

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT

SISTEMA DE BIBLIOTECAS

**EFFECTO DE LA VACUNA ADN RECOMBINANTE P2-P30 Y ANTÍGENO
RECOMBINANTE CONTRA MIOSTATINA EN LA ENGORDA DE CERDOS**

Edgar Omar Gómez Salazar

Tesis presentada como requisito parcial para la obtención del grado de:
Maestría en Ciencias en el Área de Ciencias Zootécnicas y Veterinarias

Xalisco Nayarit, Noviembre 2015

Tepic, Nayarit, a 7 de Octubre de 2015

DR. DIEGO GARCIA PAREDES

Coordinador del Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias

Área CBAP, Universidad Autónoma de Nayarit

PRESENTE:


Los que suscribimos, integrantes del Comité Tutorial del Biol. Edgar Omar Gómez Salazar, declaramos que hemos revisado la tesis titulada: **Efecto de la vacuna ADN recombinante P2-P30 y antígeno recombinante contra miostatina en la engorda de cerdos**, aprobamos que puede ser presentada para aspirar al grado de Maestro en Ciencias Biológico Agropecuarias con la opción terminal en Ciencias Zootécnicas y Veterinarias.

ATENTAMENTE


El Comité Tutorial



Dr. Clemente Lamus Flores
Director



Dr. David Román Sánchez Chiprés
Asesor



Dr. Rogelio A. Alonso Morales
Co-Director



Dr. Javier Germán Rodríguez Carpena
Asesor



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS

CBAP/223/15.

Xalisco, Nayarit; 26 de octubre de 2015.

ING. ALFREDO GONZÁLEZ JÁUREGUI
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E .

Con base al oficio de fecha 08 de octubre del presente, enviado por los CC. **Dr. Clemente Lemus Flores, Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales, Dr. David Román Sánchez Chiprés y Dr. Javier Germán Rodríguez Carpena**, donde se indica que el trabajo de tesis cumple con lo establecido en forma y contenido, y debido a que ha cumplido con los demás requisitos que solicita el Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias; dependiente de la Universidad Autónoma de Nayarit, se autoriza al C. **Edgar Omar Gómez Salazar**, continúe con los trámites necesarios para la presentación del examen de grado de Maestría en Ciencias Biológico Agropecuarias el Área de Ciencias Zootécnicas y Veterinarias.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
"Por lo Nuestro a lo Universal"

Dr. **Diego García Paredes**
Coordinador del Posgrado



C.c.p.- Expediente

&mem

DEDICATORIAS:

A mi Familia. Mi abuelo Antonio, mi abuela Guadalupe, mi mamá Araceli, mi hermano Cristian, mis tías Paty, Charo, Rocío, Mary, en especial a mi tía Kuky y mis tíos. Por todo su amor incondicional, apoyarme siempre en mis metas y sueños. Por enseñarme el valor real de tener una familia. Ustedes me han hecho la persona que soy ahora.

A mis amigos. Gris, por tus consejos, que siempre ejercen una influencia muy grande en mí y ser mi confidente en todo; Gioriela, por enseñarme a verle el lado positivo a las cosas; Gil, por tus sabios consejos y enseñarme a tener calma y paciencia. Ustedes son la familia que he elegido.

AGRADECIMIENTOS:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

A la Universidad Autónoma de Nayarit y al Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias.

A mi Comité Tutorial: Dr. Clemente Lemus Flores, Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales, Dr. Javier Germán Rodríguez Carpena y al Dr. David Román Sánchez Chiprés.

Al personal de la Estación de Pruebas de Comportamiento de las Instalaciones del Instituto de Biotecnología Animal del Departamento de Producción Animal del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara. Dr. Jorge Galindo García, Dr. Miguel Ángel Ayala Valdovinos, M. en C. Theodor Duifhuis Rivera y MVZ. Genaro Cabrera Figueroa.

Al personal del Laboratorio de Morfología del Departamento de Medicina Veterinaria del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara. Dr. Jacinto Bañuelos Pineda, Dra. Carmen Cecilia Gómez Rodiles y Biol. Efraim Rivas Celis.

Al personal del Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Genética y Bioestadística de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Biol. Amanda Gayosso Vázquez

Al personal de la Posta Porcina anexa al Laboratorio de Fisiología Nutricional y Cirugía Experimental del Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias en la Unidad Académica de Agricultura de la Universidad Autónoma de Nayarit. M. en C. Job Oswaldo Bugarín Prado, M. en C. Carlos Arturo Ortega Aguirre y Ing. Silvia Ayala Castillo.

Al personal de Nutra S.A. de C.V. Carlos Ramirez Jiménez

A mis compañeros del posgrado y personal de la Unidad Académica de Agricultura. M. en C. Karina Mejía Martínez, Ing. María de los Ángeles Rodríguez, MVZ. Alba Montoya, M. en C. Silvia Hernández, MVZ. Isidro Ruiz y Dr. Fernando Grageola.

POR TODO SU APOYO PARA LA REALIZACIÓN Y LA CULMINACIÓN DE ESTE
PRESENTE TRABAJO

ÍNDICE

	Pág.
ÍNDICE DE CUADROS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
RESUMEN	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Hipótesis	4
1.2 Objetivo General	4
1.3 Objetivos Específicos	4
II. REVISIÓN DE LITERATURA	6
2.1 La miostatina	6
2.2 Estructura del gen codificante para miostatina	7
2.3 Estructura proteica de la miostatina	8
2.4 Acción biológica de la miostatina	9
2.5 Efectos de la miostatina en el metabolismo	11
2.5.1 Metabolismo lipídico	11
2.5.2 Metabolismo de la glucosa	15
2.6 Inhibición de la miostatina	16
2.7 Comparación de la miostatina entre especies	17
2.8 Vacunas de ADN	18
2.8.1 Rutas y formas de inoculación	22
2.8.2 Inducción de la respuesta inmune	23
2.8.3 Pros y contras de las vacunas de ADN	25
III. METODOLOGÍA	28

3.1 Experimento 1	28
3.1.1 Ubicación	28
3.1.2 Animales	28
3.1.3 Tratamientos	29
3.1.4 Vacuna P2-P30 miostatina	30
3.1.5 Antígeno recombinante	30
3.1.6 Variables medidas en el experimento 1	31
3.1.6.1 Comportamiento del crecimiento	31
3.1.6.2 Calidad de la canal	31
3.1.6.3 Medición de de niveles de anticuerpos contra miostatina en el experimento 1.	32
3.1.6.4 Medición de adipocitos	33
3.1.6.5 Medición de fibras musculares	33
3.1.6.6 Medición de los niveles de creatina quinasa (CK)	36
3.2 Experimento 2	36
3.2.1 Ubicación	36
3.2.2 Animales	36
3.2.3 Tratamientos	37
3.2.4 Vacuna P2-P30 miostatina	38
3.2.5 Antígeno recombinante Ag-c y Ag-i	38
3.2.6 Variables medidas en el experimento 2	38
3.2.6.1 Comportamiento del crecimiento y rendimiento de canal	38
3.2.6.2 Medición del área del músculo <i>longissimus dorsi</i> y grasa dorsal	39

3.2.6.3 Medición de los niveles de anticuerpos contra miostatina en el experimento 2	39
3.3 Análisis estadístico	40
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
4.1 Resultados de las variables del experimento 1	41
4.1.1 Comportamiento en el crecimiento del experimento 1	41
4.1.2 Calidad de la canal del experimento 1	43
4.1.3 Efecto en los niveles de anticuerpos contra miostatina en el experimento 1	45
4.1.4 Efecto de la vacuna P2-P30 miostatina en el tejido adiposo	47
4.1.5 Efecto de la vacuna P2-P30 miostatina y antígeno en las fibras musculares	49
4.1.6 Efecto de la vacuna P2-P30 miostatina en los niveles séricos de creatina quinasa (CK)	50
4.2 Resultados de las variables del experimento 2	51
4.2.1 Efecto en el crecimiento y rendimiento de la canal en el experimento 2	51
4.2.2 Efecto en el músculo <i>longissimus dorsi</i> y grasa dorsal	53
4.2.3 Efecto en los niveles de anticuerpos en el experimento 2	55
V. CONCLUSIONES	57
VI. RECOMENDACIONES	57
VII. LITERATURA CITADA	58

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Esquema calendarizado de inmunización para los tres grupos de animales.	29
Cuadro 2. Esquema de vacunación calendarizado para los tres grupos de animales del experimento 2.	37
Cuadro 3. Ganancia de peso final y conversión alimenticia final de los cerdos con dosis de 100 μ g de vacuna y antígeno.	42
Cuadro 4. Mediciones para determinar la calidad de la canal de los cerdos inmunizados con 100 μ g de vacuna y antígeno.	44
Cuadro 5. Niveles de anticuerpos en suero con dosis de 100 μ g de vacuna y antígeno.	46
Cuadro 6. Efecto en el área y diámetro de los adipocitos con una inmunización de 100 μ g de vacuna y antígeno.	48
Cuadro 7. Efecto en el área de las fibras musculares utilizando una dosis de 100 μ g de vacuna y antígeno.	49
Cuadro 8. Resultados en los niveles séricos de CK.	50
Cuadro 9. Ganancia de peso total y rendimiento de canal por ultrasonografía.	52
Cuadro 10. Efecto de la vacuna P2-P30 y antígeno en el <i>longissimus dorsi</i> y grasa dorsal.	54
Cuadro 11. Niveles de anticuerpos en suero con dosis de 1000 μ g de vacuna y antígeno.	55

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Esquema de las características generales de la estructura del gen de miostatina bovina y regiones codificantes para la proteína	8
Figura 2. Estructura de la proteína de miostatina, formada por un péptido señal, un péptido latente, un dominio C-terminal y un sitio de proteólisis RSRR.	9
Figura 3. Esquema general de secreción, activación y actividad de la miostatina.	11
Figura 4. Mapa del vector de expresión pCI-neo.	19
Figura 5. Monitoreo del peso catorcenal de los cerdos del experimento 1	41
Figura 6. Monitoreo del peso catorcenal de los cerdos del experimento 2.	52

RESUMEN

La miostatina es una proteína perteneciente a la familia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β), la cual desempeña un papel destacado en el control negativo del desarrollo muscular. En experimentos realizados en ratones *knockout* para miostatina, se observó un aumento considerable en sus masas musculares. La miostatina es bloqueada en sangre por proteínas que impiden su unión al receptor. El propósito de este trabajo fue evaluar el efecto de la inhibición inmunológica de la miostatina en cerdos, en etapas de crecimiento y engorda, usando una vacuna de ADN recombinante (P2-P30) en combinación con antígeno recombinante contra miostatina, los cuales han sido probados en ratones, obteniendo resultados alentadores en el aumento de sus masas musculares. Se realizaron dos experimentos. En el experimento 1, se inmunizaron cerdos con dosis de 100 μg de la vacuna P2-P30 miostatina y se hizo un refuerzo de 100 μg de antígeno, encontrándose en los grupos tratados mayor luminosidad (L^*) ($P < 0.10$), menor área y diámetro de adipocitos ($P < 0.001$), pero no se encontraron diferencias entre los grupos tratados y su control en las demás variables de comportamiento de crecimiento, calidad de la canal y niveles de anticuerpos. En el experimento 2, se inmunizaron cerdos con dosis de 1000 μg de la vacuna P2-P30 miostatina y 1000 μg de antígeno recombinante. Se encontraron diferencias en los niveles de anticuerpos, teniendo títulos más elevados los grupos tratados ($P < 0.006$), pero sin diferencias en el comportamiento en el crecimiento y calidad de la canal entre los grupos tratados y su control.

I. INTRODUCCIÓN

La miostatina es una proteína perteneciente a la familia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β), la cual desempeña un papel destacado en el control negativo del desarrollo muscular. Se expresa casi de forma exclusiva en el músculo esquelético, donde actúa de forma autocrina/paracrina al inhibir el desarrollo muscular. Bloquea la proliferación y la diferenciación de los mioblastos inhibiendo la síntesis proteica. En experimentos realizados en ratones *knockout* para miostatina, se observó un aumento considerable en sus masas musculares. La miostatina es bloqueada en sangre por proteínas que impiden su unión al receptor. La principal proteína es la región N-terminal de la misma miostatina (pro péptido), otras proteínas son la folistatina (FST), la FSLT3 (*follistatin-like 3*) y la GASP1 (*GDF-associated serum protein-1*) (McPherron *et al.*, 1997; González-Cadauid *et al.*, 1998). En ratones adultos se ha usado para la inhibición de la miostatina, una versión soluble del receptor de la miostatina (ACVRIIB/Fc), anticuerpos monoclonales contra miostatina y vacunas de ADN recombinantes contra miostatina, los cuales causan un incremento en volumen de las masas musculares (Whittemore *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005). Estos resultados sugieren que terapias contra miostatina pueden usarse, desde el punto de vista clínico, como tratamiento contra distrofias musculares, pérdidas de la masa muscular relacionada con enfermedades crónicas; más recientemente, en el tratamiento de la obesidad y la diabetes tipo II.

Desde el punto de vista agropecuario, la inhibición de la miostatina puede usarse para mejorar el rendimiento de la canal en animales de importancia económica. Investigaciones actuales sugieren que los animales con un mayor número de fibras

musculares de tamaño moderado, producen una mayor cantidad y calidad de la carne.

Algunas mutaciones relacionadas con la miostatina también pueden producir una hiperplasia del músculo esquelético. Éstas han aparecido de forma natural y se han seleccionado independientemente en algunas razas de bovinos y ovinos, pero estas mutaciones no han sido descritas en cerdo u otras especies de interés cárnico; por lo que, la única manera de aprovechar ésta hipertrofia en las masas musculares relacionado con las miostatina en estas especies sólo se puede lograr por métodos transgénicos o usando la terapia génica. La inhibición inmunológica de la miostatina con fines de producción y calidad de la carne en animales de uso zootécnico no se ha explorado; por lo que una manera de lograrlo, es con el uso de las vacunas de ADN.

Las vacunas de ADN constituyen una herramienta promisoría para éste propósito. Éstas vacunas se basan en la inmunización de un plásmido el cual posee una región que codifica el antígeno de interés bajo el control de un promotor de mamífero (como ejemplo el intrón A del CMV) y puede ser producido fácilmente en las bacterias. A diferencia de las vacunas convencionales, las vacunas de ADN tienen la habilidad de estimular tanto la respuesta inmune humoral como la celular, y no tiene los problemas que poseen el empleo de las vacunas con antígenos inactivos o atenuados y las cuestiones de bioseguridad asociadas a este tipo de vacunación. Otro aspecto importante es que su producción es relativamente menos costosa y no requieren de cadena de frío rigurosa para su distribución dada su mayor estabilidad. Adicionalmente, estudios con vacunas de ADN han demostrado que incluso después

de múltiples inmunizaciones no se producen anticuerpos anti-ADN (Reyes-Sandoval y Ertl, 2001; Reyes-Sandoval y Pinto, 2002).

