

## **Evaluación de una vacuna de ADN y su péptido recombinante contra inhibina alfa (165-300) sobre la respuesta inmune y fertilidad en ratones**

### **Evaluation of DNA vaccine and its recombinant peptide against inhibin alpha (165-300) on immune response and fertility in mice**

C. Luna Palomera<sup>1</sup>, J. González González<sup>1</sup>, A. Gayosso Vázquez<sup>2</sup>, V. Ramírez Andoney<sup>3</sup>, N.F. Ojeda Robertos<sup>1</sup>, J.A. Aguilar Cabrales<sup>1</sup> y R.A. Alonso Morales<sup>2</sup>

**Palabras clave:** Inhibina alfa; vacuna de ADN; fertilidad; péptido recombinante

**Keywords:** Inhibin alpha; DNA vaccine; fertility; recombinant peptide

Recepción: 19-12-2017 / Aceptación 10-04-2018

#### **Resumen**

Se evaluó la vacuna de ADN (INHA-DNA) y su péptido recombinante (INHA-rec) contra inhibina alfa (INHA) sobre la respuesta inmune y la fertilidad en ratones. Dieciséis ratones Balb/c fueron divididos en dos grupos, 8 cada uno. Bajo un esquema de inmunización prime boost heterólogo, un grupo fue inoculado vía intramuscular (IM) con 100 µg de INHA-DNA y 14 d, después con 100 µg de INHA-rec. El grupo control recibió solución salina. Se aparearon las hembras en dos ocasiones. Posterior al primer parto se dio un refuerzo vía IM con ambos inmunógenos (100 µg INHA-DNA + 100 µg INHA-rec). La inmunización con 100 µg de INHA-DNA y INHA-rec indujo altos niveles de anticuerpo anti INHA, mayor tamaño y peso de camada ( $P < 0.05$ ) comparados con el control. La fertilidad promedio fue similar entre los tratados (67%) y control (60%). En conclusión, la vacuna de ADN y su antígeno recombinante es capaz de inducir títulos de anticuerpos contra INHA incrementando el tamaño de camada, sin un efecto negativo sobre la fertilidad en ratones.

#### **Abstract**

The aim was to evaluate a DNA vaccine (INHA-DNA) and its recombinant peptide (INHA-rec) against inhibin alpha (INHA) on the immune response and fertility in mice. Sixteen Balb/c mice were divided into two groups of 8 each and under a heterologous prime boost immunogenic scheme one group were inoculated with 100 µg of INHA-DNA and 14 d later with 100 µg of INHA-rec. The control group received saline solution. After the first birth, a booster was given with both antigens (INHA-DNA + INHA-rec). Immunization with 100 µg of INHA-DNA and INHA-rec

<sup>1</sup>División Académica de Ciencias Agropecuarias, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. E-mail: carlos.luna@ujat.mx

<sup>2</sup>Departamento de Genética y Bioestadística. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. E-mail: ralonso@unam.mx

induced high levels of anti-INHA antibody, as well as greater weight and size litter ( $P < 0.05$ ) compared to control. The mean fertility was similar between INHA (67%) and control (60%). In conclusion, the DNA vaccine and its recombinant antigen against INHA are capable of inducing immunity against INHA by increasing litter size without an apparent negative effect on fertility in mice.

---

## Introducción

La inhibina alfa (INHA) es una glicoproteína heterodimérica secretada en las células de la granulosa en el ovario, la cual inhibe la síntesis y secreción de la hormona folículo estimulante (FSH) (Knight 1996, 477; de Kretser *et al.* 2002, 530). Se ha demostrado que la inmunoneutralización de la INHA con péptidos sintéticos y recombinantes incrementa significativamente los niveles de FSH (Medan *et al.* 2006, 110; Wang *et al.* 2012, 397), el número de folículos, la tasa ovulatoria y el tamaño de camada en ovejas y cabras (D'Alessandro *et al.* 1999, 189; Medan *et al.* 2003, 289; Padilla *et al.* 2007, 162), vacas (Glencross *et al.* 1994, 601; Morris *et al.* 1993, 254; Medan *et al.* 2006, 110) y cerdas (King *et al.* 1993, 478). Efectos similares se han encontrado en novedosas vacunas de ADN contra INHA (1-32) en ovejas, ratas y ratones (Han *et al.* 2008, 260; Wang *et al.* 2012, 398; Han *et al.* 2014, 966), y recientemente incluyeron el RF-péptido liberador de amida-3 (RFRP-3) como un segundo inmunógeno incrementando en un 25% la presencia de partos dobles en ovejas y entre un 35 y 40% el tamaño de camada en ratones (Dan *et al.* 2016a, 108; b, 22).

