

DETECCIONES DE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS MEDIANTE RT-PCR EN TIEMPO REAL EN GANADO OVINO CYTOKINES GENE EXPRESSION DETECTION BY REAL TIME RT- PCR IN SHEEP

Ana Cristina Pérez de Diego Camacho, Almudena Sánchez Matamoros, José Manuel

Sánchez-Vizcaíno Rodríguez

Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET)

Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. UCM.

RESUMEN

Las citoquinas son moléculas proteicas secretadas por diferentes células, fundamentalmente del sistema inmunitario, como respuesta a una estimulación inmunológica. Existen diferentes técnicas para estudiar la producción y acción de éstas en los individuos. Este estudio consiste en la puesta a punto de una técnica de Retrotranscripción- Reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en tiempo real para la detección de la expresión del ARNm que codifica seis citoquinas (TNF- α , IFN γ , IL-4, IL2, IL-10, IL-12). Los resultados preliminares se obtuvieron tras la aplicación de la técnica a linfocitos estimulados *in vitro* con ConA (Concanavalina A) y LPS (Lipopolisacárido de *E.coli*) demostrando la detección de ARNm para IL-4, IL-2 e IFN γ y TNF- α , IL-12 e IL-10, respectivamente; posteriormente se realizó el estudio en ovejas inmunizadas frente a *Chlamydophyla abortus*, permitiendo la detección de la expresión de ARNm de las seis citoquinas. Estos resultados demuestran que es una técnica rápida, sensible y fiable para la detección de citoquinas.

Palabras clave: Citoquinas, RT-PCR, ovino

ABSTRACT

Cytokines are protein molecules that cells from the immune system secrete in response to immune stimulation. There are different techniques to study their production and their action on individuals. This study consists of the development of a real time RT-PCR method for the detection of the expression of mRNA coding for six cytokines (TNF- α , IFN γ , IL-4, IL2, IL-10, IL-12). The preliminary results were obtained from the study of lymphocytes stimulated with Con A and LPS, showing the detection of ARNm, IL-4, IL-2, IFN γ and TNF- α , IL-12, IL-10, respectively. Its subsequent application in sheep that were vaccinated against *Chlamydophyla abortus*, allowed the detection of mRNA expression for the six cytokines.

These results show that it is a swift, sensitive and reliable technique to detect mRNA of cytokines.

Keywords: Cytokines, real time RT-PCR, sheep.

INTRODUCCIÓN

Las citoquinas son moléculas proteicas de bajo peso molecular (15-30 KDa) secretadas por diferentes células, fundamentalmente del sistema inmunitario, como respuesta a una estimulación inmunológica (Giulietti *et al.*, (2001).

Atendiendo a su función más relevante, las citoquinas se pueden dividir en aquellas que están involucradas en el desarrollo hematopoyético, o bien aquellas implicadas en la respuesta inmunitaria, tanto innata como adaptativa, habiendo sido elegidas para nuestro estudio seis citoquinas relacionadas con la respuesta inmunitaria.

Existen diferentes técnicas para estudiar la producción y acción de las citoquinas en el individuo; este trabajo consiste en la puesta a punto de una técnica de Retrotranscripción-Reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en tiempo real para analizar la expresión de genes que codifican las citoquinas: TNF- α , IFN γ , IL-4, IL2, IL-10 e IL-12, siguiendo parcialmente la técnica descrita por Konnai *et al.* (2003).

La RT-PCR como técnica de biología molecular permite la detección y cuantificación de un fragmento de ARN determinado en una muestra; esta detección a tiempo real se consigue mediante una sonda SYBR GREEN que se une al ADN de doble cadena y emite fluorescencia. En este caso, hemos realizado esta técnica de forma similar a la descrita por Kukielka *et al.*(2008).