El propósito de este trabajo fue evaluar el efecto de la inhibición inmunológica de la miostatina en cerdos, en etapas de crecimiento y engorda, usando una vacuna de ADN recombinante (P2-P30) en combinación con antígeno recombinante contra miostatina, los cuales han sido probados en ratones, obteniendo resultados alentadores en el aumento de sus masas musculares.

1.1 Hipótesis

La administración de la vacuna de ADN recombinante P2-P30 reforzada con antígeno recombinante en diferentes esquemas de vacunación activa, durante las etapas de crecimiento y engorda en cerdos, llevará a un aumento de las variables en el comportamiento del crecimiento, rendimiento de la canal y respuesta inmune en la producción de anticuerpos contra miostatina.

1.2 Objetivo General

Evaluar en las etapas de crecimiento y engorda de cerdos la administración por separado de 100 μ g y 1000 μ g de la vacuna de ADN recombinante P2-P30 reforzada con antígeno recombinante contra miostatina en distintos esquemas de inmunización activa, por medio de las variables de comportamiento del crecimiento, rendimiento de la canal y de la respuesta inmune por la producción de anticuerpos contra miostatina.

1.3 Objetivos Especificos

1.3.1 Comparar dos esquemas prime-boost de inmunización activa en cerdos durante las etapas de crecimiento y engorda, con 100 μ g de la vacuna de ADN recombinante de miostatina P2-P30 reforzada con 100 μ g de antígeno recombinante, a una dosis constante sobre el efecto en el comportamiento del crecimiento y en las mediciones del rendimiento de la canal.

1.3.2 Comparar dos esquemas primer-boost de inmunización activa en cerdos durante las etapas de crecimiento y engorda, con 100 μ g de la vacuna de ADN recombinante de miostatina P2-P30 reforzada con 100 μ g antígeno recombinante, a

una dosis constante sobre la respuesta inmune mediante la generación de anticuerpos contra miostatina, metabolitos de creatina quinasa (CK), adipogénesis e hipertrofia muscular.

1.3.3 Comparar dos esquemas de inmunización activa en cerdos durante las etapas de crecimiento y engorda, con 1000 μg de la vacuna ADN recombinante de miostatina P2-P30 y 1000 μg de antígeno recombinante, a una dosis constante sobre el efecto en el comportamiento del crecimiento y en las mediciones del rendimiento de la canal.

1.3.4 Comparar dos esquemas de inmunización activa en cerdos durante las etapas de crecimiento y engorda, con 1000 μg de la vacuna ADN recombinante de miostatina P2-P30 y 1000 μg de antígeno recombinante, a una dosis constante sobre la respuesta inmune mediante la generación de anticuerpos contra miostatina.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 La miostatina

El gen que codifica la miostatina (también denominada GDF-8, *growth differentiation factor-8*) fue identificado en 1997 por McPherron y colaboradores, a partir de una muestra de ADNc (ADN complementario) del músculo pectoral de ratón que fue amplificado usando una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) degenerativa. Es miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) por lo que comparte varias características en su estructura primaria con otros miembros de la superfamilia. El miembro más parecido en estructura primaria a la miostatina es el GDF-11 (Gamer *et al.*, 1999; McPherron *et al.*, 1999; Nakashima *et al.*, 1999), el cual fue descubierto posteriormente a la miostatina y se expresa en embrión en el tejido nervioso dorsal, extremidades; y en la etapa adulta, en el cerebro y la pulpa dental. La miostatina tiene un 90% de homología con la región C-terminal de este miembro.

Como todos los miembros del TGF- β , la miostatina tiene ciertas características básicas en su estructura, como un péptido señal N-terminal, una secuencia conservada (RSRR) necesaria para el procesamiento proteolítico que dará origen a un péptido C-terminal con nueve residuos de cisteína, los cuales son necesarios para la conformación tridimensional y dimerización de la molécula madura. Sin embargo, la secuencia de la región C-terminal de la miostatina difiere de otros miembros del TGF- β conocidos (a excepción del GDF-11 como ya se mencionó) por lo que la

miostatina no puede incluirse en ninguna otra de las subfamilias existentes (McPherron *et al.*, 1997; Arce *et al.*, 2005). La miostatina se expresa durante la embriogénesis en las células del miotomo, en animales adultos se expresa preferentemente en el músculo esquelético, aunque en valores mucho menores, también se expresa en el tejido adiposo, corazón, la glándula mamaria y las células hematopoyéticas (McPherron *et al.*, 1997; González-Cadavid *et al.*, 1998; Shaoquan *et al.*, 1998; Sharma *et al.*, 1999; Cho *et al.*, 2002).

2.2 Estructura del gen codificante para miostatina

La estructura del gen está constituida por tres exones intercalados entre dos intrones (Gobet *et al.*, 1997).

El intron 1 se localiza entre las bases 5460 y 7285 en la región 3' y a 67 pares de bases (pb) del exón 2, se localiza una zona rica en pirimidinas. Se encuentra una adenina en un contexto apropiado (UUAAC) situada a -23 pb del límite 3' del exón; puede ser el lugar de la formación del lazo en la maduración del ARNm por *splicing* (Keller y Noon, 1984). Se han localizado dos posibles sitios de inicio de la transcripción aproximadamente a 110 pb (inicio 1) y a 137 pb (inicio 2) precediendo al codón de iniciación (Figura 1).



Figura 1. Esquema de las características generales de la estructura del gen de miostatina bovina y regiones codificantes para la proteína (Ramírez, 2013).

El promotor de la miostatina está dirigido por una TATA-box a unos 21 pb del punto de inicio 2. Además, contiene una CAAT-box a 65 pb del punto de inicio 2 (Royo, 2003).

2.3 Estructura de proteica de la miostatina

La miostatina como tal está formada por un péptido señal, un péptido latente, y un dominio C-terminal. Se sintetiza como una pre-proteína, la cual debe de sufrir un procesamiento proteolítico, para dar lugar a la forma biológicamente activa, que consta de un dímero del dominio C-terminal de la miostatina, unido por puentes disulfuro (McPherron y Lee, 1996; McPherron *et al.*, 1997) (Figura 2).

Estructura de la proteína miostatina

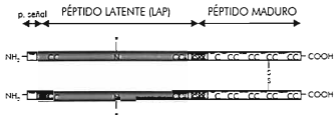


Figura 2. Estructura de la proteína de miostatina, formada por un péptido señal, un péptido latente, un dominio C-terminal y un sitio de proteólisis RSRR.

Al igual como ocurre con la mayoría de los miembros de la superfamilia del TGF- β , la miostatina presenta un elevado grado de conservación, con una homología de más del 96% en la secuencia de aminoácidos de la región C-terminal en todas las especies de aves y mamíferos estudiadas (Arce *et al.*, 2005)

2.4 Acción biológica de la miostatina

La principal acción de la miostatina es regular negativamente el desarrollo muscular, fundamentalmente durante el desarrollo embrionario como después del nacimiento (Arce *et al.*, 2005). Actúa como una señal secretada por la célula muscular esquelética que provoca un *feed-back* negativo.

El propéptido se escinde de la región madura durante el procesamiento proteolítico. La enzima responsable de esto es la furina, una endoproteasa intracelular implicada en el procesamiento de diversos miembros del TGF- β y de otras proteínas (Thomas,

2000). La furina reconoce la secuencia RSRR del precursor de la miostatina y forma un fragmento N-terminal de 266 aminoácidos (propéptido) y un fragmento C-terminal de 109 aminoácidos que formarán a la proteína madura (McPherron *et al.*, 1997). Tanto las moléculas de miostatina madura como las del propéptido permanecen unidas entre sí, formando un complejo latente. En estas condiciones la miostatina presenta muy baja afinidad por su receptor, por lo que carece de actividad biológica (Lee y McPherron, 2001; Thies *et al.*, 2001; Ríos *et al.*, 2001; Hil *et al.*, 2002; Hill *et al.*, 2003).

Para que se produzca la activación de la miostatina, el propéptido debe de separarse del dímero C-terminal. La separación del propéptido se produce por acción de metaloproteasas pertenecientes a la familia BMP-1/TLD (*bone morphogenetic protein-1/tolloid*) (Wolfman *et al.*, 2003). Estas modificaciones causan la liberación del dímero maduro capaz de unirse a una pareja de receptores localizados en la superficie de las células diana, formada por ActRIIB (*activin receptor IIB*) y ALK4 (*activin-like kinase 4*) los cuales comparte con la activina. Esta unión de la miostatina a sus receptores, provoca una vía de señalización que implica la fosforilación de las moléculas de señalización *smad-2* y *smad-3*. Estos a su vez forman un heterodímero con *smad-4*, para formar un factor de transcripción, capaz de entrar al núcleo e inducir la expresión de cualquier gen flanqueado por la secuencia de reconocimiento adecuado. En el núcleo, la miostatina inhibe la expresión de factores de regulación miogénica, como MyoD, miogenina y estimulantes de la quinasa dependiente de ciclina (Cdk) como p21 (Massague, 1998; Ríos *et al.*, 2001; Attisano y Wrana, 2002) (Figura 3).

Secreción, activación y actividad de miostatina

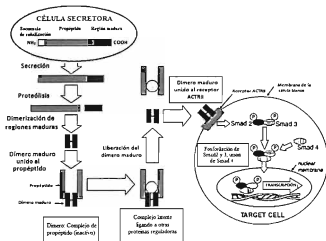


Figura 3. Esquema general de secreción, activación y actividad de la miostatina. (adaptado Lee y McPherron (2001), McNally (2004), Joulia-Ekaza y Caballero (2006).

2.5 Efectos de la miostatina en el metabolismo

2.5.1 Metabolismo lipídico

Hay informes contradictorios acerca del efecto de la MSTN en el metabolismo lipídico. En pruebas con ratones, a los cuales se les eliminó el gen de la miostatina mostraron significativamente menos colesterol en suero, así como niveles reducidos de triglicéridos en suero y a nivel hepático comparados con los ratones del tipo salvaje (McPherron y Lee, 2002; Guo *et al.*, 2009). En investigaciones con ganado

bovino con miostatina nula, éstos mostraron resultados similares. Sin embargo, no se sabe si esto se debe a una reducción intramuscular de los adipocitos o en lípidos intramiocelulares (Menissier, 1982; Savage *et al.*, 2007).

Del mismo modo, el tratamiento en ratones de tipo salvaje adultos con el sActR-IIB (fracción soluble del receptor de activina tipo IIB) durante 10 semanas, redujo drásticamente la masa grasa, mejoró la sensibilidad a la insulina y aumentó la captación de glucosa muscular, pero no después de 4 semanas (Akpan *et al.*, 2009). Contrario a esto, Benny Klimek y colaboradores (2010), reportaron altos niveles de masa grasa abdominal en respuesta a la inhibición de miostatina via inyección a una línea celular CHO secretando sActR-IIB en un ratón atímico desnudo, mientras la inhibición de la miostatina a través de una vacuna de ADN en contra de miostatina mostró un incremento en la masa del músculo esquelético pero sin una reducción en la grasa abdominal (Tang *et al.*, 2007).

Por otra parte, Zimmers y colaboradores (2002), mostraron que la sobre expresión sistémica de miostatina en ratones adultos induce a una pérdida significativa de grasa; mientras que Stolz y colaboradores (2008), reportaron que la administración exógena de miostatina sobre el rango de dosis (2-120 mg/día) podría no reducir la masa grasa en ratones de tipo salvaje o genéticamente obesos (ob/ob, db/db). Tomados en conjunto, estos reportes sugieren efectos contradictorios de la inhibición de la miostatina en el metabolismo lipídico. Sin embargo, los experimentos llevados a cabo por la administración sistémica de inhibidores de la miostatina en modelos de obesidad en ratones sugieren que la terapia contra miostatina puede ser eficaz en la mejora del metabolismo de la glucosa en lugar del tratamiento de la obesidad.

Estudios en ratones transgénicos para miostatina, mostraron que el grado en que se ve afectada la adiposidad parece ser inversamente proporcional a la extensión de la hipertrofia o atrofia (Sutrave *et al.*, 1990; Musaro *et al.*, 2001; Reisz-Porszasz *et al.*, 2003; Pursel *et al.*, 2004; Izumiya *et al.*, 2008; Leong *et al.*, 2010). Guo y colaboradores (2009), reportaron en ratones *knock-out* para miostatina, un aumento en la captación celular de glucosa y sensibilidad a la insulina, además de una disminución de tejido adiposo como consecuencia indirecta de las alteraciones metabólicas en el músculo esquelético. Estos reportes sugieren que la miostatina no afecta el tejido adiposo directamente, y que los efectos en la reducción del tejido adiposo en la inhibición de la miostatina en ratones son como resultado indirecto del incremento en la masa del músculo esquelético.

En otros reportes se informó que la miostatina promovió la resistencia a la obesidad inducida por dietas altas en grasa en ratones transgénicos, y en donde reportan que se mejoró la tolerancia a la glucosa y la reducción en ayunas en los niveles de glucosa, insulina, y triglicéridos. La miostatina podría indirectamente inhibir la acumulación de lípidos, que afectan la masa adiposa, a través de la sobreexpresión de la miostatina adiposo específica (Feldman *et al.*, 2006) en lugar de la supresión de la miostatina muscular específica (Guo *et al.*, 2009). Esta resistencia se atribuye a un incremento en la tasa metabólica causada por los adipocitos pequeños y aparentemente inmaduros (Feldman *et al.*, 2006). Tomados en conjunto, estos resultados indican que la señalización de la miostatina no tiene necesariamente un efecto regulador directo en la masa adiposa en ratones alimentados con dietas

convencionales o altas en grasas; sin embargo, ellos proponen un posible papel de la miostatina en la regulación del metabolismo de los adipocitos.

En el incremento de la masa del músculo esquelético se informó un cambio indirecto en el metabolismo del hígado así como del tejido adiposo. La inducción del transgén *Akt* en ratones obesos inducidos por la dieta resultó en una disminución del peso corporal y la masa magra así como la reducción de la esteatosis hepática. El crecimiento del músculo esquelético mediado por *Akt* protegió el hígado de los efectos de una dieta alta en grasa y aumentó la oxidación de los ácidos grasos (Izumiya *et al.*, 2008). Estos ratones habían incrementado la beta oxidación de los ácidos grasos debido a una mayor dependencia de la glucosa por la demanda de energía por el músculo esquelético hipertrofiado. Del mismo modo, un estudio *in vitro* mostró un incremento en la oxidación de ácidos grasos en las mitocondrias aisladas de hígado de ratones homocigóticos mutantes para miostatina (*Mstn*^{-/-}) y para el receptor de lipoproteína de baja densidad (*Ldlr*^{-/-}) alimentados con una dieta alta en grasa comparados con ratones homocigóticos normales *Mstn*^{+/+} y *Ldlr*^{+/+} (Tu *et al.*, 2009). Por otra parte, no hubo un aumento de la oxidación de ácidos grasos hepáticos en ratones con el gen de la miostatina nula alimentados con dieta alta en grasa (Guo *et al.*, 2009), ni tampoco en ratones con el gen de la miostatina nula alimentados con dieta convencional (Stolz *et al.*, 2008), ni en ratones adultos obesos que recibieron anticuerpos contra miostatina (Stolz *et al.*, 2008). Por lo tanto, la oxidación hepática de ácidos grasos no parece ser una característica constante de la mediación de la miostatina a la resistencia de la obesidad inducida por una dieta alta en grasa, donde otros factores pueden estar contribuyendo, por ejemplo la

composición de la dieta y la duración del tiempo en dietas altas en grasa. No obstante, es evidente que la miostatina juega un papel en la regulación del metabolismo lipídico en el hígado.

