



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EVALUACIÓN DE UNA VACUNA DE ADN CONTRA MIOSTATINA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
PRESENTA:

VIANEY RAMÍREZ ANDONEY

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:
DR. ROGELIO A. ALONSO MORALES
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. ALICIA ORTEGA AGUILAR
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DR. JUAN JOEL MOSQUEDA GUALITO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, UAQ.

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, ENERO 2020



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 Alan mi motor, mi pequeño acompañante de vida quien me brinda siempre amor sincero e incondicional, mi pequeño guerrero y mi amor chiquito.

Para mi familia. Carlota, Federico y 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 sus sabios consejos, por el amor que le tiene un abuelo a un nieto, por apoyarme siempre y por toda la confianza y amor que tienen en mí.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, los que han pasado y los que se han quedado, por hacer mis momentos amenos y ser una segunda familia. 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

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.

A mi director y tutor de Tesis, Doctor Rogelio A. Alonso Morales su esfuerzo y dedicación. Sus conocimientos, su orientación, 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. Ha sido capaz de ganarse mi lealtad, admiración y agradecimiento.

A las enseñanzas prácticas de la técnica del Laboratorio de Genética Molecular la Bióloga Amanda Gayosso Vázquez. Por su visión, motivación y optimismo, sin su apoyo y asesoría habría sido muy difícil.

INDICE

RESUMEN.....	10
INTRODUCCIÓN.....	11
MARCO TEÓRICO.....	13
Antecedentes.....	13
Actividad de la miostatina en el desarrollo.....	14
Descubrimiento de miostatina.....	14
Estructura del gen y de la proteína miostatina.....	16
Mecanismo de acción de la miostatina.....	18
Regulación de la miostatina.....	21
Características productivas y reproductivas en la mutación del gen de la miostatina.....	22
Aspectos comparados entre especies.....	22
Estudios de la miostatina en bovinos.....	23
Manipulación de la miostatina: aplicaciones clínicas.....	24
Anticuerpos anti-miostatina.....	24
Competencia por los receptores.....	24
El propéptido de la miostatina.....	25
Miostatina trunca.....	25
Folistatina e histona deacetilasa (HDAC).....	25
Inhibición del RNA de la miostatina (siRNA).....	26
Vacuna de ADN contra la miostatina.....	26
Vacunas de ADN.....	27
Inducción de la respuesta inmunitaria por vacunas de ADN.....	27
Ventajas y desventajas de las vacunas de ADN.....	28
Prime boost heterólogo.....	30
JUSTIFICACIÓN.....	31
HIPÓTESIS.....	31
OBJETIVO GENERAL.....	32

OBJETIVOS PARTICULARES.....	32
MATERIAL Y MÉTODOS.....	33
Construcciones genéticas de miostatina P2-Miostatina-P30 y obtención de vacunas génicas.....	33
Clonación y expresión de P2-Miostatina-P30 recombinante en PET11a.....	34
Inducción de la P2-Miostatina P30 recombinante.....	34
Purificación y caracterización de la expresión de la proteína P2-Miostatina-P30.....	35
Purificación de la P2-Miostatina-P30 recombinante.....	35
Cuantificación de la proteína.....	36
Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS).....	36
Tinción de geles de poliacrilamida con azul de Coomassie.....	36
Electroinmunotransferencia de proteínas a papel de nitrocelulosa (Western blot).....	36
Evaluación en ratones de diferentes esquemas de inmunización con la vacuna de ADN y la proteína P2-Miostatina-P30.....	37
Esquemas de Inmunización.....	37
Evaluación de la respuesta fenotípica e inmunológica en los esquemas de inmunización con los inmunógenos de P2-Miostatina-P30.....	38
Evaluación de la canal.....	38
Evaluación de la respuesta inmune contra la miostatina.....	39
Evaluación estadística.....	40
RESULTADOS.....	41
Clonación y expresión de la P2-Miostatina-P30 en PET11a.....	41
Inducción de la proteína recombinante.....	42
Purificación de la proteína recombinante.....	42
Evaluación de los esquemas de inmunización.....	43
Evaluación fenotípica.....	43

Evaluación de la reactividad de los sueros hiperinmunes de cerdos con la proteína recombinante.....	49
DISCUSIÓN.....	51
CONCLUSIÓN.....	54
BIBLIOGRAFIA.....	55
Anexo 1. Pesos individuales de ratones en los diferentes esquemas de inmunización.....	65

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1.- Características de las vacunas y su comparación con las vacunas de ADN.

Tabla 2.- Secuencia de primers para las construcciones génicas.

Figura 1.- Características generales del gen y la proteína miostatina.

Figura 2.- Estructura de la proteína miostatina.

Figura 3.- Alineamiento de la miostatina.

Figura 4.- Secreción, activación y actividad de la miostatina.

Figura 5.- Mapa de las construcciones genéticas de la miostatina

Figura 6.- Esquema de inmunización en ratones contra la miostatina.

Figura 7.- Protocolo de inmunización para la obtención de suero hiperinmune de cerdo.

Figura 8.- Amplificación de la miostatina.

Figura 9.- Evaluación de la purificación de la P2-Miostatina-P30.

Figura 10.- Ganancia de peso semanal.

Figura 11.-. Diferencias en el peso corporal de ratones después del protocolo de inmunización.

Figura 12. Promedios de peso corporal de ratones después del protocolo de inmunización

Figura 13. Titulación de la miostatina recombinante.

Figura 14.- Evaluación de la producción de anticuerpos en los diferentes grupos de inmunización.

ABREVIATURAS

ACTRII – Receptor de activina II.

ACVR2B. Receptor de activina tipo 2B.

APC. células presentadoras de antígenos.

ARN. Ácido ribonucleico.

ARNi. ARN de interferencia.

BMP-1/tolloid. Receptor de la proteína morfogenética ósea 1

BMP-11 Proteína morfogenética ósea 11

BMP-6. Proteína morfogenética ósea 6

CDK Ciclina

CMV. Citomegalovirus.

FLRG. Proteína de unión a activina.

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

GDF-11 Factor de crecimiento transformante 11

GDF-8 Factor de crecimiento transformante 8

GDF-9 Factor de crecimiento transformante 9

GDF11. Factor de diferenciación de crecimiento 11.

HDAC. Histona deacetilasa

MHC Complejo mayor de histocompatibilidad

miRNA. Micro ARN.

MyoD. proteína 1 de diferenciación miogénica.

PCR. Reacción en cadena polimerasa.

siRNA. ARN de interferencia.

Smad 2. Proteína 2 transductora de señales extracelulares ligadas al factor de crecimiento transformante β .

Smad 2. Proteína 2 transductora de señales extracelulares ligadas al factor de crecimiento transformante β .

Smad 3. Proteína 3 transductora de señales extracelulares ligadas al factor de crecimiento transformante β .

Smad 3. Proteína 3 trasdutora de señales extracelulares ligadas al factor de crecimiento transformante β .

Smad 4. Proteína 4 trasdutora de señales extracelulares.ligadas al factor de crecimiento transformante β .

Smad 4. Proteína 4 trasdutora de señales extracelulares.ligadas al factor de crecimiento transformante β .

TAP-1 Transportador 1 asociado con el procesamiento de antígenos 1

TAP-11 Transportador11 asociado con el procesamiento de antígenos

TGFB's Factores de crecimiento transformantes

TGF- β Factor de crecimiento transformante β

TLL-2 Proteína tipo 2. Proteasa.

Vgr-1 proteína morfogenética ósea-6, o BMP-6

RESUMEN

La miostatina es una proteína miembro de la familia del factor de crecimiento transformante β que actúa como un regulador negativo del crecimiento muscular. La interferencia de su actividad biológica incrementa el crecimiento del músculo esquelético, efecto que tiene aplicaciones clínicas y en el área de producción animal. Una estrategia para bloquear la acción de la miostatina es la inducción de una respuesta inmune contra ella. En este trabajo, se evaluaron esquemas de inmunización empleando una vacuna de ADN que expresa la miostatina recombinante fusionada a los epítotos P2 y P30 de la toxina tetánica, así como la proteína recombinante expresada en *E.coli*.

La vacuna de ADN de miostatina P2-P30, se evaluó previamente observando la capacidad de inducir crecimiento muscular en ratones, aunque empleando 4 inmunizaciones y grandes cantidades de ADN (100 μ g). Para mejorar la respuesta inmune, se evaluó un esquema de inmunización de refuerzo heterólogo (prime-boost heterólogo) donde la inoculación de la vacuna de ADN es seguida por la inmunización con la -miostatina-P2-P30 recombinante expresada en *E. coli*. En grupos de ratones control e inmunizados con dos y cuatro inmunizaciones con la vacuna génica o el antígeno recombinante y prime-boost, se registró el peso de los diferentes segmentos corporales, observando un mayor aumento de la masa muscular en el esquema de prime-boost heterólogo, lo que nos indica que es una estrategia de vacunación prometedora al reducir el tiempo y la cantidad de antígeno utilizado para inducir una respuesta inmune a la miostatina expresada en un incremento de la masa muscular.

INTRODUCCIÓN

La miostatina, también conocida como factor de crecimiento y diferenciación-8 (GDF-8), es un miembro de la familia del factor de crecimiento transformante- β que desempeña un papel esencial en la regulación del crecimiento del músculo esquelético (McPherron, Lawler and Lee, 1997; Amthor *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2002). La miostatina actúa como un regulador negativo del crecimiento del músculo esquelético y está altamente conservada a lo largo de la evolución (McPherron, Lawler and Lee, 1997).

Se ha demostrado en varias especies que las mutaciones nulas que ocurren naturalmente en el gen de la miostatina conducen a aumentos significativos en la masa del músculo esquelético, la fuerza muscular y la reducción de la acumulación de grasa (Grobet *et al.*, 1997; Kambadur *et al.*, 1997; Langley *et al.*, 2002; Schuelke *et al.*, 2004; Mosher *et al.*, 2007; Ogradniczuk and Oliffe, 2010). Los ratones knockout de miostatina, muestran igualmente incrementos en la masa muscular (Grobet *et al.*, 2003). Por otro lado, la administración sistemática de miostatina exógena en ratones adultos induce una disminución general de la masa muscular (Zimmers *et al.*, 2000). Los antagonistas de miostatina, como anticuerpos monoclonales y policlonales específicos de miostatina y folistatina, así como los antagonistas de los receptores de activina tipo II, pueden aumentar también significativamente la masa del músculo esquelético (Lee and McPherron, 2001; Bogdanovich *et al.*, 2002; Whittemore *et al.*, 2003; Lee, 2004).

La inhibición de la actividad de la miostatina puede tener beneficios potenciales para los productores de ganado, ya que puede aumentar el rendimiento del crecimiento y el contenido de carne magra en la canal. Actualmente, hay pocos informes disponibles sobre la supresión de la actividad de miostatina en especies de ganado. Se ha demostrado que la inmunización activa contra la miostatina, conduce a la producción de anticuerpos contra la miostatina mejorando el porcentaje de carne magra en las canales de cerdo (Long *et al.*, 2009).

La miostatina es una proteína altamente conservada y débilmente inmunogénica debido a tolerancia inmunológica. Las vacunas de ADN quimérico con el gen de miostatina que incorporan epítomos inmuno-potenciadores, pueden llevar a superar la tolerancia inmunitaria mediante un proceso en el que un epítomo dominante en una proteína de fusión aumenta la respuesta a otros epítomos con inmunidad débil (Gerloni *et al.*, 2000). Dos de estos elementos inmuno-potenciadores son los péptidos de toxina tetánica P2 y P30 (Valmori *et al.*, 1992). Anteriormente, se ha demostrado que el epítomo de la toxina tetánica P2 unida al gen de miostatina administrado como una vacuna de ADN en ratones aumenta la masa muscular (Tang *et al.*, 2007).

Una práctica común en la vacunación para obtener una respuesta inmune efectiva es inmunizar varias veces con el mismo inmunógeno, esto se conoce como refuerzo primario homólogo (prime-boost). Se ha demostrado que el refuerzo con el mismo antígeno administrado de manera diferente, conocido como refuerzo primario heterólogo (prime-boost heterólogo), mejora significativamente la inmunización, induciendo respuestas humorales y celulares (Lu, 2009).

En este estudio, evaluamos el efecto sobre el crecimiento muscular en grupos de ratones de la construcción quimérica de la miostatina fusionada a los epítomos P2-P30 como una vacuna de ADN, así como el antígeno recombinante expresado en *E. coli*. Se probó un esquema de inmunización prime-boost heterólogo en comparación a grupos de ratones controles negativos e inmunizados con dos y cuatro inmunizaciones con la vacuna génica o el antígeno recombinante.

MARCO TEÓRICO

Antecedentes

El fenotipo doble músculo es una característica descrita en algunas razas bovinas que se manifiesta como un incremento de la masa muscular del animal. El origen de este fenotipo se encuentra en mutaciones del 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 (McPherron, Lawler and Lee, 1997).

Diversos estudios concuerdan en que la miostatina regula el número final de fibras de músculo durante el desarrollo bloqueando la proliferación y diferenciación de mioblastos, regulando el tamaño de la fibra del músculo y manteniendo las células satélites en un estado pasivo e inhibiendo la síntesis de proteína (Clair, Della-Fera and Baile A., 2001). De esta forma, es posible que esta proteína y moléculas con las que interactúa pueden ser blancos terapéuticos para incrementar el crecimiento muscular. La inhibición de la actividad de la miostatina puede tener importantes aplicaciones no solo en producción pecuaria también pueden tener un potencial terapéutico en humanos. La interferencia de la acción de la miostatina *in vivo* se ha logrado por la administración de sus inhibidores naturales como la folistatina (Matzuk *et al.*, 1995; Zimmers *et al.*, 2000; Lee and McPherron, 2001), antagonistas de los receptores de activina tipo II (Lee *et al.*, 2005), a través de anticuerpos monoclonales o policlonales (Bogdanovich *et al.*, 2002; Whittemore *et al.*, 2003), así como también con la misma proteína recombinante, obteniéndose un aumento significativo de las masas musculares. Sin embargo, estos procedimientos son costosos y complicados. En contraste la inducción de una respuesta auto-inmunitaria contra miostatina puede ofrecer una alternativa prometedora.

Ensayos previos en el laboratorio de genética molecular muestran que es posible establecer estados de autoinmunidad específica a blancos determinados mediante su modificación antigénica con los epítomos P2-P30. Muy probablemente estos resultados pueden mejorar si se emplean esquema de inmunización "prime-boost" para reducir la frecuencia de inmunizaciones.

Actividad de la miostatina en el desarrollo

Durante el desarrollo embrionario, cuando se segmenta el mesodermo somítico para originar somitos embrionarios, todas sus células tienen las mismas capacidades de diferenciación. Sin embargo, a medida que maduran, las distintas regiones de los somitos se determinan para diferenciar sólo tipos celulares concretos (Climent *et al.*, 2002). Los mioblastos se desarrollan a partir de células miogénicas precursoras, que son de origen mesodérmico. Estas células están destinadas a entrar en el linaje miogénico y son capaces de proliferar y establecer un grupo de mioblastos. Los mioblastos se alinean formando cadenas de células que se unen por sus extremos gracias a las glucoproteínas de la membrana para formar un sincitio. En las zonas de contacto la membrana plasmática se reorganiza y señales especiales causan que los mioblastos salgan al ciclo celular, para que dejen de dividirse y diferenciarse, desprendiéndose de las proteínas y enriqueciéndose en fosfolípidos, requisito indispensable para que ocurra la fusión y finalmente se formen miotubos multinucleados. Ambos procesos, dependen de Ca^{2+} y el final del proceso consiste en la formación de los miotubos (Rehfeld, 2004). Todo este mecanismo es regulado por diferentes proteínas, la principal reguladora del crecimiento muscular es la miostatina.

Descubrimiento de la miostatina

En 1997, Mc Pherron *et al.*, identificaron en ratón, mediante PCR degenerativa, un nuevo miembro de la superfamilia de los TGF β : 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 TGF β , y particularmente con TGF β -1, de 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 Vgr-1 (BMP-6), en cuanto a su mayor homología de aminoácidos entre la primera cisteína conservada y el final de la cadena C-terminal (45%). Massagué (1998) la clasificó en un grupo de proteínas 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 TGF β más semejante en estructura primaria a la miostatina es el GDF-11 o BMP-11 (McPherron, Lawler and Lee, 1997; Gamer *et al.*, 1999; Nakashima *et al.*, 1999), factor descubierto posteriormente a la miostatina y que se expresa en el 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 del 90% de aminoácidos en su región C-terminal.

La secuencia de miostatina tiene todas las características presentes en los miembros de la familia, incluyendo la secuencia N-terminal, el sitio de procesamiento proteolítico, y el dominio C-terminal, que contiene nueve residuos de cisteína (McPherron, Lawler and Lee, 1997; Gamer *et al.*, 1999; Nakashima *et al.*, 1999). Durante la embriogénesis GDF-8 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 y limita el crecimiento de las fibras musculares (McPherron, Lawler and Lee, 1997). El aumento de la masa muscular en ratones nulos de miostatina se observa desde edad temprana y se mantiene por toda la vida (McPherron and Lee, 2002). Significativamente, los ratones nulos 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 depende de su concentración (McPherron, Lawler and Lee, 1997).

Análisis de los músculos de ratones mutantes homocigotos mostraron que el aumento de la masa muscular resulta de una combinación de hiperplasia (aumento del número de fibras musculares) e hipertrofia (aumento de tamaño de la fibra) (McPherron, Lawler and Lee, 1997). Existen evidencias de que miostatina es específica de un tipo de fibras (Ji *et al.*, 1998; Carlson, Booth and Gordon, 1999). Así

pues, la miostatina podría modular la expresión del gen que controla el tipo de fibra muscular.

Estructura del gen y de la proteína miostatina

La secuencia de ADN 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 codón serina entre la base uno y dos. En la región 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 and Noon, 1984) (Figura 1).

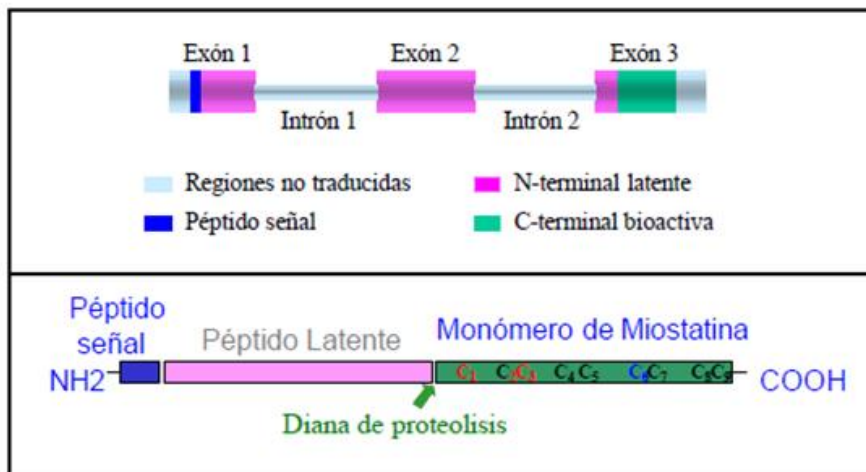


Figura 1.- Características generales del gen y la proteína miostatina. Esquema de la estructura del gen de miostatina bovina y regiones codificantes de la proteína.

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 and 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 (McPherron, Lawler and Lee, 1997; Royo, 2003). 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 2).

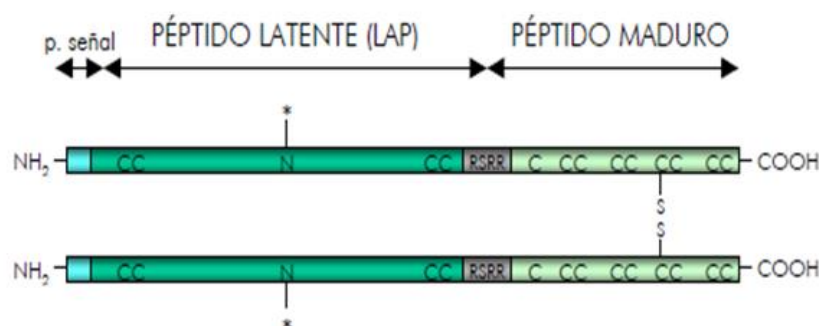


Figura 2.- Estructura de la proteína miostatina. Miostatina está formada por un péptido señal, un péptido latente, un dominio carboxi-terminal y un sitio de proteólisis (RSS). La molécula bioactiva está formada por un dímero de fragmentos carboxiterminales unidos por un puente disulfuro (S) y nueve residuos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

Promotor: El promotor de miostatina está 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).