Una vez realizada la puesta a punto de esta técnica mediante el análisis de linfocitos estimulados *in vitro*, fue adaptada para la evaluación de animales de la especie ovina vacunados frente a clamidiosis, con el fin de aplicarla posteriormente en el seguimiento de diferentes inmunizaciones y enfermedades.

MATERIAL Y MÉTODOS

Origen de los linfocitos:

A. Puesta a punto de la técnica:

Los primeros ensayos se realizaron con linfocitos estimulados *in vitro* obtenidos de sangre de 12 ovejas adultas de raza Rubia del Molar procedente de vena yugular recogida en tubos con anticoagulante (EDTA).

B. Validación de la técnica:

Se realizó extrayendo ARNm directamente de sangre recogida con anticoagulante (EDTA) de 4 ovejas adultas de raza Churra a las que se había vacunado frente a clamidiosis previamente para estimular su sistema inmunitario.

Obtención de linfocitos y su estimulación

A. Puesta a punto:

La obtención de linfocitos se realizó por gradiente de densidades con HISTOPAQUE-1077 (Sigma-aldrich®), técnica que permite la separación de células mononucleares de sangre periférica, comprobando después su viabilidad mediante la tinción con azul tripán.

Una vez separados los linfocitos y tras la realización del recuento, se ajustó la concentración a 2 - 5 millones /ml (dependiendo de la muestra y el estado del estudio) usando el medio de cultivo RPMI1640 (Gibco) específico para células sanguíneas. De esta solución siempre se cultivan 100 µl /pocillo, lo que supone entre 200.000 y 500.000 linfocitos, y posteriormente fueron estimulados con mitógenos (Concanavalina A, Lipopolisacárido de *Escherichia coli*) para favorecer la producción de citoquinas. Los mitógenos fueron usados a distintas concentraciones y durante diferentes periodos de tiempo de cultivo, según se indica en la tabla 1.

Tabla 1. Mitógenos utilizados para estimulación junto con las concentraciones y tiempos de cultivo, que fueron probados a lo largo del estudio. Con A: Concaivalina A; LPS: Lipopolisacárido de *Escherichia coli*.

MITOGENO	Con A					LPS		MEZCLA	
	Con A		LPS		Con A	LPS	Con A	LPS	
CONCENTRACION (ug/ml)	0,5	1	5	10	15	10	15	5	5
TIEMPO	16h, 24h y 48h → 24h								

Extracción de ARNm

A. Puesta a punto: Linfocitos estimulados

Inicialmente para la extracción de ARNm se procedió al uso del reactivo TRIZOL. Otro método utilizado fue mediante el uso del RNeasy Mini Kit (Quiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras la extracción del ARN se procedía a la destrucción del ADN mediante el uso de RNase-Free DNase Set (Quiagen).

B. Validación de la técnica: Sangre

En esta fase sólo se realizó mediante el RNeasy Mini Kit (Quiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante para sangre completa. Posteriormente se realizó la destrucción del ADN, mediante el uso de RNase-Free DNase Set (Quiagen).Como valor indicativo aproximado de la cantidad de ARN empleada para la RT-PCR se calculó la concentración mediante espectrofotometría (Sambrook y Russell, 2001).

RT-PCR

A. Puesta a punto:

Las primeras pruebas de la puesta a punto de la técnica se realizaron en un paso, utilizando el Brilliant® II SYBR® Green QRT-PCR Master Mix Kit (Stratagene), éste incluye todos los componentes necesarios para llevar a cabo la síntesis de copias de ADN a partir del ARNm en un único tubo (buffer, MgCl₂, Nucleótidos, SureStar®*Taq* polimersa, SYBR Green, Transcriptasa reversa), salvo los cebadores y la muestra. Los cebadores se obtuvieron de estudios anteriores(Tabla 2).

Tabla 2. Primers empleados para la detección de citoquinas y genes de expresión constante (GAPDH, B-actina) utilizados en el estudio, indicando la cantidad utilizada, la longitud del producto, la temperatura de anillamiento así como la referencia bibliográfica de los estudios anteriores en los que se probaron estos primers.