2.5.2 Metabolismo de la glucosa

Ya que el músculo esquelético es el tejido predominante donde la captación de la glucosa estimulada por la insulina se lleva a cabo en el estado postprandial, mejorar la sensibilidad a la insulina (SI) es esencial para mejorarla en el resto del cuerpo (Savage *et al.*, 2007, DeFronzo y Tripathy, 2009).

Ratones en los que se ha eliminado el gen de la miostatina mostraron alta utilización de glucosa y mejora de SI cuando se midieron por calorimetría indirecta y por pruebas de tolerancia a glucosa e insulina, así como represión en el estado hiperinsulinémico-euglicémico de ratones del tipo salvaje (McPherron y Lee, 2002, Guo *et al.*, 2009). Desde entonces, la tasa de infusión de glucosa (GIR de glucose infusion rate) medida en estos estudios de fijación, determina la SI. Una alta GIR en ratones con miostatina nula indica mayor captación de glucosa por los tejidos periféricos en respuesta a la insulina en comparación con los ratones del tipo salvaje (Guo *et al.*, 2009). Además, la administración *in vivo* de insulina en ratones con miostatina nula resultó en una mayor activación de Akt (serina-tronina quinasa) que media la señalización de la insulina y del factor de crecimiento tipo insulina (IGF-1) en el músculo esquelético, así como en el tejido adiposo blanco y marrón. Esta observación sugiere que la mejora en todo el cuerpo de SI en ratones con miostatina nula no es exclusivamente consecuencia del aumento de la masa muscular

esquelética (Savage *et al.*, 2007, DeFronzo y Tripathy, 2009, Guo *et al.*, 2009). Curiosamente, se reportó que la miostatina reduce la señalización de Akt inducida por IGF-1 donde inhibe la diferenciación de mioblastos y la hipertrofia en los miotubos (Morissette *et al.*, 2009, Trendelenburg *et al.*, 2009). Además, la fosforilación de Akt estimulada por la insulina se redujo significativamente tanto en el músculo esquelético y el hígado de ratones tratados con miostatina junto con una profunda reducción en Si (Hittel *et al.*, 2010). Estos resultados fueron confirmados por las observaciones que mostraron un incremento en los niveles de p-Akt (Akt fosforilada) en músculos de ratones con miostatina nula, e incluso mayores niveles de p-Akt estimulados por insulina cuando se compararon con músculos de ratones del tipo salvaje (Zhang *et al.*, 2011).

2.6 Inhibición de la miostatina

La inactivación de la miostatina circulante se produce por su asociación a una serie de proteínas transportadoras que impiden su unión al receptor (González-Cadavid *et al.*, 1998; Hill *et al.*, 2002; Zimmers *et al.*, 2002, Hill *et al.*, 2003). La principal proteína desde el punto de vista cuantitativo, es el propéptido N-terminal, con el cual forma un complejo latente que impide la unión al receptor. En menor medida, la miostatina circula unida a otras dos proteínas: la FSTL-3 (*folistatin-like 3*) y GASP-1 (*GDF-associated serum protein-1*). La unión de la miostatina a FSRP es prácticamente irreversible e impide la acción del ligando, también es capaz de unirse con otros miembros del TGF- β (Tsuchida *et al.*, 2000; Scheneyer *et al.*, 2001; Hill *et al.*, 2002).

Al contrario GASP-1 no tiene afinidad por otros miembros del TGF- β (Hill *et al.*, 2002).

Otro mecanismo que impide el funcionamiento de la miostatina depende de la follistatina (FS) que también es capaz de unirse a la miostatina y dar lugar a la formación de un complejo inactivo (Phillips y De Krestler, 1998; Shimasaki *et al.*, 1988; Zimmers *et al.*, 2002). En ratones transgénicos que sobreexpresan FS en el músculo presentan un fenotipo similar (incluso más acentuado) al de los ratones *knockout* de miostatina (Lee y McPherron, 2001). Se cree que la FS actúa directamente en el músculo y regula la accesibilidad de la miostatina a su receptor (Hill *et al.*, 2002). La pérdida de la actividad de la FS provoca atrofia de las masas musculares (Matzuk *et al.*, 1995).

2.7 Comparación de la miostatina entre especies

Los análisis de las secuencias del dominio C-terminal entre diferentes especies, muestran que es idéntico entre humanos, ratones, ratas, cerdos, pollos, pavos, conejos y bovinos. Esto sugiere la conservación de la función de la miostatina (Grobet *et al.*, 1997; Kambadur *et al.*, 1997; Lee y Mcpherron, 2001).

También se ha identificado en un gran número de especies de peces. Sin embargo, las secuencias de la miostatina en peces, son bastante divergentes con el resto de los vertebrados (Maccatrozzo *et al.*, 2001; Ostbye *et al.*, 2001; Rodgers y Weber, 2001). Las comparaciones de estas secuencias, el hecho de que la miostatina se expresa en una gama mucho más amplia de tejidos en los peces, y que el GDF-11 se expresa en el cerebro de algunos mamíferos, han llevado a la conclusión de que

el GDF-11 y la miostatina derivan del mismo gen ancestral el cual originalmente se expresaba en cerebro y músculo. La miostatina pudo haber adquirido una expresión restringida al músculo en mamíferos, pero no en peces, donde conserva su patrón ancestral de expresión (Biga *et al.*, 2005; Funkenstein y Olekh, 2010).

2.8 Vacunas de ADN

La vacunación empleando ADN inició cuando en Wolff y colaboradores (1990), demostraron que la inyección de ADN plasmidico en músculo de ratón resultaba en un incremento en la expresión de la proteína codificada por el plásmido, esto llevó a plantear la posibilidad del desarrollo de vacunas mediante la transferencia genética de ADN plasmidico "desnudo" sin usar vectores virales o ADN encapsulado en liposomas.

Después se reportó la generación de anticuerpos contra la hormona de crecimiento humano (hGH) y la α -antitripsina (hAAT) inoculando ADN codificante para ambas proteínas (Tang *et al.*, 1992). Con estos descubrimientos, varios antígenos codificados por plásmidos se han usado para la inducción de la producción de anticuerpos y la activación de linfocitos T citotóxicos (Tang *et al.*, 1992; Cox *et al.*, 1993; Ulmer *et al.*, 1993). A partir de estos experimentos se han iniciado investigaciones en el sector académico como en el privado para el desarrollo de vacunas basadas en ADN encaminadas para combatir enfermedades de origen viral, bacterianas y parasitarias, así como dirigidas al tratamiento de patologías tales como el cáncer, enfermedades autoinmunes y de hipersensibilidad a los antígenos (Reyes-Sandoval y Ertl, 2001).

Los vectores plasmídicos son la unidad funcional de las vacunas de ADN. En estos vectores se insertan los genes que codifican las proteínas de interés y son de origen bacteriano. El vector empleado para vacunas de ADN está compuesto por una unidad transcripcional y el esqueleto plasmídico; el vector comúnmente utilizado como vacuna para mamíferos es el pCI-neo. La unidad transcripcional incluye un promotor, un intrón, un fragmento de ADN que codifica el antígeno y una secuencia de terminación de la transcripción (Figura 4) (Ramírez, 2013).

Mapa del vector pCI-neo

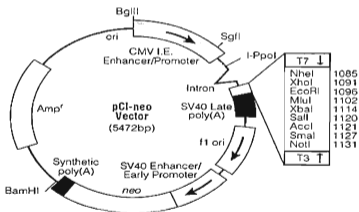


Figura 4. Mapa del vector de expresión pCI-neo (Adaptado de Ramírez, 2013).

Los genes codificados en estos plásmidos se encuentran bajo el control de promotores casi siempre de origen viral, como el citomegalovirus humano (CMV), el virus de sarcoma de Rous (RSV) o el virus de simios 40 (SV-40). Estos promotores

son secuencias cortas a las cuales se les unen factores de transcripción, que ayudan a guiar y activar a las polimerasas, en la actualidad el promotor más frecuentemente usado es el de la región inmediata temprana del CMV (CMV/IE), el cual permite altos niveles de transcripción de manera constitutiva en una gran variedad de células eucariotas (Montgomery *et al.*, 1993; Bohm *et al.*, 1996; Sandoval y Ertl, 2001).

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

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

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

La mayor parte de los plásmidos poseen una serie de sitios de clonación sintéticos con secuencias que son reconocidas por enzimas de restricción, los cuales no se encuentran en el resto del plásmido (Sambrook, 1989). De esta manera es posible clonar secuencias de ADN que codifican para el antígeno de interés y que han sido

obtenidas por PCR con cebadores que poseen idénticos sitios de restricción que las secuencias blanco (Reyes-Sandoval y Pinto, 2002).

Los plásmidos tienen además diversos genes de resistencia a los antibióticos, como son la ampicilina o la kanamicina, lo cual permite su selección en cultivos de bacterias transformadas (Kowalczyk y Ertl, 1999). Un buen número de vacunas de ADN poseen marcadores que codifican para α -lactalasa y confieren resistencia a la ampicilina, aunque los preferidos en humanos son los marcadores selectivos para kanamicina (Reyes-Sandoval y Pinto, 2002).

Si una secuencia contra la que se quiere inducir una respuesta inmune está presente en el individuo, no se reconoce como patógeno. Por tal motivo un elemento importante en los plásmidos es la presencia de motivos CpG bacterianos (también conocidos como ISS de *immunostimulatory DNA sequences*), que poseen propiedades inmunomoduladoras y representan un elemento adyuvante intrínseco (Kowalczyk y Ertl, 1999; Shedlock y Weiner, 2000; Srivastava y Liu, 2003; Huygen, 2005). Las secuencias CpG activan al sistema inmune innato para producir citocinas inmunoestimuladoras (Pisetsky *et al.*, 1995; Krieg *et al.*, 1995). Las ISS forman parte de un grupo conocido como patrones microbianos asociados a patogenicidad (PAMPs de *pathogen-associated molecular patterns*) que son reconocidos por células del sistema inmune innato que poseen sobre su superficie los receptores conocidos como TLR-9 (de *toll-like receptors*) y cuya interacción con los PAMPs correspondientes induce su activación (Krug *et al.*, 2001; Kadowaki *et al.*, 2001).

2.8.1 Rutas y formas de inoculación

El sitio de inoculación, así como la forma en que el ADN se libera en el organismo, desempeña una función importante para inducir una respuesta inmunitaria exitosa; se sabe que sólo 1 a 10% del total del ADN inoculado se procesa de manera adecuada para expresar la proteína de interés (Kowalczyk y Ertl, 1999; Reyes-Sandoval y Ertl, 2001; Huygen, 2005). Las rutas de inoculación que se han empleado incluyen intramuscular, intradérmica, intravenosa, intraperitoneal, epidérmica, oral, intranasal y vaginal. La inyección intramuscular del ADN mediante agujas hipodérmicas es el método más usado, ya que no requiere entrenamiento especializado, además del bajo costo, aunque el uso de la pistola génica (*gene gun*) produce los mejores resultados (Huygen, 2005).

La inoculación de ADN con la pistola génica se lleva a cabo mediante el acoplamiento del ADN a esferas de oro o tungsteno, que se bombardean en la dermis y capas subdérmicas con la ayuda de helio comprimido, lo que permite la transfección directa de las células blanco. Esta metodología hace posible usar mucho menos ADN y es casi 100 veces más eficiente (Shedlock y Weiner, 2000; Reyes-Sandoval y Ertl, 2001; Huygen, 2005). En un estudio se comparó los diferentes métodos de inmunización y se determinó que la cantidad de ADN necesaria para inducir respuestas inmunitarias van de 10 a 100 μg en inyecciones intramusculares y de tan sólo 0.4 μg cuando se usó pistola génica, por lo que esta última metodología es la más eficiente desde el punto de vista de la cantidad de ADN usado (Fyran *et al.*, 1993; Robinson y Torres, 1997).

2.8.2 Inducción de la respuesta inmune

Hay tres mecanismos principales los cuales antígeno es procesado y presentado al sistema inmune tras la vacunación con ADN.

Cuando un plásmido se introduce en la célula se transloca al núcleo, donde se inicia la transcripción del transgén; 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 vinculan con moléculas de MHC clase I. Los péptidos de gran afinidad con su respectiva molécula de MHC I se estabilizan y entran en la vía secretoria, con lo que alcanzan la superficie celular, donde se acoplan con el receptor de los linfocitos T (TcR) presentes en la superficie de los linfocitos T citotóxicos (CD8+) para inducir su activación (Tang *et al.*, 1992; Shedlock y Weine, 2000; Huygen, 2005).

Las proteínas exógenas que se endocitan o fagocitan (presentación cruzada en la inmunización con ADN) entran a 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 clase II y se translocan hacia la superficie de la célula, donde se presentan y unen a los TcR en los linfocitos T cooperadores (CD4+); todo ello tiene como consecuencia su activación y expansión (Huygen, 2005).

De esta forma, la unión del complejo MHC-péptido y TcR, en las APC y linfocitos T respectivamente, provee la denominada señal 1 de la activación de los linfocitos T.

Sin embargo, esta señal 1 es insuficiente para generar una buena respuesta inmunitaria y es necesaria una segunda señal para completar la activación de los linfocitos CD4+ y CD8+ (Kowalczyk y Ertl, 1999; Reyes-Sandoval y Ertl, 2001; Srivastava y Liu, 2003). La señal 2 se induce mediante moléculas coestimuladoras presentes en la superficie de las APC (en su mayor parte células dendríticas [CD]), como las proteínas de la familia B7. Con anterioridad, las CD requieren una señal para su activación inicial y maduración; esta señal llamada señal 0, o señal de alarma, la inducen ciertas citocinas inflamatorias, proteínas de choque térmico (HSP) o los motivos CpG presentes en el ADN bacteriano. El resultado de la señal 0 es la sobreexpresión de moléculas del MHC y coestimuladoras en su superficie, lo que favorece después el proceso de presentación de antígeno (señal 1). En esta etapa, las CD activadas cambian su morfología y perfil de expresión de receptores para quimiocinas, dejan la periferia y migran hacia los ganglios linfáticos donde participan en la activación de linfocitos T y B inmaduros (Tang *et al.*, 1992; Shedlock y Weine, 2000; Huygen, 2005).