Proteína: La miostatina está formada por un péptido señal, un péptido latente, y un dominio en la región carboxi-terminal caracterizado por nueve residuos de cisteína, teóricamente involucrados en la formación de puentes disulfuro intra- e intercatenarios (Royo, 2003). Se sintetiza como una preproteína, que se procesa proteolíticamente, para dejar libres a las moléculas bioactivas que formarán dímeros del dominio carboxi-terminal, unidos por puentes disulfuro (Massague, 1992; McPherron and Lee, 1996; Carlson, Booth and Gordon, 1999).

Su estructura se caracteriza por poseer:

1. Un grupo de aminoácidos hidrofóbicos cerca del extremo N-terminal que funciona como señal para su secreción.
2. Una forma precursora que es proteolíticamente procesada, liberando un fragmento bioactivo de la región carboxiterminal y otro de la región aminoterminal. Al fragmento aminoterminal se le denomina péptido asociado latente, y mientras permanece unido, mantiene al TGF- β en un estado latente.
3. Una región carboxiterminal muy conservada entre los miembros de la familia, que contiene 9 residuos de cisteína localizados en lugares característicos (McPherron and Lee, 1996)

La molécula activa está formada por un dímero proveniente de fragmentos carboxiterminales unidos por puentes disulfuro. En la mayoría de los casos la forma activa está formada por homodímeros, aunque existen casos de heterodímeros entre diferentes miembros de la familia, quienes presentan actividades distintas a las que presentan los homodímeros. (Figura 3).

Mecanismo de acción de la miostatina

La miostatina se expresa fundamentalmente en músculo esquelético y se secreta en el 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 (a través de un efecto) en las células precursoras musculares, ejerciendo una regulación de la masa muscular (Slack, 1993).

Miostatina Bovino 1 nqklqisvviylfmlivagpvdlnenseqkenvekeglcnaclwrenttserleaikiqilsklrletapniskdairqlpkappilelidqfdvqrdassdgsleddyhartetvitmpresdlltqvegkpkcoff

Miostatina Cerdo 1 nqklqiyvviylfmlivagpvdlnenseqkenvekeglcnaclwrenttserleaikiqilsklrletapniskdairqlpkappilelidqfdvqrdassdgsleddyhartetvitmpresdllmqvegkpkcoff

Miostatina Pollo 1 nqklavyvviylfmgiaavpvaldgssqptenaekdglcnaclwrenttserleaikiqilsklrletapniskdairqlpkappilelidqfdvqrdassdgsleddyhartetvitmpresdflvqmegkpkcoff

Miostatina Ratón 1 nqklamvviylfmliaaavpvaldgssqptenaekdglcnaclwrenttserleaikiqilsklrletapniskdairqlpkappilelidqfdvqrdassdgsleddyhartetvitmpresdflmadokkcoff

Miostatina Bovino 421 kfsskiqynklvkaqlwiylrpvktptvfvqilrlrikpmkdgtrytgirskldmnpqgtgiwgsidvktvlqnlwkqpesnlgieikaldenghdlavtfpqpgedglnpflvkvtdtpkrerrdflgdodehsteer

Miostatina Cerdo 421 kfsskiqynkvvkaqlwiylrpvktptvfvqilrlrikpmkdgtrytgirskldmnpqgtgiwgsidvktvlqnlwkqpesnlgieikaldenghdlavtfpqpgedglnpflvkvtdtpkrerrdflgdodehsteer

Miostatina Pollo 421 kfsskiqynkvvkaqlwiylrqvqkptvfvqilrlrikpmkdgtrytgirskldmnpqgtgiwgsidvktvlqnlwkqpesnlgieikaldenghdlavtfpqpgedglnpflvkvtdtpkrerrdflgdodehsteer

Miostatina Ratón 421 kfsskiqynkvvkaqlwiylrpvktptvfvqilrlrikpmkdgtrytgirskldmnpqgtgiwgsidvktvlqnlwkqpesnlgieikaldenghdlavtfpqpgedglnpflvkvtdtpkrerrdflgdodehsteer

Miostatina Bovino 841 ccryptvdfaeafgdwiiapkrykanycsgecefvflqkypthlvhqanprqsagpcoctptkmspinmlyfngkeqiiygkipanvvdrogs*

Miostatina Cerdo 841 ccryptvdfaeafgdwiiapkrykanycsgecefvflqkypthlvhqanprqsagpcoctptkmspinmlyfngkeqiiygkipanvvdrogs*

Miostatina Pollo 841 ccryptvdfaeafgdwiiapkrykanycsgecefvflqkypthlvhqanprqsagpcoctptkmspinmlyfngkeqiiygkipanvvdrogs*

Miostatina Ratón 841 ccryptvdfaeafgdwiiapkrykanycsgecefvflqkypthlvhqanprqsagpcoctptkmspinmlyfngkeqiiygkipanvvdrogs*

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

Figura 3.- Alineamiento de la miostatina. Se muestra el alineamiento de aminoácidos de la miostatina de bovino, cerdo, pollo y ratón. Con líneas se muestran los tres exones y en línea punteada el péptido, señal, péptido latente y péptido maduro.

Durante el procesamiento, el propéptido se escinde de la región madura y se forma un complejo con dos péptidos maduros conectados por enlaces disulfuro. 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 e inducir la inducción de la expresión. Dentro de la célula, la miostatina inhibe la expresión de factores de regulación miogénica, como MyoD y estimulantes de la quinasa dependientes de ciclina (Cdk), tales como p21 (Figura 4).

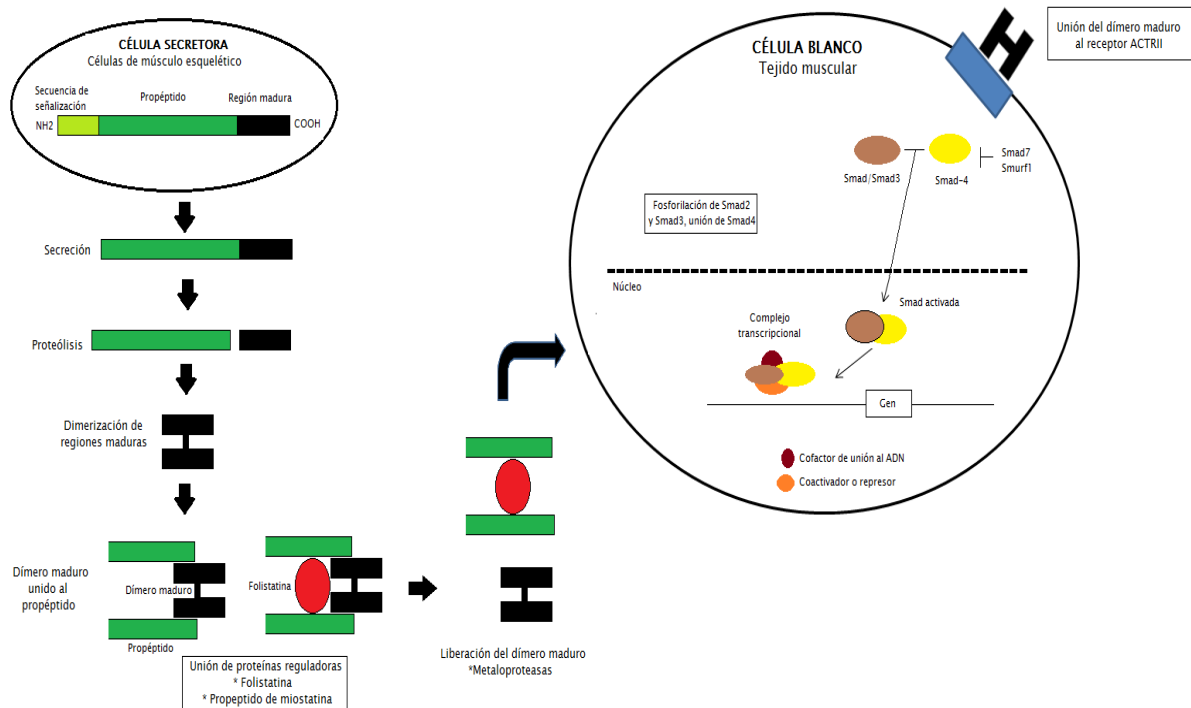


Figura 4.- Secreción, activación y actividad de miostatina. El propéptido puede inhibir la señalización de miostatina uniéndose al dímero activo. El dímero activo de miostatina (miostatina madura) se une al receptor ACTRIIB el cual recluye y activa por transfosforilación al receptor ACTRII/TβR1. Smad2 y Smad3 son subsecuentemente activados, forman un complejo con Smad4 y son traslocados al núcleo activando el gen blanco de expresión.

Regulación de la actividad de 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 la miostatina es la escisión proteolítica del propéptido. Miembros de las metaloproteinasas (BMP)-/tolloid son capaces de escindir el propéptido presente en la región N-terminal inmediata al residuo aspartato 76, la importancia de estas proteasas radica en la regulación de miostatina *in vivo* (Lee and McPherron, 2001). 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% (Grobet *et al.*, 1997). La interpretación más simple de estos resultados es que el propéptido mutante es capaz de formar complejos latentes con miostatina que son resistentes a la activación de las proteasas de la familia BMP-1/tolloid. Se ha demostrado previamente que este grupo de proteasas desempeña un papel análogo en la regulación de las actividades de algunos miembros de la familia TGF- β (Blader *et al.*, 1997; Marqués *et al.*, 1997; Piccolo *et al.*, 1997; Scott *et al.*, 1999; Pappano *et al.*, 2003). Es interesante mencionar que uno de los miembros de la familia BMP-1/tolloid, se expresa específicamente en el músculo esquelético durante la embriogénesis (Scott *et al.*, 1999), aumentando la posibilidad de que la proteasa TLL-2 activa la miostatina durante el desarrollo embrionario.

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 proteínas de la familia TGF- β (Yamashita *et al.*, 1995; Iemura *et al.*, 1998; Nakashima *et al.*, 1999). Estudios previos sugieren que la folistatina se expresa en las células del miotoma y funciona como un potente antagonista de la miostatina (Amthor *et al.*, 2002). La sobreexpresión de folistatina en los músculos puede causar un aumento dramático en el crecimiento muscular por el contrario, la pérdida de folistatina disminuye la masa muscular (Lee and McPherron, 2001).

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- β (Hayette *et al.*, 1998; Tsuchida *et al.*, 2000).

Características productivas y reproductivas en la mutación del gen de miostatina

Los animales hipermusculados poseen al nacimiento casi el doble de fibras musculares que los animales normales (Fiems, 2012). También se ha encontrado que tienen un contenido menor en tejido conectivo (Boccard, 1982).

Las canales de los animales hipermusculados, presentan menos grasa intramuscular y un color más pálido (Boccard, 1982). Las canales de animales que presentan hipertrofia muscular hereditaria, presentan 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) (Fiems, 2012).

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 (Menissier, 1982).

Aspectos comparados entre 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, y, de hecho, las mutaciones en el gen de la miostatina se han demostrado son responsables del fenotipo de doble musculatura en el ganado bovino (Grobet *et al.*, 1997; Kambadur *et al.*, 1997; McPherron, Lawler and Lee, 1997).

La miostatina también se ha identificado en diferentes especies de peces (McPherron, Lawler and Lee, 1997; Maccatrozzo *et al.*, 2001; Østbye *et al.*, 2001; Rodgers *et al.*, 2001; Fan *et al.*, 2016). Sin embargo, la secuencia de la proteína miostatina en los peces es bastante divergente en comparación con la de otros vertebrados. Esta comparación de secuencias, junto con la observación de que estos genes se expresan en una gama mucho más amplia de tejidos en los peces, sugiere de que la divergencia entre la miostatina y GDF-11 se produjo después del origen de los peces por los genes del precursor ancestral original (Østbye *et al.*, 2001).

Estudios de la miostatina en bovinos

El estudio de la miostatina está ampliamente enfocado al ganado bovino. Los bovinos con mutaciones en la miostatina denominados “doble musculatura” se caracterizan por la hipertrofia de los músculos en las regiones de la zona proximal anterior y cuartos traseros y protrusión muscular con límites intermusculares 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 (Michaux, 1985; Charlier *et al.*, 1995; Grobet *et al.*, 1997). 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; Carlson, Booth and Gordon, 1999).

Manipulación de la miostatina: aplicaciones clínicas

Existen enormes incentivos comerciales para desarrollar estrategias farmacológicas 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) (Gonzalez-Cadavid *et al.*, 1998). Tratamientos que estimulan el crecimiento muscular sin ejercicio, lo que sería especialmente útil para personas con movilidad reducida o confinados a la cama por períodos prolongados (H.Q. Han and William E. Mitch, 2011). Existen una serie de estrategias para la inhibición de la miostatina en la actualidad bajo investigación clínica o preclínica. Que van desde la inhibición de la actividad de la miostatina hasta la inhibición de su síntesis.

Anticuerpos anti-miostatina.

La inyección de anticuerpos anti-miostatina en ratones adultos jóvenes provocó hipertrofia muscular (Bogdanovich *et al.*, 2002). En los ratones adultos normales, las inyecciones semanales de un anticuerpo monoclonal anti-miostatina ha mostrado inducir hipertrofia del 13-30% de la masa muscular y un 10% de aumento en la fuerza (Whittemore *et al.*, 2003).

Competencia por los receptores.

Otro enfoque terapéutico es la introducción de una versión soluble del receptor de activina tipo IIB (ACTRII) 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 inyecta en ratones de tipo salvaje (Lee *et al.*, 2005).

El propéptido de la miostatina.

La miostatina circulante se activa cuando el propéptido se escinde por la proteasa BMP-1/tolloid (Hill *et al.*, 2003), por lo tanto la inhibición de esta enzima proteolítica bloquea la actividad de miostatina (Zimmers *et al.*, 2000). Sin embargo, esta estrategia es arriesgada ya que las proteasas BMP-1/tolloid están involucradas en una gran variedad de sistemas de desarrollo (Ge and Greenspan, 2006). Una estrategia alternativa, es el uso de un propéptido sintético modificado para ser resistente a la ruptura enzimática. Los ratones inyectados con una proteína modificada tuvieron un incremento del 27% de la masa muscular en un mes, sin efectos negativos reportados. La sobre-expresión del propéptido de miostatina en ratones transgénicos suprimió la acumulación de grasa y estimulo la hiperplasia muscular (45 a 115%, dependiendo del músculo) (Wolfman *et al.*, 2003).

Miostatina trunca.

El tratamiento con anti-miostatina ha demostrado mejorar efectivamente la regeneración muscular en ratones viejos después de UNA lesión y el desgaste muscular relacionado con la edad (Siriatt *et al.*, 2007). Inyecciones subcutáneas de anti-miostatina, aumentan la miogénesis (Sunada, 2006). Si resultados similares se pueden lograr en los seres humanos, este tratamiento podría aumentar la masa muscular y velocidad de reparación.

Folistatina e histona deacetilasa (HDAC).

La 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; Zimmers *et al.*, 2000; Lee and McPherron, 2001). La variación genética en el gen de folistatina contribuyen a la variación de la masa y fuerza muscular en humanos (Amthor *et al.*, 2004). 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 and McPherron, 2001). Un método alternativo para bloquear la miostatina puede

ser a través de la inducción de follistatina mediante la administración de la HDAC (Gaviño *et al.*, 2013). Los inhibidores de HDAC, impiden que las histonas se unan al ADN y por lo tanto permiten que se produzca la transcripción de follistatina (Amthor *et al.*, 2002). Recientemente, se ha demostrado que los inhibidores de HDAC, activan la expresión de follistatina en las células del músculo esquelético y en los músculos lesionados (Iezzi *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 a 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 mostraron 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).

Vacuna de ADN contra miostatina.

El desarrollo de una vacuna de ADN específica contra miostatina mostro una mejoría funcional en el crecimiento muscular en los ratones inmunizados. La masa muscular de los ratones inmunizados con una vacuna de ADN modificada con los epítomos P2, P30 de la toxina tetánica se encontró un aumento significativo en relación con el grupo control (Ramírez-Andoney, 2013), y lo más importante una mejora funcional de la resistencia muscular incrementando la masa muscular (Tang *et al.*, 2007). 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.

Vacunas de ADN

Las vacunas de ADN, también conocidas como vacunas genéticas, vacunas de ácidos nucleicos o vacunas de ADN desnudo, entre otros términos, emplean una metodología relativamente simple que ha abierto una nueva era en la inmunología, con un alto potencial como vacunas profilácticas y terapéuticas (Indresh K. Srivastava and Margaret A. Liu, 2003). Todo esto se debe a que combinan muchas de las características deseables de las vacunas tradicionales, pero ofrecen las siguientes ventajas adicionales: a) seguridad, dado que no usan microorganismos vivos; b) capacidad de inducir una respuesta inmunitaria celular y humoral; c) facilidad de modificar los antígenos codificados en los plásmidos; d) menor costo cuando se producen a gran escala; y e) vida media mayor, por lo que se consigue una mejor estabilidad en cuanto a la temperatura de almacenamiento y transporte, lo que permite prescindir de la cadena fría utilizada en las vacunas convencionales (Doria-Rose and Haigwood, 2003).

Inducción de la respuesta inmunitaria por vacunas de ADN

Cuando un plásmido se introduce en la célula se transloca al núcleo, donde se inicia la transcripción del transgene; a continuación, los transcritos se llevan al citoplasma y allí se traducen. Las proteínas recién sintetizadas se degradan en el proteosoma hasta péptidos de 8 – 10 aminoácidos, que se transportan al retículo endoplásmico, mediante un sistema especializado de transporte que emplea proteínas transportadoras (TAP-I y TAP-II) y una vez en el retículo se unen con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I. Los péptidos de gran afinidad con su respectiva molécula del MHC clase I se estabilizan y entran en la vía secretoria, con lo que alcanza la superficie celular donde se acoplan con el

receptor de los linfocitos T presentes en los linfocitos T citotóxicos CD8+ (Doria-Rose and Haigwood, 2003; Shixia Wang and Shan Lu*, 2014).

Las proteínas exógenas que se endocitan o fagocitan entran en la vía endosómica y en ella se degradan en pequeños péptidos de 12 a 25 aminoácidos que luego se vinculan con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de tipo II y se traslocan hacia la superficie de la célula donde se presentan y unen a los receptores de los linfocitos T cooperadores (CD4+); todo ello tiene como consecuencia su activación y expansión (Doria-Rose and Haigwood, 2003).

Por otro lado, los linfocitos B se activan mediante su receptor (BcR) por los antígenos que se sintetizan y secretan o presentan en la superficie de las células que se transfectaron en la inmunización con ADN. Posteriormente, los linfocitos B activados se diferencian hacia células de memoria o células plasmáticas; estas últimas pueden: a) continuar la síntesis de anticuerpos o b) establecerse en la médula ósea y continuar también la producción de anticuerpos presentes en el suero y mucosas por largos periodos (Shixia Wang and Shan Lu, 2014).

Ventajas y desventajas de las vacunas de ADN

Las vacunas de ADN están compuestas por un plásmido bacteriano o también llamado vector en el cual se ha insertado una secuencia de ADN que codifica para un antígeno de interés o proteína (Indresh K. Srivastava and Margaret A. Liu, 2003). Las vacunas de ADN ofrecen una serie de ventajas sobre las tecnologías ya existentes para la producción de las vacunas. Ellas estimulan tanto la respuesta inmune humoral como celular y a diferencia de las vacunas con microorganismos recombinantes no hay respuesta inmune hacia el vector lo cual permite su utilización de manera repetida (Saade and Petrovsky, 2012).

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. En la selección del método a emplear hay que tomar en cuenta dos consideraciones importantes: la cantidad de ADN a inocular y las características de la respuesta inmune que se desea obtener. La administración de vacunas mediante agujas posee la ventaja de ser un método barato, aunque requiere de 100 a 1000 veces más ADN que el bombardeo de partículas para inducir una respuesta inmune. (Sardesai and Weiner, 2011). El bombardeo de partículas con pistola de genes tiende a inducir una respuesta T cooperadora de tipo Th2 que sirve para combatir infecciones parasitarias y en mucosas, mientras que las inyecciones intramusculares desvían la respuesta cooperadora hacia Th1 en la que se activa la respuesta celular lo que permite el control de infecciones bacterianas intracelulares y virales (Nascimento and Leite, 2012).

Las principales características, así como las ventajas y desventajas se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de las vacunas 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)
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
Termostabilidad	Si	No	No	Si
Costo de producción	Bajo	Alto	Alto	Alto

Reyes S., Pinto R; 2002

Prime boost heterólogo

La inmunización con ADN parece ser efectiva para inducir la respuesta inmune, pero requiere inmunizaciones repetidas y altas dosis de ADN (Van Drunen Littel-van Den Hurk, Babiuk and Babiuk, 2004), lo que hace que el procedimiento de inmunización sea engorroso, prolongado y costoso (Reisz-Porszasz *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2007).