Gen	Secuencia de primers (5'-3')	Concentración	Producto (pb)	T^a de anillamiento	Referencia
GAPDH	F: ATC ACT GCC ACC CAG AAG ACT R: CAT GCC AGT GAG CTT CCC GTT	100 nM	153	60°C	Gohin <i>et al.</i> (1997)
B- Actina	F: CGC ACC ACT GGC ATT GTC AT R:TCC AAG GCG ACG TAG CAG AG	100 nM	227	55°C	S. Konnai <i>et al.</i> (2003)
TNF-α	F: GAA TAC CTG GAC TAT GCC GA R: CCT CAC TTC CCT ACA TCC CT	100 nM	238	60°C	Smeed <i>et al.</i> (2007)
IL- 10	F: TGC TGG ATG ACT TTA AGG G R:AGG GCA GAA AGC GAT GAC A	400 nM	186	55°C	S. Konnai <i>et al.</i> (2003)
IL12	F: AAC CTG CAA CTG AGA CCA TT R: ATC CTT GTG GCA TGT GAC TT	400 nM	186	55°C	S. Konnai <i>et al.</i> (2003)
IFNγ	F: GCT TTA CTG CTC TGT GTG CT R: GAC TTC TCT TCC GCT TTC TG	100 nM	442	60°C	Gohin <i>et al.</i> (1997)
IL- 2	F: TTT TAC GTG CCC AAG GTT AA R: CGT TTA CTG TTG CAT CAT CA	400 nM	217	55°C	S. Konnai <i>et al.</i> (2003)
IL-4	F: GCC ACT TCG TCC ATG GAC AC R: TTC CAA GAG GTC TCT CAG CG	100 nM	311	60°C	Gohin <i>et al.</i> (1997)

La muestra inicial consistió en 0,3- 2 μ g. de ARNm procedente de linfocitos estimulados. A esta muestra se le añade: Master mix de la QRT-PCR, la enzima RT (Retrotranscriptasa), responsable de la transcripción de ARNm a ADNc (ADN complementario), en las cantidades indicadas por el fabricante y los cebadores en las concentraciones que encontramos en la tabla 2.

El termociclador utilizado para la RT-PCR fué el modelo Mx3000p (Stratagene).Los programas a los que fueron sometidas las muestras se exponen en la tabla 3.

Tabla 3 Programas de ciclos a los que se sometieron las muestras de ARN para la realización de la RT-PCR en un paso.

CICLOS	PASO	DURACIÓN	TEMPERATURA
1	Retrotranscriptasa inversa (RT)	30 minutos	48°
1	Desnaturalización	10 minutos	95°
45	Replicación del ADN	45 segundos	95°
		40 segundos	55°: IL2, IL10, IL12 60°: TNF- α , IFN γ , IL4
		30 segundos	72°
1	Elongación	7 segundos	72°

Tras la RT-PCR se realizó una curva de disociación que comienza a 65°C hasta alcanzar los 95°C, para asegurar que el resultado positivo se corresponde con el fragmento deseado y no se trate de dímeros de cebadores o bien de fragmentos inespecíficos. Los resultados positivos fueron secuenciados.

Posteriormente se procedió a la realización de la puesta a punto en dos pasos. El primer paso consistió en la transcripción inversa del ARN que da lugar a la síntesis de ADNc, mediante el uso de AffinityScript QPCR ADNc Synthesis Kit (Stratagene), realizándose la retrotranscripción incubando durante 5 minutos a 25°C para permitir el anillamiento de los oligo cebadores, 15 minutos a 42°, lo que se corresponde con la fase de síntesis del ADNc y finalmente 5 minutos a 95 ° para terminar la reacción de transcripción inversa.