Posterior a la etapa de activación se inicia la etapa efectora; los linfocitos T activados dejan los ganglios linfáticos hacia la periferia y siguen un gradiente de quimiocinas hasta llegar al lugar donde se necesitan y tras la unión de sus TcR con los antígenos expresados en el contexto de MHC apropiado comienzan su etapa efectora mediante la secreción de sustancias tóxicas, como las perforinas (células CD8+) o interleucinas con actividad inflamatoria como el INF- γ (células CD4+) (Tang *et al.*, 1992; Kowalczyk y Ertl, 1999; Shedlock y Weine, 2000; Reyes-Sandoval y Ertl, 2001; Huygen, 2005).

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 transfectoran en la inmunización con el DNA. Con posterioridad, los linfocitos B activados cambian de isotipo; las secuencias que codifican a la región variable de las inmunoglobulinas sufren hipermutación y las clonas con un receptor con mayor afinidad por el antígeno se seleccionan y expanden. Los linfocitos B activados se diferencian al final 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; por lo tanto, es posible encontrar anticuerpos presentes en el suero y mucosas por largos periodos (Reyes-Sandoval y Ertl, 2001; Huygen, 2005).

2.8.3 Pros y contras de las vacunas de ADN

Entre las diferentes propuestas para clasificar a las vacunas que se utilizan en la actualidad, una de ellas toma en cuenta si el microorganismo se encuentra atenuado y por lo tanto vivo, o si éste se encuentra inactivado o muerto. Las primeras constituyen las vacunas tradicionales elaboradas con microorganismos atenuados seleccionados por mantener su inmunogenicidad aunque desprovistos de su patogenicidad, en este grupo se incluyen las vacunas hechas a partir de microorganismos recombinantes que son virus o bacterias que expresan antígenos heterólogos provenientes de otros microorganismos. Por su parte, las vacunas inactivadas consisten en microorganismos muertos o proteínas aisladas nativas o

recombinantes las cuales se conocen como vacunas de subunidades (Estrada-Parra, 1996; Ertl y Xiang, 1996).

Las características deseables en toda vacuna se mencionan a continuación:

Seguridad. Las vacunas no deben producir efectos secundarios o causar enfermedad alguna. Las vacunas basadas en virus atenuados pueden revertir a su forma virulenta, llevando de manera inherente un riesgo potencial en su utilización. Aunque la posibilidad de que esto suceda es muy baja en la actualidad, el riesgo potencial no desaparece. El mejor ejemplo de vacuna viral preparada con microorganismos atenuados es la vacuna oral anti-poliomielítica tipo Sabin, la cual se considera segura y es utilizada a nivel mundial. Sin embargo, se han reportado algunos casos de poliomielitis por la reversión a la forma virulenta de los virus atenuados tipo dos y tres que son constituyentes de esta vacuna. Por su parte, las vacunas de ADN carecen de este riesgo, y tal vez la principal preocupación en términos de seguridad sea la posibilidad de integración del ADN al genoma del individuo, provocando la activación de proto-oncogenes o inactivación de genes supresores de tumores. Hasta la fecha, se ha observado que el ADN permanece en forma episomal, descartando la posibilidad de integración genómica (Nichols *et al.*, 1995).

Métodos de inoculación. Esta característica va estrechamente ligada a la seguridad de la vacuna. El método de aplicación de ésta no debe de presentar riesgo alguno a los individuos que la reciben o que la aplican. La utilización de jeringas y agujas constituye un riesgo sobre todo por la generación de desechos en lugares con poco control sobre ellos permitiendo su reutilización. Por lo anterior, las vacunas de

administración oral resultan ideales en cuanto a seguridad. La inmunización con ADN ha sido realizada con éxito mediante este tipo de administración, así como mediante pistolas genéticas, las cuales se consideran también seguras.

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

Costos. La elaboración de vacunas tradicionales requiere de una infraestructura costosa. Las técnicas empleadas para clonación de genes en nuevos vectores para vacunación con ADN son bastante simples, rápidas y no requieren del mismo tipo de instalaciones necesarias para producir virus recombinantes. Las vacunas con microorganismos atenuados son menos estables que las que se preparan con microorganismos inactivados, Por su parte, las vacunas de ADN son estables a temperatura ambiente lo cual contribuye a la disminución significativa de los costos de producción.

III. METODOLOGÍA

Para la realización de esta investigación se llevaron a cabo dos experimentos:

3.1 Experimento 1

En este experimento se atendieron los objetivos específicos 1 y 2.

3.1.1 Ubicación

El experimento 1 se desarrolló en la Estación de Pruebas de Comportamiento, de las instalaciones del Instituto de Biotecnología Animal, Rancho Cofradía Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara, ubicado en el km 7.5 de la carretera a San Isidro Mazatepec, municipio de Tlajomulco de Zuñiga, Jalisco. Con una latitud 20° 28' longitud oeste 103° 27' y una altura sobre el nivel del mar de 1575 m. La temperatura media anual oscila entre 20 °C y 22 °C, la dirección de los vientos es variable y la precipitación pluvial media anual es de 900 mm³. El clima se considera semiseco y semihumedo de acuerdo a la clasificación Koepen de climas del mundo (INEGI, 2000).

3.1.2 Animales

En el experimento se emplearon 30 cerdos divididos en 3 grupos de 10 machos castrados destetados de raza Yorkshire-Landrace de 28 días de edad, con un peso de 8.5±0.8 kg. Después de un periodo de aclimatación de 7 días, se alojaron en corrales individuales de 2x2 m con piso mixto de concreto y barandal metálico.

El alimento ofrecido fue de una presentación comercial en base a los requerimientos nutricionales determinados por el NRC (1996), de acuerdo a la edad y peso de los

animales, y se ofreció a los cerdos a saciedad. El alimento de etapa de inicio contenía 22% de proteína cruda, el alimento de desarrollo 18% y el de etapa de finalización un 15%.

3.1.3 Tratamientos

Se estableció un grupo control (T3) y dos grupos experimentales (T1 y T2) con 10 cerdos cada uno, que fueron inmunizados por vía subcutánea en un esquema de vacunación *prime-boost* con una vacuna de ADN recombinante de miostatina P2-P30 y refuerzo de antígeno recombinante contra miostatina (Cuadro 1).

Cuadro 1. Esquema calendarizado de inmunización para los tres grupos de animales.

Día	0	14	28	Descanso (28 días)			56	70	84	Descanso (28 días)		113
Grupo T1	X	X	X+AR									Sacrificio
Grupo T2	X	X	X			X	X	X+AR				Sacrificio
Grupo T3												Sacrificio

X: Vacuna recombinante P2-P30. X+AR.- Vacuna recombinante P2-P30 más antígeno recombinante. T1 y T2.- Grupos experimentales. T3.- Grupo control.

El manejo de los animales utilizados en el presente experimento, se llevó a cabo bajo los lineamientos de la NOM-051-ZOO-1995 de trato humanitario de animales y la NOM-062-ZOO-1999 de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. El sacrificio se realizó bajo la NOM-033-ZOO-1995 de sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres. La evaluación de las características de la canal y calidad de la carne se hizo bajo los lineamientos de la

NMX-FF-081-SCFI-2003 de productos pecuarios, carne de porcino en canal y calidad de la carne.

Las vacunas utilizadas en los cerdos se usaron conforme a la NOM-012-ZOO-1993, que habla de las especificaciones para la regulación de productos químicos, farmacéuticos, biológicos y alimenticios para uso en animales o consumo por éstos.

3.1.4 Vacuna P2-P30 miostatina

Las vacunas se administraron cada dos semanas de forma subcutánea en la región de la oreja. Los inóculos consistían en 100 µg de ADN recombinante contra miostatina en PBS cbp 1 mL, la cual se construyó en el laboratorio de Genética Molecular, perteneciente al Departamento de Genética y Bioestadística de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, la vacuna consta del plásmido pCI-neo al cual se le insertó un fragmento del gen de miostatina modificado con los epitopos P2 y P30 de la toxina tetánica, los plásmidos recombinantes se recuperaron usando columnas del kit comercial Quiagen® Endo Free Plasmid Mega Kit (Ramírez, 2013).

3.1.5 Antígeno recombinante

Se reforzó con antígeno a los grupos experimentales, al grupo T1 en la semana 4 y al grupo T2 en la semana 12. Los inóculos de antígeno recombinante contra miostatina consistieron en 100 µg de proteína recombinante + adyuvante incompleto de Freud/1 mL cbp PBS, el cual se obtuvo en el mismo laboratorio que la vacuna, empleando un sistema de expresión en *E. coli* basado en el plásmido PETII. La

proteína se recuperó por columnas de níquel empleando el kit QIAexpress® Ni-NTA Fast Start para la purificación y detección de recombinantes.

3.1.6 Variables medidas en el experimento 1

3.1.6.1 Comportamiento del crecimiento

Se monitoreó el peso de los cerdos cada 14 días durante las 16 semanas de experimento, el alimento se ofreció *ad libitum* y se pesaba diariamente la oferta y el rechazo. La ganancia de peso final se obtuvo de los pesos de los cerdos en las 16 semanas restando el peso inicial. La conversión alimenticia se obtuvo de dividir el consumo de alimento total entre la ganancia de peso final de cada uno de los cerdos.

3.1.6.2 Calidad de la canal

Los cerdos fueron sacrificados en la Unidad de Calidad de la carne del Rancho Cofradía de la Universidad de Guadalajara. La insensibilización al momento del sacrificio se realizó por medio de choque eléctrico y posteriormente los cerdos fueron desangrados. El peso al sacrificio se obtuvo al pesar cada cerdo dietado 24 horas antes del sacrificio. El rendimiento de canal se obtuvo después del sacrificio, al dividir el peso de la canal fría a las 24 hr post sacrificio entre el peso al sacrificio por 100%, para cada uno de los cerdos seleccionados. Para el peso de la canal se consideró el cuerpo del cerdo sacrificado, con cabeza, eviscerado, desangrado y sin pelo.

Se recuperó un trozo de carne del lomo (músculo *longissimus dorsi*) a la altura de la décima costilla, de una pulgada de ancho, que comprendía grasa y lomo, con esta muestra se midió, grasa dorsal utilizando un vernier milimétrico. El área del lomo, se

obtuvo por medio de una plantilla. El color subjetivo se tomó con la escala reportada por el NPPC (National Pork Producer Council) que va del 1 al 5 (1= pálido, 2= ligeramente rosa, 3= rosa grisáceo, 4= rojo claro y 5= rojo oscuro). El color objetivo se obtuvo con un equipo Minolta, utilizando la escala CIE L* a* b*. El pH de la canal a 45 min post-sacrificio se tomó usando un potenciómetro de cuchilla.

3.1.6.3 Medición de niveles de anticuerpos contra miostatina en el experimento 1.

En todos los grupos experimentales se tomaron muestras de sangre el día cero y el día 112 del experimento. La sangre se obtuvo de la vena cava superior y se colectó en tubos vacutainer de 8.5 mL sin anticoagulante, posteriormente se centrifugó la muestra a 3000 rpm por 10 min, el suero obtenido se guardó en microtubos de 2 mL, y se procedió a congelarlos a -20 °C hasta su posterior análisis.

Para evaluar los títulos de anticuerpos contra miostatina, se empleó la técnica de ELISA la cual se realizó utilizando el siguiente protocolo: Se une el antígeno de miostatina recombinante al fondo de las placas de ELISA (Maxisorb, nunc) diluyendo (50 ug/ml) en el amortiguador de carbonatos (carbonato de sodio 0,1 M, bicarbonato de sodio 0,1 M, pH 9,6), se incuba por 18 horas a 4 °C, se realizan 3 lavados (Buffer de lavado 10 X; cloruro de sodio 1,25 M, 250 mM tris-HCl pH 7,9, Tween-20 1%) y se agrega la solución de bloqueo (leche descremada 2%, en Buffer de lavado 1 X) incubando por 1 h y posteriormente, se agrega el primer anticuerpo (suero de animales inmunizados) diluyendo 1/100 e incubando por una hora a 37 °C. Se repite el lavado y después se agregara el segundo anticuerpo diluido 1/1000 (anti IgG cerdo acoplado a peroxidasa), se incuba durante 1 hora a 37 °C, se repite el lavado y

se revela colocando 100 μ l pozo de solución reveladora (*), se incuba por 5 minutos y después se agrega 50 μ l pozo de la solución de frenado (ácido sulfúrico 42N) y se lee a 450 nm en lector de ELISA (Crowther, 2010). * Solución reveladora: ácido cítrico 0.1 M pH 4.5 citrato de sodio 0.1 M pH 4.5. Por placa se mezclan 5 mL del ácido cítrico 0.1 M y 5 mL de citrato de sodio 0.1 M, se agregan 200 μ l de una solución de 5 μ g de orto-fenilén-diamina (OPD), 20 μ L de peróxido de hidrogeno al 30%.

3.1.6.4 Medición de adipocitos

Después del sacrificio se obtuvo una muestra de grasa dorsal de los cerdos de los grupos experimentales y del grupo control para medición de adipocitos. Los adipocitos se fijaron y se tiñeron usando la técnica Red Oil descrita por Gondret y Lebret (2002). Los frotis (4 por animal) fueron observados al microscopio usando aceite de inmersión y el objetivo 10X. Se tomaron 40 micrografías por animal, las mediciones incluyeron área y diámetro de los adipocitos descartando a los que tuvieran un diámetro menor a 1 μ m. Para esto se utilizó un microscopio de luz (Motic®) y un programa analizador de imágenes (Motic Images Plus 2.0 ML®), los cuales fueron facilitados en la Unidad Académica de Medicina veterinaria y Zootecnia de la UAN.

3.1.6.5 Medición de fibras musculares

Posterior al sacrificio de los cerdos se tomó una muestra del músculo semitendinoso para medir el efecto de hipertrofia en las fibras musculares por el efecto de la vacuna. Se cortaron muestras del tejido en forma cúbica de aproximadamente 4 cm².

las cuales se colocaron en formol al 10% para su fijación y conservación hasta su uso. Después de mantener las muestras de músculo semitendinoso en formol al 10%, se extrajeron y cortaron trozos de 2 cm², los trozos se cortaron usando un bisturí. Una vez obtenidas las muestras se procedió a deshidratarlas, esto se hizo usando concentraciones crecientes de alcohol a 70%, 80%, 90%, 96% y 100%, las muestras se mantuvieron en agitación en cada alcohol por 4 h. Después de la deshidratación se procedió al proceso de aclaramiento, que consistió en sumergir las muestras, primero en benzoato de metilo por 1 h, y posteriormente en alcohol bencílico por 45 min, hasta que las muestras se precipitaron en el alcohol.

Una vez realizada la deshidratación de las muestras se realizó el parafinado. El parafinado consistió en la inmersión de las muestras en 2 pases de parafina líquida a 54 °C durante 15 min en cada una. Al término de ésta fase el tejido se colocó en un pequeño recipiente cúbico al cual se le agregó parafina líquida de pureza grado reactivo, posterior a esto se dejaron enfriar por una hora a temperatura ambiente para su solidificación. Una vez sólidos, los cubos se etiquetaron y guardaron para su posterior corte en microtomo. Los cortes histológicos se realizaron en un microtomo giratorio Leica® RM2125RT, éstos consistían en cortes coronales de 12 micras de espesor, los cortes se colocaban en un baño de flotación a 45 °C de donde se tomaban para montarlos en un portaobjetos con albúmina.