Un procedimiento común de inmunización consiste en administrar el mismo antígeno repetidamente, dando al menos un refuerzo. Este esquema de inmunización se ha llamado prime-boost homólogo. Un hallazgo interesante e inesperado es que, el refuerzo con el antígeno, pero en una presentación distinta resulta en una respuesta inmune más efectiva. Este esquema de inmunización se ha llamado prime-boost heterólogo (Excler and Plotkin, 1997; Ramshaw and Ramsay, 2000). El rápido progreso del uso de nuevos vectores de vacunación, como vacunas de ADN y aquellas basadas en vectores virales, ciertamente ha ampliado aún más el alcance de la vacunación con esquema prime boost heterólogo. La más eficaz de estas estrategias provoca altos niveles de respuestas de inmunidad mediadas por células T CD41 y CD81, que son cruciales para la protección contra una variedad de patógenos (Lu, 2009). El protocolo prime-boost heterólogo consta solo de dos inmunizaciones, la primera que emplea la vacuna de ADN y la segunda que puede incluir un antígeno recombinante (Lu, 2009).

JUSTIFICACIÓN

Estudios previos en ratones BALB/c vacunados con miostatina modificada con los epítomos inmunoestimulantes de la toxina tetánica p2 y P30, mostraron un incremento significativo de la masa muscular. Sin embargo, para lograr esto se emplearon cuatro dosis de 100 µg de ADN, una cada 2 semanas.

Las cantidades de ADN necesario para inducir la aparición de anticuerpos y linfocitos citotóxicos van de 10 a 100 µg de ADN en inyecciones intramusculares en ratones y hasta 1 mg en primates no humanos por lo que reducir el número de inmunizaciones es fundamental para obtener costos más bajos y su empleo a gran escala.

La inhibición de miostatina puede tener importantes aplicaciones cénicas y en producción animal, pero estas solo pueden ser alcanzadas si se cuentan con métodos de inmunización efectivos que induzcan una respuesta rápida, con un número reducido de aplicaciones, que mantenga una inmunidad prolongada, así como el empleo de bajas dosis del inmunógeno.

Con la intención de disponer de sistemas de inmunización más eficientes y potencializar la inhibición de miostatina en este trabajo se evaluaron cuatro esquemas de inmunización empleando diferentes aplicaciones de vacuna de ADN, antígeno recombinante o ambos.

HIPÓTESIS

La inmunización con una vacuna contra miostatina en un esquema prime boost heterólogo (vacuna de ADN y un refuerzo con la proteína purificada de miostatina modificada con los epítomos P2 y P30 de la toxina tetánica) inducirá una mayor producción de anticuerpos contra la miostatina y un mayor aumento de las masas musculares de los individuos inmunizados.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y evaluar diferentes esquemas de inmunización empleando una vacuna de ADN y el antígeno recombinante de la miostatina fusionada con los epítomos P2 – P30 de la toxina tetánica.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Producir y caracterizar miostatina P2-P30 recombinante.
- 2.- Aplicar un esquema de inmunización con la vacuna de ADN usando dos y cuatro inoculaciones en un modelo murino.
- 3.- Aplicar un esquema de inmunización con antígeno recombinante de miostatina P2-P30 usando dos y cuatro inmunizaciones en un modelo murino.
- 4.- Aplicar un esquema de inmunización con la vacuna de ADN y un refuerzo con antígeno recombinante de miostatina P2-P30 (Prime-boost heterólogo) en un modelo murino.
- 5.- Evaluar la respuesta inmunológica y fenotípica de los protocolos de inmunización.

MATERIAL Y MÉTODOS

Construcciones genéticas de P2-Miostatina-P30 y obtención de vacunas genéticas.

Las construcciones genéticas de miostatina se obtuvieron por PCR y se clonaron en el vector de expresión pCI-neo (Promega, Madison, Wisconsin, EUA). Los primers se diseñaron en base a la secuencia de ARNm de miostatina del pollo (GenBank AY448008). Los primers contienen la secuencia de los epítomos de la toxina tetánica P2, P30 o ambas y el sitio de clonación XbaI (Tabla 2). Se purificó ADN a partir de embrión de pollo de 15 días de incubación para amplificar el fragmento C-terminal del gen de miostatina (798-1127pb) con los primers MSTNF y MSTNR y se clonó en el sitio XbaI del vector pCI-neo. De esta amplificación se obtuvieron las diferentes construcciones (Figura 5). Cada construcción genética fue validada por PCR y análisis de secuencia de nucleótidos. El ADN plasmídico de cada construcción se purificó libre de endotoxinas usando el kit Maxi de plásmido EndoFree (Qiagen, Chatsworth, CA, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla 2. Secuencia de los primers para las construcciones genéticas de la miostatina.

Primer	Secuencia (5'- 3')
MSTN F	AT <u>TCTAGA</u> ATGGATTTTGGVCTTGACTGTGATG
MSTN R	AT <u>TTCTAGA</u> TCATGAGCACCCACAGCGATCTAC
MSTN P2	AT <u>TCTAGA</u> ATGCAGTATATAAAAGCAAATTCCTAAATTTATAGGTATAACTG AAGATTTTGGCCTTGACTGTGATG
MSTN P30	AT <u>TCTAGA</u> TACTACTTCTAAATGACTAGCAGATACTTTAGGAACCCTCAA CCAAAAGCTAACGGTAAAATTATTAACATTGAGCACCCGCAACGATCTAC
TSFP2 F	AT <u>CATATG</u> CAGTATATAAAAGCAAATTC
TSFP30 R	AT <u>GGATCC</u> TCA GTGGTGGTGGTGGTG TACTTCTAAATGACTAGCAGATAC

Los sitios de restricción de las enzimas XbaI (TCTAGA); BamHI (GGATCC); NdeI (CATATG) están subrayados.

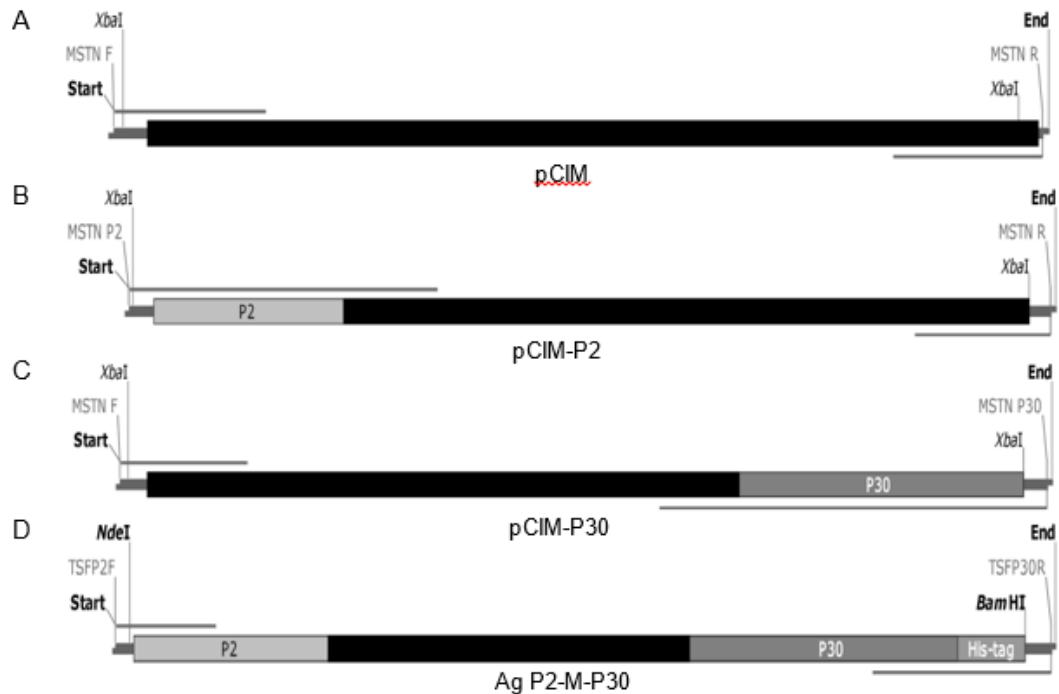


Figura 5.- Mapa de las construcciones genéticas de miostatina. A. Gen de miostatina bioactiva (348 pb); B. Epítipo P2 fusionado con el extremo 5' del fragmento de miostatina (389 pb); C. Epítipo P30 fusionado con el extremo 3' del fragmento de miostatina (416 pb) y D. Fragmento de miostatina fusionado con los epítipos P2 y P30 (457 pb). Se indican los nombres de construcciones genéticas, los sitios de restricción, el inicio y el final de las regiones de codificación y las posiciones de los cebadores.

Clonación y expresión de P2-Miostatina-P30 recombinante en PET11a.

Clonación de la construcción P2-Miostatina-P30 al vector de expresión pET11a.

Se diseñaron oligonucleótidos TSFP2 F Y TSFP30 R para amplificar la miostatina con los epítipos P2 y P30 fusionados en los extremos 5' y 3' de una construcción anterior y movilizarla al vector de expresión pET11a. Estos oligonucleótidos contienen un fragmento de la secuencia de los epítipos P2 o P30 y la secuencia de las enzimas corte Nde1 y BamH1 respectivamente, que están presentes en el sitio de clonación del vector pET11a (Tabla 1).

Inducción de la P2-Miostatina P30 recombinante.

Para la expresión de la proteína recombinante se seleccionó una clona de miostatina p2-p30 en el plásmido PET11a en una placa de agar con ampicilina y

posteriormente se inocularon 10ml de medio LB con ampicilina [100µg/ml] con una colonia y se incubo toda la noche a 37°C en agitación vigorosa. Al siguiente día se expandió el cultivo a una dilución 4:1000 ml en medio de cultivo con ampicilina se incubó a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica a 600nm de 0.5 OD. En ese momento se adicono IPTG a una concentración final de 1mM y se incubó toda la noche. Transcurrido el tiempo de inducción, se tomó una alícuota para evaluar el grado de expresión de la proteína recombinante en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 15%, posteriormente el cultivo se centrifugó 15 minutos a 4000 x g a 4°C para purificar la proteína.

Purificación y caracterización de la expresión de la proteína P2-Miostatina-P30

Purificación de la P2-Miostatina-P30 recombinante.

La purificación de la proteína se realizó bajo condiciones desnaturizantes a través de una columna de afinidad Ni⁺² - NTA (Quiagen, Chatsworth, CA, EUA). Siguiendo un método casero. La pastilla celular proveniente de 500ml de cultivo se resuspendió en 20ml de buffer de lisis (Tris pH8 50mM, 2-mercaptoetanol 5mM, Tritón 5%, Sarcosyl 2%, Guanidina 6M, NaCl 100mM), se incubo 15 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se adicionó lisozima [10µg/ml] y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrida la incubación se adicionó DNasa [5ug/ml], se incubo 60 minutos a 37°C mezclando por inversión frecuentemente. Se centrifugo el lisado a 12,000 x g 30 minutos a 4°C y posteriormente se mezcló con buffer de unión 2x (Imidazol 40 mM, fosfato de sodio 40 mM, NaCl 1 M, Guanidina 6 M pH 7.4) volumen a volumen. Se recuperó el sobrenadante y se filtró en la columna por capilaridad. Se lavó la columna con 10 ml de buffer de unión 1x y se eluyó en 5 fracciones con 1 ml de buffer de elución (Imidazol 500mM, fosfato de sodio 20mM, NaCl 0.5 M, Guanidina 6 M, pH 4.5). Finalmente, las muestras se dializaron PBS y se analizó la purificación por SDS-PAGE.

Cuantificación de la proteína.

La concentración de proteína se determinó por espectrofotometría a 260 nm y 280 nm en el equipo Epoch de biotek

Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS).

La proteína se analizó electroforéticamente en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), Los geles de poliacrilamida empleados se utilizaron al 15%. Se preparó un gel separador y otro concentrador, una vez polimerizado el gel separador, se añadió el gel concentrador, así como el molde de los pozos. Los geles se prepararon en moldes de vidrio de 10.2 x 8.8 cm, con separadores de 1.5mm. Los geles se montaron en una cámara de electroforesis Mini-PROTEAN® 3 Cell de BIORAD con buffer de corrida 1x (Tris 0.025 M, glicina 0.192 M y SDS al 0.01%). Las muestras se prepararon con buffer de carga (Tris 60mM, SDS 2%, Glicerol 10%, Azul de bromofenol 0.0025%, 2- mercapto etanol 1.83% final). La mezcla se desnaturalizo a 96°C por 10 minutos. Los geles se corrieron a 75 V por 120 minutos.

Tinción de geles de poliacrilamida con azul de Coomassie.

Los geles se sumergieron en 10ml de azul de Coomassie (0.4% de azul de coomasie, 12% de ácido acético glacial y 20% etanol), se incubaron toda la noche a temperatura ambiente. Para contrastar las bandas, se destiñeron agregando 10 ml de solución desteñidora (ácido acético glacial 15% y metanol al 30%) y se incubaron a 56° C durante 15 minutos.

Electroinmunotransferencia de proteínas a papel de nitrocelulosa (Western blot).

Terminada la separación electroforética de las proteínas, se cortó un trozo de papel de nitrocelulosa con un poro de 0.45 µm (Millipore, EUA) del tamaño del gel de acrilamida y se activó en buffer de transferencia (Tris 0.25M, Glicina 1.92M, 20% metanol) por 5 minutos y se lavó con H₂O_{dd}. Posteriormente se apilaron usando la cámara semi-seca Trans-Blot® de BIORAD en el siguiente orden: cojinete de fibra

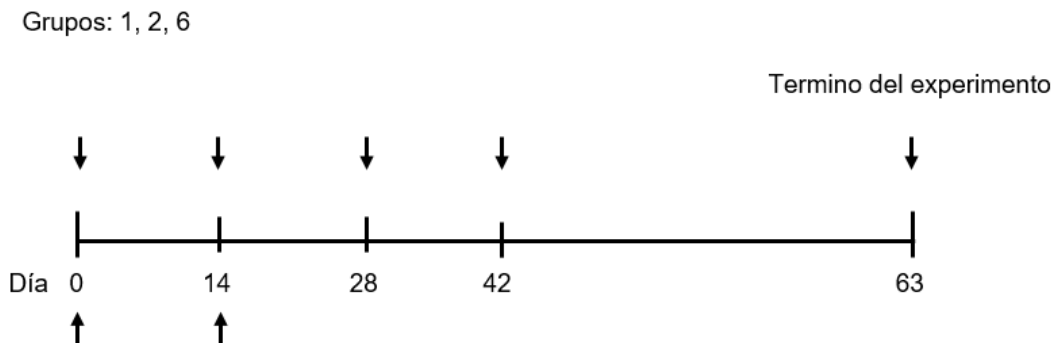
scotch, papel filtro, el papel de nitrocelulosa, gel de acrilamida, papel filtro y otro cojinete. Todos los elementos apilados fueron previamente embebidos en buffer de transferencia. La transferencia se realizó a 20V por 75 minutos. Transcurrido el tiempo, se bloqueó la membrana con leche al 5% en solución de lavado (Cloruro de sodio 1.25M, Tween 20 1%, Tris HCL 0.25M) por 1 hora a 37°C; se lavó, 3 veces en agitación por 5 minutos con solución de lavado y se agregó el primer anticuerpo anti-His en una dilución 1:400 en leche al 5% y se incubó por 1 hora a 37°C. Se lavó bajo las mismas condiciones y se agregó el segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa anti-conejo en una dilución 1:1500 en leche al 5%. Se lavó nuevamente y se reveló con Diaminobencidina de Sigma según las condiciones del fabricante.

Evaluación en ratones de diferentes esquemas de inmunización con la vacuna de ADN y la proteína P2-Miostatina-P30.

Esquemas de Inmunización.

Se utilizaron ratones BALB/c machos de 21 días de edad, con los cuales se formaron 6 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 o de miostatina recombinante y se aplicaron los días 0, 14, 28 y 42; los ratones fueron sacrificados en el día 63 postinmunización (Figura 6). Cada grupo experimental sirvió para evaluar cada esquema de inmunización 1: Inmunización DNA plásmidos pCIM – P2 + pCIM-P30 en cuatro ocasiones; Grupo 2: Inmunización con antígeno recombinante P2-M-P30 cuatro ocasiones; Grupo 3: Inmunización con DNA de los plásmidos pCIM–P2 + pCIM-P30 + antígeno recombinante P2-M-P30 (Prime boost heterólogo). Grupo 4: Vacuna DNA pCIM–P2 + pCIM-P30 en dos ocasiones; Grupo 5: Antígeno recombinante P2-M-P30 en dos ocasiones. Grupo 6: PBS.

Los ratones se manipularon conforme a las especificaciones de la NOM-062-ZOO-1999 se tomaron pesos semanales para evaluar la ganancia de peso y posteriormente se registraron los siguientes pesos: peso al sacrificio, peso de 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.



Grupos: 3, 4, 5

Figura 6.- Esquemas de inmunización en ratones contra la miostatina. Grupos de ratones recibieron cuatro inmunizaciones a intervalos de 15 días con diferentes inmunógenos o PBS. Grupo 1: Inmunización DNA plásmidos pCIM – P2 + pCIM-P30; Grupo 2: Inmunización con antígeno recombinante P2-M-P30; Grupo 6: PBS. Otros grupos fueron inmunizados solo dos veces, cada 15 días. Grupo 3: Inmunización con DNA de los plásmidos pCIM-P2 + pCIM-P30 + antígeno recombinante P2-M-P30. Grupo 4: Vacuna DNA pCIM-P2 + pCIM-P30; Grupo 5: Antígeno recombinante P2-M-P30. El experimento terminó el día 63. Todas las inmunizaciones fueron por vía subcutánea.

Evaluación de la respuesta fenotípica e inmunológica en los esquemas de inmunización con los inmunógenos de P2-Miostatina-P30.

Evaluación de la canal.

Al finalizar el protocolo de inmunización, se sacrificó a los ratones y se registró el peso corporal intacto, así como las siguientes regiones corporales: canal, cabeza, región craneal, región caudal, tríceps y cuádriceps. La canal se obtuvo después de retirar la cabeza, los órganos internos, la piel, las patas de los tarsos, los carpos y la cola de la tercera vértebra sacra. La región craneal comprendía el pecho y las extremidades delanteras, retirando la cabeza y cortando la carcasa al nivel de

la última vértebra lumbar. El segmento corporal restante era la región caudal, incluidas las extremidades posteriores. El peso normalizado individual de cada región se obtuvo después de restar el valor promedio del grupo de control negativo.

Evaluación de la respuesta inmune contra la miostatina.

Para estandarizar de la evaluación inmunológica de la miostatina P2-P30 recombinante por ELISA, se diseñó un protocolo de inmunización para la obtención de un suero positivo hiperinmune contra miostatina en dos cerdos (Figura 7).

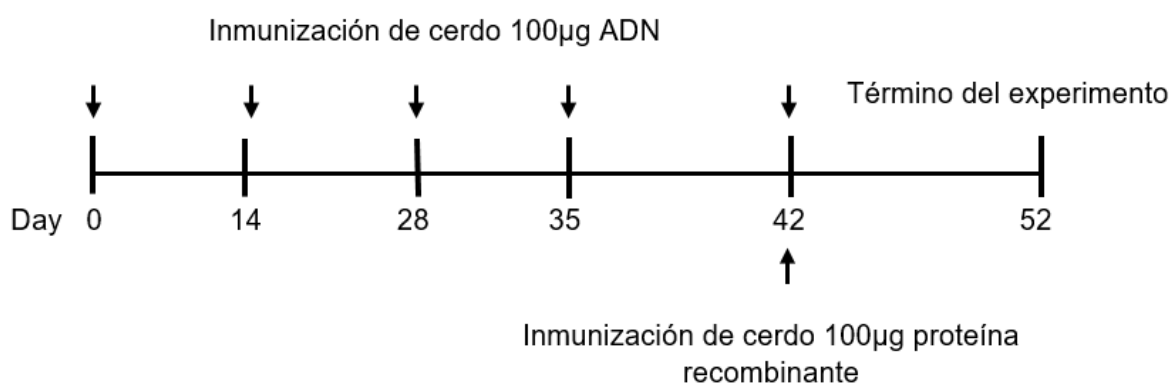


Figura.7.- Protocolos de inmunización para la obtención de suero hiperinmune en cerdo. Se inmunizaron dos cerdos con la vacuna de ADN de la miostatina (Plásmidos pCIM-P2 + pCIM-P30) y un cerdo control con PBS.

