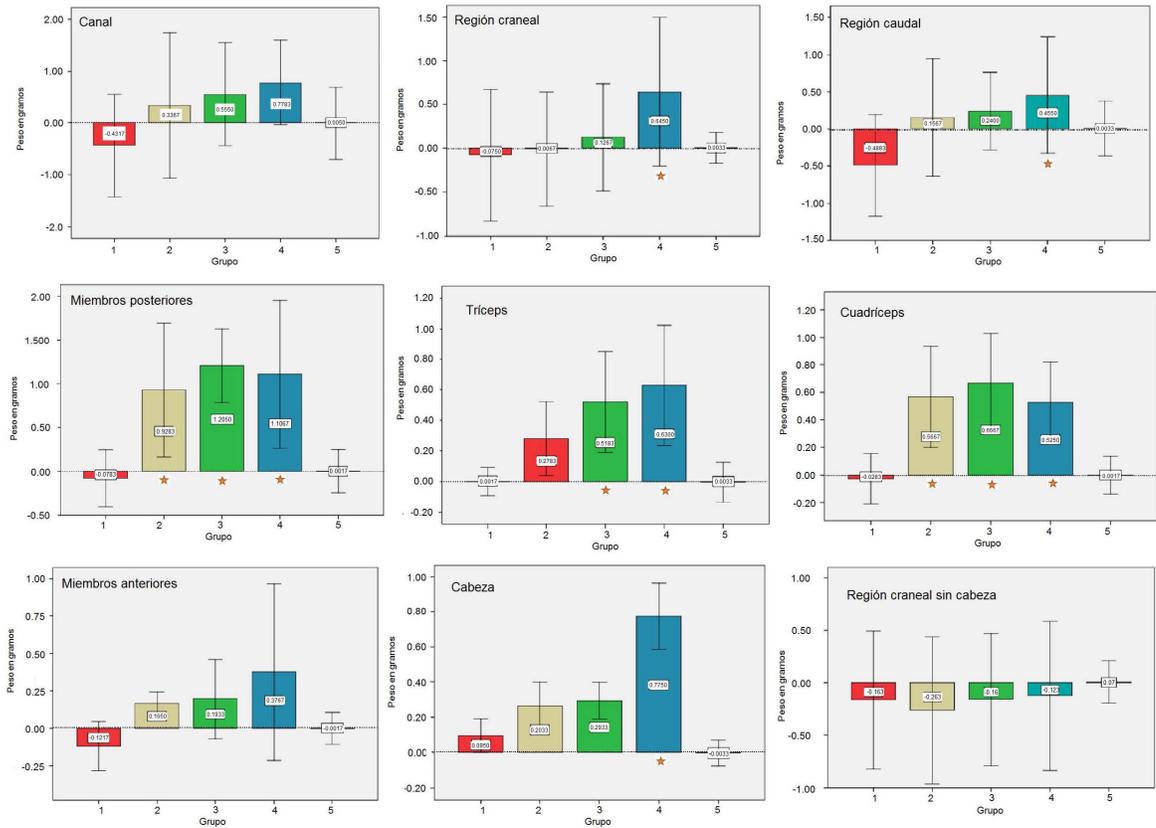


Figura 12. Promedio de peso obtenidas en las diferentes regiones corporales de los grupos inmunizados. Las diferencias estadísticamente significativas están indicadas con una estrella ( $p \leq 0.05$ ), barras de error  $\pm 1$  desviación estándar. Grupo 1. Miostatina, 2. Miostatina P2, 3. Miostatina P30, 4. Miostatina P2-P30 y 5. Control.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En nuestro estudio, en la dinámica del crecimiento de los diferentes grupos de inmunización y en el peso al sacrificio no se apreciaron diferencias significativas entre los grupos vacunados y no vacunados, estas observaciones concuerdan las de Xianyong et al., 2005, donde los pesos corporales de los ratones inmunizados con miostatina recombinante de cerdo no mostraron diferencias significativas. En ratones knockout para el gen de miostatina McPherron *et al.*, 1997, encontraron un aumento del peso corporal de alrededor de 30% durante los estadios adultos jóvenes (2-5 meses) y casi todo el aumento de peso en los animales homocigotos podría explicarse por un aumento en la masa muscular. Estos hallazgos no sugieren que la ausencia de miostatina en la etapa prenatal conduce a un aumento mayor en las masas musculares, que el que se puede obtener en el bloque de su actividad de forma postnatal. Esto puede explicar los resultados de nuestros experimentos, en donde administrando la vacuna de miostatina a las 4 semanas de edad no resulto en un aumento apreciable en el peso corporal, aunque si notamos un aumento en algunas regiones corporales, así como en algunos músculos. Sería interesante evaluar el efecto de la administración de la vacuna a edades más tempranas, o el efecto de una inmunización pasiva desde el momento de la lactancia.

El peso a la canal de los ratones inoculados con solo con la vacuna de ADN con el gen de miostatina resulto menor que el grupo control, además esta tendencia se aprecia en varias regiones corporales, esto concuerda con el trabajo de Zimmers *et al.*, 2002 donde encontraron que la administración de grandes cantidades de miostatina conducen a una disminución masiva de peso corporal total (30%) dentro de 16 días y el efecto es dosis dependiente. La pérdida de músculo representó 35-50% de la disminución de peso total. La reducción de la masa muscular fue debida a una disminución en el tamaño de la fibra. Además de la pérdida de músculo, hubo una ausencia casi total de tejido adiposo blanco, así como una disminución en la masa de otros tejidos (Zimmers *et al.*, 2002).