Después de que los cortes estuvieron montados en el portaobjetos se procedió al desparafinado, para esto los cortes se sumergieron en xilol por 30 min. Posteriormente se hidrataron en concentraciones decrecientes de alcohol de 100%, 96%, 90%, 80% y 70% por 5 min en cada alcohol. Al término de esta etapa los cortes

se colocaron directamente en el colorante hematoxilina de Harris (colorante básico que tiene afinidad sobre núcleos y organelos) durante 1 min, después se lavaron con agua corriente hasta que dejó de fluir el colorante. Inmediatamente después se colocaron en el colorante eosina al 1% recién hecha durante 30 s y después se lavaron de la misma manera que el anterior. La eosina es un colorante ácido que tiene afinidad por el citoplasma, al cual tiñe de color rosa. Enseguida los cortes se deshidrataron con alcohol etílico en concentraciones crecientes (70%, 80%, 90%, 96 y 100 %) durante 5 min en cada concentración, y se aclaró el tejido en xilol durante 20 min. Después a los portaobjetos se les colocó una gota de entellan (resina) y se les cubrió con un cubreobjetos y se dejaron secar durante 1 h, posterior al secado se verificó la integridad de los cortes usando un microscopio de luz Magnús® para asegurarse de que el corte histológico fuera completamente limpio y transversal.

Fueron procesadas en total 16 muestras de músculo *longissimus dorsi* de cada cerdo y de cada tratamiento. La integridad de los cortes ya teñidos se verificaba en cada una de las láminas antes de tomar las micrografías, si los cortes no eran los óptimos, se procedía a realizar todo el proceso de corte histológico y tinción nuevamente. Las micrografías de las preparaciones histológicas para medir el tamaño de las fibras musculares se obtuvieron utilizando un microscopio de luz Leica® DMLB. Las micrografías se tomaron utilizando el objetivo de 20X. Una vez obtenidas las micrografías se procedió a su análisis histológico utilizando el procesador de imágenes Motic Images Plus 2.0 ML®. Para el análisis se midieron alrededor de 10 fibras musculares por campo de las cuales sólo se obtuvo el área. En los

tratamientos T1 y T2 se midieron 75 fibras por muestra (n= 450) y para el tratamiento T3 se midieron 100 fibras por muestra (n= 400).

3.1.6.6 Niveles de creatina quinasa (CK)

Se tomaron muestras sanguíneas de 5 cerdos de cada tratamiento en la semana 13 del experimento para medir los niveles de CK en suero. El suero se analizó mediante espectrofotometría, utilizando el kit comercial de método cinético para la enzima CK, se usaron como sustratos, la fosfocreatina y el ADP, y mediante una serie de reacciones enzimáticas acopladas, se midió la velocidad de formación de NADPH mediante el aumento de absorbancia, a 340-365 nm.

3.2 Experimento 2

En este experimento se atendieron los objetivos específicos 3 y 4.

3.2.1 Ubicación

Este experimento se llevó a cabo en la posta porcina anexa al Laboratorio de Fisiología Nutricional, Cirugía Experimental del área CBAP, perteneciente a la Unidad Académica de Agricultura, dependiente de la Universidad Autónoma de Nayarit, la cual se localiza en el km 9 de la carretera Tepic-Compostela.

3.2.2 Animales

En el experimento se emplearon 10 cerdos divididos en 3 grupos de machos castrados destetados de raza Yorkshire × Landrace × Pietrain de 45 días de edad,

con un peso de 15.0±5 kg. Se alojaron en corrales individuales de 2x2 m con piso mixto de concreto y barandal metálico.

El alimento utilizado fue una mezcla comercial en base a los requerimientos nutricionales determinados por el NRC (1998), de acuerdo a la edad y peso de los animales, y se ofreció a los cerdos a saciedad. El alimento de etapa de inicio contenía 22% de proteína, el alimento de desarrollo 18% y el de etapa de finalización un 15%.

3.2.3 Tratamientos

Se estableció un grupo control con dos cerdos y dos grupos experimentales con 4 cerdos cada uno, que fueron inmunizados por vía subcutánea e intramuscular en dos diferentes esquemas de vacunación activa con una vacuna de DNA recombinante de miostatina P2-P30 y refuerzo de antígeno recombinante contra miostatina (Cuadro 2).

Cuadro 2. Esquema de vacunación calendarizado para los tres grupos de animales del experimento 2.

Día	0	14	28	42	56	70	84
Grupo T1	X (IM)	Ag-c (IM)					sacrificio
Grupo T2	Ag-c (SC)	Ag-i (SC)	Ag-i (SC)	Ag-i (SC)			sacrificio
Grupo T3	PBS	PBS	PBS	PBS			sacrificio

Dónde: X.- vacuna ADN P2-P30 contra miostatina. Ag-c.- Antígeno recombinante + adyuvante completo de Freud; Ag-i.- Antígeno recombinante + adyuvante incompleto de Freud. IM.- Intramuscular. SC.- Subcutánea.

3.2.4 Vacuna P2-P30 miostatina

La vacuna consistía en la misma construcción plasmídica (P2-P30) usada en el experimento 1. Se construyó en el mismo laboratorio. Los inóculos consistían en 500 µg de la vacuna recombinante en 1 mL de PBS y se administraron 2 mL por dosis. La vacuna se administró el día cero (día de inicio del experimento) únicamente en el grupo T1 en forma intramuscular en la región de la pierna.

3.2.5 Antígeno recombinante Ag-c y Ag-i

Se usaron dos tipos de antígenos recombinantes: El Ag-c el cual consistía en 500 µg de la proteína recombinante + adyuvante completo de Freud/1 mL de PBS y el Ag-i con 500 µg de la proteína recombinante + adyuvante incompleto de Freud/1 mL de PBS. Al grupo T1 se le inoculó Ag-c el día 14 del experimento, se hizo de forma intramuscular en la región de la pierna. Al grupo T2 se le inoculó con Ag-c de manera subcutánea (región de la oreja) al inicio del experimento. Únicamente al grupo T2 se le inoculó Ag-i los días 14, 28 y 42 del experimento de forma subcutánea en la región de la oreja. En todas las dosis se usaron 2 mL por aplicación.

3.2.6 Variables medidas en el experimento 2

3.2.6.1 Comportamiento en el crecimiento y rendimiento de canal

Se monitoreó el peso de los cerdos cada 14 días durante las 7 semanas de experimento, el alimento se ofreció ad libitum. La ganancia de peso final se obtuvo de los pesos de los cerdos en las 7 semanas restando el peso inicial. Para calcular el rendimiento de canal se usó la ecuación para predecir la cantidad de cortes magros

expresada en Kg descrita en Orcutt y colaboradores (1990), para la evaluación de la canal en cerdos vivos con ultrasonografía, para esto se utilizó un ultrasonido SonoVet 600 y la ecuación es la siguiente:

$$\text{CCMU} = -2.41 + (0.35 \times \text{peso final en Kg}) - (1.37 \times \text{GD3U en cm}) + (0.32 \times \text{AOCH en cm}^2)$$

Dónde: CCMU= Ecuación para predecir la cantidad de cortes magros expresada en Kg; GD3U= centímetros de espesor de ambas capas de grasa dorsal subcutánea a la altura de la última costilla sobre la línea media; AOCH=área del ojo de la chuleta.

3.2.6.2 Medición del área del músculo *longissimus dorsi* y grasa dorsal

Cada 14 días durante las 7 semanas del experimento se monitoreo con el uso de un ultrasonido el área y circunferencia del músculo *longissimus dorsi* y el espesor de la grasa dorsal en cada uno de los cerdos del experimento.

3.2.6.3 Medición de los niveles de anticuerpos contra miostatina en el experimento 2

En todos los grupos experimentales se tomaron muestras de sangre el día cero y el día 84 del experimento. La sangre se obtuvo de la vena cava superior y se colectó en tubos vacutainer de 8.5 mL sin anticoagulante, posteriormente se centrifugó la muestra a 3000 rpm por 10 min, el suero obtenido se guardó en microtubos de 2 mL, y se procedió a congelarlos a -20 °C hasta su análisis. Para evaluar los títulos de anticuerpos contra miostatina, se empleó también la técnica de ELISA indirecta descrita en el experimento 1, con una dilución de 1/100.

3.3 Análisis Estadístico

En ambos experimentos se realizó un análisis de varianza bajo un diseño completamente al azar con covarianza (peso inicial en la variables de comportamiento del crecimiento y peso al sacrificio en la variables de calidad de la canal). Se realizó contrastes simples (grupos experimentales por separado contra el grupo control) y contrastes por diferencias (grupos experimentales en conjunto contra el grupo control) por separado en cada etapa o periodo de medición, el procedimiento se llevó acabo usando el programa estadístico SPSS®.

El modelo estadístico es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta + \varepsilon_{ij}$$

Dónde: μ = media

τ = tratamiento (T1, T2, T3)

β = covarianza (peso inicial ó peso al sacrificio)

ε = error experimental

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados de las variables del experimento 1

4.1.1 Comportamiento en el crecimiento del experimento 1

Como se observa en la Figura 5, no hubo diferencias significativas en ganancia de peso ($P > 0.10$) entre los grupos experimentales, pero si se observó una tendencia a mayor peso al inicio (peso a 14 días $P < 0.10$) en los cerdos inmunizados (T1-T2). En cuanto a la ganancia de peso final (GPF) y la conversión alimenticia final (CAF), tampoco se observaron diferencias significativas ($P > 0.10$) (Cuadro 3).



Figura 5. Monitoreo del peso catorcenal de los cerdos del experimento 1. I.- Tres inmunizaciones sucesivas; R.- Refuerzo.

Cuadro 3. Ganancia de peso final y conversión alimenticia final de los cerdos con dosis de 100 µg de vacuna y antígeno.

Variables	Medias ajustadas en los grupos experimentales				Contrastes simple		Contrastes por-diferencia
	T1	T2	T3	ee	T1-T3	T2-T3	(T1-T2)-T3
GPF (kg)	92.87	96.58	93.30	0.59	0.92	0.521	0.73
CAF	2.85	2.8	2.82	0.06	0.70	0.786	0.95

ee: error estándar. T1: tres inmunizaciones + refuerzo; T2: tres inmunizaciones + descanso + tres inmunizaciones + refuerzo; T3: grupo control. GPF: ganancia de peso final; CAF: conversión alimenticia final.

Los contrastes simples del peso inicial al peso a los 56 días, no se tomaron en cuenta debido a que los dos grupos experimentales seguían el mismo esquema de vacunación en esos pesajes.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Ramírez en el año 2013, donde el comportamiento en el crecimiento de ratones inmunizados con diferentes construcciones de una vacuna ADN recombinante contra miostatina no mostró diferencias significativas ($P > 0.05$), pero ahí sí reportan diferencias en las evaluaciones de la canal del grupo inmunizado con la vacuna P2-P30 comparado con su control ($P > 0.05$); lo que en los grupos inmunizados de este trabajo, no sucede, y que fueron inmunizados con la misma dosis utilizada por Ramírez (100 µg). Estos resultados también difieren con lo reportado por Long y colaboradores (2009), donde la inmunización activa con una dosis más elevada (1mg y 4mg) de un antígeno recombinante contra miostatina en cerdos, mostraron diferencias significativas en el rendimiento de la canal, comparados con el grupo control ($P < 0.05$). Pero concuerdan con lo encontrado por Xianyong y colaboradores (2005)

donde el peso corporal de ratones inmunizados con miostatina recombinante de cerdo no mostró diferencias significativas ($P > 0.05$). Aunque no hubo efecto de la vacuna en el comportamiento del crecimiento, se puede observar que los datos presentados en el Cuadro 3 corresponden a parámetros normales en el comportamiento productivo de los cerdos machos Yorkshire-Landrace, en los cuales se ha reportado una conversión alimenticia promedio entre 2.30 a 3.1 Kg y una ganancia de peso diaria promedio de 695 g/día (Bruininx *et al.*, 2001; Dunshea *et al.*, 2003; Gondret *et al.*, 2005; Lynch *et al.*, 2006).

4.1.2 Calidad de la canal del experimento 1

En cuanto a la calidad de la canal y sus variables sólo se observaron diferencias estadísticas significativas entre el grupo T2 y el control en la variable color L^* ($P < 0.10$), como se puede observar en el Cuadro 4.

La calidad de carne de cerdo, si sólo consideramos el pH, la capacidad de retención de agua (CRA) y el color, se puede definir por los siguientes atributos: primero, la gama de pH ideal se encuentra entre 5.6 – 6.8. Carnes con un pH por debajo del 5.6 tienen una CRA reducida y un color pálido no aceptable. La carne con un pH mayor de 6.0 posiblemente son demasiado oscuras.

Cuadro 4. Mediciones para determinar la calidad de la canal de los cerdos inmunizados con 100 µg de vacuna y antígeno.

Variables	Medias ajustadas en los grupos experimentales				Contrastes simple		Contrastes por diferencia
	T1	T2	T3	ee	T1-T3	T2-T3	(T1-T2)-T3
Peso al sacrificio (kg)	112.33	114.16	108.75	2.54	0.35	0.17	0.20
Rendimiento de canal fría (%)	81.82	82.84	82.06	1.51	0.91	0.74	0.90
Peso canal fría 24 hrs (kg)	95.30	96.45	95.49	1.69	0.94	0.71	0.87
Grasa dorsal (mm)	18.43	19.18	18.56	2.14	0.96	0.85	0.93
Área del lomo (cm ²)	58.49	59.36	54.57	4.15	0.53	0.47	0.45
Color NPPC	1.66	1.17	1.74	0.28	0.86	0.22	0.42
Color L*	57.20	57.96	51.85	2.25	0.13	0.10*	0.08*
Color a*	9.93	9.49	9.54	0.70	0.72	0.96	0.86
Color b*	1.82	1.76	0.02	0.80	0.16	0.18	0.13
pH 24 h	5.48	5.58	5.50	0.64	0.89	0.61	0.83

NPPC: National Pork Producer Council; T1: tres inmunizaciones + refuerzo; T2: tres

inmunizaciones + descanso + tres inmunizaciones + refuerzo; T3: grupo control; L*:

a* y b*.- brillantez, enrojecimiento y amarillez, respectivamente. *P< 0.10.

Rendimiento de canal fría: se le consideró canal al cuerpo del cerdo eviscerado, sin cerdas, con cabeza, piel y extremidades.