Se ha encontrado que las vacunas de ADN, incluyendo las de INHA, expresan exitosamente el antígeno en tejidos *in vivo* a partir de DNA de plásmido (Han *et al.* 2008, 255; Kutzler *et al.* 2008, 778; Wang y Lu, 2013, 18.3.4); sin embargo, la fertilidad ha sido baja debido a limitaciones en la secreción de gonadotropinas y en el desarrollo folicular (Dan *et al.* 2016b, 106), lo cual posiblemente también se deba a que la vacuna incluye una secuencia parcial de la INHA.

El desarrollo y evaluación de una nueva vacuna de ADN y su péptido recombinante que expresa completo el péptido maduro de la INHA (165-300), puede inducir mejor respuesta inmune debido a que se asemeja a la conformación nativa, por lo que podría inducir una mejor respuesta superovulatoria. El objetivo fue evaluar una nueva vacuna de ADN contra INHA (165-300) y su péptido recombinante sobre la respuesta inmune, fertilidad y tamaño de camada en ratones.

## **Método**

### **Producción del plásmido y péptido recombinante**

La construcción de la vacuna de ADN se diseñó clonando la secuencia del péptido maduro de INHA (165-300), el cual fue amplificado por PCR a partir de ADN genómico porcino al vector pGEM-T. Se comprobó por PCR y por secuenciación la correspondencia con las secuencias reportadas en el Gen Bank del NCBI (NM\_214189). A las construcciones se les agregó las secuencias del toxoide tetánico P2 y P30. El fragmento se sub clonó en el vector de expresión pCIneo (Promega™). A partir de las colonias positivas se comprobó la presencia del fragmento por PCR y secuenciación. Se crecieron colonias transformadas y se purificó el plásmido recombinante (INHA-ADN). Se evaluó su expresión *in vitro* inducida en *E. coli* cepa BL21 a 37 ° C y una densidad óptica de 0.5 de OD y 1 mM de IPTG; posteriormente el péptido de INHA recombinante (INHA-rec) fue purificado para su uso como inmunógeno.

Se preparó el inmunógeno de la vacuna INHA-ADN empleando el plásmido bacteriano con capacidad de expresar el fragmento del péptido maduro (305 pb) de INHA y los epítomos inmunomoduladores (P2 y P30) se agregó a la preparación polietilamina (PEI) como adyuvante en una relación 1:6. El segundo inmunógeno se preparó usando el antígeno INHA-rec producido en el vector de expresión pET11a en *E. coli*, purificado por cromatografía de afinidad con agarosa níquel. Este antígeno se preparó adicionando el adyuvante Montanide ISA 71 VG™ (Seppic SA, Francia) en proporción 1:1.

### **Inmunización de ratones con la vacuna de ADN y antígeno recombinante**

El estudio se realizó en la Unidad de Producción y Experimentación Animal de la División Académica de Ciencias de la Salud de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Todos los procedimientos fueron realizados en acuerdo con las disposiciones de la Norma Oficial Mexicana 051-ZOO-1995 para la producción, cuidado y uso de animales experimentales, y fueron avalados por el comité de ética institucional (Ref. Núm., CIEI/SubBQBtCA/2018.1).