Igualmente, Reisz-Porszasz *et al.* 2003, encontraron en ratones que sobreexpresan la miostatina, una reducción de peso de 20-25% en los músculos esqueléticos individuales dentro de los 42 días de vida postnatal, y esto también se debió únicamente a la reducción en el tamaño de la fibra. La sobre-expresión de miostatina, además, condujo a una reducción del peso del corazón (17% de reducción)- Nuestros resultados indican aumentos significativos en el peso a la canal después de la vacunación con ADN; un estudio reciente ha mostrado que los pesos corporales de los ratones tratados con un anticuerpo monoclonal neutralizante contra miostatina aumentó 10% el peso corporal (Whittemore *et al.*, 2003), de manera similar los ratones que expresan una mutación dominante contra miostatina, mostraron un aumento de hasta el 35% en masa de músculo esquelético. En dos estudios independientes (Yang *et al.* 2001; Lee y McPherron 2001) con ratones transgénicos observaron un aumento de peso en canal de 48% a las 18 semanas. Nuestro trabajo demuestra que una vacuna de ADN contra miostatina puede promover un aumento en la masa muscular esquelética.

Al restarle los pesos del control negativo a las diferentes regiones evaluados se aprecia que los ratones inoculados con miostatina sin modificar antigénicamente, se redujo el peso en todas las regiones estudiadas, menos en la cabeza, la cual tuvo un ligero crecimiento y los tríceps en donde no hubo cambios. En general, en comparación al grupo control, con todas las construcciones genéticas con P2 y P30 se encontró un aumento en los pesos de las diferentes regiones corporales. El análisis estadístico prueba que con la construcción de la miostatina P2-P30 se obtuvo un aumento significativo en la región craneal, la región caudal y la cabeza. En los miembros posteriores, los tríceps y cuádriceps, el aumento significativo fue encontrado con todas las construcciones, en el caso del tríceps no se encontró efecto con P2. Este aumento en tríceps y cuádriceps concuerda con el estudio de Grobet *et al.*, 2003 en donde muestran que la inactivación postnatal del gen de la miostatina en el músculo estriado es suficiente para causar una hipertrofia muscular generalizada de la misma magnitud que la

observada para ratones knock-out de miostatina y que este aumento es debido a la hipertrofia (71%), así como hiperplasia (29%). Los músculos individuales de miostatina en ratones knock-out mostraron un aumento de peso de hasta 262% como en el caso del músculo pectoral (McPherron *et al.*, 1997). El músculo tibial anterior crecido puramente por hipertrofia. En contraste, el tamaño del grupo de musculos gastrocnemio/plantar aumento tanto por hipertrofia (71%) como hiperplasia (29%)(Zhu *et al.*, 2000).