La CRA no mejora por encima de 6.0. Segundo, el color ideal de la carne de cerdo fresco es el N° 4 en la nueva tabla de colores del National Pork Producers Council

(NPPC). Esto se traduce a una puntuación de color objetiva (Minolta L*) de 43.3 (NPPC, 1999, Cannon *et al.*, 1995). Más objetivamente, el color se puede medir usando un cromámetro Minolta®. Este método mide el brillo (valor de L*), el enrojecimiento (valor a*) y la amarillez (valor b*) de la muestra. La NPPC sugiere que los valores de L* -para describir el rango de la escala del color pálido N° 1 al color oscuro N° 6- debe ser aproximadamente 61, 55, 49, 43, 37 y 31, respectivamente. Por lo tanto, el valor ideal L* parece ser entre 43 y 49. En cuanto a los resultados presentados en el Cuadro 4, se puede observar que conforme a la escala de la NPPC para el color, la carne de los cerdos tratados con la vacuna tiene un color más pálido -N° 1 (pálido) de la escala NPPC- que los cerdos del grupo control. Esto concuerda con los valores de color obtenidos con el cromámetro Minolta para L*, los cuales en los cerdos tratados (grupos T1 y T2) tiene valores de 57.14 y 57.89 respectivamente, valores más altos que en el grupo control (T3) el cual tiene valores de 52.05 que equivale al N° 2 (ligeramente rosa) de la escala NPPC. Esto parecería indicar que la vacuna de ADN P2-P30 tendría un efecto negativo en cuanto a la calidad de la carne, pero aún no hay estudios que confirmen esto.

4.1.3 Efecto en los niveles de anticuerpos contra miostatina en el experimento 1

En los resultados de las evaluaciones de los sueros por la técnica de ELISA del experimento, no se observaron diferencias significativas ($P > 0.10$) en los niveles de anticuerpos contra miostatina en ninguno de los grupos experimentales (Cuadro 5). Se esperaba que los títulos de anticuerpos de la toma del día 112 fueran más elevados en los grupos tratados (T1 y T2) en comparación con el grupo control (T3)

ya que los grupos experimentales ya habían recibido dosis de la vacuna contra miostatina, pero considerando el nivel de absorbancia del control positivo para anticuerpos contra miostatina que fue de 1.05 se observa que los títulos de anticuerpos de los grupos tratados son negativos, por lo que se deduce que no hubo una respuesta inmune a la vacuna suficiente para la producción de anticuerpos contra miostatina.

Cuadro 5. Niveles de anticuerpos en suero con dosis de 100 µg de vacuna y antígeno.

Toma de muestra	Medias ajustadas				Contrastes simple		Contrastes por diferencia	
	T1	T2	T3	ee	T1-T3	T2-T3	T1-T2	(T1-T2)-T3
Día 0	0.69	0.65	0.63	0.04	0.31	0.67	0.55	0.41
Día 112	0.63	0.68	0.67	0.08	0.76	0.91	0.69	0.90

T1: tres inmunizaciones + refuerzo; T2: tres inmunizaciones + descanso + tres inmunizaciones + refuerzo; T3: grupo control.

En este experimento se optó por utilizar una dosis de 100 µg de la vacuna ADN recombinante contra miostatina P2-P30, considerando los resultados obtenidos en ratones por Ramirez (2013). En ese trabajo, aunque no se midieron los niveles de anticuerpos por el efecto de la inmunización de la vacuna, la producción de éstos por el efecto de la vacuna se obviaron, ya que si se demostró que ésta tuvo un efecto significativo ($P < 0.05$) en las evaluaciones de las canales (aumento de peso en la región craneal, caudal, miembros posteriores, tríceps, cuádriceps y cabeza) en los ratones inmunizados con la vacuna con los epitopos P2 y P30; esta hipótesis se basó en que no hubiera habido efecto si la vacuna no haya activado la respuesta

inmune para la producción de anticuerpos que bloquearan la actividad de la miostatina. Esto fue demostrado por Tang y colaboradores (2007), donde la utilización de una vacuna de ADN contra miostatina produjo un aumento en el peso corporal a consecuencia del incremento de la masa muscular y éste debido a la producción de anticuerpos contra miostatina, por el efecto de la inmunización de la vacuna. Los resultados obtenidos en este experimento y que se observan en el Cuadro 5 nos sugieren que la dosis utilizada de 100 μ g de la vacuna de ADN recombinante P2-P30 no fue suficiente para producir una respuesta inmune humoral en los cerdos.

4.1.4 Efecto de la vacuna P2-P30 contra miostatina en el tejido adiposo.

Se observaron diferencias significativas ($P < 0.01$) en el área y diámetro ($P < 0.05$) de los adipocitos entre el grupo control (T3) y el grupo (T1). Como se pueden observar las medias ajustadas de los resultados por grupo, el grupo T3 contiene adipocitos con un área y un diámetro mayor que los grupos T1 y T2 que fueron tratados con la vacuna (Cuadro 6). Estos resultados son algo contradictorios con los observados en el Cuadro 4, ya que en las evaluaciones de la canal se observa que no hubo diferencias significativas en cuanto al espesor de grasa dorsal de los grupos tratados; además, ahí mismo se observa que el grupo control tiene menor grasa dorsal que los tratados, por lo que se esperaba que, en el tamaño de los adipocitos, los resultados no mostraran diferencias significativas. En reportes previos se ha comprobado que la miostatina juega un papel directo en la regulación de la homeostasis del tejido adiposo (McPherron *et al.*, 1997). De hecho McPherron y colaboradores (1997),

notaron que ratones *knockout* para el gen de miostatina tenía niveles detectables de ARN de miostatina en el tejido adiposo. También se ha demostrado que ratones *knockout* para el gen de miostatina reducen los niveles de grasa subcutánea en el cuerpo y los niveles de concentración de leptina (Lin *et al.*, 2002; McPherron y Lee, 2002). La sobreexpresión de un inhibidor de miostatina reduciendo su actividad, también mostró una reducción de tejido adiposo subcutáneo (Zhao *et al.*, 2005).

Cuadro 6. Efecto en el área y diámetro de los adipocitos con una inmunización de 100 µg de vacuna y antígeno.

Variables	Medias ajustadas				Contrastes simple		Contrastes por diferencia
	T1	T2	T3	ee	T1-T3	T2-T3	(T1-T2)-T3
Área (µm ²)	6793.9	7272.2	7500.4	130.8	0.001***	0.024	0.005**
Diámetro (µm)	91.7	95.1	96.6	0.85	0.001***	0.24	0.004**

T1: tres inmunizaciones + refuerzo; T2: tres inmunizaciones + descanso + tres inmunizaciones + refuerzo; T3: grupo control. ***P< 0.01; **P< 0.05

Aún no se ha dilucidado como la miostatina afecta al tejido adiposo, por lo que se cree que la reducción de la grasa corporal se debe a que la miostatina puede actuar directamente sobre los adipocitos, promoviendo la proliferación o diferenciación en un mecanismo invertido como en el músculo esquelético o la reducción de la grasa corporal puede ser secundaria al aumento de la demanda metabólica del incremento significativo de la masa muscular en ratones *knockout* para el gen de miostatina (Elliot *et al.*, 2012).

4.1.5 Efecto de la vacuna P2-P30 miostatina en la fibras musculares y antígeno.

Cuando se evaluó el área de las fibras musculares del músculo semitendinoso, no se observaron diferencias significativas ($P > 0.10$) entre los grupos tratados comparados con los control.

Los resultados discrepan con lo encontrado en el bloqueo de la miostatina por acción de anticuerpos monoclonales contra miostatina (Whittemore *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2007), en estos trabajos se demostró que el bloqueo de la miostatina produce un aumento en el área de las fibras musculares (hipertrofia) en los ratones tratados, comparados con sus controles.

Cuadro 7. Efecto en el área de las fibras musculares utilizando una dosis de 100 μg de vacuna y antígeno.

Variable	Medias ajustadas				Contrastes simple		Contrastes por diferencia
	T1	T2	T3	ee	T1-T3	T2-T3	(T1-T2)-T3
Área (μm^2)	4786.78	4670.01	4778.11	76.78	0.93	0.34	0.62

T1: tres inmunizaciones + refuerzo; T2: tres inmunizaciones + descanso + tres inmunizaciones + refuerzo; T3: grupo control. * $P < 0.10$.

Pero dado que en éste experimento no hubo una respuesta inmune la cual produjera anticuerpos capaces de bloquear la acción de la miostatina (Cuadro 5), y así provocar un efecto hipertrófico en las fibras musculares, era de esperarse que las mediciones de las fibras resultaran sin diferencias entre los grupos tratados y el control.

4.1.6 Efecto de la vacuna P2-P30 miostatina en los niveles séricos de creatina quinasa (CK)

En cuanto a los niveles de CK en sangre tampoco hubo diferencias estadísticas significativas ($P > 0.10$) entre las distintas tomas de muestra (Cuadro 8).

Cuadro 8. Resultados en los niveles séricos de CK.

Variable	Medias ajustadas				ee	Contrastes simple		
	Toma día 0	Toma día 56	Toma día 112(T1)	Toma día 112(T2)		0-56	0-112(T1)	0-112(T2)
Niveles de CK (U/L)	3295.6	3527.3	1629.8	1885.5	1065.8	0.88	0.30	0.36

T1: tres inmunizaciones + refuerzo; T2: tres inmunizaciones + descanso + tres inmunizaciones + refuerzo; T3: grupo control.

La CK es una enzima que se encuentra, tanto en el citosol como en las mitocondrias de las células, pertenece a la familia de las guanidino-fosfotransferasas y es clave en el metabolismo energético celular (Webb *et al.*, 1997). Cataliza la fosforilación reversible de creatina a fosfocreatina y de ADP a ATP, esta reacción es importante en la regeneración del ATP. La creatina quinasa se encuentra principalmente en el músculo esquelético, en el músculo cardíaco y en el cerebro (Schlattner *et al.*, 2006). Niveles elevados de CK en suero están estrechamente asociados con el daño celular, la disrupción de las células musculares, o enfermedad. Estas alteraciones celulares pueden causar que la CK se filtre a partir de células en el suero sanguíneo (Totsuka *et al.*, 2002). La medición de la actividad de CK en suero y determinación de perfiles de sus isoenzimas son todavía un importante indicador de la ocurrencia

de necrosis de células del músculo y el daño tisular debido a la enfermedad o trauma (Brancaccio et al., 2007).

Se ha reportado que el bloqueo de la miostatina reduce los niveles de CK. Haidet y colaboradores (2008), demostraron en ratones, que la inhibición de la actividad de la miostatina utilizando follistatina reduce los niveles de CK en suero. La inmunización de cerdos con un antígeno recombinante contra miostatina reduce los niveles en la actividad de la CK en suero de 19.9% a 43.8% comparados con sus controles (Long et al., 2009). Dado que en este experimento no hubo efecto de la vacuna para producir anticuerpos capaces de bloquear la actividad de la miostatina, era de esperar que los niveles de CK no fueran bajos, pero aun así los niveles presentados siguen siendo muy elevados para los estándares en cerdos. Los niveles normales de CK en cerdos oscilan entre 66-489 U/L y en cerdos estresados los niveles son mayores a 1000 U/L (Duncan and Prasse's Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology, 2003). Una explicación a los valores de CK del experimento puede ser el manejo dado a los cerdos previo a la toma de muestra para medir los niveles de CK, en el que los animales pudieron haberse estresado y alterado sus niveles de CK.

4.2 Resultados de las variables del experimento 2

4.2.1 Efecto en el crecimiento y rendimiento de la canal en el experimento 2

Como se observa en la Figura 2, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los pesajes de los animales en el experimento 2 ($P > 0.10$), al igual que en la ganancia de peso total y el rendimiento de la canal ($P > 0.010$) (Cuadro 9).

Ganancia de peso catorcenal

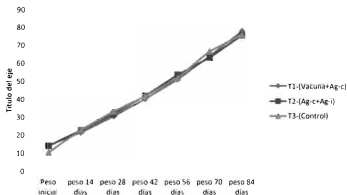


Figura 6. Monitoreo del peso catorcenal de los cerdos del experimento 2. Ag-c: antígeno + adyuvante completo de Freud; Ag-i: antígeno + adyuvante incompleto de Freud.

Cuadro 9. Ganancia de peso total y rendimiento de canal por ultrasonografía

Variables	Medias ajustadas			ee	Contrastes simples		Contrastes por diferencia	
	T1	T2	T3		T1-T3	T2-T3	T1-T2	(T1-T2)-T3
GDP								
total (kg)	64.05	61.79	62.11	5.20	0.83	0.97	0.69	0.92
Rend.								
canal (%)	39.81	40.55	41.14	0.65	0.29	0.61	0.33	0.41

T1: vacuna + (antígeno + adyuvante completo de Freud); T2: (antígeno + adyuvante completo de Freud) + (antígeno + adyuvante incompleto de Freud); T3: grupo control

GDP total.-ganancia de peso total; Rend. canal.- rendimiento de canal.

Las mediciones de rendimiento de canal se obtuvieron mediante ultrasonografía, los valores mostrados son congruentes con lo encontrado por otros autores que utilizaron el mismo método donde tuvieron rendimientos de canal en kg similares (Mersmann, 1982; Terry et al., 1989; Guadarrama et al., 1999).

4.2.2 Efecto en el músculo *longissimus dorsi* y grasa dorsal en el experimento 2

En cuanto al área y circunferencia del músculo *longissimus dorsi* (LD) y espesor de grasa dorsal no hubo diferencias significativas en ninguno de los grupos tratados ($P > 0.10$).

Se esperaría que el efecto del bloqueo de la miostatina se reflejara en un aumento en el tamaño del *longissimus dorsi*, dado que se ha demostrado que la inmunización contra miostatina produce un aumento en volumen del músculo esquelético (Bogdanovich et al., 2002; Whittemore et al., 2003; Kim et al., 2006; Long et al., 2009; Ramirez, 2013).

Long y colaboradores (2009), inmunizaron cerdos con un antígeno recombinante contra miostatina, un grupo control de cerdos con una dosis de 1 mg de antígeno y otro grupo tratado con 4 mg, sus resultados muestran un rendimiento de canal mayor en los grupos tratados comparados con su control ($P < 0.01$) lo cual difiere con los resultados de este trabajo, pero al igual que en esta investigación, no reportan diferencias significativas en el espesor de grasa dorsal y área del ojo de la chuleta ($P > 0.05$) (Cuadro 10).

Cuadro 10. Efecto de la vacuna P2-P30 y antígeno en el *longissimus dorsi* y grasa dorsal.

Variables	Medias ajustadas				Contrastes simple		Contrastes por diferencia	
	T1	T2	T3	ee	T1-T3	T2-T3	T1-T2	(T1-T2)-T3
Grasa dorsal (mm)	16.46	15.48	15.70	0.60	0.50	0.84	0.18	0.79
LD circunferencia (mm)	210.61	210.17	218.84	13.12	0.73	0.71	0.97	0.71
LD área (mm ²)	279.94	275.48	287.71	37.11	0.90	0.85	0.91	0.87

T1: vacuna + (antígeno + adyuvante completo de Freud); T2: (antígeno + adyuvante completo de Freud) + (antígeno + adyuvante incompleto de Freud); T3: grupo control.
LD.- *longissimus dorsi*.