Se sensibilizaron microplacas tipo Maxisorp (ELISA) con 60 ng de miostatina recombinante purificada (P2-MP3-0) en buffer de carbonatos (bicarbonato de sodio 0.1 M, carbonato de sodio 0.1 M p.H. 9.6) incubando durante toda la noche a 4 ° C. Las placas se lavaron tres veces con buffer de lavado (cloruro de sodio 0,12 M, Tris-HCl 25 mM, pH 7,9, Tween-20 al 1%). Posteriormente, las placas se bloquearon con leche descremada al 5% en buffer de lavado y se incubaron 1 hora a 4 ° C. Los sueros de cerdo se diluyeron 1: 100 en con leche descremada al 5% en buffer de lavado y se añadieron a cada pozo por duplicado, incubando durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, las placas se lavaron tres veces con buffer de lavado, y se añadió IgG anti-cerdo acoplado a peroxidasa (Jackson Immunoresearch, PA) diluido 1: 1500 en leche descremada al 5% en buffer de lavado y se incubó durante 1 hora a 37 ° C.

Después de lavar con buffer de lavado, la placa se reveló añadiendo buffer de citratos (ácido cítrico 0,1 M pH 4,5, citrato sódico 0,1 M pH 4,5, 200 µl de orto-fenilendiamina (OPD) [5 µg] y 20 µl de peróxido de hidrógeno [30%]), la reacción se detuvo mediante la adición de 100 µl de H₂SO₄ 2M. Las placas se leyeron a OD 450.

Evaluación estadística

Se verificó los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas de los pesos semanales, debido a que los datos no cumplieron con los supuestos de homogeneidad y normalidad se realizó un análisis de Kruskal-Wallis para evaluar las diferencias entre grupos. Se considero como efecto significativo una $p < 0.05$.

Los pesos de las diferentes regiones se analizaron utilizando el procedimiento del modelo lineal general (GLM) incluyendo el efecto fijo de tratamiento y el peso inicial como covariable. Se consideró como significativo un valor de $\alpha < 0.05$. En aquellos casos en los que el efecto del tratamiento fue significativo, se utilizó a prueba de Bonferroni para la comparación de medias.

Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el paquete estadístico en SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) Las gráficas se obtuvieron utilizando el software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, LLC, EE. UU.).

RESULTADOS.

Clonación y expresión de la P2-Miostatina-P30 en PET11a.

Se purificó ADN del plásmido pCIM-P2 en el vector pCIneo. 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 2.5 mg de ADN por 500 ml de cultivo bacteriano con una relación 260/280 de 1.70.

Se diseñaron iniciadores universales para la movilización de clonas en pCIneo a PET11a con los sitios de corte específicos del vector de expresión PET11a (BamH1 y NdeI) y una parte de la secuencia de los epítomos inmunoestimulantes P2 y P30 (Tabla. 2).

La estrategia seguida para la clonación y movilización del gen de la miostatina consistió en amplificar inicialmente la construcción estandarizando las condiciones de PCR en un gradiente de temperaturas (Fig. 8). Los productos amplificados se separaron por electroforesis y posteriormente se purificaron por perlas de sílice, y ligaron al Vector T pGEM®-T (Promega, Madison, WI) una relación molar inserto: vector 3:1, se utilizaron 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. Se transformaron 25 ng del producto de ligación en bacterias competentes de *E. coli* cepa DH5α y por PCR se verificó si las clonas eran positivas con los iniciadores del vector (M13), las clonas que resultaron positivas se les extrajo el ADN del plásmido recombinante mediante una purificación por lisis alcalina para digerirlo con las endonucleasas BamHI y NdeI. El fragmento liberado se recuperó del gel y se ligó al vector de expresión PET11a, el cual previamente había sido digerido con las mismas enzimas y desfosforilado. EL ADN ligado se empleó para transformar células competentes de *E. coli* cepa DH5α. Las clonas recombinantes se identificaron por PCR empleando los iniciadores que se asientan en el vector. Se obtuvo ADN de los plásmidos recombinantes y se comprobó su identidad mediante secuenciación de nucleótidos y posteriormente se transformó en células BL21 para la expresión de la proteína.

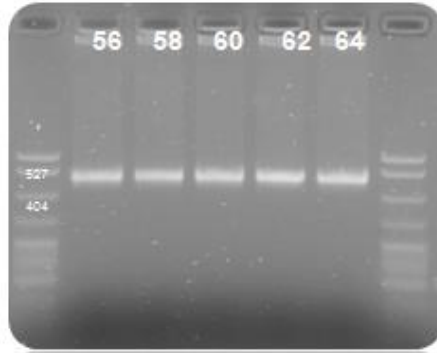


Figura 8.- Amplificación de miostatina. Gradiente de temperaturas para la amplificación de miostatina.

Inducción de la proteína recombinante.

Se indujo la expresión de una clona de miostatina p2-p30 en 250ml de cultivo. La inducción se verificó en un gel de acrilamida al 15% (Figura 9A).

Purificación de la proteína recombinante.

Se purifico miostatina recombinante P2-M-P30 por cromatografía de afinidad con columnas de níquel. La identificación de la proteína se evaluó por electroforesis SDS PAGE y Western blot con un anticuerpo anti-his (Figura 9B).

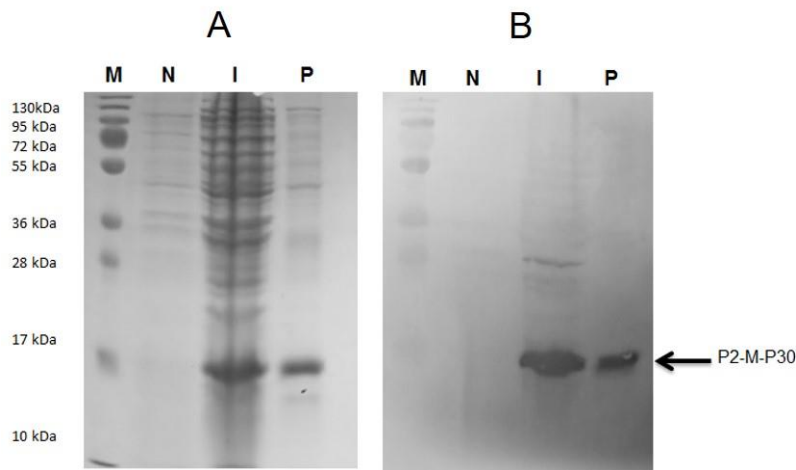


Figura 9.- Evaluación de la purificación de la miostatina P2-P30 recombinante. Electroforesis SDS / PAGE (gel de poliacrilamida al 15%) teñido con azul de Coomasie. Se muestran los lisados bacterianos de miostatina recombinante (P2-M-P30) no inducida (N), inducida (I) y purificada (A), Western blot de una membrana PVDF previamente transferida de un gel de poliacrilamida y reaccionado a un anticuerpo anti-His (B). Los pesos moleculares se indican en kDa (M).

Evaluación de los esquemas de inmunización

Evaluación fenotípica.

Para reducir la cantidad de antígeno utilizado y el número de inmunizaciones aplicadas, se evaluaron diferentes protocolos de inmunización utilizando la vacuna de ADN y en antígeno recombinante en diferentes frecuencias de inmunización.

Estos esquemas se compararon con grupos de ratones donde se inyectaron cuatro inmunizaciones, ya sea de ADN (grupo 1) o antígeno recombinante (grupo 2), y grupos de ratones donde se inyectaron solo dos inoculaciones de ADN (grupo 4) o antígeno recombinante (grupo 5) y un grupo con un esquema prime-boost heterologo donde se inmunizó con ADN y se reforzó con antígeno recombinante. Una vez terminado el protocolo de inmunización, se tomaron pesos individuales de diferentes regiones corporales (Anexo 1).

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 grupo control (Figura 10).

Para evaluar la canal de los diferentes esquemas de inmunización se pesaron diferentes regiones corporales (canal, región craneal, caudal miembros anteriores, miembros posteriores, tríceps, cuádriceps y cabeza). En la tabla 3 se muestran los promedios y la desviación estándar de las mediciones de los pesos en diferentes regiones corporales y los resultados del análisis de covarianza.

Tabla 3. Promedio de los pesos y desviaciones estándar de las diferentes regiones corporales en los grupos de ratones inmunizados.

	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6	COVARIABLE
VARIABLE DEPENDIENTE	ADN x4	Ag x4	Prime-Boost	ADN x2	Ag x2	Control	
PESO FINAL	24,99±0,81	23,54±0,82	25,54±0,82	23,51±0,85	25,13±0,84	22,88±0,82	-0,7±0,55
CANAL	10,97±0,42	9,91±0,42	11,39±0,42*	9,54±0,44	10,52±0,44	9,39±0,43	-0,3±0,32
CABEZA	2,41±0,10	2,24±0,10	2,34±0,10	2,30±0,10	2,02±0,10	2,02±0,10	-0,08±0,07
REGIÓN CRANEAL	6,19±0,26	5,46±0,26	6,09±0,26	5,29±0,27	5,74±0,26	5,26±0,26	-0,15±0,18
REGIÓN CAUDAL	4,79±0,19	4,49±0,19	5,27±0,19*	4,19±0,19	4,73±0,19	4,09±0,19	-0,18±0,15
CUADRÍCEPS	1,51±0,07	1,42±0,07	1,46±0,07	1,43±0,07	1,45±0,07	1,24±0,07	0,02±0,05
TRÍCEPS	0,61±0,03	0,56±0,03	0,62±0,03	0,62±0,03	0,63±0,03	0,60±0,03	0,05±0,02*

*Promedios dentro de una misma fila son estadísticamente diferentes respecto al grupo control ($p \leq 0.05$).

La covariable el modelo se evalúa en el siguiente valor siguientes: Peso inicial = 9,792.

Grupo 1 Cuatro inmunizaciones con pCIM-P2 + pCIM-P30. Grupo 2. Cuatro inmunizaciones con Ag P2-M-P30. Grupo 3. Dos inmunizaciones con pCIM-P2 + pCIM-P30 y un refuerzo con Ag P2-M-P30. Grupo 4. Dos inmunizaciones con pCIM-P2 + pCIM-P30. Grupo 5. Dos inmunizaciones con Ag P2-M-P30. Grupo 6. Cuatro inmunizaciones con PBS.

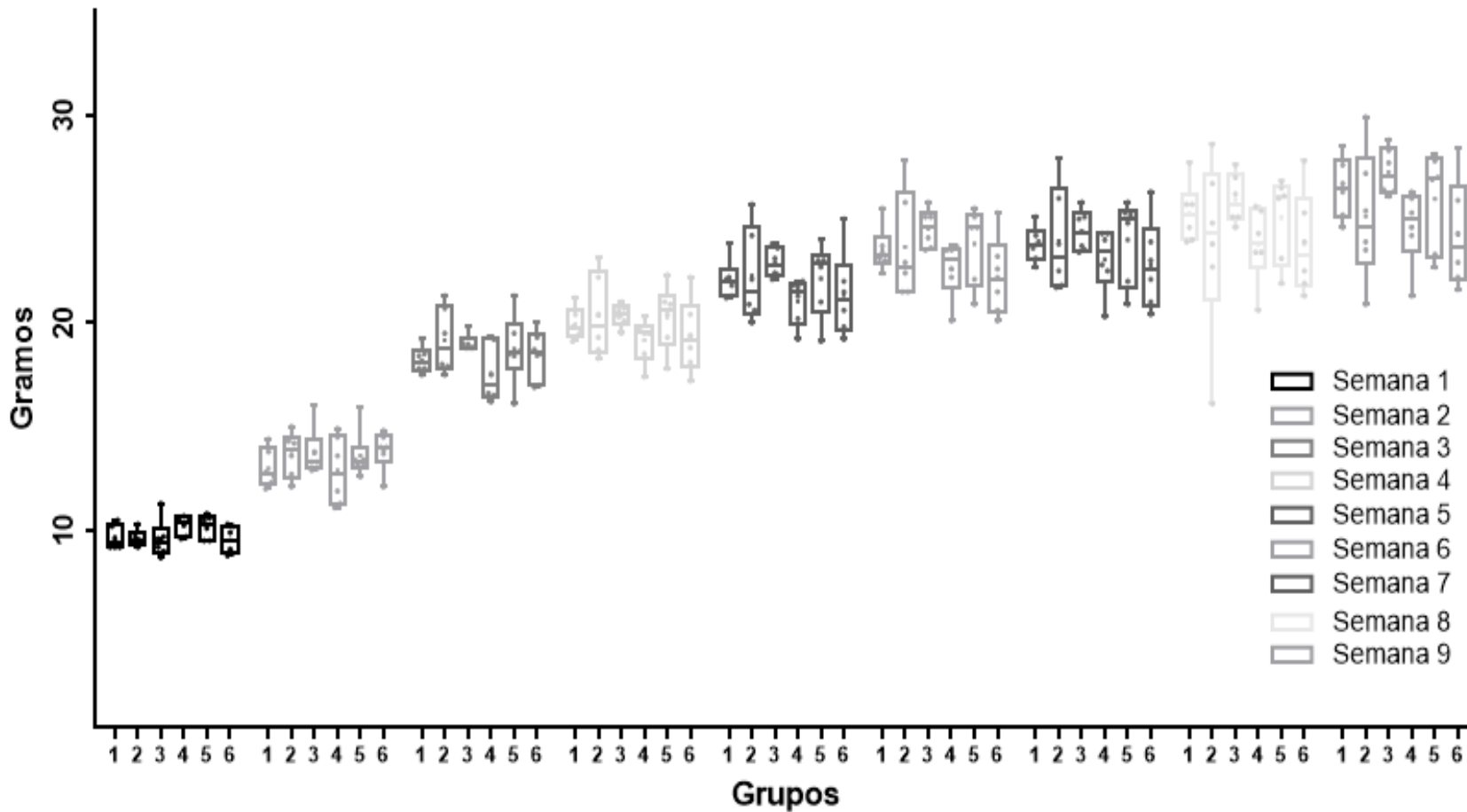


Fig 10.- Ganancia de peso semanal. Pesos semanales de ratones inmunizados. Los gráficos muestran el peso individual en los diferentes grupos de inmunización: A) Cabeza, B) Tríceps, C) Cuádriceps, D) Región craneal, E) Canal y F) Región caudal. Los grupos de inmunización consisten en 1- pCIM – P2 + pCIM-P30 (cuatro veces); grupo 2- Ag P2-M-P30 (cuatro veces); grupo 3- pCIM – P2 + pCIM-P30 y Ag P2-M-P30 (refuerzo primario heterólogo); grupo 4- pCIM – P2 + pCIM-P30 (dos veces); grupo 5- Ag P2-M-P30 (dos veces); grupo 6- PBS (cuatro veces).

Las diferencias de pesos fueron obtenidas restando el valor promedio del grupo de control negativo y graficadas. En la Figura 11 y 12 se muestra que el tratamiento del grupo prime-boost (grupo 3), tuvo un aumento de peso significativo principalmente en la canal y la región caudal. Este grupo tuvo una respuesta de crecimiento similar al grupo 1, en donde se inmunizó 4 veces con la vacuna de ADN. En la región craneal, tríceps, cuádriceps y cabeza, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de tratamiento. Sin embargo, los valores medios en los grupos mostraron una tendencia a un mayor peso en el grupo 3 (Figura 11).

También se muestra que, usando solo dos inmunizaciones con la vacuna de ADN, la respuesta inmune no fue suficiente para inducir un incremento en el peso corporal. Sin embargo, dos inmunizaciones con el antígeno recombinante pudieron inducir un efecto de crecimiento.

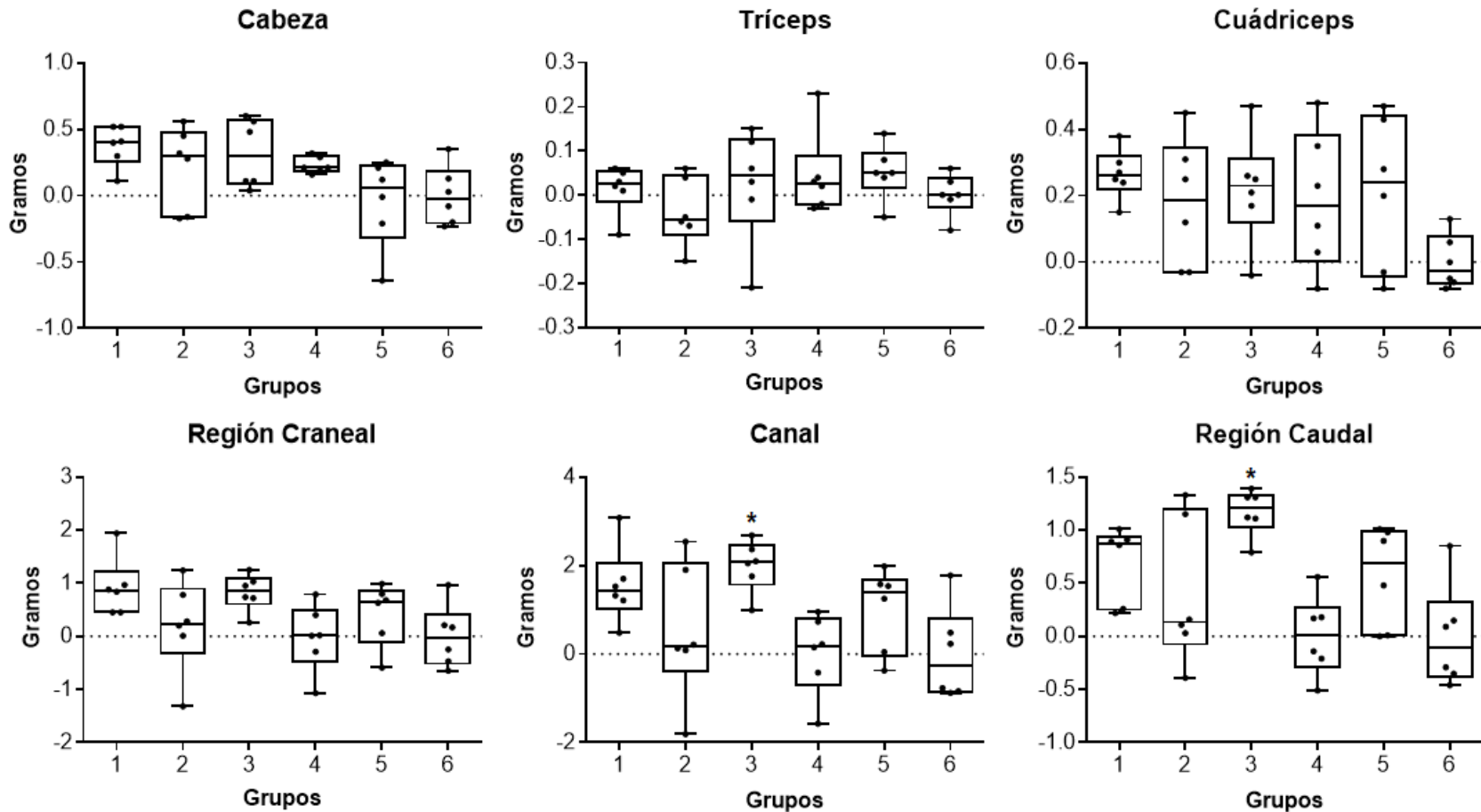


Figura 11. Diferencias en el peso corporal de ratones después del protocolo de inmunización. Los gráficos muestran el peso normalizado individual de distintas regiones del cuerpo en los diferentes grupos de inmunización: A) Cabeza, B) Tríceps, C) Cuádriceps, D) Región craneal, E) Canal y F) Región caudal. Los grupos de inmunización consisten en 1- pCIM – P2 + pCIM-P30 (cuatro veces); grupo 2- Ag P2-M-P30 (cuatro veces); grupo 3- pCIM – P2 + pCIM-P30 y Ag P2-M-P30 (refuerzo primario heterólogo); grupo 4- pCIM – P2 + pCIM-P30 (dos veces); grupo 5- Ag P2-M-P30 (dos veces); grupo 6- PBS (cuatro veces). La línea punteada indica el valor promedio basal. . El asterisco indica diferencia estadística con el grupo control.