El aumento en las masas musculares dado por la vacunación con las construcciones de miostatina modificada con los epítomos P2 y P30, nos indica que estos epítomos fueron capaces de modificar las propiedades antigénicas de la miostatina, logrando romper la barrera de reconocimiento de lo propio. Nuestros datos nos sugiere que el efecto de estos epítomos es aditivo y los validan como herramientas en vacunas para inducir estados de autoinmunidad con aplicaciones en la manipulación de actividades fisiológicas o en terapia oncológica.

Finalmente, aparentemente los cambios fisiológicos observados en los ratones inmunizados con la vacuna de la miostatina ADN no fueron acompañados por cambios físicos perjudiciales, lo que sugiere que la vacuna puede aumentar el tamaño del músculo esquelético sin efectos secundarios importantes. El aumento de los músculos por la vacuna de la miostatina ADN proporciona así una nueva estrategia farmacológica para incrementar el valor de las canales, así como el tratamiento de enfermedades asociadas con la pérdida de masa muscular. Sin embargo, se requieren estudios posteriores de seguridad y de efectos a largo plazo de la autoinmunidad. El presente estudio sienta las bases para el trabajo futuro en esta nueva estrategia emocionante y prometedora.

## **PERSPECTIVAS**

La mejora funcional del músculo por la vacuna de ADN contra miostatina, proporciona una nueva estrategia para aumentar la ganancia de peso en animales de abasto así como mejorar el rendimiento de la canal. En el presente estudio se sientan las bases para el trabajo futuro de esta nueva estrategia prometedora para el incremento de masa muscular del 6.5 al 80.76 %. Se requieren estudios posteriores de seguridad y de los efectos a largo plazo de la autoinmunidad.

Una aplicación importante de esta vacuna es en aspectos de producción animal. Será muy interesante evaluar el efecto de esta vacuna en diferentes especies animales de interés pecuario: cerdos, aves bovinos, ovejas. Valorar como se afectan las características de crecimiento, las proporciones corporales, la calidad de la carne, el rendimiento productivo y sus repercusiones económicas.

Esta vacuna indudablemente puede tener aplicaciones en aspectos médicos. Tanto en el área de medicina veterinaria como en humana, en el tratamiento de distrofias musculares, en estados de pérdida de masas musculares que se presenta en enfermedades crónicas, estados de postración prolongada o en el envejecimiento.

## REFERENCIAS

- Acosta J, Carpio Y, Borroto I, Gonzalez O, Estrada MP. 2005. Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype. *J Biotechnol* 119: 324–331.
- Amthor H, Christ B, Rashid-Doubell F, Kemp CF, Lang E, Patel K. 2002. Follistatin regulates bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) activity to stimulate embryonic muscle growth. *Dev Biol* 243:115–27.
- Amthor H, Connolly D, Patel K, Brand-Saberi B, Wilkinson DG, et al. 1996. The expression and regulation of *follistatin* and a *follistatin-like* gene during avian somite compartmentalization and myogenesis. *Dev. Biol.* 178:343–62
- Azevedo, V., Levitus, G., Miyoshi, A., Candido, A.L., Goes, A.M. & Oliveira, S.C. 1999. Main features of DNA-based immunization vectors. *Braz J Med Biol Res*, 32,147-53.
- Blader P, Rastegar S, Fischer N, Strahle U. 1997. Cleavage of the BMP-4 antagonist chordin by zebrafish tolloid. *Science* 278:1937–40.
- Bogdanovich S, Krag TO, Barton ER, Morris LD, Whittemore LA, Ahima RS, Khurana TS. 2002. Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature* 420: 418–421.
- Bohm, W., Kuhrober, A., Paier, T., Mertens, T., Reimann, J. & Schirmbeck, R. 1996. DNA vector constructs that prime hepatitis B surface antigen-specific cytotoxic T lymphocyte and antibody responses in mice after intramuscular injection. *J Immunol Methods*, 193, 29-40.
- Boyajeau D., Ménissier F., Valls Ortiz J.M., 1971. Document de travail sur le caractère des culard chez les bovins. 38p. (ronéoté) - synthèse des résultats publiés.