Tras la obtención del ADNc, se procedió a realizar el segundo paso, que se corresponde con la PCR, mediante el uso del Brilliant II SYBR Green QPCR mix, que contiene todos los componentes necesarios para la amplificación del ADNc. Los cebadores utilizados y las condiciones de uso para la PCR son las citadas para la RT-PCR en un paso. En este caso, el programa utilizado para la PCR que se muestra en la tabla 4 carece del ciclo correspondiente a la retrotranscripción.

Tabla 4. Programas para las PCR de las muestras sometidas a una RT previa en otro paso.

CICLOS	PASO	DURACIÓN	TEMPERATURA
1	Desnaturalización	10 minutos	45°
45	Replicación del ADN	45 segundos	95°
		40 segundos	55°: IL2, IL10, IL12 60°: TNF- α , IFN γ , IL4
		30 segundos	72°
1	Elongación	7 segundos	72°

Para la obtención de la curva de disociación de la muestra se procedió del mismo modo que en el proceso en un paso.

B. Validación de la técnica:

La validación de la técnica, es decir, el análisis de las muestras de sangre de 4 ovejas churras vacunadas, se realizó con el protocolo en dos pasos.

RESULTADOS

La realización de la extracción de ARN en linfocitos estimulados *in vitro* fue satisfactoria, tanto con el uso del reactivo TRIZOL como del RNeasy Mini Kit (Quiagen). Este último fue el elegido para la extracción en sangre obteniéndose ratios de pureza de ARN cercanos a 1,8 mediante espectrofotometría.

Los genes de expresión constante, utilizados en este estudio como referencia, fueron GAPDH y β -Actina, los cuales fueron detectados por PCR tanto en la puesta a punto en muestras de linfocitos estimulados y no estimulados *in vitro*, como en las muestras de sangre procedentes de ovejas vacunadas frente a clamidiosis.

En los casos en los que los linfocitos procedentes de sangre periférica, fueron estimulados mediante el uso de Con A como mitógeno, se pudo detectar mediante las PCRs desarrolladas en este trabajo la presencia del ARNm para IL-4, IL-2 e IFN γ .

La estimulación con LPS dio lugar a resultados positivos para las PCRs diseñadas con el objetivo de amplificar regiones del ARNm origen de TNF- α , IL-12 e IL-10.

Finalmente, la estimulación conjunta con concentraciones de 10 μ g/ml de Con A. y 5 μ g/ml de LPS permitió la detección mediante RT-PCR de todas las citoquinas estudiadas (Figuras 1 y 2).

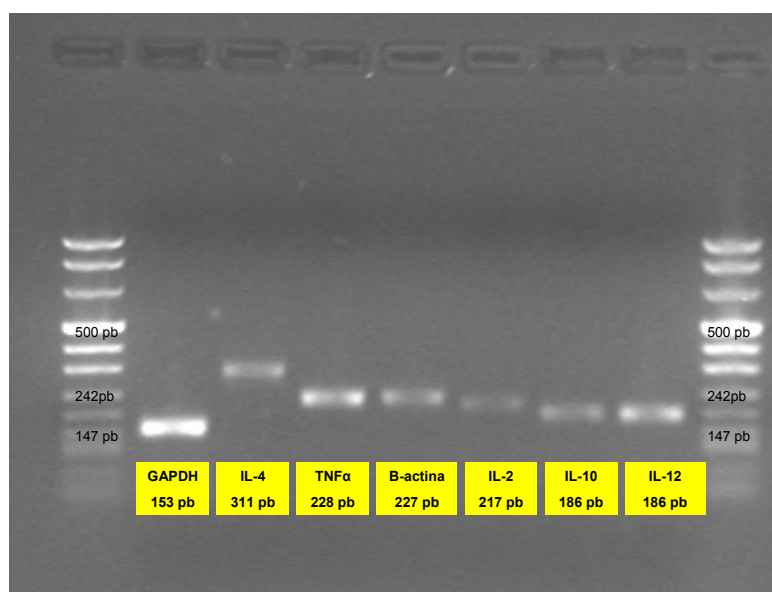


Figura 1. Imagen de un gel realizado con los productos de RT-PCR en tiempo real para GAPDH, IL4, TNF- α , β -Actina, IL-2, IL-10, IL-12. Linfocitos estimulados con Con A y LPS.