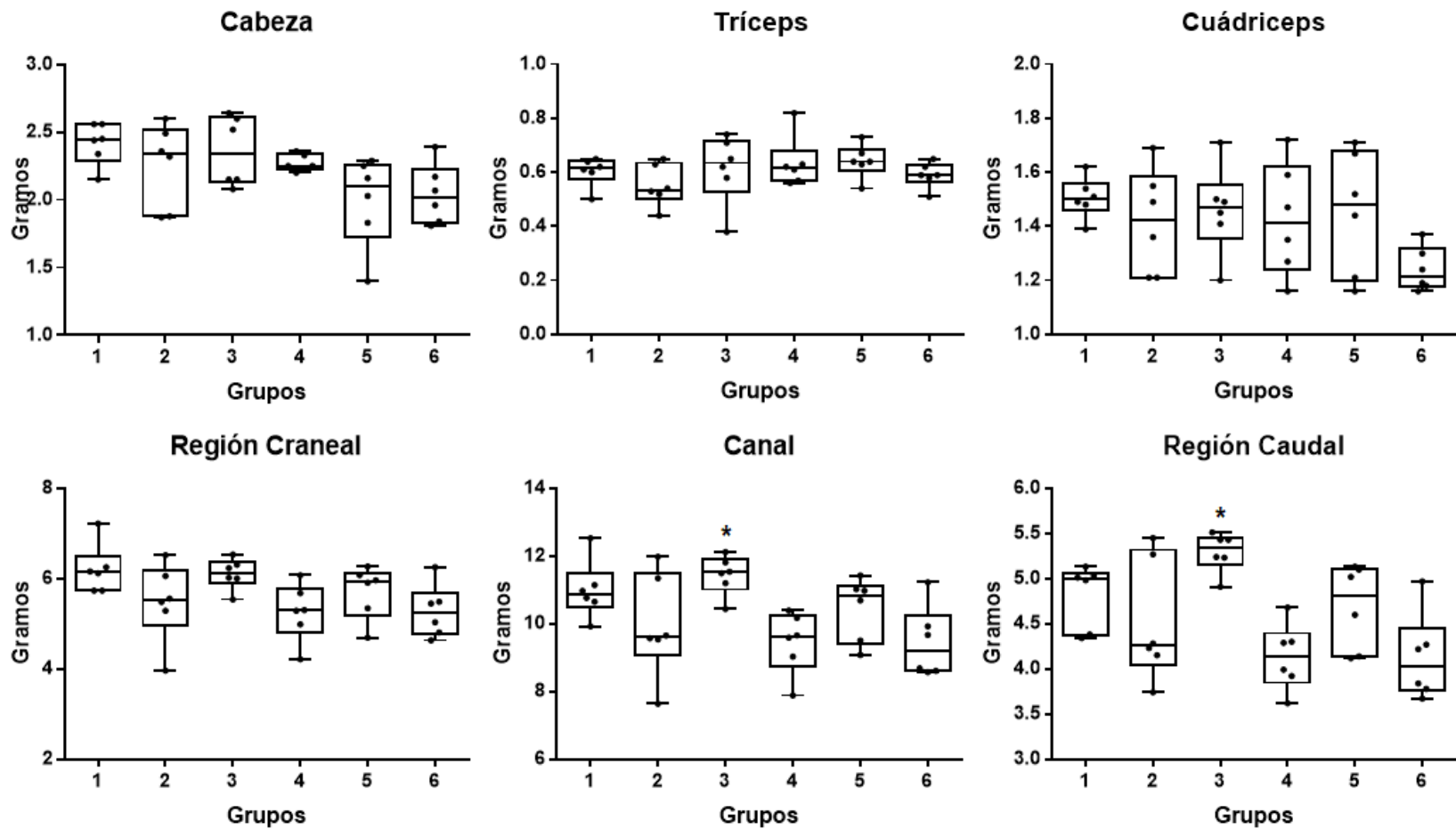


Figura 12. Promedios de peso corporal de ratones después del protocolo de inmunización. Los gráficos muestran el peso normalizado individual de distintas regiones del cuerpo en los diferentes grupos de inmunización: A) Cabeza, B) Tríceps, C) Cuádriceps, D) Región craneal, E) Canal y F) Región caudal. Los grupos de inmunización consisten en 1- pCIM – P2 + pCIM-P30 (cuatro veces); grupo 2- Ag P2-M-P30 (cuatro veces); grupo 3- pCIM – P2 + pCIM-P30 y Ag P2-M-P30 (refuerzo primario heterólogo); grupo 4- pCIM – P2 + pCIM-P30 (dos veces); grupo 5- Ag P2-M-P30 (dos veces); grupo 6- PBS (cuatro veces). La línea punteada indica el valor promedio basal. El asterisco indica diferencia estadística con el grupo control.

Evaluación de la reactividad de los sueros hiperinmunes de cerdos con la proteína recombinante.

Se sensibilizó una placa de 96 pozos con diluciones doble seriadas iniciando con 480ng de la proteína recombinante purificada y una dilución constante del suero hiperinmune de cerdos 1/100 para determinar la cantidad de antígeno necesaria para la evaluación de producción de anticuerpos en los ratones inmunizados (Figura 12).

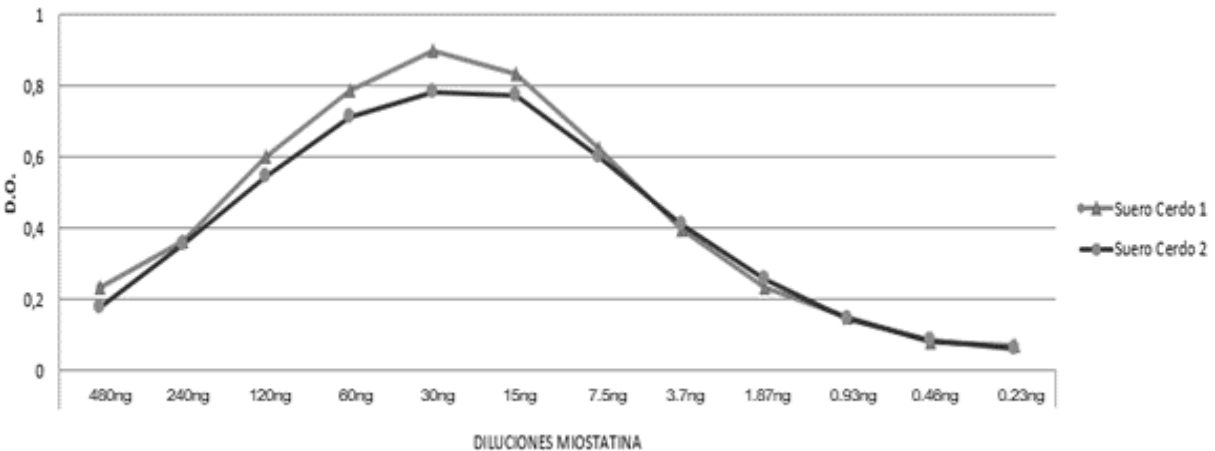


Figura 13.- Titulación de la reactividad de la P2-Miostatina-P30. Se hicieron diluciones dobles seriadas de miostatina iniciando 1/10 (240ng), se utilizó como primer anticuerpo suero hiperinmune de cerdo 1/100, como segundo anticuerpo anti cerdo 1/1500. La placa de ELISA se reveló con OPD.

Con base en estos resultados, se definieron ensayos de ELISA sensibilizando la placa con una dilución constante del antígeno (60ng).

Evaluación de la producción de anticuerpos por ELISA en los esquemas de inmunización.

Se observaron densidades ópticas elevadas cuando se utiliza el antígeno en la vacunación. Sin embargo, en aquellas donde solo se utiliza ADN se observan valores muy bajos (Figura 13).

DISCUSIÓN

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 Ma *et al.*, 2005; Ramírez-Andoney, 2013, donde los pesos corporales de los ratones inmunizados con miostatina recombinante no mostraron diferencias significativas.

Sin embargo, se observan aumentos significativos en el peso a la canal después de la inmunización con ADN y en el esquema prime-boost; un estudio demostró 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 de (Lee and McPherron, 2001; Whittemore *et al.*, 2003) con ratones transgénicos se observó un aumento de peso en canal de 48% a las 18 semanas.

La participación de las construcciones quiméricas de la P2-Miostatina-P30 tiene un mejor efecto en el aumento de peso, principalmente en la canal, la cabeza, la región caudal y los tríceps. Este aumento en tríceps y la región caudal 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, Lawler and Lee, 1997). El músculo tibial anterior crecido puramente por hipertrofia. En contraste, el tamaño del grupo de músculos 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 la P2-Miostatina-P30 recombinante, nos indica que los epítomos P2 y P30 juegan un papel importante en la inducción de inmunidad a la miostatina. Estudios anteriores han demostrado que la toxina tetánica como estimulante inmunitario puede generar una respuesta inmunitaria dirigida al péptido fusionado (Panina-Bordignon *et al.*, 1989; Combadiere and Liard, 2011) como la que se observa en la evaluación de anticuerpos donde en los esquemas que se usa la P2-Miostatina-P30 recombinante se observan densidades ópticas más altas que en aquellos donde solo se utiliza la vacuna de ADN. Los epítomos de toxina tetánica no son tóxicos, pero son altamente inmunogénicos, por lo que proporcionan una respuesta Th promiscua asociada con una reacción inmune específica (Valmori *et al.*, 1992; Dalum *et al.*, 1997). Estos fragmentos de toxina tetánica se han utilizado con éxito para inducir células Th en respuestas inmunes humorales contra antígenos de superficie tumoral (Janssen *et al.*, 2003; Lund *et al.*, 2003) y en patógenos infecciosos (Renard *et al.*, 2003).

La inmunización con ADN es efectiva para inducir la respuesta inmune (Tang *et al.*, 2007), pero requiere inmunizaciones repetidas y altas dosis de ADN, lo que hace que el procedimiento de inmunización sea engorroso, prolongado y costoso (Reisz-Porszasz *et al.*, 2003).

Para reducir la cantidad de antígeno utilizado, la cantidad de inmunizaciones aplicadas, obtener una respuesta inmune significativa y crecimiento muscular, se evaluó un protocolo de inmunización prime-boost heterólogo donde se observó una ganancia mayor de peso que en aquellos esquemas donde solo se utilizó la vacuna de ADN o la proteína recombinante P2-Miostatina-P30. Estos resultados indican que el esquema de inmunización prime boost heterólogo es un protocolo eficaz y prometedor para mejorar la inducción de inmunidad, reduciendo el número de inmunizaciones utilizadas y el tiempo para obtener una respuesta inmune, dando como resultado un mayor peso y respuestas más homogéneas (Lu, 2009).

El análisis de ELISA reveló que la presencia de anticuerpos solo se observó cuando el antígeno recombinante se usó como inmunógeno esto es probablemente

debido a que las cantidades del antígeno que se producen cuando se administra un plásmido están en el orden de los pico o nano gramos (Sardesai and Weiner, 2011). Estos niveles relativamente pequeños de antígeno hacen pensar que la respuesta inmune se debe al tipo de células que capturan el ADN, ya que es necesario que células presentadoras de antígeno (CPA) capturen el antígeno, lo procesen y lo presenten a otras células del sistema inmune como los linfocitos T (Van Drunen Littelvan Den Hurk, Babiuk and Babiuk, 2004). Por otro lado, estudios anteriores han demostrado que la toxina tetánica en forma de un estimulante inmunitario fusionado con péptidos (que puede no ser antigénico para sí mismo) puede provocar una respuesta inmunitaria dirigida al péptido fusionado (Panina-Bordignon *et al.*, 1989; Combadiere and Liard, 2011). Los epítomos de la toxina tetánica no son tóxicos sino altamente inmunogénicos, por lo que proporcionan una respuesta Th promiscua asociada con una reacción inmune específica (Valmori *et al.*, 1992; Dalum *et al.*, 1997). Estos fragmentos de toxina tetánica se han utilizado con éxito para inducir células Th en respuestas inmunes humorales contra antígenos de superficie tumoral (Janssen *et al.*, 2003; Lund *et al.*, 2003) y en patógenos infecciosos (Renard *et al.*, 2003).

Los resultados en este estudio son notables debido a que la inmunización activa contra la miostatina podría ser factible para mejorar la masa muscular con aplicaciones clínicas y productivas. Los ratones inmunizados aparentemente tenían un tamaño de órgano normal y no presentaban signos patológicos, lo que sugiere que la inhibición de la miostatina aumenta específicamente la masa del músculo esquelético sin efectos secundarios (Grobet *et al.*, 2003; Schuelke *et al.*, 2004).

CONCLUSION

Este estudio muestra que la inmunización con una vacuna de ADN que expresa miostatina fusionada con los epítomos P2-P30 promueve el crecimiento del músculo esquelético, sin embargo, un protocolo inmunización prime-boost mejora la respuesta inmune además de ser un procedimiento más práctico al reducir la frecuencia de inmunización y obteniendo mejores ganancias de peso principalmente en la región caudal.

Aparentemente los cambios fisiológicos observados en los ratones inmunizados 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 observado 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 prometedora.

BIBLIOGRAFIA

Acosta, J., Carpio, Y., Borroto, I., Gonz, O. and Estrada, M. P. (2005) 'Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype', *Journal of Biotechnology*, 119, pp. 324–331. doi: 10.1016/j.jbiotec.2005.04.023.

Amthor, H., Christ, B., Rashid-Doubell, F., Kemp, C. F., Lang, E. and Patel, K. (2002) 'Follistatin regulates bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) activity to stimulate embryonic muscle growth', *Developmental Biology*, 243(1), pp. 115–127. doi: 10.1006/dbio.2001.0555.

Amthor, H., Nicholas, G., McKinnell, I., Kemp, C. F., Sharma, M., Kambadur, R. and Patel, K. (2004) 'Follistatin complexes Myostatin and antagonises Myostatin-mediated inhibition of myogenesis', *Developmental Biology*. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.01.046.

Blader, P., Rastegar, S., Fischer, N. and Strähle, U. (1997) 'Cleavage of the BMP-4 antagonist chordin by zebrafish tolloid', *Science*. doi: 10.1126/science.278.5345.1937.

Boccard, R. (1982) 'RELATIONSHIP BETWEEN MUSCLE HYPERTROPHY AND THE COMPOSITION OF SKELETAL MUSCLES', *King and Ménissier, Martinus Nijhoff*, pp. 148–149.

Bogdanovich, S., Krag, T. O. B., Barton, E. R., Morris, L. D., Whittemore, L. A., Ahima, R. S. and Khurana, T. S. (2002) 'Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade', *Nature*, 420(6914), pp. 418–421. doi: 10.1038/nature01154.

Carlson, C. J., Booth, F. W. and Gordon, S. E. (1999) 'Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading', *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 277(2 46-2), pp. 601–606.

Charlier, C., Coppieters, W., Farnir, F., Grobet, L., Leroy, P. L., Michaux, C., Mni, M., Schwers, A. and Vanmanshoven, P. (1995) 'The mh gene causing double-muscling in cattle maps to bovine Chromosome 2', *Mammalian Genome*, 6(December), pp. 788–792. doi: 10.1007/BF00539005.

Clair, H., Della-Fera, M. A. and Baile A., C. (2001) *Review of myostatin*

history, physiology and applications, International Archives of Bioscience.

Climont, J., Martinez-climont, J. A., Blesa, D., Garcia-barchino, M. J., Saez, R., Sa, D., Azagra, P., Lluch, A. and Garcia-conde, J. (2002) 'Genomic Loss of 18p Predicts an Adverse Clinical Outcome in Patients with High-Risk Breast Cancer 1', 8(December), pp. 3863–3869.

Combadiere, B. and Liard, C. (2011) 'Transcutaneous and intradermal vaccination.', *Human vaccines*, 7(8), pp. 811–827. doi: 10.4161/hv.7.8.16274.

Dalum, I., Jensen, M. R., Gregorius, K., Thomasen, C. M., Elsner, H. I. and Mouritsen, S. (1997) 'Induction of cross-reactive antibodies against a self protein by immunization with a modified self protein containing a foreign T helper epitope', *Molecular Immunology*, 34(16–17), pp. 1113–1120. doi: 10.1016/S0161-5890(97)00147-8.

Doria-Rose, N. A. and Haigwood, N. L. (2003) 'DNA vaccine strategies: Candidates for immune modulation and immunization regimens', *Methods*, 31(3), pp. 207–216. doi: 10.1016/S1046-2023(03)00135-X.

Van Drunen Littel-van Den Hurk, S., Babiuk, S. L. and Babiuk, L. A. (2004) 'Strategies for improved formulation and delivery of DNA vaccines to veterinary target species', *Immunological Reviews*, pp. 113–125. doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.00140.x.

Excler, J. L. and Plotkin, S. (1997) 'The prime-boost concept applied to HIV preventive vaccines.', *AIDS (London, England)*.

Fan, Q. H., Zhang, Z. Q., Brown, R., France, S. and Bennett, S. (2016) 'New Zealand Pneumolaelaps Berlese (Acari: Laelapidae): Description of a new species, key to species and notes on biology', *Systematic and Applied Acarology*, 21(1), pp. 119–138. doi: 10.11158/saa.21.1.8.

Fiems, L. O. (2012) 'Double Muscling in Cattle: Genes, Husbandry, Carcasses and Meat', *Animals*, 2(Dm), pp. 472–506. doi: 10.3390/ani2030472.

Gamer, L. W., Wolfman, N. M., Celeste, A. J., Hattersley, G., Hewick, R. and Rosen, V. (1999) 'A novel BMP expressed in developing mouse limb, spinal cord, and tail bud is a potent mesoderm inducer in *Xenopus* embryos', *Developmental Biology*, 208(1), pp. 222–232. doi: 10.1006/dbio.1998.9191.

Gaviño, M. A., Wenemoser, D., Wang, I. E. and Reddien, P. W. (2013) 'Tissue absence initiates regeneration through Follistatin-mediated inhibition of Activin signaling', *eLife*. doi: 10.7554/eLife.00247.

Ge, G. and Greenspan, D. S. (2006) 'BMP1 controls TGF β 1 activation via cleavage of latent TGF β -binding protein', *Journal of Cell Biology*, 175(1), pp. 111–120. doi: 10.1083/jcb.200606058.

Gerloni, M., Xiong, S., Mukerjee, S., Schoenberger, S. P., Croft, M. and Zanetti, M. (2000) 'Functional cooperation between T helper cell determinants', *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 97(0027-8424 (Print)), pp. 13269–13274. doi: 10.1073/pnas.230429197.

Gonzalez-Cadavid, N. F., Taylor, W. E., Yarasheski, K., Sinha-Hikim, I., Ma, K., Ezzat, S., Shen, R., Lalani, R., Asa, S., Mamita, M., Nair, G., Arver, S. and Bhasin, S. (1998) 'Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(25), pp. 14938–43. doi: 10.1073/pnas.95.25.14938.

Grobet, L., Martin, L. J. R., Poncelet, D., Pirottin, D., Brouwers, B., Riquet, J., Schoeberlein, A., Dunner, S., Mnissier, F., Massabanda, J., Fries, R., Hanset, R. and Georges, M. (1997) 'A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle', *Nature Genetics*, 17(1), pp. 71–74. doi: 10.1038/ng0997-71.

Grobet, L., Pirottin, D., Farnir, F., Poncelet, D., Royo, L. J., Brouwers, B., Christians, E., Desmecht, D., Coignoul, F., Kahn, R. and Georges, M. (2003) 'Modulating skeletal muscle mass by postnatal, muscle-specific inactivation of the myostatin gene', *Genesis*, 35(4), pp. 227–238. doi: 10.1002/gene.10188.

H.Q. Han and William E. Mitch (2011) 'Targeting the Myostatin Signaling Pathway to Treat Muscle Wasting Diseases', *Curr Opin Support Palliat Care*, 5(4), pp. 334–341. doi: 10.1097/SPC.0b013e32834bddf9.Targeting.

Hayette, S., Gadoux, M., Martel, S., Bertrand, S., Tigaud, I., Magaud, J. P. and Rimokh, R. (1998) 'FLRG (follistatin-related gene), a new target of chromosomal rearrangement in malignant blood disorders', *Oncogene*. doi:

10.1038/sj.onc.1201807.

Hill, J. J., Davies, M. V., Pearson, A. A., Wang, J. H., Hewick, R. M., Wolfman, N. M. and Qiu, Y. (2002) 'The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.M206379200.

Hill, J. J., Qiu, Y., Hewick, R. M. and Wolfman, N. M. (2003) 'Regulation of myostatin in vivo by growth and differentiation factor-associated serum protein-1: A novel protein with protease inhibitor and follistatin domains', *Molecular Endocrinology*. doi: 10.1210/me.2002-0366.

Iemura, S. I., Yamamoto, T. S., Takagi, C., Uchiyama, H., Natsume, T., Shimasaki, S., Sugino, H. and Ueno, N. (1998) 'Direct binding of follistatin to a complex of bone-morphogenetic protein and its receptor inhibits ventral and epidermal cell fates in early *Xenopus* embryo', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.95.16.9337.