Capuccio I., Marchitelli C., Serracchioli A., Nardone A., Filippini F., Ajmone-Marsan P., Valentini A. 1998. A G-T transversion introduces a stop codon at the *mh* locus in hypertrophic Marchigiana beef subjects. *Animal Genetics*, 29 (suppl. 1): 51.

Carlson CJ, Booth FW, Gordon SE. 1999. Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 277:R601–6

Chapman, B.S., Thayer, R.M., Vincent, K.A. & Haigwood, N.L. 1991. Effect of intron A from human cytomegalovirus (Towne) immediate-early gene on heterologous expression in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 19, 3979-86.

Charlier C, Coppieters W, Farnir F, Grobet L, Leroy PL. 1995. The *mh* gene causing double-muscling in cattle maps to bovine chromosome 2. *Mamm. Genome* 6:788–92

Condon, C., Watkins, S.C., Celluzzi, C.M., Thompson, K. & Falo, L.D., Jr. 1996. DNA based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. *Nat Med*, 2, 1122-8.

Doe, B., Selby, M., Barnett, S., Baenziger, J. & Walker, C.M. 1996. Induction of cytotoxic T lymphocytes by intramuscular immunization with plasmid DNA is facilitated by bone marrow-derived cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 8578-83.

Ertl, H.C. & Xiang, Z. 1996. Novel vaccine approaches. *J Immunol*, 156, 3579-82.

Estrada-Parra, S., Estrada-García, I. 1996. Vacunas y vacunación. En: *Inmunología de memoria*. Editorial Médica Panamericana: México.

Fynan, E.F.; Webster, R.G.; Fuller, D.H.; Haynes, J.R.; Santoro, J.C. and Robinson, H.L. 1993. DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal and gene-gun inoculations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 90: 11478:11482).

Gamer, L.W., Wolfman, N.M., Celeste, A.J., Hattersley, G., Hewick, R., Rosen, V. 1999. "A novel BMP expressed in developing mouse limb, spinal cord and tail bud is a potent mesoderm inducer in *Xenopus* embryos". *Dev. Biol.* 208: 222-232.

Ge G, Greenspan DS. 2006. Developmental roles of the BMP1/TLD metalloproteinases. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 78: 47-68.

Gerrard D.E., Thrasher K.H., Grant K.L., Lemenager R.P. y Judge M.D. 1991. Serum-induced myoblast proliferation and gene expression during development of double muscled and normal cattle. *Journal of Animal Science*, 69 (supl. 1): 317.

Gonzalez-Cadavid NF, Taylor WE, Yarasheski K, Sinha-Hikim I, Ma K, Ezzat S, Shen R, Lalani R, Asa S, Mamita M, Nair G, Arver S, Bhasin S. 1998. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14938-14943.

Grobet L, Martin LJ, Poncelet D. 1997. A deletion in the bovine Myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle. *Nat Genet* 17:71-4.

Grobet L, Pirottin D, Farnir F. 2003. Modulating skeletal muscle mass by postnatal, muscle-specific inactivation of the Myostatin gene. *Genesis*;35:227-38.

Hanset R. y Michaux C. 1982. Creatine and creatinine levels in plasma red cells and muscles as characteristics of double-muscled cattle. En: *Muscle hipertrophy of genetic origin and its use to improve beef production*. Eds. J.W.B. King and F. Ménissier, pp. 237-256. (Martinus Nijhoff Publishers: The Hague).

Harding, C.V. & Song, R. 1994. Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules. *J Immunol*, 153,4925-33.