Los resultados aunque sin mostrar diferencias significativas, concuerdan con lo reportado por Guadarrama y colaboradores (1999), quienes usando ultrasonografía reportaron un área de LD de 33.3 cm² y un espesor de grasa dorsal de 2.7 cm. ellos usaron cerdos con un peso vivo final de alrededor de 107 Kg y en este caso se usaron cerdos de alrededor de 78 Kg, lo que podría explicar esta variación; además se demuestra que, aunque la vacuna no tuvo un efecto positivo en crecimiento muscular, rendimiento de canal (Cuadros 9 y 10) y comportamiento en el crecimiento (Figura 2), tampoco se observaron efectos perjudiciales, pues todos los parámetros se mantuvieron en los rangos normales del comportamiento productivo en cerdos.

4.2.3 Efecto en los niveles de anticuerpos en el experimento 2

Para los niveles de anticuerpos contra miostatina solo hubo diferencias en el muestreo del día 84 entre los grupos T1 y T3 ($P < 0.01$) y entre los grupos T1 y T2 ($P < 0.01$), donde se observan niveles más altos de títulos de anticuerpos contra miostatina en el grupo T1.

Cuadro 11. Niveles de anticuerpos en suero con dosis de 1000 μg de vacuna y antígeno.

Muestréos	Medias ajustadas				Contrastes simple		Contrastes por diferencia	
	T1	T2	T3	ee	T1-T3	T2-T3	T1-T2	(T1-T2)-T3
Día 0	0.745	0.764	0.599	0.11	0.5	0.45	0.87	0.45
Día 84	1.256	1.171	1.115	0.01	0.006***	0.12	0.006***	0.02*

T1: vacuna + (antígeno + adyuvante completo de Freud); T2: (antígeno + adyuvante completo de Freud) + (antígeno + adyuvante incompleto de Freud); T3: grupo control; LD.- *longissimus dorsi*. *** $P < 0.01$

Con el grupo T1 se siguió una estrategia inmunización *prime-boost*, esta estrategia de inmunización implica cebar primeramente el sistema inmune a un antígeno diana emitido por uno vector y luego impulsar selectivamente esta inmunidad por la readministración de un antígeno recombinante o un vector distinto. Con las primeras estrategias *prime-boost* los efectos en la inmunización fueron meramente aditivos, mientras que con algunas estrategias recientes (que involucran poxvirus o adenovirus) se han logrado potentes efectos sinérgicos (Woodland, 2004). Ésta mejora sinérgica de la inmunidad al antígeno diana es reflejado en un incremento en el número de células T específicas al antígeno, enriquecimiento selectivo de células T de alta avidéz y el aumento de la eficacia contra el desafío del patógeno

(McShane, 2002; Estcourt *et al.*, 2002). Además, se ha demostrado la activación tanto de linfocitos T CD8+ y CD4+ (McShane, 2001; Brooks *et al.*, 2001; Tanghe *et al.*, 2001). Los resultados del Cuadro 11, muestran que la estrategia de inmunización *prime-boost* es la más eficiente para producir inmunidad. Nuestros datos concuerdan con lo reportado por Long y colaboradores (2009), donde las dosis de 1 mg y 4 mg de un antígeno recombinante contra miostatina inoculado en cerdos produce un aumento en los niveles de anticuerpos contra miostatina en los sueros de los animales tratados comparados con su control ($P < 0.05$) en muestras tomadas el día 84 del experimento. Nuestros resultados también muestran que a pesar de que hubo una respuesta inmune a la vacuna y al antígeno recombinante contra miostatina en la producción de anticuerpos, ésta respuesta no fue la suficiente para producir un efecto en el comportamiento del crecimiento, rendimiento de la canal y las demás variables mostradas en el Cuadro 10.

V. CONCLUSIONES

Se puede concluir con estos dos experimentos que una dosis de 100 μg de vacuna de ADN P2-P30 no produce una respuesta inmunológica en cerdos, aún en un sistema de vacunación *prime-boost*; y la utilización de 1000 μg de la vacuna produce una respuesta inmune como lo demuestran los niveles de anticuerpos, pero esta respuesta no es la suficiente como para producir un efecto en el crecimiento de la masa muscular y rendimiento canal en cerdos.

VI. RECOMENDACIONES

Se recomienda hacer pruebas para valorar la dosis de la vacuna y su efecto en el crecimiento muscular en cerdos ya que las dosis encontradas en ratones no tuvieron los mismos efectos en cerdos.

VII. LITERATURA CITADA

- Akpan, I.; Goncalves, M.D.; Dhir, R.; Yin, X.; Pistilli, E.E.; Bogdanovich, S.; Khurana, T.S.; Ucran, J.; Lachey, J.; Ahima, R.S. 2009. The effects of a soluble activin type IIB receptor on obesity and insulin sensitivity. *International journal of obesity* 33: 1265-1273.
- Arce, V.M.; Carneiro, I.; Fernández-Nocelo, S.; Devesa, J. 2005. La miostatina: un regulador autocrino/paracrino del desarrollo muscular. *Endocrinol Nutr.* 52: 350-7.
- Attisano L.; Wrana J.L. 2002. Signal transduction by the TGF- β superfamily. *Science.* 296: 1646-7.
- Azevedo, V.; Levitus, G.; Miyoshi, A.; Candido, A.L.; Goes, A.M.; Oliveira, S.C. 1999. Main features of DNA-based immunization vectors. *Braz J Med Biol Res* 32: 147-53.
- Benny Klimek, M.E.; Aydogdu, T.; Link, M.J.; Pons, M.; Koniaris, L.G.; Zimmers, T.A. 2010. Acute inhibition of myostatin-family proteins preserves skeletal muscle in mouse models of cancer cachexia. *Biochemical and biophysical research communications* 391: 1548-1554.
- Biga, P.R.; Roberts, S.B.; Iliev, D.B.; McCauley, L.A.R.; Moon, J.S.; Collodi, P.; Goetz, F.W. 2005. The isolation, characterization, and expression of a novel GDF11 gene and a second myostatin form in zebrafish, *Danio rerio*. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* 141: 218-230

- Bogdanovich, S.; Krag, T.O.; Barton, E.R.; Morris, L.D.; Whittemore, L.A.; Ahima, R.S.; Khurana, T.S. 2002. Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature*. 420: 418-421.
- Bohm, W.; Kuhrober, A.; Paier, T.; Mertens, T.; Reimann, J.; Schirmbeck, R. 1996. DNA vector constructs that prime hepatitis B surface antigen-specific cytotoxic T lymphocyte and antibody responses in mice after intramuscular injection. *J Immunol Methods* 193: 29-40.
- Brancaccio, P.; Maffulli, N.; Limongelli, F.M. 2007. Creatine kinase monitoring in sportmedicine. *British Medical Bulletin*. 81-82 (1): 209-230
- Brooks J.V.; Frank, A.A.; Keen, M.A.; Bellisle, J.T.; Orme, I.M. 2001. Boosting vaccine for tuberculosis. *Infect Immun* 69: 2714-2717.
- Brooks, J.V.; Frank, A.A.; Keen, M.A.; Bellisle, J.T.; Orme, I.M. 2001. Boosting vaccine for tuberculosis. *Infect. Immun.* 69: 2714-2717.
- Bruininx, E. M. A. M.; van der Peet-Schwering, C. M. C.; Schrama, J. W.; Vereijken, P.F.G.; Vesseur, P.C.; Everts, H.; den Hartog, L.A.; Y Beynen, A.C. 2001. Individually measured feed intake characteristics and growth performance of group-housed weanling pigs: Effects of sex, initial bodyweight, and body weight distribution within groups. *Journal of Animal Science*. 79: 301-308.
- Cannon, J.E.; Morgan, J.B.; McKeith, F.K.; Smith, G.C.; Sonka, S.; Heavner, J.; Meeker, D.L. 1995. Pork chain quality audit packer survey: Quantification of pork quality characteristics. *J. Muscle Foods*. 6:369.



- Cho T.; Gerstenfeld L.C.; Einhorn T.A. 2002. Differential expression of members of the transforming growth factor β superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 17: 513-20.
- Cox G.J.M.; Zamb, T.J.; Babiuk L.A. 1993. Bovine herpesvirus 1: immune response in mice and cattle injected with plasmid DNA. *J Virol.* 67: 5664-7.
- Crowther, J.R. 2010. *Methods in Molecular Biology (Elisa :Theory and Practice)*. Springer. Vol. 42.
- DeFronzo, R.A.; Tripathy, D. 2009. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes care* 32: 157-163.
- Duncan and Prasse. *Clinical Pathology*. 4th ed. (Latimer, Mahaffey and Prasse) pp. 331-338.
- Dunsha, F.R.; Kerton, D. K.; Cranwell, P.D.; Campbell, R.G.; Mullan, B.P.; King, R.H.; Power, G.N.; y Pluske, J.R. 2003. Lifetime and post-weaning determinants of performance indices of pigs. *Australian Journal of Agricultural Research* 54: 363-370.
- Elliott, B.; Renshaw, D.; Getting, S.; Mackenzie, R. 2012. The central role of myostatin in skeletal muscle and whole body homeostasis. *Acta Physiol.* 205: 324-340.
- Ertl, H.C.; Xiang, Z. 1996. Novel vaccine approaches. *J Immunol* 156: 3579-82.
- Estcourt, M.J.; Ramsay, A.J.; Brooks, A.; Thomson, S.A.; Medveckzy, C.J.; Ramshoaw, I.A. 2002. Prime-boost immunization generates a high frequency, high-avidity CD8(+) cytotoxic T lymphocyte population. *Int Immunol* 14: 31-37

- Estrada-Parra, S.; Estrada-García, I. 1996. Vacunas y vacunación. En: Inmunología de memoria. Editorial Médica Panamericana: México.
- Feldman, B.J.; Steeper, R.S.; Farese Jr., R.V.; Yamamoto, K.R. 2006. Myostatin modulates adipogenesis to generate adipocytes with favorable metabolic effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 15675-15680.
- Funkenstein, B.; Olekh, E.; Jakowlew, S.B. 2010. Identification of a novel transforming growth factor-beta (TGF-beta6) gene in fish: regulation in skeletal muscle by nutritional state. *BMC Mol. Biol.* 11: 37.
- Fynan, E.F.; Webster, R.G.; Fuller, D.H.; Haynes, J.R.; Santoro, J.C.; Robinson, H.L. 1993. DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal and gene-gun inoculations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.* 90: 11478-11482.
- Gamer, L.W.; Wolfman, N. M.; Celeste, A. J.; Hattersley, G.; Hewick, R.; Rosen, V. 1999. A novel BMP expressed in developing mouse limb, spinal cord and tail bud is a potent mesoderm inducer in *Xenopus* embryos. *Dev. Biol.* 208: 222-232.
- Gondret, F.; Lefaucheur, L.; Louveau, I.; y Lebret, B. 2005. The long-term influences of birth weight on muscle characteristics and eating meat quality in pigs individually reared and fed during fattening. *Arch. Tierz., Dummerstorf* 48: 68-73.
- Gondret, F.; Lebret, B. 2002. Feeding intensity and dietary protein level affect adipocyte cellularity and lipogenic capacity of muscle homogenates in grow

- pigs, without modification of the expression of sterol regulatory element binding protein. *J Anim Sci*. 80: 3184-93.
- Gonzalez-Cadauid, 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.; Bhasin, S. 1998. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14938-14943.
- Grobet, L.; Martin, L.J.R.; Poncelet, D.; Pirottin, D.; Brouwers, B.; Riquet, J.; Schoeberlein, A.; Dunner, S.; Menissier, F.; Massabanda, J.; Fries, R.; Hanset, R.; Georges, M. 1997. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nat. Genet.* 17: 71-74.
- Guadarrama, M.C.A.; Bermúdez, M. M.; Madrazo, V.P.A.; Ibergüengoytia, C.J.A. 1999. Estimación in vivo del rendimiento de las canales porcinas mediante ultrasonografía. *Técnica pecuaria en México*. 37: 31-38.
- Guo T.; Jou W.; Chanturiya T.; Portas J.; Gavrilova O.; McPherron A.C. 2009. Myostatin inhibition in muscle, but not adipose tissue, decreases fat mass and improves insulin sensitivity. *PLoS One* 4: 4937.
- Haidet, A.M.; Rizo, L.; Handy C.; Umaphathi, P.; Eagle, A.; Shilling, C.; Boue, D.; Martin, P.T.; Sahenk, Z.; Mendell, J.R.; Kaspar, B.K. 2008. Long-term enhancement of skeletal muscle mass and strength by single gene administration of myostatin inhibitors. *PNAS*. 105: 4318-4322.
- Handel, S.E. Stickland, N.C. 1987. The effects of low birthweight on the ultrastructural development of two myofibre types in the pig. *J. Anat* 150: 129-143.

- Hill J.J.; Davies M.V.; Pearson A.A.; Wang J.H.; Hewick R.M.; Wolfman N.M.; Qiu Y. 2002. The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. *J Biol Chem.* 277: 40735-41.
- Hill J.J.; Qiu Y.; Hewick R.N.; Wolfman N.M. 2003. Regulation of myostatin in vivo by GASP-1: a novel protein with protease inhibitor and follistatin domains. *Mol Endocrinol.* 17: 1144-54.
- Hittel, D.S.; Axelson, M.; Sarna N.; Shearer, J.; Huffman, K.M.; Kraus, W.E. 2010. Myostatin decreases with aerobic exercise and associates with insulin resistance. *Med Sci Sports Exerc* 42: 2023-2029.
- Huygen K. 2005. Plasmid DNA vaccination. *Microbes Infect.* 7: 932-938
- INEGI. 2000. Instituto Nacional de Geografía e Informática. Marco geoestadístico del estado de Jalisco, México D.F.
- Izumiya, Y.; Hopkins, T.; Morris, C.; Sato, K.; Zeng, L.; Viereck, J.; Hamilton, J. A.; Ouchi, N.; LeBrasseur, N.K.; Walsh K. 2008. Fast/Glycolytic muscle fiber growth reduces fat mass and improves metabolic parameters in obese mice. *Cell metabolism* 7: 159-172.
- Kadowaki N.; Ho S.; Antonenko S.; Malefyt R. W.; Kastelein R. A.; Bazan F.; Liu Y. J. 2001. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 194: 863-9.
- Kambadur R.; Sharma M.; Smith T.P.L.; Bass J.J. 1997. Mutations in myostatin (GDF8) in double-musled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res.* 7: 910-15.

- Keller, E.B.; Noon, W.A. 1984. Intron splicing: a conserved internal signal in introns of animal premRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:7417-20.
- Kowalczyk D.W.; Ertl H.C. Immune responses to DNA vaccines. 1999. *Cell Mol Life Sci* 55: 751-770.
- Krieg A.M.; Yi A.K.; Matson S.; Waldschmidt T.J.; Bishop G.A.; Teasdale R.; Koretzky G.A.; Klinman D.M. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374: 546-9.
- Krug A.; Towarowski A.; Britsch S.; Rothenfusser S.; Hornung V.; Bals R.; Giese T.; Engelmann H.; Endres S.; Krieg A. M.; Hartmann G. 2001. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol* 31: 3026-37.
- Lee S-J.; McPherron, A.C. 2001. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 9306-11.
- Lee, S-J.; Reed, L.A.; Davies, M.V.; Gigenrath, S.; Goad, M.E.; 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.; Wolfman, N. M. 2005. Regulation of muscle growth by multiple ligands signaling through activin type II receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 18117-18122
- Lefaucheur, L. 1989. Les differents types de fibres musculaires chez le porc. *INRA. Prod. Anim.* 2 (3): 205-213.