Para evaluar la antigenicidad de la vacuna INHA-ADN y el péptido INHA-rec, se usaron 16 ratones hembras Balb/c sexualmente maduras. Para la inmunización se empleó un sistema prime boost heterólogo (Lu 2009, 349). Un grupo (INHA, n=8) fue inoculado vía intramuscular (IM) con 100 µg de la vacuna INHA-ADN, y 14 d después se inoculó vía IM 100 µg del antígeno INHA-rec. Para las hembras del grupo control (n=8), recibieron solución salina en cada ocasión. Con la

finalidad de evaluar la fertilidad y tamaño de camada en los ratones, 14 días después de la aplicación de la INHA-rec, cada grupo de hembras fueron apareadas con un macho por un periodo de 14 días. Posterior al apareamiento se registró el número de hembras paridas, tamaño y peso de la camada de la primera camada.

Treinta y cinco días después de la última inoculación se dio un refuerzo con ambos inmunógenos con las mismas dosis y vía de administración. Cada grupo de hembras se apareó con un macho por 14 días posterior al refuerzo, y posterior a la gestación se registró el número de hembras paridas, tamaño y peso de la camada de la segunda camada.

### **Sacrificios de ratones y obtención de sueros**

Cuatro días después del primer apareamiento para muestras sanguíneas se sacrificaron por decapitación tres ratones de cada tratamiento, atendiendo las normas internacionales y la NOM-062-ZOO-1999, y avalado por el comité de ética institucional. Después del segundo parto, las hembras restantes de cada tratamiento fueron sacrificadas por decapitación y se tomaron muestras sanguíneas. En cada caso la sangre se recuperó en tubos Eppendorf de 1.5 mL, se centrifugó a 3000 rpm por 5 min y posteriormente los sueros fueron almacenados a -20° C para su posterior análisis.

Determinación de anticuerpos por ELISA. Los títulos de anticuerpos de los ratones tratados con los inmunógenos contra INHA se calcularon con base en la densidad óptica (DO) como sigue:

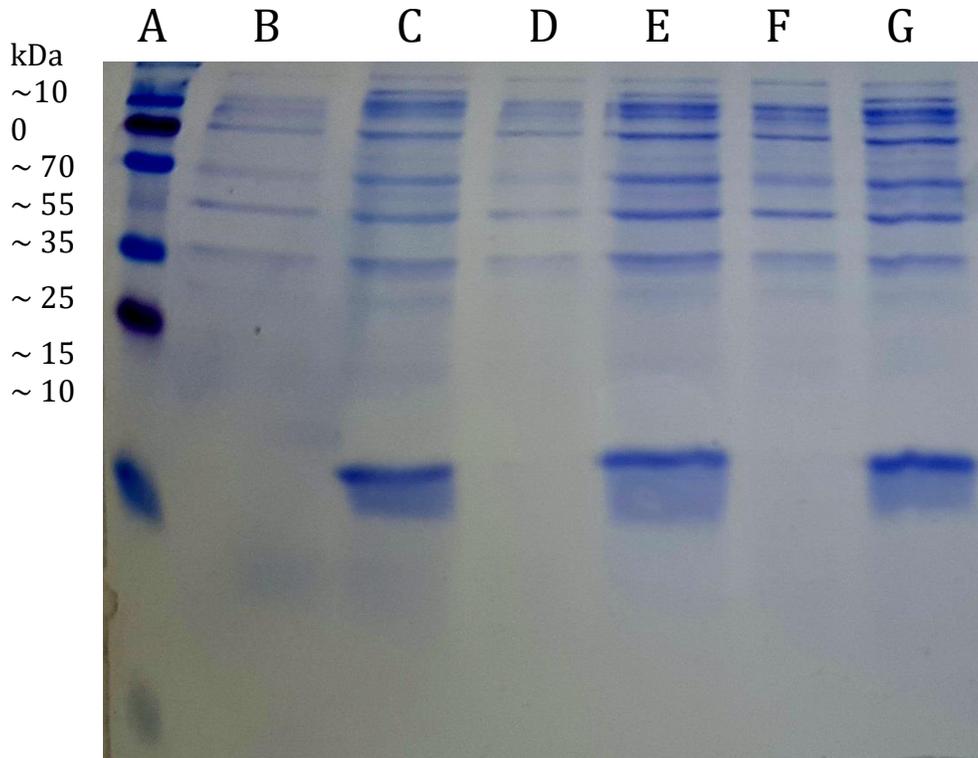
$$\text{Títulos de Anticuerpo} = \frac{\text{DO promedio del grupo tratado}}{\text{DO promedio del grupo control}}$$