Hartikka, J., Sawdey, M., Cornefert-Jensen, F., Margalith, M., Barnhart, K., Nolasco, M., Vahlsing, H.L., Meek, J., Marquet, M., Hobart, P., Norman, J. &

- Manthorpe, M. 1996. An improved plasmid DNA expression vector for direct injection into skeletal muscle. *Hum Gene Ther*, 7, 1205-17.
- Hayette S, Gadoux M, Martel S, Bertrand S, Tigaud I. 1998. *FLRG* (follistatin-related gene), a new target of chromosomal rearrangement in malignant blood disorders. *Oncogene* 16:2949–54
- Hill JJ, Davies MV, Pearson AA, Wang JH, Hewick RM. 2002. The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. *J. Biol. Chem.* 277:40735–41
- Hill JJ, Qiu Y, Hewick RM, Wolfman NM. 2003. Regulation of myostatin in vivo by growth and differentiation factor-associated serum protein-1: a novel protein with protease inhibitor and follistatin domains. *Mol. Endocrinol.* 17:1144–54.
- Hooper R. 2005. Mighty mice hold key to muscle-wasting disease. *NewScientist*, <http://www.newscientist.com/article.ns?id=mg18825294.400> (last accessed August 2007).
- Kambadur R, Sharma M, Smith TPL, Bass JJ. 1997. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res.* 7:910–15
- Keller E.B. y Noon W.A. 1984. Intron splicing: a conserved internal signal in introns of animal premRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* ;81:7417-20.
- Klinman, D.M.; Takeno, M.; Ichino, M.; Gu, M.; Yamshechikov, G.; Mor, G. y Conover, J. 1997. DNA vaccines: safety and efficacy issues. *Springer Semin. Immunopathol.* 19: 245-256.
- Kocabas AM, Kucuktas H, Dunham RA, Liu Z. 2002. Molecular characterization and differential expression of the myostatin gene in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Biochim. Biophys. Acta* 1575:99–107.

Kowalczyk DW, Ertl HC. 1999. Immune responses to DNA vaccines. *Cell Mol Life Sci* 55:751-770.

Krieg, A.M. & Wagner, H. 2000. Causing a commotion in the blood: immunotherapy progresses from bacteria to bacterial DNA. *Immunol Today*, 21, 521-6.

Lee S-J, McPherron AC. 2001. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:9306–11

Lee SJ, Reed LA, Davies MV, Girgenrath S, Goad ME, Tomkinson KN, Wright JF, Barker C, Ehrmantraut G, Holmstrom J, Trowell B, Gertz B, Jiang MS, Sebald SM, Matzuk M, Li E, Liang LF, Quattlebaum E, Stotish RL, Wolfman NM. 2005. Regulation of muscle growth by multiple ligands signaling through activin type II receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 18117–18122.

Levitt, N., Briggs, D., Gil, A. & Proudfoot, N.J. 1989. Definition of an efficient synthetic poly(A) site. *Genes Dev*, 3, 1019-25.

Maccatrozzo L, Bargelloni L, Cardazzo B, Rizzo G, Patarnello T. 2001. A novel second myostatin gene is present in teleost fish. *FEBS Lett.* 509:36–40

Manuelidis, L. 1977. A simplified method for preparation of mouse satellite DNA. *Anal. Biochem.* 78:561-568.

Marchitelli C, Savarese MC, Cris`a A, Nardone A, Marsan PA, Valentini A. 2003. Double muscling in Marchigiana beef breed is caused by a stop codon in the third exon of myostatin gene. *Mamm. Genome* 14:392–95

Marques G, Musacchio M, Shimell MJ, Wunnenberg-Stapleton K, Cho KW, O'Conner MB. 1997. Production of a DPP activity gradient in the early *Drosophila* embryo through the opposing actions of the SOG and TLD proteins. *Cell* 91:417 26.

Massague J. 1992. Receptors for the TGF- $\beta$  family. *Cell*, 69: 1067-1070.

Matzuk MM, Lu N, Vogel H, Sellheyer K, Roop DR, Bradley A. 1995. Multiple defects and perinatal death in mice deficient in follistatin. *Nature* 374: 360–363.