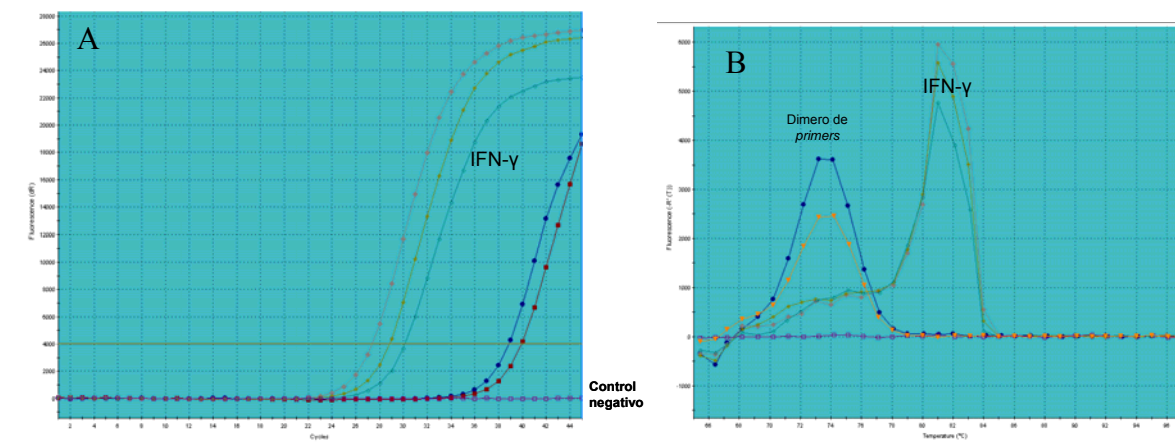


Figura 2. RT-PCR en tiempo real, para la detección de ARNm de IFN- γ . a) Muestras estimuladas con ConA y LPS. b) Imagen de la curva de disociación para IFN- γ .

La RT-PCR realizada tanto en un paso como en dos, permitió la elaboración de dos programas de PCR, los cuales se diferenciaban únicamente en la temperatura de anillamiento; realizándose en un caso a 55°C (β -Actina, IL 2, IL 10 e IL 12) y en otro a 60°C (GAPDH, IL 4, TNF- α e IFN γ), obteniéndose resultados positivos que posteriormente se secuenciaron y presentaron homología con las secuencias de ARNm que codifican citoquinas en ovino publicadas en las bases de datos, del 99% - 100%.

En la fase de validación, utilizando como muestra el ARN procedente directamente de la sangre de animales vacunados, la técnica permitió detectar la expresión de ARNm de las seis citoquinas (Figura 3).