### **Análisis estadístico**

Los resultados para las variables títulos de anticuerpos, fertilidad, tamaño y peso de la camada se evaluaron mediante una prueba T (SAS, 2009). Solo se consideró el efecto principal de tratamiento, debido a que el número de parto (primero y segundo) no fue importante.

### **Resultados**

La inducción de la expresión en *E. coli* cepa BL21 a 37° C resultó en una exitosa expresión de la inhibina recombinante, comparada con aquellas que no fueron inducidas (Fig. 1).



**Figura 1.** Inducción de Inhibina alfa (165-300) en *E. coli* BL21 en LB. Marcador de peso molecular, carril A; clonas no inducidas, carriles B, D y F; clonas inducidas, carriles C, E y G.

Los resultados de la inoculación de ratones y la evaluación de la fertilidad se presentan en la Tabla 1. La fertilidad promedio de los ratones fue similar entre INHA (67%) y control (60%). El tamaño de camada en hembras tratadas con vacunas INHA-DNA y INHA-rec ( $8.67 \pm 0.88$  crías) fue mayor ( $P < 0.05$ ) comparado con el control ( $4.33 \pm 1.67$  crías). Por consiguiente, el peso de la camada también fue diferente ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos ( $16.57 \pm 2.53$  g vs.  $6.59 \pm 2.53$  g). Los títulos de anticuerpo encontrados en hembras inmunizadas contra INHA fue 2.9 veces mayor comparados con el control ( $P < 0.05$ ).

**Tabla 1.** Fertilidad y tamaño de camada en ratones inmunizados con una vacuna de ADN (INHA-DNA) contra INHA y su péptido recombinante (INHA-rec)

Variable	Tratamiento		Valor de Probabilidad
	100 µg de INHA-DNA y 100 µg del INHA-rec	Control	
Títulos de anticuerpo (veces)	2.9	-	0.007
Fertilidad (%)	67	60	0.85
Tamaño de camada (crías)	8.67 ± 0.88	4.33 ± 1.67	0.05
Peso de camada (g)	16.57 ± 2.53	6.59 ± 2.53	0.05

P<0.05 Diferencias estadísticas significativas con un alfa igual o menor a 0.05

## **Discusión**

Este primer experimento muestra que la vacuna INHA-DNA y su antígeno INHA-rec es capaz de inducir una respuesta inmune bajo un esquema de inoculación prime boots.

En la evaluación de la expresión de la vacuna de ADN, el análisis electroforético mostró que el peso molecular de la INHA recombinante coincide con el peso molecular (~14-18 kDa) del péptido maduro de la INHA previamente aislado (Rivier *et al.* 1985, 125; Knight 1996, 477).

La vacuna INHA-DNA y su antígeno INHA-rec bajo un esquema de inoculación prime boots heterólogo es capaz de incrementar el tamaño de camada cerca de un 100%. Estos resultados son superiores a los de Han *et al.* (2008, 260) quienes reportaron incrementos en tamaño de camada en un 16.5% en ratas. En otro estudio en el que se evaluó una vacuna de ADN en roedores, Han *et al.* (2014, 966) reportan incrementos en tamaño de camada en solo 7.3%.

Este incremento significativo en el tamaño de camada es posible explicarlo debido a que la construcción vacunal empleada incluye la secuencia completa de la INHA. En la evaluación de la inducción de la expresión de la vacuna de ADN (INHA-ADN) en cepas *E. coli* BL21, (Figura 1) se ha constatado la expresión del péptido recombinante (INHA-rec) correspondiente al péptido maduro. Por lo anterior, es posible tener una mayor similitud pos transduccional de la INHA recombinante en relación a la nativa, lo cual ofrece una ventaja comparativa a la desarrollada por otro grupo de investigadores (Han *et al.* 2008, 255).