Iezzi, S., Padova, M. Di, Serra, C., Caretti, G., Simone, C., Maklan, E., Minetti, G., Zhao, P., Hoffman, E. P., Puri, P. L. and Sartorelli, V. (2004) 'Deacetylase Inhibitors Increase Muscle Cell Size by Promoting Myoblast Recruitment and Fusion through Induction of Follistatin', *Developmental Cell*, 6, pp. 673–684.

Indresh K. Srivastava and Margaret A. Liu (2003) 'Gene Vaccines', *Ann Intern Med*, 138, pp. 550–559.

Janssen, E. M., Lemmens, E. E., Wolfe, T., Christen, U., Von Herrath, M. G. and Schoenberger, S. P. (2003) 'CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes', *Nature*, 421(6925), pp. 852–856. doi: 10.1038/nature01441.

Ji, S., Losinski, R. L., Cornelius, S. G., Frank, G. R., Willis, G. M., Gerrard, D. E., Depreux, F. F. S. and Spurlock, M. E. (1998) 'Myostatin expression in porcine tissues: Tissue specificity and developmental and postnatal regulation', *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 275(4 44-4), pp. 1265–1273.

Kambadur, R., Sharma, M., Smith, T. P. L. and Bass, J. J. (1997) 'Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle', *Genome Research*, 7(9), pp. 910–916. doi: 10.1101/gr.7.9.910.

Keller, E. B. and Noon, W. A. (1984) 'Intron splicing: A conserved internal signal in introns of animal pre-mRNAs', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(23 I), pp. 7417–7420. doi: 10.1073/pnas.81.23.7417.

Langley, B., Thomas, M., Bishop, A., Sharma, M., Gilmour, S. and Kambadur, R. (2002) 'Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression', *Journal of Biological Chemistry*, 277(51), pp. 49831–49840. doi: 10.1074/jbc.M204291200.

Lee, S.-J. (2004) 'Regulation of Muscle Mass By Myostatin', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20(1), pp. 61–86. doi: 10.1146/annurev.cellbio.20.012103.135836.

Lee, S.-J. and McPherron, A. C. (2001) 'Regulation of myostatin activity and muscle growth', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(16), pp. 9306–9311. doi: 10.1073/pnas.151270098.

Lee, S.-J., Reed, L. A., Davies, M. V, Girgenrath, S., Goad, M. E. P., Tomkinson, K. N., Wright, J. F., Barker, C., Ehrmantraut, G., Holmstrom, J., Trowell, B., Gertz, B., Jiang, M.-S., Sebald, S. M., Matzuk, M., Li, E., Liang, L.-F., Quattlebaum, E., Stotish, R. L. and Wolfman, N. M. (2005) 'Regulation of muscle growth by multiple ligands signaling through activin type II receptors.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(50), pp. 18117–18122. doi: 10.1073/pnas.0505996102.

Lin, J., Arnold, H. B., Della-Fera, M. A., Azain, M. J., Hartzell, D. L. and Baile, C. A. (2002) 'Myostatin knockout in mice increases myogenesis and decreases adipogenesis', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 291(3), pp. 701–706. doi: 10.1006/bbrc.2002.6500.

Long, D. B., Zhang, K. Y., Chen, D. W., Ding, X. M. and Yu, B. (2009) 'Effects of active immunization against myostatin on carcass quality and expression of the myostatin gene in pigs', *Animal Science Journal*, 80(5), pp. 585–590. doi:

10.1111/j.1740-0929.2009.00666.x.

Lu, S. (2009) 'Heterologous prime-boost vaccination', *Current Opinion in Immunology*, pp. 346–351. doi: 10.1016/j.coi.2009.05.016.

Lund, L. H., Andersson, K., Zuber, B., Karlsson, A., Engström, G., Hinkula, J., Wahren, B. and Winberg, G. (2003) 'Signal sequence deletion and fusion to tetanus toxoid epitope augment antitumor immune responses to a human carcinoembryonic antigen (CEA) plasmid DNA vaccine in a murine test system', *Cancer Gene Therapy*, 10(5), pp. 365–376. doi: 10.1038/sj.cgt.7700574.

Ma, X., Cao, Y., Shu, D. and Bi, Y. (2005) 'Cloning and expression of swine myostatin gene and its application in animal immunization trial', *Science in China, Series C: Life Sciences*. doi: 10.1360/04yc0061.

Maccatrozzo, L., Bargelloni, L., Cardazzo, B., Rizzo, G., Patarnello, T., B, V. U. B., Padova, I., Biologia, D. and Veterinaria-agripolis, M. (2001) 'A novel second myostatin gene is present in teleost ϕ sh', *FEBS Lett*, 509, pp. 36–40.

Marqués, G., Musacchio, M., Shimell, M. J., Wünnenberg-Stapleton, K., Cho, K. W. Y. and O'Connor, M. B. (1997) 'Production of a DPP activity gradient in the early drosophila embryo through the opposing actions of the SOG and TLD proteins', *Cell*. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80425-0.

Massague, J. (1992) 'Receptors for the TGF-beta Family', *Cell Press*, 69, pp. 1067–1070.

Matzuk, M. M., Kumar, T. R., Vassalli, A., Bickenbach, J. R., Roop, D. R., Jaenisch, R. and Bradley, A. (1995) 'Functional analysis of activins during mammalian development', *Nature*, 374(6520), pp. 354–356. doi: 10.1038/374354a0.

McPherron, A. C., Lawler, A. M. and Lee, S. J. (1997) 'Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member', *Nature*, 387(6628), pp. 83–90. doi: 10.1038/387083a0.

McPherron, A. C. and Lee, S.-J. (2002) 'Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice', doi: 10.1172/JCI200213562', *J. Clin. Invest.*, 109(5), pp. 595–601. doi: 10.1172/JCI200213562.Introduction.

McPherron, A. C. and Lee, S. J. (1996) *The transforming growth factor β superfamily, Growth Factors and Cytokines in Health and Disease*. doi:

10.1016/S1874-5687(96)80016-4.

Menissier, F. (1982) 'MUSCULAR HYPERTROPHY OR THE DOUBLE MUSCLED TRAIT IN CATTLE', *Current topics in Veterinary Medicine and Animal Science*, 16, pp. 387–428.

Michaux, C. (1985) 'On the genetic determinism of muscular hypertrophy in the Belgian White and Blue cattle breed', *Génét. Sél. Evol*, 17, pp. 359–368.

Mosher, D. S., Quignon, P., Bustamante, C. D., Sutter, N. B., Mellersh, C. S., Parker, H. G. and Ostrander, E. A. (2007) 'A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs', *PLoS Genetics*, 3(5), pp. 779–786. doi: 10.1371/journal.pgen.0030079.

Nakashima, M., Toyono, T., Akamine, A. and Joyner, A. (1999) 'Expression of growth/differentiation factor 11, a new member of the BMP/TGF β superfamily during mouse embryogenesis', *Mechanisms of Development*, 80(2), pp. 185–189. doi: 10.1016/S0925-4773(98)00205-6.

Nascimento, I. P. and Leite, L. C. C. (2012) 'Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies', *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. doi: 10.1590/S0100-879X2012007500142.

Ogrodniczuk, J. and Oliffe, J. (2010) 'Manning up for men's mental illness', *Australian Family Physician*, 39(12), pp. 931–932. doi: 10.1074/jbc.M004356200.

Østbye, T., Galloway, T. F., Nielsen, C., Gabestad, I. and Bardal, T. (2001) 'The two myostatin genes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) are expressed in a variety of tissues', *Eur. J. Biochem*, 5257, pp. 5249–5257.

Panina-Bordignon, P., Tan, A., Termijtelen, A., Demotz, S., Corradin, G. and Lanzavecchia, A. (1989) 'Universally immunogenic T cell epitopes: promiscuous binding to human MHC class II and promiscuous recognition by T cells', *European Journal of Immunology*, 19(12), pp. 2237–2242. doi: 10.1002/eji.1830191209.

Pappano, W. N., Steiglitz, B. M., Scott, I. C., Keene, D. R. and Greenspan, D. S. (2003) 'PappanoWN03MolCellBiol.pdf', 23(13), pp. 4428–4438. doi: 10.1128/MCB.23.13.4428.

Piccolo, S., Agius, E., Lu, B., Goodman, S., Dale, L. and De Robertis, E. M. (1997) 'Cleavage of chordin by xolloid metalloprotease suggests a role for

proteolytic processing in the regulation of spemann organizer activity', *Cell*. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80424-9.

Ramírez-Andoney, V. (2013) *Construcción de una vacuna de ADN contra Miostatina*. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA METROPOLITANA. Available at: <http://132.248.9.195/ptd2013/enero/0687632/Index.html>.

Ramshaw, I. A. and Ramsay, A. J. (2000) 'The prime-boost strategy: Exciting prospects for improved vaccination', *Immunology Today*, 21(4), pp. 163–165. doi: 10.1016/S0167-5699(00)01612-1.

Rehfeld, J. F. (2004) 'Clinical endocrinology and metabolism. Cholecystokinin.', *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, 18(4), pp. 569–86. doi: 10.1016/j.beem.2004.07.002.

Reisz-Porszasz, S., Bhasin, S., Artaza, J. N., Shen, R., Sinha-Hikim, I., Hogue, A., Fielder, T. J. and Gonzalez-Cadavid, N. F. (2003) 'Lower skeletal muscle mass in male transgenic mice with muscle-specific overexpression of myostatin', *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 285(4), pp. E876–E888. doi: 10.1152/ajpendo.00107.2003.

Renard, V., Sonderbye, L., Ebbelhøj, K., Rasmussen, P. B., Gregorius, K., Gottschalk, T., Mouritsen, S., Gautam A. and Leach, D. . (2003) 'HER-2 DNA and Protein Vaccines Containing Potent Th Cell Epitopes Induce Distinct Protective and Therapeutic Antitumor Responses in HER-2 Transgenic Mice', *The Journal of Immunology*, 171, pp. 1588 –1595. doi: 10.4049/jimmunol.171.3.1588.

Rodgers, B. D., Weber, G. M., Sullivan, C. V and Levine, M. A. (2001) 'Isolation and Characterization of Myostatin Complementary Deoxyribonucleic Acid Clones from Two Commercially Important Fish : *Oreochromis mossambicus* and *Morone chrysops* *', *Oreochromis mossambicus and Morone chrysops. Endocrine*, 142(4), pp. 1412–1418.

Royo, L. J. (2003) *Secuenciación Y Análisis Del Gen De La Miostatina Bovina, Facultad De Veterinaria*.

Saade, F. and Petrovsky, N. (2012) 'Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines', *Expert Review of Vaccines*. doi: 10.1586/erv.11.188.

Sardesai, N. Y. and Weiner, D. B. (2011) 'Electroporation delivery of DNA

vaccines: Prospects for success', *Current Opinion in Immunology*. doi: 10.1016/j.coi.2011.03.008.

Schuelke, M., Wagner, K. R., Stolz, L. E., Hübner, C., Riebel, T., Kömen, W., Braun, T., Tobin, J. F. and Lee, S.-J. (2004) 'Myostatin Mutation Associated with Gross Muscle Hypertrophy in a Child', *New England Journal of Medicine*, 350(26), pp. 2682–2688. doi: 10.1056/NEJMoa040933.

Scott, I. C., Blitz, I. L., Pappano, W. N., Imamura, Y., Clark, T. G., Steiglit, B. M., Thomas, C. L., Maas, S. A., Takahara, K., Cho, K. W. Y. and Greenspan, D. S. (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', *Developmental Biology*, 213(2), pp. 283–300. doi: 10.1006/dbio.1999.9383.

Shixia Wang and Shan Lu* (2014) 'DNA Immunization', pp. 1–28. doi: 10.1002/9780471729259.mc1803s31.DNA.

Siriatt, V., Salerno, M. S., Berry, C., Nicholas, G., Bower, R., Kambadur, R. and Sharma, M. (2007) 'Antagonism of Myostatin Enhances Muscle Regeneration During Sarcopenia', *Molecular Therapy*, 15(March 2014), pp. 1463–1470. doi: 10.1038/sj.mt.6300182.

Slack, J. M. (1993) 'Embryonic induction. [Review]', *Mechanisms of Development*.

Sunada, Y. (2006) 'Therapeutic strategies for muscular dystrophy by myostatin inhibition', in *Clinical Neurology*.

Tang, L., Yan, Z., Wan, Y., Wei, H. and Zhang, Y. (2007) 'Myostatin DNA vaccine increases skeletal muscle mass and endurance in mice', *Muscle and Nerve*, 36(3), pp. 342–348. doi: 10.1002/mus.20791.

Tsuchida, K., Arai, K. Y., Kuramoto, Y., Yamakawa, N., Hasegawa, Y. and Sugino, H. (2000) 'Identification and characterization of a novel follistatin-like protein as a binding protein for the TGF- β family', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.M006114200.

Valmori, D., Pessi, A., Bianchi, E. and Corradin, G. (1992) 'Use of human universally antigenic tetanus toxin T cell epitopes as carriers for human

vaccination.', *Journal of Immunology*, 149(2), pp. 717–721. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1378079>.

Whittemore, L. A., Song, K., Li, X., Aghajanian, J., Davies, M., Girgenrath, S., Hill, J. J., Jalenak, M., Kelley, P., Knight, A., Maylor, R., O'hara, D., Pearson, A., Quazi, A., Ryerson, S., Tan, X. Y., Tomkinson, K. N., Veldman, G. M., Widom, A., Wright, J. F., Wudyka, S., Zhao, L. and Wolfman, N. M. (2003) 'Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 300(4), pp. 965–971. doi: 10.1016/S0006-291X(02)02953-4.

Wolfman, N. M., McPherron, A. C., Pappano, W. N., Davies, M. V., Song, K., Tomkinson, K. N., Wright, J. F., Zhao, L., Sebald, S. M., Greenspan, D. S. and Lee, S. (2003) 'Activation of latent myostatin by the BMP-1/Tolloid family of metalloproteinases', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(26), pp. 15842–15846.

Yamashita, H., Dijke, P. Ten, Huylebroeck, D., Kuber Sampath, T., Andries, M., Smith, J. C., Heldin, C. H. and Miyazono, K. (1995) 'Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.130.1.217.

Zhu, X., Hadhazy, M., Wehling, M., Tidball, J. G. and McNally, E. M. (2000) 'Dominant negative myostatin produces hypertrophy without hyperplasia in muscle', *FEBS Letters*. doi: 10.1016/S0014-5793(00)01570-2.

Zimmers, T. A., Davies, M. V., Koniaris, L. G., Paul Haynes, Esquela, A. F., Tomkinson, K. N., McPherron, A. C., Wolfman, N. M. and Lee, S.-J. (2000) 'Induction of Cachexia in Mice by Systemically Administered Myostatin', *Science*, 296(May), pp. 1486–1488. Available at: <http://science.sciencemag.org/>.

Anexo 1. Pesos individuales de ratones en los diferentes esquemas de inmunización.

Grupo	Peso	Canal con cabeza	Canal sin cabeza	Cabeza	Región craneal	Región caudal	Cuadriceps	Tríceps
1	25,6	13,43	10,97	2,44	6,12	4,98	1,54	0,64
1	24,6	13,35	10,76	2,56	5,73	5,03	1,49	0,61
1	27,59	14,85	12,52	2,34	7,22	5,13	1,48	0,62
1	23,86	13,06	10,65	2,45	6,25	4,38	1,51	0,5
1	23,21	12,2	9,92	2,15	5,73	4,34	1,39	0,6
1	25,71	13,69	11,14	2,56	6,16	5,01	1,62	0,65
2	25,59	13,95	11,34	2,6	6,06	5,27	1,69	0,65
2	23,72	12,04	9,65	2,36	5,56	4,15	1,55	0,52
2	22,6	11,88	9,54	2,32	5,29	4,23	1,36	0,63
2	20,37	9,47	7,64	1,87	3,96	3,74	1,21	0,44
2	27,68	14,49	11,98	2,49	6,52	5,45	1,49	0,54
2	22,22	11,6	9,57	1,88	5,48	4,28	1,21	0,53
3	24,74	12,57	10,44	2,15	5,54	4,91	1,2	0,65
3	24,56	13,38	11,2	2,15	6	5,24	1,5	0,74
3	26,59	14,17	12,12	2,08	6,53	5,51	1,41	0,62
3	25,38	14,08	11,54	2,52	6,23	5,23	1,49	0,58
3	26,82	14,5	11,81	2,64	6,31	5,43	1,45	0,38
3	26,06	14,15	11,49	2,6	6,02	5,43	1,71	0,71
4	24,75	12,65	10,39	2,23	5,68	4,68	1,59	0,82
4	22,78	11,41	9,03	2,36	4,99	3,99	1,27	0,63
4	23,15	11,91	9,66	2,25	5,3	4,29	1,16	0,56
4	19,84	10,14	7,88	2,25	4,21	3,62	1,35	0,62
4	24,79	12,38	10,17	2,2	6,07	3,92	1,72	0,57
4	23,78	11,93	9,59	2,33	5,29	4,3	1,47	0,61
5	26,89	13,68	11,42	2,25	6,27	5,13	1,71	0,64
5	26,63	13,33	11,02	2,29	5,91	5,1	1,52	0,64
5	25,52	12,47	10,69	2,03	6,08	4,6	1,44	0,73
5	25,78	13,14	10,98	2,16	5,96	5,02	1,67	0,67
5	22,55	11,41	9,5	1,4	5,34	4,12	1,21	0,63
5	21,69	10,86	9,08	1,83	4,69	4,14	1,16	0,54
6	24,2	11,51	9,67	1,81	5,45	4,22	1,16	0,59
6	20,51	10,62	8,68	1,96	5,03	3,67	1,18	0,59
6	27,14	13,6	11,22	2,39	6,25	4,97	1,37	0,65
6	21,48	10,61	8,57	2,07	4,63	3,84	1,19	0,51
6	23,38	12,09	9,92	2,17	5,49	4,27	1,3	0,62
6	21,71	10,45	8,61	1,84	4,81	3,78	1,24	0,58

RESEARCH PAPER

Chimeric Myostatin - Tetanic Toxin Epitopes and Heterologous Prime-boost Immunization Improve Immune Response Stimulating Muscle Growth in Mice

Vianey Ramírez Andoney, Amanda Gayosso Vázquez, Juan Pablo Pintor Ríos, Jorge Enrique Vázquez Buchelli, and Rogelio A. Alonso Morales

Received: 17 March 2019 / Revised: 16 June 2019 / Accepted: 17 June 2019
© The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering and Springer 2019

Abstract Myostatin is a transforming growth factor- β family member who acts as a negative regulator of skeletal muscle growth. The interference of its biological activity could increase skeletal muscle growth with clinical and animal production applications. A strategy to block the myostatin action is by the induction of an immune response against it. In this work, we evaluated as an immunogen a recombinant myostatin fused to the tetanic toxin T- helper epitopes P2 and P30. Genetic constructs of the chimeric myostatin were cloned in an expression vector and used as a DNA vaccine. Besides, a chimeric genetic construct, P2-myostatin-P30 was expressed in *Escherichia coli*, obtaining a recombinant chimeric antigen. To find out the functionality of these genetic constructs as a vaccine in inducing muscle growth responses, experimental groups of BALB/c mice were DNA immunized with the myostatin fused to P2, P30 or both. Furthermore, to improve the immune response, a heterologous prime-boost immunization scheme was evaluated where the DNA inoculation was followed by immunization with the recombinant antigen P2-myostatin-P30. The different body segments weight was

recorded in control and vaccinated mice groups, finding increased muscle masses in the vaccinated groups. These experiments showed the effectiveness of the P2 and P30 T-helper epitopes in inducing an immune response to the fused myostatin, leading to muscle growth. The heterologous prime-boost immunization protocol is a promising vaccination strategy reducing the time and amount of antigen used to induce a immune response to myostatin.

Keywords: myostatin, prime boost immunization, tetanic toxin epitopes, DNA vaccine

1. Introduction

Myostatin, also known as growth and differentiation factor-8 (GDF-8), is a member of the transforming growth factor-beta family that plays an essential role in regulating skeletal muscle growth [1-3]. Myostatin acts as a negative regulator of skeletal muscle growth and is highly conserved through evolution [3]. Systematic administration of exogenous myostatin in adult mice induces an overall decrease in muscle mass [4].