McPherron A.C., Lawler A.M., Lee S.-J. 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- $\beta$  superfamily member. *Nature*, 387: 83-90.

McPherron A.C., Lawler A.M., Lee S.-J. 1999. Regulation of anterior/posterior patterning of the axial skeleton by growth/differentiation factor 11. *Nat Genet.*; 22:260-264.

McPherron A.C., Lee S.-J. 1996. The transforming growth factor  $\beta$  superfamily. *Growth factors and cytokines in health and disease*. Vol. 1B: 357-393. JAI Press Inc.

McPherron AC, Lee SJ. 2002. Suppression of body fat accumulation in Myostatin-deficient mice. *J Clin Invest* 109:595–601.

Menissier F. 1982. Present state of knowledge about the genetic determination of muscular hypertrophy or the double muscled trait in cattle. In *Muscle Hypertrophy of Genetic Origin and Its Use to Improve Beef Production*, ed. JWB King, F Mennisier, pp. 387–428.

Montgomery, D.L., Shiver, J.W., Leander, K.R., Perry, H.C., Friedman, A., Martinez, D., Ulmer, J.B., Donnelly, J.J. & Liu, M.A. 1993. Heterologous and homologous protection against influenza A by DNA vaccination: optimization of DNA vectors. *DNA Cell Biol*, 12, 777-83.

Nakamura T, Takio K, Eto Y, Shibai H, Titani K, Sugino H. 1990. Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science* 247:836–38

Nakashima, M., Toyono, T., Akamine, A., Joyner, A. 1999. “Expression of growth/differentiation factor 11, a new member of the BMP/TGF $\beta$  superfamily during mouse embryogenesis”. *Mech. Development* 80: 185-189.

Nichols, W.W., Ledwith, B.J., Manam, S.V. & Troilo, P.J. 1995. Potential DNA vaccine integration into host cell genome. *Ann N Y Acad Sci*, 772, 30-9.

Ostbye T-K, Galloway TF, Nielsen C, Gabestad I, Bardal T, Andersen O. 2001. The two myostatin genes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) are expressed in a variety of tissues. *Eur. J. Biochem.* 268:5249–57

Pappano WN, Steiglitz BM, Scott IC, Keene DR, Greenspan DS. 2003. Use of *Bmp1/Tll1* doubly homozygous null mice and proteomics to identify and validate in vivo substrates of BMP-1/tolloid-like metalloproteinases. *Mol. Cell. Biol.* 23:4428–38

Piccolo S, Agius E, Lu B, Goodman S, Dale L, DeRobertis EM. 1997. Cleavage of chordin by xolloid metalloprotease suggests a role for proteolytic processing in the regulation of Spemann organizer activity. *Cell* 91:407–16.

Ramazanov, Z., Jimenez del Rio, M., & Ziegenfuss, T. 2003. Sulfated polysaccharides of brown seaweed *Cystoseira canariensis* bind to serum myostatin protein. *Acta Physiol Pharmacol Bulg* 27 (2-3): 101-6.

Reisz-Porszasz S, Bhasin S, Artaza JN. 2003. Lower skeletal muscle mass in male transgenic mice with muscle-specific overexpression of Myostatin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 285:E876–E88.

Reyes-Sandoval A, Ertl HC. 2001. DNA vaccines. *Curr Mol Med*;1:217-243.

Robinson, H.L. & Torres, C.A. 1997. DNA vaccines. *Semin Immunol*, 9, 271-83.

Robinson, H.L.; Huni, L.A. and Webster, R.G. 1993. Protection against a lethal influenza challenge by immunization with a hemagglutinin-expressing plasmid DNA. *Vaccine*. 11: 957-960

Rodgers BD, Weber GM. 2001. Sequence conservation among fish myostatin orthologues and the characterization of two additional cDNA clones from *Morone saxatilis* and *Morone americana*. *Comp. Biochem. Phys. B* 129:597–603.