La expresión de la secuencia completa del péptido maduro de Inhibina y el antígeno recombinante permite inducir respuestas inmunes más fuertes, lo cual se ve reflejado en los niveles de anticuerpos producidos. El resultado final es la neutralización de la INHA endógena, la cual ejerce una fuerte regulación negativa contra FSH (Knigh *et al.* 2012, 57), permitiendo el

incremento de FSH, el desarrollo de un mayor número de folículos, y por consiguiente una mayor tasa de ovulación. Este efecto ya se ha observado en otros estudios que incluyen secuencias parciales de la INHA (Han *et al.* 2008, 253), o asociadas con otros péptidos (Dan *et al.* 2016a, 18) o antígenos (Han *et al.* 2013, 262 pero con respuestas en incrementos en tamaño de camada menos favorables en ratas (29.6% Han *et al.* 2008, 260; 30.3% Wang *et al.* 2012, 398), ratones tratados con vacunas de ADN de INHA (1-32) (7.6% Han *et al.* 2013, 966) y ratones tratados e INHA (1-32) asociado con otros péptidos (28.40% Dan *et al.*, 2016a: 22).

El esquema de inmunización prime boost heterólogo que combina la vacuna INHA-ADN, el antígeno INHA-rec y el posterior refuerzo es otro aspecto a considerar. La vacuna INHA-ADN inicialmente promueve la expresión de proteínas recombinantes *in vivo* produciendo células B de memoria las cuales son específicas de dominios de conformación sensibles del antígeno (Lu 2009, 349). Esto promueve una significativa respuesta humoral y celular cuando el antígeno INHA-rec fue inoculado (Niess *et al.* 2005, 256; Kutzler *et al.* 2008, 778; Lu 2009, 349).

Uno de las limitantes en el uso de vacunas de ADN son las múltiples dosis que se tienen que inocular para promover una buena respuesta inmune, la cual lo convierte en algo impráctico (Han *et al.* 2014, 966). Es posible que el esquema de inmunización prime boost heterólogo contribuya a disminuir las múltiples dosis de vacunas de ADN, por lo que nuevos estudios que incluyan otras especies serán requeridos. La vacuna de ADN contra INHA presenta ventajas que incluyen su producción con menor costo y no requiere una cadena fría para su mantenimiento o dispositivos especiales para su aplicación.

En conclusión, esta nueva vacuna de ADN contra INHA y su péptido recombinante es capaz de inducir anticuerpos contra INHA en ratones e incrementar el tamaño de camada sin un efecto negativo aparente en la fertilidad. Esta vacuna también podría funcionar para incrementar la tasa de ovulación y el tamaño de camada en animales domésticos de importancia zootécnica; sin embargo, se requieren plantear nuevos experimentos, evaluar fertilidad y la respuesta en niveles de FSH, principalmente.

### **Agradecimientos**

A la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco por el financiamiento del proyecto UJAT-2014-IA-14 para la realización de estos estudios.