In several species, it has been shown that natural occurring null mutations in the myostatin gene, lead to dramatic increases in skeletal muscle mass, muscle strength and reduced fat accumulation in comparison to wild-type phenotypes [5-10]. Conditional myostatin knockout mice, presenting postnatal inactivation of the myostatin gene, also show striking increases in muscle mass [11]. Myostatin antagonists, such as monoclonal and

Vianey Ramírez Andoney, Amanda Gayosso Vázquez, Juan Pablo Pintor Ríos, Jorge Enrique Vázquez Buchelli, Rogelio A. Alonso Morales
Department of Genetic and Biostatistics, Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics, National Autonomous University of Mexico, Mexico City 04510, Mexico

Rogelio A. Alonso Morales*
Molecular Genetics Laboratory, Department of Genetic and Biostatistics, Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics, National Autonomous University of Mexico, Mexico City 04510, Mexico
Tel: +52-55-56225956
E-mail: ralonso@unam.mx

polyclonal antibodies specific to myostatin and follistatin, as well as activin type II receptor antagonists, can significantly increase skeletal muscle mass [12-15].

Important potential clinical applications can be obtained by blocking myostatin, leading to the improvement of several myopathies such as muscular dystrophies, ageing, and muscle loss due to chronic infections or immobilization [10,16-18].

Inhibition of myostatin activity may have potential benefits for livestock producers as well, as it can increase either, the growth performance and the lean meat content in the carcass. At present, few reports are available about the suppression of myostatin activity in livestock species. It has been demonstrated that the active immunization against myostatin, leading to myostatin antibody production, improves the lean meat percentage in pig carcasses [19].

Myostatin is a highly conserved protein, and weakly immunogenic due to immune tolerance. DNA chimeric vaccines that incorporate immune-enhancer epitopes can overcome immune tolerance by a process where a dominant epitope on a fusion protein, enhances the response to other epitopes with weak immunity [20]. Two such of immune-enhancer elements are the tetanus toxin peptides P2 and P30 [21]. Previously, It has been shown that the P2 tetanic toxin epitope linked to myostatin gene administrated as a DNA vaccine in mice, increased muscle mass [16].

A common practice in vaccination, to obtain an effective immune response, is to immunize several times with the same immunogen, this is known as homologous prime-boost. The boosting with the same antigen delivered in different form, known as heterologous prime-boost, has been shown to improve significantly the immunity, inducing both humoral and cell-mediated responses [22,23].

In this study, we assess the effect, in muscle growth in mice, of the chimeric epitope P2-myostatin and evaluate the epitope P30 fused to myostatin gene after immunization using DNA vaccination and a heterologous prime-boost immunization scheme, where the vaccine DNA inoculation was followed by immunization with a recombinant P2-myostatin-P30 antigen produced in *E. coli*.

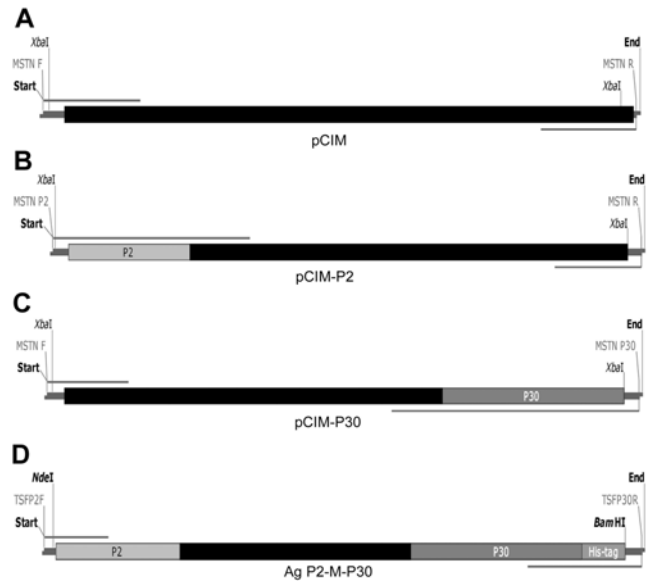


Fig. 1. Map of the genetic myostatin constructs. A. Myostatin c-fragment gene (348 bp); B. Epitope P2 fused to the 5' end of the myostatin fragment (389 bp); C. Epitope P30 fused to the 3' end of the myostatin fragment (416 bp) and D. Myostatin fragment fused with the P2 and P30 epitopes (457 bp). The genetic construct names, restriction sites, the start and end of the coding regions, and the positions of the primers are indicated.

2. Materials and Methods

2.1. Preparation of DNA vaccines constructs

Myostatin genetic constructs (Fig. 1) were obtained by PCR. Amplified myostatin genetic constructs were cloned in the pCI-neo Mammalian Expression Vector (Promega, Madison, Wisconsin, USA). PCR primers were designed based on the reported chicken myostatin mRNA sequence (GenBank accession number AY448008). Primers comprised the epitopes sequences of the tetanus toxin P2, P30, and the XbaI cloning site (Table 1). DNA isolated from chicken embryo muscle was used as a template to amplify the C-terminal fragment of chicken myostatin gene (positions 798-1127) with the primers MSTNF and MSTNR and

Table 1. Nucleotide DNA sequence of the PCR primers used for the myostatin genetic constructs

Primer	Sequence (5'-3')
MSTN F	AT <u>TCTAGA</u> ATGGATTTTGGVCTTGACTGTGATG
MSTN R	AT <u>TTCTAGA</u> TCATGAGCACCCACAGCGATCTAC
MSTN P2	AT <u>TCTAGA</u> ATGCAGTATATAAAAGCAAATTCTAAATTTATAGGTATAACTG AAGATTTTGGCCTTGACTGTGATG
MSTN P30	AT <u>TCTAGA</u> TACTACTTCTAAATGACTAGCAGATACTTTAGGAACCCCTCAA CCAAAAGCTAACGGTAAAATTATTAACATTGAGCACCCGCAACGATCTAC
TSFP2 F	AT <u>CATATG</u> CAGTATATAAAAGCAAATTC
TSFP30 R	AT <u>GGATCC</u> TCA GTGGTGGTGGTGGTG TACTTCTAAATGACTAGCAGATAC

Restriction endonuclease sites are underlined: XbaI (TCTAGA); BamHI (GGATCC); NdeI (CATATG).

cloned in the XbaI site of the pCI-neo vector, obtaining the pCIM plasmid (myostatin only). This was used as template to amplify, with the MSTNR and MSTNP2 primers, the myostatin fused to the P2 epitope at the 5' end, who was cloned in the pCI-neo vector, generating the pCIM-P2 plasmid; The pCIM-P30 plasmid (myostatin fused to P30 epitope at the 3' end) was obtained by amplifying the myostatin gene with the MSTNF and MSTNP30 primers. Each genetic construction was validated by PCR and nucleotide sequence analysis. PCR was used for assessing positive recombinant clones and the correct cloning orientation. The encoded T7 promoter primer (5' TAATAC GACTCACTATAGG 3') was used plus the reverse primer for each genetic construct (MSTNR, MSTNP30, TSFP30R, see Table 1). The T7 primer was used also for sequencing and verification of the cloned genetic constructs. The plasmid DNA of each construct was grown and purified using EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Chatsworth, CA, EUA) following the manufacturer's instructions.

2.2. Recombinant antigen production

The pET11 *E. coli* protein expression system (Novagen, Darmstadt, Germany) was used to produce recombinant myostatin fused to the P2 epitope in the amino-terminal end, and the P30 epitope plus a 6× histidine tail at the carboxy terminal end (P2-M-P30). The myostatin gene was PCR amplified using primers TSFP2F and TSFP30R shown in Table 1 and cloned into the NdeI and BamHI restriction site of the pET 11(a+) vector, giving the pET-P2MP30 plasmid. An *E. coli* culture of BL21 strain transformed with the pET-P2MP30 plasmid was grown to an OD of 0.5 (600 nm) in LB medium (200 mL) plus

ampicillin (50 mg/L), and the recombinant myostatin protein expression was induced by adding IPTG to 1 mM and incubating at 37°C for 18 h. The recombinant P2-Myostatin-P30-His protein (P2-M-P30) was purified by affinity chromatography, using Ni²⁺ – NTA agarose (Qiagen, Chatsworth, CA, USA) following the manufacturer instructions under denaturalization conditions. Shortly, harvested pelleted bacteria was suspended in 40 mL of lysis buffer (6M guanidine hydrochloride, 50 mM Tris, pH 8.0, 5 mM 2-mercaptoethanol, 5% Tritón X100, 2% Sarcosyl, 100 mM NaCl), incubated for 15 min, and centrifuged at 12,000 × g for 30 min. The supernatant was passed through 1 mL of the Ni²⁺ – NTA column, washed with buffer containing 40 mM Imidazole, 40 mM Sodium phosphate, 1 M NaCl, 6 M guanidine hydrochloride; pH 7.4 and the recombinant antigen eluted with a solution of 6 M guanidine hydrochloride, 50 mM Imidazole, 20 mM Sodium phosphate, 0.5 M NaCl; pH 4.5. The eluted recombinant myostatin was dialyzed against PBS. The recombinant myostatin was quantified by spectrophotometry and assessed by SDS-PAGE and western-blotting (Fig. 2), using a His-probe antibody (H-15) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).

2.3. Animals and treatments

Male BALB/c mice were housed at the animal facility of the Universidad Autonoma Metropolitana - Xochimilco, Mexico City, in environmentally controlled rooms with 12 h daily light, temperature of 22±2°C and humidity of 60±5%. Mice were fed *ad libitum* and followed protocols approved by the Institutional Committee for Care and Use of Experimental Animals of National Autonomous

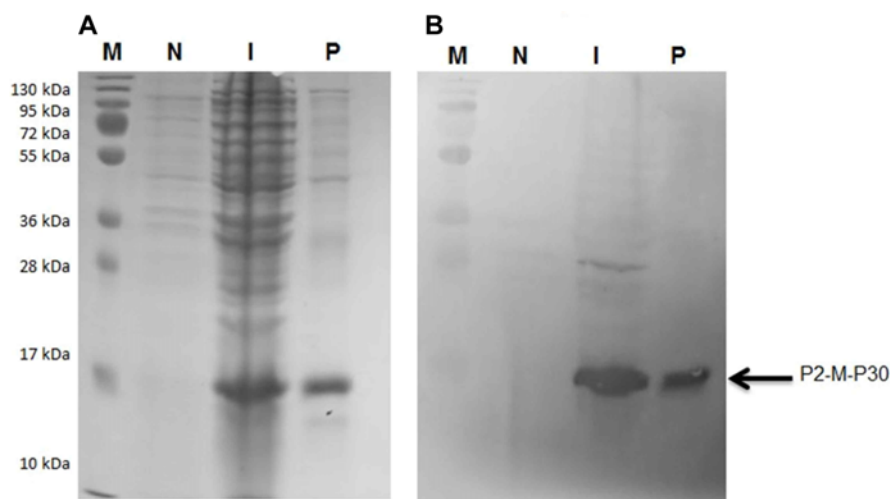


Fig. 2. Western blot analysis of the recombinant myostatin P2-M-P30. Bacterial lysates of non-induced (N), induced (I) and purified recombinant myostatin P2-M-P30 on a Ni-NTA column (P), were subjected to SDS/PAGE electrophoresis (15% polyacrylamide gel) and stained with Coomassie blue (A), transferred to the PVDF membrane, and reacted to an anti-His antibody (B). Molecular weights are indicated in kDa (M).

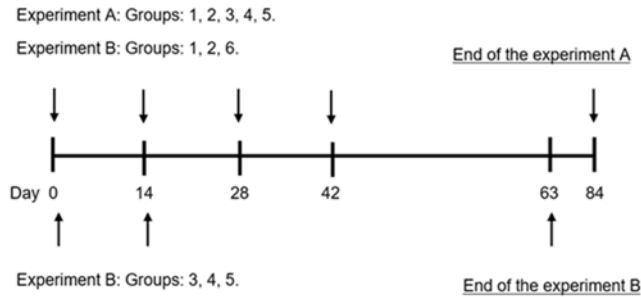


Fig. 3. Immunization schedules for experiments A and B. Experiment A.- Groups of mice were immunized four times at 15-day intervals with the different genetic constructs of DNA or with PBS. Group 1: pCIM; Group 2: pCIM – P2; Group 3: pCIM – P30; Group 4: pCIM–P2 + pCIM-P30; Group 5: PBS. The experiment ended on day 84. Experiment B.- Some groups of mice received four immunizations at 15-day intervals with different immunogens or PBS. Group 1: Plasmids pCIM–P2 + pCIM-P30; Group 2: Recombinant antigen P2-M-P30; Group 6: PBS. Other groups were immunized only twice, every 15 days. Group 3: pCIM–P2 + pCIM-P30 + P2-M-P30. Group 4: pCIM–P2 + pCIM-P30; Group 5: P2-M-P30. The experiment ended on day 63. All immunizations were subcutaneously.

University of Mexico (CICUAE, DC-2017/2-6).

Groups of 6 Male BALB/c mice (3 weeks old) were used to assay the effect of the immunization with the DNA genetic constructs of the myostatin gene fused to P2 and P30 epitopes. We assessed two different immunization schemes (see Fig. 3). In experiment A, groups of mice were DNA immunized with different myostatin construct, injecting 100 µg/100 µL of plasmid DNA, inoculated subcutaneously. Group 1: pCIM, group 2: pCIM–P2; group 3: pCIM-P30; group 4: pCIM–P2 + pCIM-P30; group 5 (control) was immunized with PBS. Mice were immunized 4 times, every 14 days. The muscle weight was recorded on day 84. The immunization dose of DNA used by application was of 100 µg, which has been reported, is the amount required to induce an immune response [24].

The immunization subcutaneous route was selected because it is relatively easy for vaccine delivery and may be advantageous because of the high number of antigen presenting cells present locally [25].

In experiment B, a prime boost immunization scheme was evaluated (Fig. 3), consisting of an initial DNA vaccine immunization, followed by a boost with the same DNA vaccine in combination with the recombinant myostatin antigen P2-M-P30. Groups of 6 Male BALB/c mice (3 weeks old) were employed. Group 1 was immunized with 100 µg/100 µL DNA (pCIM–P2 + pCIM-P30; 50 µg/each) on days 0, 14, 28 and 42; Group 2 was immunized on days 0, 14, 28 and 42, with 100 µg/100 µL of the recombinant antigen P2-M-P30 in incomplete Freund's adjuvant. Group 3,

the prime-boost group, was immunized with 100 µg/100 µL DNA (pCIM–P2 + pCIM-P30, 50 µg/each), on days 0 and 14, and with 100 µg/100 µL recombinant antigen P2-M-P30 in incomplete Freund's adjuvant on day 14; Group 4 was immunized with 100 µg/100 µL DNA (pCIM-P2 + pCIM-P30, 50 µg/each), on days 0 and 14; Group 5 was immunized with 100 µg/100 µL recombinant antigen P2-M-P30 with incomplete Freund's adjuvant on days 0 and 14; Group 6 (control) was immunized with PBS 100 µL on days 0, 14, 28, 42. All individuals were weighed weekly and body regions were evaluated on day 63.

2.4. Carcass evaluation

At the end of the experiments, mice were euthanized, and the intact body weight recorded, as well the following body regions: Carcass, head, cranial region, caudal region, triceps, and quadriceps. The carcass was obtained after removing the head, internal organs, skin, paws from tarsals and carpals and tail from the 3rd sacral vertebra. The cranial region comprised the chest and the front limbs, removing the head and cutting the carcass at the level of the last lumbar vertebra. The remaining body segment was the caudal region, including the forelimbs. The individual normalized weight of each region was obtained after the subtraction of the average value of the negative control group.

2.5. Antibody determination by ELISA

Enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) plates were coated with 60 ng of purified recombinant myostatin (P2-MP3-0) in buffer A (Sodium bicarbonate 0.1 M, sodium carbonate 0.1 M pH 9.6) incubating overnight at 4°C. The plates were washed three times with buffer B (Sodium chloride 0.12 M, Tris-HCl 25 mM pH 7.9, Tween-20 1%). Then, the plates were blocked with 5% skim milk in buffer B and incubated 1 h at 4°C. Mouse sera were diluted 1:10 and 1:100 (100 µL) in buffer B and added to each well in duplicate, incubating for 1 h at 37°C. Afterward, plates were washed three times with buffer B, and horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch, Philadelphia, PA, USA) diluted 1:1500 in buffer B was added to each well and incubated for 1 h at 37°C. After washing with buffer B, the plate was developed adding buffer C (0.1 M citric acid pH 4.5, 0.1 M sodium citrate pH 4.5, 200 µL ortho-phenylene diamine (OPD) [5 µg], and 20 µL hydrogen peroxide [30%]), the reaction was stopped by adding 100 µL of 2 M H₂SO₄. The plates were read at OD 450.

2.6. Statistical evaluation

Data were analyzed using the general linear model (GLM)

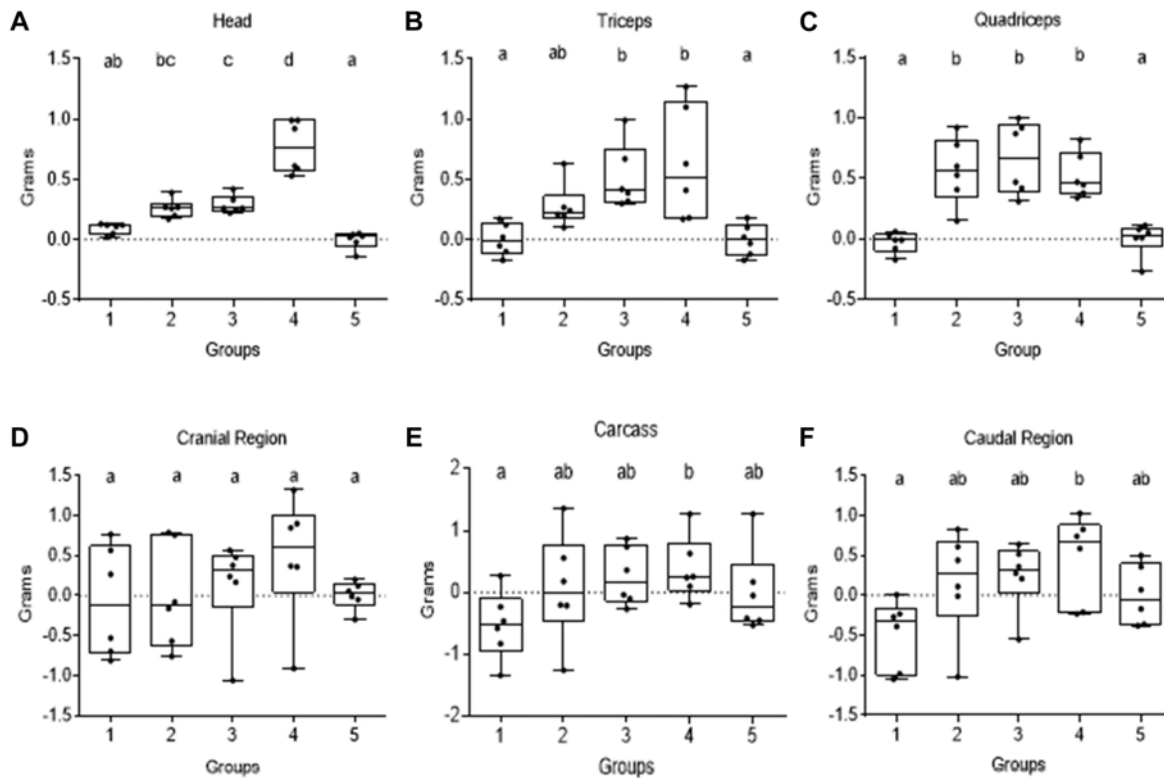


Fig. 4. Body weight segments of mice after immunization with DNA-myostatin constructs. The individual normalized weight of the body segments from the groups of immunized mice are plotted and shown in each graph: A. Head, B. Triceps, C. Quadriceps, D. Cranial region, E. Carcass, and F. Caudal region. The immunized mice groups with the DNA constructs are: 1- pCIM; 2- pCIM-P2; 3- pCIM-P30; 4- pCIM-P2 + pCIM-P30; 5- inoculated with PBS (negative control). The dotted line indicates the basal average weight value of the segments. Different literals indicate statistical differences between groups.

procedure in SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The individual normalized weight for each region was obtained subtracting the average value of the control group to each individual value. Differences between means were determined by a one-way ANOVA test with post-hoc Tukey test. The degree of statistical significance was set at $p \leq 0.05$. Results for each body region among groups were graphed as boxes. Figures were obtained using the GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software, LLC, USA).

3. Results and Discussion

3.1. Weight of different body regions in the immunized groups

The individual weights after been normalized (subtracting the average value of the negative control group) of the different body regions in the immunization groups of the experiment A and B, are showed in Fig. 4 and 5 respectively. The individual weight values for each mouse segment by group and experiment A and B can be provided under request.