- Leong, G.M.; Kee, A.J.; Millard, S.M.; Martel, N.; Eriksson, N.; Turner, N.; Cooney, G.J.; Hardeman, E.C.; Muscat, G.E. 2010. The Ski proto-oncogene regulates body composition and suppresses lipogenesis. *International journal of obesity* 34: 524-536.
- Levitt, N.; Briggs, D.; Gil, A.; Proudfoot, N.J. 1989. Definition of an efficient synthetic poly (A) site. *Genes Dev.* 3: 1019-25.
- Lin, J.; Arnold, H.B.; Della-Fera, M.A.; Azain, M.J.; Hartzell, D.L.; Baile, C.A. 2002. Myostatin knockout in mice increases myogenesis and decreases adipogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291: 701-706.
- Lin, J.; Arnold, H.B.; Della-Fera, M.A.; Azain, M.J.; Hartzell, D.L.; Baile, C.A. 2002. Myostatin knockout in mice increases myogenesis and decreases adipogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 29: 701-706.
- Long, D.; Zhang, K.; Chen, D.; Ding, X.; Bing Y.U. 2009. Effects of active immunization against myostatin on carcass quality and expression of the myostatin gene in pigs. *Animal Science Journal* 80: 585-590.
- Lopez-Rivero, J.L. 1993. Características histoquímicas, bioquímicas y morfológicas del músculo esquelético equino. *Agro Ciencia*, 9 (2): 113-131.
- Lynch, P.B.; Cahill A.; Lawlor, P.; Boyle, L.; O'Doherty, J.; O'Doherty, J.V.; le Dividich, J. 2006. Studies on growth rates in pigs and the effect of birth weight. Agriculture and Food Development Authority, Dublin.
- Maccatrozzo, L.; Bargelloni, L.; Cardazzo, B.; Rizzo, G.; Patarnello, T. 2001. A novel second myostatin gene is present in teleost fish. *FEBS Lett.* 509: 36-40.
- Massague J. 1998. TGF- β signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 67: 753-91.

- Matzuk M.M.; Lu N.; Vogel H.; Seltheyer K.; Roop D.R.; Bradley A. 1995. Multiple defects and perinatal death in mice deficient in follistatin. *Nature*. 374: 360–363.
- McPherron A.C.; Lawler A.M.; Lee S.-J. 1999. Regulation of anterior/posterior patterning of the axial skeleton by growth/differentiation factor 11. *Nat Genet.*; 22:260-264.
- McPherron A.C.; Lee S.-J. 1996. The transforming growth factor β superfamily. *Growth factors and cytokines in health and disease*. JAI Press Inc. Vol. 1B: 357-393.
- McPherron, A. C.; Lawler, A. M.; Lee, S.-J. 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature*. 387: 83-90.
- McPherron, A. C.; Lee S.-J. 2002. Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 109:595–601.
- McShane, H. 2002. Prime-boost immunization strategies for infectious diseases. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 4: 23–27.
- McShane, H.; Brookes, R.; Gilbert S.C.; Hill, A.V. 2001. Enhanced immunogenicity of CD4 β T-cell responses and protective efficacy of a DNA-modified vaccinia virus Ankara prime-boost vaccination regimen for murine tuberculosis. *Infect. Immun.* 69: 681–686.
- Menissier, F. 1982. *Muscle Hypertrophy of Genetic Origin and Its Use to Improve Beef Production*. The Hague, Martinus Nijhoff.
- Mersman, H.J. 1982. Ultrasonic determination of backfat depth and loin eye area in swine. *J Anim Sci* 54: 268.

- Montgomery, D.L.; Shiver, J.W.; Leander, K.R.; Perry, H.C.; Friedman, A.; Martinez, D.; Ulmer, J.B.; Donnelly, J.J.; Liu, M.A. 1993. Heterologous and homologous protection against influenza A by DNA vaccination: optimization of DNA vectors. *DNA Cell Biol* 12: 777-83.
- Morissette, M.R.; Cook, S.A.; Buranasombati, C.; Rosenberg, M.A.; Rosenzweig, A. 2009. Myostatin inhibits IGF-I-induced myotube hypertrophy through Akt. *American journal of physiology. Cell physiology* 297: 1124-1132.
- Musaro, A.; McCullagh, K.; Paul, A.; Houghton, L.; Dobrowolny, G.; Molinaro, M.; Barton, E.R.; Sweeney, H.L.; Rosenthal, N. 2001. Localized IGF-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nature genetics* 27: 195-200.
- Nakashima, M.; Toyono, T.; Akamine, A.; Joyner, A. 1999. Expression of growth/differentiation factor 11, a new member of the BMP/TGF β superfamily during mouse embryogenesis. *Mech. Development* 80: 185-189.
- Nichols W.W.; Ledwith B.J.; Manam, S. V.; Troilo, P.J. 1995. Potential DNA vaccine integration into host cell genome. *Ann N Y Acad Sci* 772: 30-9.
- Orcutt, M.W.; Forrest, J.C.; Judge, M.D.; Schinckel A.D. Kuei, C.H. 1990. Practical means for estimating pork carcass composition. *J Anim Sci* 68: 3987
- Ostbye, T-K.; Galloway, T.F.; Nielsen, C.; Gabestad, I.; Bardal, T.; Andersen, O. 2001. The two myostatin genes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) are expressed in a variety of tissues. *Eur. J. Biochem.* 268: 5249-57.
- Phillips D.J.; De Krester D.M. 1998. Follistatin: a multifunctional regulatory protein. *Front Neuroendocrinol.* 19: 287-322.

- Pisetsky D.S.; Reich C.; Crowley S.D.; Halpern M.D. 1995. Immunological properties of bacterial DNA. *Ann N Y Acad Sci* 772: 152-63.
- Pursef, V.G., Mitchell, A.D.; Bee, G.; Elsasser, T.H.; McMurtry, J.P.; Wall, R.J., Coleman, M.E.; Schwartz, R.J. 2004. Growth and tissue accretion rates of swine expressing an insulin-like growth factor I transgene. *Animal biotechnology* 15: 33-45.
- Ramírez, A. V. 2013. Construcción de una vacuna de ADN contra miostatina. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. UNAM.
- Reisz-Porszasz, S.; Bhasin, S.; Artaza, J.N.; Shen, R.; Sinha-Hikim, I.; Hogue, A. Fielder, T.J.; González-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: E876-888.
- Reyes-Sandoval A.; Erti H.C. 2001. DNA vaccines. *Curr Mol Med*. 1: 217-243.
- Reyes-Sandoval, A.; Pinto A.R. 2002. Vacunas de ADN. *Publicación Especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla*. Puebla, México. pp. 327-342.
- Ríos, R.; Carneiro, I.; Arce, V.M.; Devesa, J. 2001. Myostatin regulates cell survival during C2C12 myogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 280:561-6.
- Robinson, H.L.; Torres, C.A. 1997. DNA vaccines. *Semin Immunol* 9: 271-83.
- Rodgers, B.D.; Weber, G.M. 2001. Sequence conservation among fish myostatin orthologues and the characterization of two additional cDNA clones from *Morone saxatilis* and *Morone americana*. *Comp. Biochem. Phys. B* 129: 597-603.

- Ross, M. y Rousvell, L. 1994. *Histología*. 20 ed. Panamericana. México.
- Royo, M. 2003. *Secuenciación y análisis del gen de la miostatina bovina*. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria, Madrid.
- Ruusunen, M. 1996. Composition and cross sectional area of muscle fibre types in relation to daily gain and fat content of carcass in Landrace and Yorkshire pigs. *Agricultural and Food Science In Finland*. 5: 593-600.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Vol. 1. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.
- Savage, D.B.; Petersen, K.F. Shulman, G.I. 2007. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiological reviews* 87: 507-520.
- Schneyer, A.; Tortoriello, D.V.; Holmes, W.E.; Pan, Y.; Keutmann, H.T.; Schneyer, A.L. 2001. Follistatin-related protein (FSRP): a new member of the follistatin gene family. *Mol Cell Endocrinol*. 180: 33-8.
- Schlattner, U.; Tokarska-Schlattner, M.; Wallimann, T. 2006. Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*. 1762 (2): 164-180.
- Shaoquan J.J.; Losinski R.L.; Cornelius S.G.; Frank G.R.; Willis G.M.; Gerrard D.E. 1998. Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and development and postnatal regulation. *Am J Physiol*. 275: 1265-73
- Sharma, M.; Kambadur, R.; Matthews, K.G. 1999. Myostatin, a transforming growth factor- β superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. *J Cell Physiol* 180:1-9.

- Shedlock D.J.; Weiner D.B. 2000. DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. *J Leukoc Biol.* 68: 793-806.
- Shimasaki S.; Koga M.; Esch F.; Cooksey K.; Mercado M.; Koba A.; Ueno N.; Ying S. Y.; Ling N.; Guillemin R. 1998. Primary structure of the human follistatin precursor and its genomic organization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85:4218-4222.
- Srivastava I.K.; Liu M.A. 2003. Gene vaccines. *Ann Intern Med.* 138: 550-559.
- Stinckens, A.; Bijttebier, J.; Luyten, T.; Van den Maagdenberg, K.; Harmegnies, N.; De Smet, S.; Georges, M.; y Buys, N. 2005. Detection of polymorphisms in the myostatin gene in Belgian pietrain pigs. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences.* 70: 37-41.
- Stinckens, A.; Bijttebier, J.; Luyten, T.; Van den Maagdenberg, K.; Harmegnies, N.; De Smet, S.; Georges, M.; y Buys, N. 2008. Characterization of the complete porcine MSTN gene and expression levels in pig breeds differing in muscularity. *Animal Genetics.* 39: 586-596.
- Stolz, L.E.; Li, D.; Qadri, A.; Jalenak, M.; Klamon, L.D.; Tobin, J.F. 2008. Administration of myostatin does not alter fat mass in adult mice. *Diabetes, obesity & metabolism* 10: 135-142.
- Stratil A.; Kopečný M. 1999. Genomic organization, sequence and polymorphism of the porcine myostatin (GDF8; MSTN) gene. *Animal Genetics.* 30: 462-78.
- Sutrave, P.; Kelly, A.M.; Hughes, S.H. 1990. Ski can cause selective growth of skeletal muscle in transgenic mice. *Genes & development* 4: 1462-1472.

- Szabó, G.; Dallmann, G.; Müller, G.; Patthy, L.; Soller, M.; Varga, L. 1998. A deletion in the myostatin gene causes the compact (Crmp1) hypermuscular mutation in mice. *Mammalian Genome*. 9: 671-2.
- Tang D.; DeVit M.; Johnson S.A. 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature*. 356: 152-4.
- Tang, L.; Yan, Z.; Wan, Y.; Han, W.; Zhang, Y. 2007. Myostatin DNA vaccine increases skeletal muscle mass and endurance in mice. *Muscle Nerve*. 36: 342-348.
- Tanghe, A. 2001. Improved immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding Ag85 by protein boosting. *Infect. Immun.* 69: 3041-3047.
- Terry, C.A.; Savell, J.W.; Recio H.A.; Cross H.R. 1989. Using ultrasound technology to predict pork carcass composition. *J Anim Sci* 67: 1279.
- Thies R.S.; Chen T.; Davies M.V.; Tomkinson K.N.; Pearson A.A.; Shakey Q.A.; Wolfman, N.M. 2001. GDF-8 propeptide binds to GDF-8 and antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 binding. *Growth Factors* 18: 251-9.
- Thomas M.; Langley B.; Berry C.; Sharma M.; Kirk S.; Bass J.; Kambadur, R. 2000. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J Biol Chem*. 275: 40235-43.
- Totsuka, M.; Nakaji, S.; Suzuki, K.; Sugawara, K.; y Sato, K. 2002. Break point of serum creatine kinase release after endurance exercise. *Journal of Applied Physiology*. 93 (4): 1280-1286.

- Trendelenburg, A.U.; Meyer, A.; Rohner, D.; Boyle, J.; Hatakeyama, S.; Glass, D.J. 2009. Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. *American journal of physiology. Cell physiology* 296: 1258-1270.
- Tsuchida K.; Arai K.Y.; Kuramoto Y.; Yamakawa N.; Hasegawa Y.; Sugino H. 2000. Identification and characterization of a novel follistatin-like protein as a binding protein for the TGF- β family. *J Biol Chem.* 75: 40788-96.
- Tu, P.; Bashin, S.; Hruz, P.W.; Herbst, K.L.; Castellani, L.W.; Hua, N.; Hamilton, J.A.; Guo, W. 2009. Genetic disruption of myostatin reduces the development of proatherogenic dyslipidemia and atherogenic lesions in Ldlr null mice. *Diabetes* 58: 1739-1748.
- Ulmer, J.B.; Donnelly, J.J.; Parker, S.E.; Rhodes, G.H.; Felgner, P.L.; Dwarki, V.J.; Gromkowski, S.H.; Deck, R.R.; DeWitt C.M.; Friedman, A.; Hawe, L.A.; Leander, K.R.; Martinez, D.; Perry, H.C.; Shiver, J.W.; Montgomery, D.L.; Liu, M.A. 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259: 1745-1749.
- 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.; Wolfman, N.M. 2003. Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. *Biochem Biophys Res Commun*: 300: 965-971.

- Wolff, J.A.; Malone, R.W.; Williams, P.; Chong, W.; Acsadi, G.; Jani, A. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247: 1465-1468.
- 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.; Lee, S.J. 2003. Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. *Proc Natl Acad Sci USA*: 100: 15842-15846.
- Woodland, D.L. 2004. Jump-starting the immune system: prime-boosting comes of age. *TRENDS in Immunology* 25: 98-104.
- Xianyong, M.A.; Yongchang, C.A.O.; Dingming, S.H.U.; Yingzuo, B.I. 2005. Cloning and expression of swine myostatin gene and its application in animal immunization trial. *Science in China Ser. C Life Sciences*. Vol.48 No.4 368-374.
- Zhang, C.; McFarlane, C.; Lokireddy, S.; Bonala, S.; Ge X.; Masuda, S.; Gluckman, P.D.; Sharma, M.; Kambadur, R. 2011. Myostatin-deficient mice exhibit reduced insulin resistance through activating the AMP-activated protein kinase signalling pathway. *Diabetologia* 54: 1491-1501.
- Zhao, B.; Wall, R. J.; Yang, J. 2005. Transgenic expression of myostatin propeptide prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun*. 337: 248-255.
- Zimmers, T.A.; Davis, M.V.; Koniaris, L.G.; Haynes, P.; Esquela, A.F.; Tomkinson, K.N.; McPherron, A.C.; Wolfman, N.M.; Lee, S-J. 2002. Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science* 296: 1486-1488.