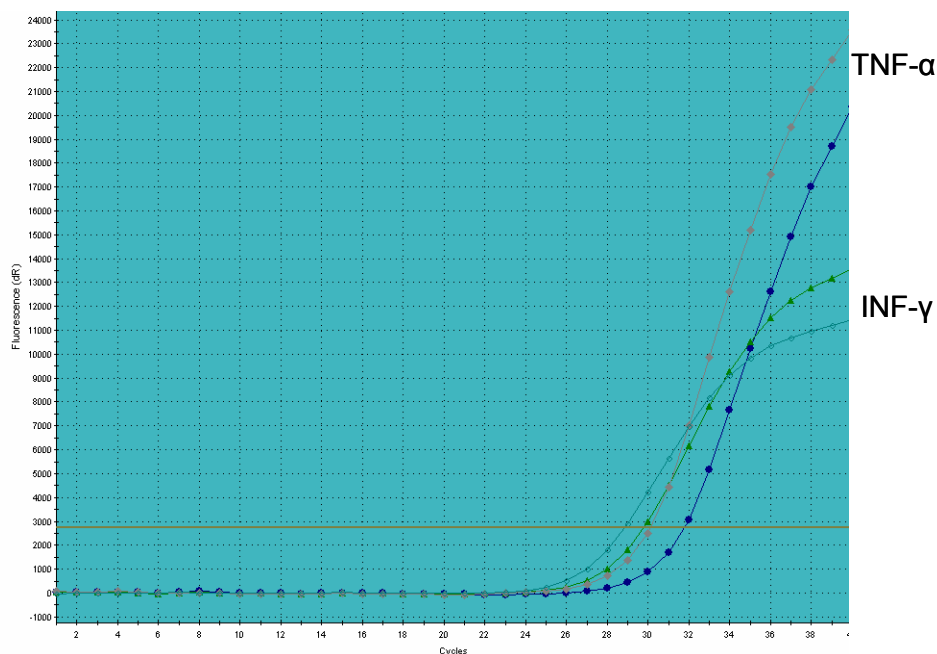


Figura 3. Ejemplo de RT-PCR en tiempo real, para TNF α e IFN γ con muestras de sangre de ovejas vacunadas.

DISCUSIÓN

La elección de la extracción de ARN en linfocitos estimulados *in vitro* mediante el método RNeasy Mini Kit (Quiagen) para la puesta a punto y única técnica utilizada en sangre, se debe a que esta técnica facilita el tratamiento posterior de destrucción de ADN, el cual se realizaba tras la extracción del ARN. Este paso es fundamental en este protocolo, ya que evita la contaminación genómica de la muestra, mediante la digestión del ADN presente, consiguiendo mantener únicamente el ARN.

Las cantidades de ARN utilizadas, a pesar de ser medidas mediante espectrofotometría, han sido variables a lo largo del experimento, puesto que el objetivo inicial del trabajo no era la cuantificación, si no la puesta a punto de la RT-PCR cualitativa. Por lo que en esta fase del método no ha representado un problema para la interpretación de los resultados.

En la fase de puesta a punto de la técnica, la estimulación con 10µg/ml de Con A dio como resultado la expresión de genes de IL-4, IL-2 e IFN γ , como se indica en los resultados. Estos resultados se corresponden parcialmente con lo esperado, puesto que estudios previos de Gohin *et al.* (1997) indicaban que para la producción de estas citoquinas era necesaria la utilización de Con A (7,5 µg/ml) junto con *Phorbol Triacetate* (5 ng/ml); sin embargo, en este caso la utilización de Con A ha sido suficiente. Para la obtención de TNF- α e IL-10, Gohin *et al.*(1997) usaban como mitógeno el LPS (10 µg/ml), coincidiendo con los datos obtenidos en el presente trabajo. Se ha conseguido detectar, y por tanto estimular, la producción de IL12, mediante el uso de Con A y LPS, sin la necesidad de emplear otros mitógenos utilizados en estudios previos como el *pokweed mitogen* (Konnai *et al.*, 1994).

En cuanto a los cebadores, cabe destacar que en este estudio se han adaptado los ya publicados para PCR convencional (Gohin *et al.*1997) en la técnica de PCR en tiempo real, optimizándose las concentraciones y las temperaturas para disminuir el trabajo laboratorial en la medida de lo posible, hasta conseguir resultados satisfactorios para las seis citoquinas, utilizando solamente dos temperaturas de anillamiento diferentes, pudiendo así utilizar un mismo programa para la PCR de tres citoquinas simultáneamente.