3.2. Effect in muscle growth of DNA immunization with myostatin fused to P2 and P30 epitopes

To achieve a procedure to improve muscle growth useful in clinical or animal science applications, we assess as immunogen recombinant myostatin fused either to the tetanic toxin T- helper epitope P2, the epitope P30, or both. It has been shown that the DNA immunization of chimeric P2 – myostatin induce muscle growth [16]. However, the tetanic toxin T- helper P30 epitope fused to myostatin has not been evaluated as DNA vaccine to date. Also, it is not known if the combination of both of epitope could improve the immune and muscle response.

In the experiment A (Fig. 4) we evaluated in group of mice, the effect in increasing the weight of different body segments, of the active DNA immunization with myostatin genetic constructs consisting of 1) the myostatin gene only, 2) the chimeric P2-myostatin, 3) the fused P30-myostatin or 4) the effect of both, P2- myostatin and P-30 myostatin constructs, these in comparison to a control group 5) who was injected with PBS. In Fig. 3, we can see, in the chimeric myostatin immunized groups (groups 2, 3, and 4) an increased weight in most of the body segments

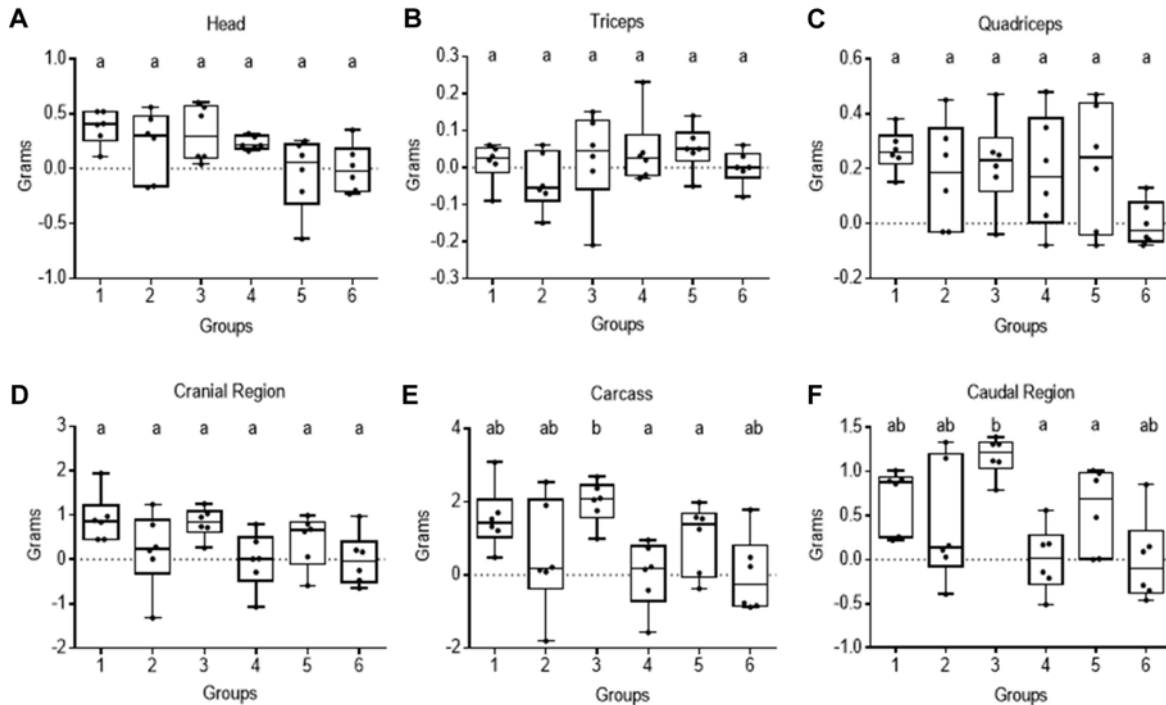


Fig. 5. Differences in the body weight of mice after several immunization protocols. Graphs show the individual normalized weight of distinct body regions in the immunization groups: A. Head, B. Triceps, C. Quadriceps, D. Cranial region, E. Carcass, and F. Caudal region. Immunization groups consist 1- pCIM-P2 + pCIM-P30 (four times); group 2- Ag P2-M-P30 (four times); group 3- pCIM-P2 + pCIM-P30 and Ag P2-M-P30 (heterologous prime-boost); group 4- pCIM-P2 + pCIM-P30 (two times); group 5- Ag P2-M-P30 (two times); group 6- PBS (four times). The dotted line indicates the basal average value. Different literals indicate statistical differences between groups.

evaluated, in comparison to the negative control group. An increased weight in muscle mass was observed with the P2- myostatin DNA construct, as it was reported by Tang (2007) [16]. We could see that also the P30 tetanic toxin epitope are able to induce muscle weight. It seems that the participation of both chimeric P2 and P30 myostatin constructs, have a better effect in promoting weight gain, mainly in the carcass, head, caudal region, and triceps. These results indicate that P2 and P30 epitopes play a significant role in inducing immunity to the fused myostatin, and when both epitopes are present the effect is even stronger.

Previous studies have shown the tetanic toxin as immune stimulant fused to peptides, which may not be antigenic to itself, can lead an immune response directed to the fused peptide [26,27]. The tetanic toxin epitopes are not toxic, but highly immunogenic, so they provide a promiscuous Th response associated with a specific immune reaction [21,28]. These tetanic toxin fragments have been used successfully to induce Th cells in humoral immune responses against tumor surface antigens [29,30] and in infectious pathogens [31].

A relevant observation in this study was that the myostatin

gene administrated as a DNA vaccine (pCIM DNA construct) led to a generalized decrease in the body weight, presumably by a systematic effect of the expression of myostatin after the transfection on inoculated tissues. Accordingly, it has been reported that the myostatin action could suppress muscle development [1,12]. In mouse, it has been reported that the systemically administrated myostatin leads to muscle loss for 35–50% of the total weight [4]. In male transgenic mice with muscle-specific overexpression of myostatin lead to weight reduction of 20–25% in individual skeletal muscles, solely due to a reduction in the fiber muscle size [32].

Results in this study are remarkable because active immunization against myostatin could be a feasible approach to improve the muscle mass with clinical and productive applications. Mice immunized apparently had normal organ size and no pathological signs, suggesting that the inhibition of myostatin specifically increases skeletal muscle mass without side-effects [10,11].

It seems the DNA immunization is effective in inducing immune response, but it requires repeated immunizations and high doses of DNA, making the immunization procedure cumbersome, prolonged, and expensive [33].

3.3. Heterologous prime-boost myostatin immunization

To reduce the amount of antigen used and the number of immunizations applied to obtain a significant immune response and muscle growth, a heterologous prime-boost immunization protocol was evaluated (Fig. 5).

Heterologous prime-boost vaccination strategies, using DNA vaccines and attenuated viral vectors, generate improved immune responses against a variety of encoded antigens. The most effective of these strategies elicit high levels of both CD41 and CD81 T-cell-mediated immunity responses, which are crucial for protection against a variety of pathogens [31].

The heterologous prime-boost protocol consists of only two immunizations, the first one employing the DNA vaccine and the second one including a recombinant antigen. In experiment B, this scheme was compared with mice groups where four immunizations, either of DNA (group 1) or recombinant antigen (group 2), and mice groups where two inoculations of DNA (group 4) or recombinant antigen (group 5) was injected. It is shown in Fig. 5, that the heterologous prime-boost group treatment (group 3), had a significant weight increase mainly in the carcass and the caudal region. This group had a similar growth response as the group 1, who was immunized 4 times with the DNA vaccine (similar immunization scheme as group 4 in experiment A). In the cranial region, triceps, quadriceps, and head, there were no significant differences found among the treatment groups. However, the mean values in the groups showed a tendency to a higher weight in group 3 (prime-boost group).

These results indicate that the heterologous prime boost immunization scheme is an effective and promising protocol to improve the induction of immunity, reducing the number of immunizations used and the time in obtaining an immune response, resulting in higher weight and more homogeneous responses.

The experiment B also shows that using only two immunizations with the DNA vaccine, the immune response was not enough to induce an increment in body weight. However, two immunizations with the recombinant antigen were able to induce a growth effect.

3.4. Antibody response to vaccination

We assessed by ELISA, the antibody production induced by the different immunization schemes. In experiment A, with DNA immunization, the ELISA analysis revealed apparently no antibodies production (see Fig. 6). In experiment B, the presence of antibodies was seen only when the recombinant antigen was used as an immunogen (Fig. 7). It seems, that although apparently, the DNA immunization did not induce antibodies, an immune effect was produced, noticeable by body weight growth, perhaps

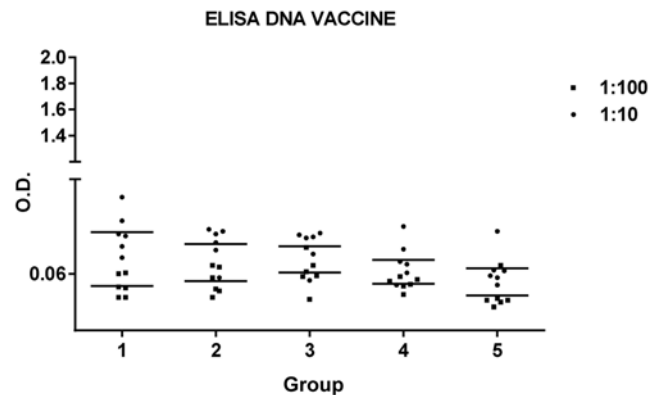


Fig. 6. Indirect ELISA assay using individual antisera from experimental group A of mice immunized with 1- pCIM; 2- pCIM-P2; 3- pCIM-P30; 4- pCIM-P2 + pCIM-P30; 5- PBS. Sera from immunized mice were diluted 1:10 and 1:100, and analyzed in duplicate.

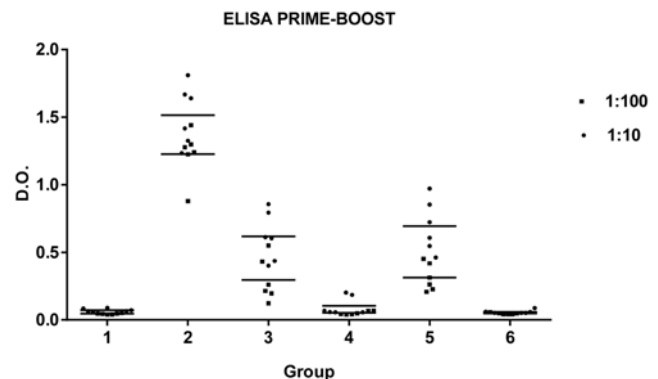


Fig. 7. Indirect ELISA assay using individual antisera from experimental group B of mice immunized with group 1- pCIM-P2 + pCIM-P30; group 2- Ag P2-M-P30; group 3- pCIM-P2 + pCIM-P30 and Ag P2-M-P30; group 4- pCIM-P2 + pCIM-P30; group 5- Ag P2-M-P30; group 6- PBS. Sera from immunized mice were diluted 1:10 and 1:100 and analyzed in duplicate.

by the participation of cellular immune response. Antigen encoded DNA vaccination experiments commonly reports antibody production [34], because of that, it was surprising that we were unable to detect antibodies. One possible explanation is that we use in the ELISA assays as antigen the recombinant myostatin P2-M-P30 produced in *E. coli*. It seems that the recombinant antigen expressed in *E. coli* produced inclusion bodies and although we were able to purify it under denaturalization conditions, after the dialysis, the protein precipitated. This suggests that the recombinant myostatin is misfolding and probably, because of antigenic changes, the antibodies induced by the DNA vaccine are not binding to the recombinant P2-M-P30. When the recombinant antigen P2-M-P30 is used as immunogen, the antibodies produced are now detected by the homologous

antigen. In spite of this, the prime boost immunization is showing a muscle growth effect. Perhaps, if the P2-M-P30 antigen is expressed in animal cells, the post-transduction processing will lead to a native folding and antigenic properties more suitable to enhance the immune response.

4. Conclusion

This work shows that immunization with a DNA vaccine expressing myostatin fused to P2 - P30 epitopes promotes skeletal muscle growth; furthermore, it showed that a heterologous prime-boost protocol can improve the immune response and be a practical active immunization procedure. This protocol has the potential to be used as a new pharmacological approach for several biomedical therapies and interventions in animal production as well, increasing the value of the carcasses and allowing the treatment of diseases associated with loss of muscle mass. A further improvement would be the use of either chemical or genetic adjuvants [35], this will reduce the amount of DNA and antigen used, and probably will enhance the immune effect. A practical attribute of the prime boost strategy is the decreases in the frequency of immunization and amount of antigen used. These results indicate that an immunization approach can be a feasible way to reduce the biological activity of myostatin and to improve skeletal muscle growth.

Acknowledgments

This work was supported by the National Autonomous University of Mexico – Technological Innovation, Research Projects Support Program, Project No IN214912 (Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica - PAPIIT, IN214912).

References

- Amthor, H., B. Chris, F. Rashid-Doubell, C. F. Kemp, E. Lang, and K. Patel (2002) Follistatin regulates bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) activity to stimulate embryonic muscle growth. *Dev. Biol.* 243: 115-127.
- Lin, J., H. B. Arnold, M. A. Della-Fera, M. J. Azain, D. L. Hartzell, and C. A. Baile (2002) Myostatin knockout in mice increases myogenesis and decreases adipogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291: 701-706.
- McPherron, A. C., A. M. Lawler, and S. J. Lee (1997) Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature.* 387: 83-90.
- Zimmers, T. A., M. V. Davies, L. G. Koniaris, P. Haynes, A. F. Esqueda, K. N. Tomkinson, A. C. McPherron, N. M. Wolfman, and S. J. Lee (2000) Induction of Cachexia in Mice by Systemically Administered Myostatin. *Science.* 296: 1486-1488.
- Grobet, L., L. J. Martin, D. Poncelet, D. Pirottin, B. Brouwers, J. Riquet, A. Schoeberlein, S. Dunner, F. Mnissier, J. Massabanda, R. Fries, R. Hanset, and M. Georges (1997) A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-musled phenotype in cattle. *Nat. Genet.* 17: 71-74.
- Kambadur, R., M. Sharma, T. P. Smith, and J. J. Bass (1997) Mutations in myostatin (GDF8) in double-musled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res.* 7: 910-916.
- Langley, B., M. Thomas, A. Bishop, M. Sharma, S. Gilmour, and R. Kambadur (2002) Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J. Biol. Chem.* 277: 49831-49840.
- Ogrodniczuk, J. and J. Oliffe (2010) Manning up for men's mental illness. *Aust. Fam. Physician.* 39: 931-932.
- Mosher, D. S., P. Quignon, C. D. Bustamante, N. B. Sutter, C. S. Mellersh, H. G. Parker, and E. A. Ostrander (2007) A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLoS Genet.* 3: e79.
- Schuelke, M., K. R. Wagner, L. E. Stolz, C. Hübner, T. Riebel, W. Kömen, T. Braun, J. F. Tobin, and S. J. Lee (2004) Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl. J. Med.* 350: 2682-2688.
- Grobet, L., D. Pirottin, F. Farnir, D. Poncelet, L. J. Royo, B. Brouwers, E. Christians, D. Desmecht, F. Coignoul, R. Kahn, and M. Georges (2003) Modulating skeletal muscle mass by postnatal, muscle-specific inactivation of the myostatin gene. *Genesis.* 35: 227-238.
- Bogdanovich, S., T. O. Krag, E. R. Barton, L. D. Morris, L. A. Whittemore, R. S. Ahima, and T. S. Khurana (2002) Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature.* 420: 418-421.
- Whittemore, L. A., K. Song, X. Li, J. Aghajanian, M. Davies, S. Girgenrath, J. J. Hill, M. Jalenak, P. Kelley, A. Knight, R. Maylor, D. O'hara, A. Pearson, A. Quazi, S. Ryerson, X. Y. Tan, K. N. Tomkinson, G. M. Veldman, A. Widom, J. F. Wright, S. Wudyka, L. Zhao, and N. M. Wolfman (2003) Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300: 965-971.
- Lee, S. J. (2004) Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu. Rev. Cell Dev. Bio.* 20: 61-86.
- Lee, S. J. and A. C. McPherron (2001) Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 9306-9311.
- Tang, L., Z. Yan, Y. Wan, W. Han, and Y. Zhang (2007) Myostatin DNA vaccine increases skeletal muscle mass and endurance in mice. *Muscle Nerve.* 36: 342-348.
- Gonzalez-Cadavid, N. F., W. E. Taylor, K. Yarasheski, I. Sinha-Hikim, K. Ma, S. Ezzat, R. Shen, R. Lalani, S. Asa, M. Mamita, G. Nair, S. Arver, and S. Bhasin (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.
- Kirk, S., J. Oldham, R. Kambadur, M. Sharma, P. Dobbie, and J. Bass (2000) Myostatin regulation during skeletal muscle regeneration. *J. Cell Physiol.* 184: 356-363.
- Long, D. B., K. Y. Zhang, D. W. Chen, X. M. Ding, and B. Yu (2009) Effects of active immunization against myostatin on carcass quality and expression of the myostatin gene in pigs. *Anim. Sci. J.* 80: 585-590.
- Gerloni, M., S. Xiong, S. Mukerjee, S. P. Schoenberger, M. Croft, and M. Zanetti (2000) Functional cooperation between T helper cell determinants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 13269-13274.
- Valmori, D., A. Pessi, E. Bianchi, and G. Corradin (1992) Use of human universally antigenic tetanus toxin T cell epitopes as carriers for human vaccination. *J. Immunol.* 149: 717-721.

22. Lu, S. (2009) Heterologous prime-boost vaccination. *Curr. Opin. Immunol.* 21: 346-351.
23. Ramshaw I. A. and A. J. Ramsay (2000) The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. *Immunol. Today.* 21: 163-165.
24. Doria-Rose, N. A. and N. L. Haigwood (2003) DNA vaccine strategies: candidates for immune modulation and immunization regimens. *Methods.* 31: 207-216.
25. Combadiere, B. and C. Liard (2011) Transcutaneous and intradermal vaccination. *Hum. Vaccin.* 7: 811-827.
26. Panina-Bordignon, P., A. Tan, A. Termijtelen, S. Demotz, G. Corradin, and A. Lanzavecchia (1989) Universally immunogenic T cell epitopes: promiscuous binding to human MHC class II and promiscuous recognition by T cells. *Eur. J. Immunol.* 19: 2237-2242.
27. Dalum, I., M. R. Jensen, K. Gregorius, C. M. Thomasen, H. I. Elsner, and S. Mouritsen (1997) Induction of cross-reactive antibodies against a self protein by immunization with a modified self protein containing a foreign T helper epitope. *Mol. Immunol.* 34: 1113-1120.
28. Janssen, E. M., E. E. Lemmens, T. Wolfe, U. Christen, M. G. Von Herrath, and S. P. Schoenberger (2003) CD4⁺ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8⁺ T lymphocytes. *Nature.* 421: 852-856.
29. Lund, L. H., K. Andersson, B. Zuber, A. Karlsson, G. Engström, J. Hinkula, B. Wahren, and G. Winberg (2003) Signal sequence deletion and fusion to tetanus toxoid epitope augment antitumor immune responses to a human carcinoembryonic antigen (CEA) plasmid DNA vaccine in a murine test system. *Cancer Gene Ther.* 10: 365-376.
30. Renard, V., L. Sonderbye, K. Ebbehøj, P. B. Rasmussen, K. Gregorius, T. Gottschalk, S. Mouritsen, A. Gautam, and D. R. Leach (2003) HER-2 DNA and protein vaccines containing potent Th cell epitopes induce distinct protective and therapeutic antitumor responses in HER-2 transgenic mice. *J. Immunol.* 171: 1588-1595.
31. Egan A. F., M. J. Blackman, and D. C. Kaslow (2000) Vaccine efficacy of recombinant *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 in malaria-naive, -exposed, and/or -rechallenged *Aotus vociferans* monkeys. *Infect. Immun.* 68: 1418-1427.
32. Reisz-Porszasz S., S. Bhasin, J. N. Artaza, R. Shen, I. Sinha-Hikim, A. Hogue, T. J. Fielder, and N. F. Gonzalez-Cadavid (2003). Lower skeletal muscle mass in male transgenic mice with muscle-specific overexpression of myostatin. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285: E876-E888.
33. Van Drunen Littel-van Den Hurk, S., S. L. Babiuk, and L. A. Babiuk (2004) Strategies for improved formulation and delivery of DNA vaccines to veterinary target species. *Immunol. Rev.* 199: 113-125.
34. Wang, S. and S. Lu (2014) DNA Immunization. *Curr. Protoc. Microbiol.* 31: 18.3.1-18.3.24.
35. Tregoning, J. S., R. F. Russell, and E. Kinnear (2018) Adjuvanted influenza vaccines. *Hum. Vaccin Immunother.* 14: 550-564.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.