Royo M., 2003. Secuenciación y análisis del gen de la miostatina bovina. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria, Madrid.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning. A laboratory manual. Vol. 1. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.

Scott IC, Blitz IL, Pappano WN, Imamura Y, Clark TG, et al. 1999. Mammalian BMP-1/tolloid-related metalloproteinases, including novel family member mammalian tolloid-like 2, have differential enzymatic activities and distributions of expression relevant to patterning and skeletogenesis. *Dev. Biol.* 213:283–300

Siriatt V, Salerno MS, Berry C, Nicholas G, Bower R, Kambadur R, Sharma M. 2007. Antagonism of myostatin enhances muscle regeneration during sarcopenia. *Mol Ther* 15: 1463–1470.

Sunada Y. 2006. Therapeutic strategies for muscular dystrophy by myostatin inhibition. *Rinsho Shinkeigaku*:11: 942–944 [in Japanese].

Tang DC, DeVit M, Johnson SA. 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature*;356:152-154.

Tang L, Yan Z, Wan Y, Han W, Zhang Y. 2007. Myostatin DNA vaccine increases skeletal muscle mass and endurance in mice. *Muscle Nerve*: 36:342–348.

Tsuchida K, Arai KY, Kuramoto Y, Yamakawa N, Hasegawa Y, Sugino H. 2000. Identification and characterization of a novel follistatin-like protein as a binding protein for the TGF- $\beta$  family. *J. Biol. Chem.* 275:40788–96

Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ, *et al.* 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*;259:1745-1749.

Uytterhaegen L., Claeys E., Demeyer D., Lippens M., Fiems L.O., Boucqué C.Y., Van de Voorde G. Y Bastiaens A. 1994. Effects of double-muscling on carcass quality, beef tenderness and myofibrillar protein degradation in Belgian Blue White bulls. *Meat Science*, 38: 255-267.

Whittemore LA, Song K, Li X, Aghajanian J, Davies M, Girgenrath S, Hill JJ, Jalenak M, Kelley P, Knight A, Maylor R, O'Hara D, Pearson A, Quazi A, Ryerson S, Tan XY, Tomkinson KN, Veldman GM, Widom A, Wright JF, Wudyka S, Zhao L, Wolfman NM. 2003. Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. *Biochem Biophys Res Commun*: 300: 965–971.

Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*;247:1465-1468.

Wolfman NM, McPherron AC, Pappano WN, Davies MV, Song K, Tomkinson KN, Wright JF, Zhao L, Sebald SM, Greenspan DS, Lee SJ. 2003. Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. *Proc Natl Acad Sci USA*: 100:15842–15846.

Xiang, Z.Q., Spitalnik, S.L., Cheng, J., Erikson, J., Wojczyk, B. & Ertl, H.C. 1995. Immune responses to nucleic acid vaccines to rabies virus. *Virology*, 209, 569-79.

Xianyong MA, Yongchang CAO, Dingming SHU, Yingzuo BI. 2005. Cloning and expression of swine myostatin gene and its application in animal immunization trial. *Science in China Ser. C Life Sciences* Vol.48 No.4 368—374

Yamashita H, ten Dijke P, Huylebroeck D, Sampath TK, Andries M. 1995. Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects. *J. Cell Biol.* 130:217–26

Yang J, Ratovitski T, Brady JP, Solomon MB, Wells KD, Wall RJ. 2001. Expression of Myostatin pro domain results in muscular transgenic mice. *Mol Reprod Dev*;60:351–61.

Zachwieja JJ, Smith SR, Sinha-Hikim I, Gonzalez-Cadavid N, Bhasin S. 1999. Plasma myostatin-immunoreactive protein is increased after prolonged bed rest with low-dose T3 administration. *J Gravit Physiol*: 6: 11–15.

Zhao B, Wall RJ, Yang J. 2005. Transgenic expression of myostatin propeptide prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun*: 337:248–255.

Zhu X, Hadhazy M, Wehling M, Tidball JG, McNally EM. 2000. Dominant negative Myostatin produces hypertrophy without hyperplasia in muscle. *Fed Eur Biochem Soc Lett*;474:71–5.