Existen estudios previos para la detección de expresión de genes de citoquinas que se realizan mediante el uso de sondas Taqman (Budhia *et al.*, 2006), pero no mediante SYBR Green para el estudio de las seis citoquinas cuya expresión se detecta en este trabajo, el cual presenta las ventajas de no tener que diseñar una sonda específica y es una técnica mucho más económica. Se realizaron RT-PCRs en uno paso y dos pasos, obteniéndose resultados positivos. Se comenzó mediante la técnica en un paso porque ésta minimiza la contaminación de la muestra de ARNm, al ser manipulada una sola vez, y porque los protocolos de esta técnica ya se

empleaban con éxito por nuestro equipo (Kukielka *et al.*, 2008). Tras la obtención de los primeros resultados positivos con la técnica anterior, se procedió a la realización en dos pasos, ya que nos permite realizar con la misma cantidad de ARNm inicial hasta 10 veces más PCRs que la técnica en un paso.

La RT-PCR en tiempo real mediante una sonda SYBR GREEN ha resultado apropiada, comparando los productos de PCR con las secuencias publicadas en las bases de datos.

Las puestas a punto de las PCRs para GAPDH y β -Actina, serán la herramienta válida para la cuantificación, actualmente en desarrollo en nuestro laboratorio.

La técnica puesta a punto en este trabajo fue probada, mediante el análisis de sangre de animales con el sistema inmunitario activo tras la vacunación para clamidiosis, lo que supone que, a su vez, será una herramienta útil, para la descripción de la evolución de estas citoquinas en respuesta a enfermedades o vacunas.

CONCLUSIONES

La RT-PCR en tiempo real parece ser una herramienta útil para el estudio de la expresión de ARNm que codifica citoquinas de un modo rápido, sensible y fiable a partir de sangre de animales con un sistema inmunitario activo.

La técnica puesta a punto en este estudio, permite detectar la expresión de seis citoquinas realizando sólo dos programas diferentes de PCR.

El protocolo estandarizado incluyendo los dos genes de expresión constante (GAPDH, β -actina) permitirá cuantificar la expresión génica de las citoquinas objeto de este estudio.

AGRADECIMIENTOS

Este ensayo ha sido financiado gracias al proyecto europeo BTVAC FP6-2005-SSP-5A. AC. Pérez de Diego, disfruta de una beca del programa FPU del Ministerio de Educación y Almudena Sánchez Matamoros de una beca de colaboración en el Departamento de Sanidad Animal.

Los autores muestran su agradecimiento a la Dra. Belén Rodríguez, y a las técnicas Belén Rivera y Rocío Sánchez, por su dedicación y colaboración en este estudio, y a la Asociación Nacional de Ganado selecto Churro (ANCHE), por el envío de muestras de sangre de animales vacunados.

BIBLIOGRAFÍA

- Budhia, S, Haring, LF, McConnell, I, Blacklaws, BA.** 2006. Quantitation of ovine cytokine mRNA by real-time RT-PCR. *J. Immunol. Methods* 309, 160-172.
- Giulietti, A, Overbergh, L, Valckx, D, Decallonne, B, Bouillon, R, Mathieu, C,** 2001, An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods (San Diego, Calif)* 25, 386-401.
- Gohin, I, Olivier, M, Lantier, I, Pepin, M, Lantier, F.** 1997, Analysis of the immune response in sheep efferent lymph during *Salmonella abortusovis* infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 60, 111-130.
- Konnai, S, Usui, T, Ohashi, K, Onuma, M.** 2003. The rapid quantitative analysis of bovine cytokine genes by real-time RT-PCR. *Vet. Microbiol.* 94, 283-294.
- Kukielka, D, Esperon, F, Higes, M, Sanchez-Vizcaino, JM,** 2008, A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detection of deformed wing virus and black queen cell virus in honeybee *Apis mellifera*. *J. Virol. Methods* 147, 275-281.
- Sambrook, J, Russell, DW.** 2001 *Commonly Used Techniques in Molecular Cloning.* Molecular Cloning. Vol.3. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. A8.20-A8.21.