## **Referencias**

- Dan X, Han L, Riaz H, Luo X, Liu X, Chong Z, Yang L. (2016). Effect of the novel DNA vaccine fusing inhibin  $\alpha$  (1-32) and the RF-amide related peptide-3 genes on immune response, hormone levels and fertility in Tan sheep. *Anim Reprod Sci* 164: 105 – 110.
- Dan X, Han L, Riaz H, Luo X, Liu X, Chong Z, Yang L. (2016). Construction and evaluation of the novel DNA vaccine harboring the inhibin  $\alpha$  (1–32) and the RF-amide related peptide-3 genes for improving fertility in mice. *Experimental Animals* 65: 17–25.
- D'Alessandro A, Martemucci G, Iaffaldano N. (1999). Active immunization with a synthetic fragment of pig inhibin  $\alpha$  subunit increases ovulation rate and embryo production in superovulated ewes but season affects its efficiency. *J Reprod Fertil* 115: 185-191.
- de Kretser DM, Hedger MP, Loveland KL, Phillips DJ. (2002). Inhibins, activins and follistatin in reproduction. *Hum Reprod* 8: 529-541.
- Glencross RG, Bleach EC, Wood SC Knight PG. (1994). Active immunization of heifers against inhibin: effects on plasma concentrations of gonadotrophins, steroids and ovarian follicular dynamics during prostaglandin synchronized cycles. *J Reprod Fertil* 100: 599–605.
- Han L, Mao DG, Zhang DK, Liang AX, Fang M, Muhammad Moaen-ud-Din, Yang LG. (2008). Development and evaluation of a novel DNA vaccine expressing inhibin  $\alpha$  (1–32) fragment for improving the fertility in rats and sheep. *Anim Reprod Sci* 109:251-265.
- Han L, Zhen YH, Liang AX, Zhang J, Riaz H, Xiong JJ, Guo AZ, Yang LG. (2013). Oral vaccination with inhibin DNA delivered using attenuated *Salmonella choleraesuis* for improving reproductive traits in mice. *J Basic Microbiol* 54: 962-968.
- Knight PG. (1996). Roles of inhibins, activins and follistatin in the female reproductive system. *Front Neuroendocrin* 17:476-509.
- Knight PG, Satchell L, Glister C. (2012). Intra-ovarian roles of activins and inhibins. *Mol. Cell. Endocrinol.* 359 (1–2): 53-65.
- King BF, Britt JH, Esbenshade KL, Flowers WL, Sesti LA, Martin TL. (1993). Ovulatory and endocrine responses after active immunization of gilts against a synthetic fragment of bovine inhibin. *J Anim Sci* 71:975-982.
- Kutzler MA Weiner DB. (2008). DNA vaccines: ready for prime time? *Nat Rev Genet* 9: 776–788.
- Lu S. (2009). Heterologous Prime-Boost Vaccination. *Current Opinion in Immunology* 21: 346–351.

- Medan MS, Takedom T, Aoyagi Y, Konishi M, Yazawa S, Watanabe G Taya K. (2006). The effect of active immunization against inhibin on gonadotropin secretions and follicular dynamics during the estrous in cows. *J Reprod Dev* 52: 107–113.
- Medan MS, Watanabe G, Sasaki K, Nagura Y, Sakai H, Fujita M, Sharawy S Taya K. (2003). Ovarian and hormonal response of female goats to active immunization against inhibin. *J Endocrinol* 177: 287–294.
- Morris DG, McDermott MG, Diskin MG, Morrison CA, Swift PJ Sreenan JM. (1993). Effect of immunization against synthetic peptide sequences of bovine inhibin a-subunit on ovulation rate and twin-calving rate in heifers. *J Reprod Fert* 97: 255–261.
- Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick BA, Vyas JM, Boes M, Ploegh HL, Fox JG, Littman DR, Reinecker HC. (2005). CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 307: 254-258.
- Padilla G, Knight PG Holtz W. (2007). Superovulation and embryo collection in nulliparous Boer goat does immunized against a recombinant ovine  $\alpha$ -subunit inhibin. *Small Ruminant Res* 74: 159–164.
- Rivier J, Spiess J, McClintock R, Vaughan J, Vale W. (1985). Purification and partial characterization of inhibin from porcine follicular fluid. *Biochem Biophys Res Comm.* 133 (1): 120-127.
- Wang SL, Han L, Ahmad S, Cao SX, Xue LQ, Xing ZF, Feng JZ, Liang AX, and Yang LG. (2012). Effect of a DNA vaccine harboring two copies of inhibin  $\alpha$  (1-32) fragments on immune response, hormone concentrations and reproductive performance in rats. *Theriogenology* 78: 393– 401.
- Wang S, and Lu S. (2013). DNA Immunization. *Current Protocols in Microbiology*, 31, 18.3.1–18.3.24. <http://doi.org/10.1002/9780471729259.mc1803s31>