Zimmers TA, Davies MV, Koniaris LG, Haynes P, Esquela AF, Tomkinson KN, McPherron AC, Wolfman NM, Lee SJ. 2002. Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science*: 296:1486–1488.

# ANEXOS

## Anexo 1. Alineamiento de miostatina (aminoácidos).

### Alineamiento miostatina aminoácidos

```

Miostatina Bovino 1 mqklqisvyiylfmlivagpvdlnenseqkenvekeglcnacnwrentssrleaikiqilsklrletapniskdairqlpkappllelidqfdvqrdassdgsleddyhartetvitmpesdlltqvegkpkcoff
Miostatina Cerdo 1 mqklqiyvyiylfmlivagpvdlnenseqkenvekeglcnacmwrgntkssrleaikiqilsklrletapniskdairqlpkapplrelidqydvqrdssdgsleddyhattetiitmpesdllmqvegkpkcoff
Miostatina Pollo 1 mqklavyvyiylfmqiavdpvaldgsaqptenaekdglcnactwrqntkssriaaikiqilsklrlegapnisdrikqlpkapplqelidqydvqrdssdgsleddyhattetiitmpesdflvqmegkpkcoff
Miostatina Ratón 1 mqklamvvyiylfmliaagpvdlnegsereenvekeglcnacawrontrvsriaaikiqilsklrletapniskdairqlprapplrelidqydvqrdssdgsleddyhattetiitmpesdflmoaddkpkcoff

Miostatina Bovino 421 kfsskiqynklvkaqlwiylrpvktptvfvqilrlikpmkdgtrytgirskldmnpgtgiwqsidvktvlqnlwkqpesnlgieikaldenghldavtfppegdgltpflekvtdtpkrsrrdfgldcdehstesr
Miostatina Cerdo 421 kfsskiqynkvkaqlwiylrpvktptvfvqilrlikpmkdgtrytgirskldmnpgtgiwqsidvktvlqnlwkqpesnlgieikaldenghldavtfppegdglpfpflekvtdtpkrsrrdfgldcdehstesr
Miostatina Pollo 421 kfsskiqynkvkaqlwiylrqvqkpttffvqilrlikpmkdgtrytgirskldmnpgtgiwqsidvktvlqnlwkqpesnlgieikafdetgrldavtfppegdglpfpflekvtdtpkrsrrdfgldcdehstesr
Miostatina Ratón 421 kfsskiqynkvkaalwiylrpvktptvfvqilrlikpmkdqtrvtgirsklidmnpqatwasiwkdvktvlqnlwkqpesnlgieikaldenghldavtfpqpaedglpfpflekvtdtpkrsrrdfgldcdehstesr

Miostatina Bovino 841 ccrypltvdfeargdwiiapkrykanycsgecefvflqkypthlvhqanprgsagpcctptkmspinmlyfngkeqiiykipamvvdrcgcs*
Miostatina Cerdo 841 ccrypltvdfeargdwiiapkrykanycsgecefvflqkypthlvhqanprgsagpcctptkmspinmlyfngkeqiiykipamvvdrcgcs*
Miostatina Pollo 841 ccrypltvdfeargdwiiapkrykanycsgecefvflqkypthlvhqanprgsagpcctptkmspinmlyfngkeqiiykipamvvdrcgcs*
Miostatina Ratón 841 ccrypltvdfeargdwiiapkrykanycsgecefvflqkypthlvhqanprgsagpcctptkmspinmlyfngkeqiiykipamvvdrcgcs*

```

Sequence	Start	End	#Match	NonMatch	%Match
Miostatina Bovino	1	1128			
Miostatina Cerdo	1	1128	360	16	95
Miostatina Pollo	1	1128	331	45	88
Miostatina ratón	1	1128	348	28	92

- █ Primer exón
- █ Segundo exón
- █ Tercer exón
- Péptido señal
- Péptido latente
- Péptido maduro

