

## Expresión de genes de *Chlamydia abortus* en respuesta a estradiol y progesterona *in vitro*

D. Álvarez<sup>1\*</sup>, A. Murcia-Belmonte<sup>1</sup>, A. J. Buendía<sup>2</sup>, C. Schnee<sup>3</sup>, J. Salinas<sup>1</sup>, M. R. Caro<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Sanidad Animal, <sup>2</sup> Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica comparadas, Facultad de veterinaria, Universidad de Murcia. \* [daniel.alvarez@um.es](mailto:daniel.alvarez@um.es)

<sup>3</sup> Friedrich-Loeffler-Institut. Institut für molekulare Pathogenese. Jena, Alemania.

### 1. Introducción y objetivos

La familia *Chlamydiaceae* comprende once especies de bacterias patógenas que tienen en común un desarrollo intracelular obligado y un ciclo bifásico, característico y único entre los procariontes, con dos formas bien diferenciadas: una infectiva, y otra reproductiva, adaptadas a los ambientes extracelular e intracelular respectivamente. Una de estas especies, *Chlamydia abortus*, es el agente etiológico del aborto enzoótico ovino (AEO), una enfermedad que causa importantes pérdidas económicas en el sector ovino-caprino y que tiene un potencial zoonótico, especialmente para mujeres embarazadas.

Tras el contagio, que suele ser por vía oronasal, *C. abortus* se caracteriza por mantenerse de forma latente en el hospedador sin causar síntomas hasta que el animal queda gestante, entonces se multiplica de forma masiva en la placenta causando abortos en las últimas semanas de gestación. Tras el aborto, el hospedador logra controlar la enfermedad poniendo en marcha mecanismos inmunitarios que conducen al establecimiento de una memoria inmunológica que protege a los animales en gestaciones sucesivas.

Los animales que han abortado excretan la bacteria en el periodo periovulatorio de los siguientes ciclos estrales, de forma que la enfermedad se mantiene de forma enzoótica en el rebaño. Así, existen fases de latencia durante la infección clamidial, primero desde la infección del animal hasta la colonización placentaria, y luego desde el aborto hasta la nueva excreción en los siguientes estros [1]. Este proceso de latencia/multiplicación activa parece estar relacionada con las hormonas responsables del ciclo reproductor. Estudios previos han demostrado que el estradiol y la progesterona son capaces tanto de modular la respuesta inmune frente a bacterias como de influir en la interacción patógeno intracelular-célula hospedadora [2][3].

A pesar de esta relación entre el ciclo estral y la infección por *C. abortus*, no existen, ni en modelos murinos ni en modelos utilizando al hospedador natural, estudios sobre el papel que pueden jugar en el transcurso de la infección clamidial las hormonas sexuales esteroideas, tales como el estradiol o la progesterona.

El objetivo de este estudio fue investigar la influencia de dichas hormonas en el ciclo de infección de *C. abortus*. Para ello analizamos la expresión génica de esta bacteria

cultivada *in vitro* y expuesta a estradiol y progesterona para poder evaluar su posible papel en la inmunopatología de la infección por este microorganismo.

## 2. Material y métodos

### 2.1. Cultivo celular

Para este ensayo utilizamos la línea celular RAW 264.7. Se trata de una línea continua de macrófagos derivada de ratón, susceptible a la infección por *Chlamydia* [4] y sensible a hormonas esteroideas [5]. Fueron mantenidas en medio DMEM sin rojo fenol (Gibco), complementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) tratado para eliminar la presencia de hormonas esteroideas (charcoal stripped serum) a 37°C y 10% de CO<sub>2</sub>.

### 2.2. Preparación y adición de hormonas

La progesterona y el 17β-estradiol, ambos liofilizados (Sigma), fueron disueltos en etanol absoluto para tener una solución stock de 1 mg/ml. A continuación se diluyeron estas soluciones hasta alcanzar las concentraciones séricas fisiológicas medias de progesterona (35 ng/ml) y estradiol (5 pg/ml) del ratón [6] utilizando medio DMEM. Una vez que las células, en placas de 24 pocillos, alcanzaban el 70% de confluencia, se añadía a los pocillos correspondientes estradiol o progesterona, dejando algunos pocillos sin tratar como controles. Los cultivos se mantuvieron en incubación con los distintos tratamientos hormonales durante 24 horas antes de proceder a la infección con *C. abortus* de los mismos.

### 2.3. Infección del cultivo celular

Para la infección se utilizó la cepa AB7 de *C. abortus*. La técnica consiste en diluir el inóculo en tampón PBS con dietilaminoetil dextrano (DEAE-D) hasta tener una concentración de  $2 \times 10^6$  unidades formadoras de inclusiones/ml. Tras retirar el medio de cultivo de los pocillos, se procede a la co-incubación de las células con 100 µl de este inóculo durante 90 minutos a 37°C. Posteriormente se centrifugan las placas a 840 x g durante 30 minutos, se lavan suavemente con PBS y se vuelve a añadir el medio de cultivo celular (DMEM + 10% FBS).

Los cultivos infectados fueron tratados de nuevo con hormonas como se describe en el punto anterior y se incubaron a 37°C y 10% CO<sub>2</sub>.

### 2.4. Obtención de muestras

A las 24, 48 y 72 horas post-infección se recogieron las células infectadas en una solución estabilizadora de RNA (RNAlater, Sigma) y se congelaron a -20°C. Posteriormente se llevó a cabo la separación del pellet de células de la solución estabilizadora mediante centrifugación, y la extracción de RNA total usando un kit comercial (RNeasy Mini Kit, Qiagen), incluyendo tratamiento con DNasa (Qiagen), siguiendo las instrucciones del

fabricante. La cantidad y calidad del RNA fueron determinadas por espectrofotometría (NanoDrop). Las muestras se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis.

### 2.5. Selección de genes y diseño de primers

Para este estudio seleccionamos 10 genes relacionados con el ciclo de vida de *C. abortus*: *ompA*, *omcA* (proteínas de membrana), *dnaK*, *GroEL* (respuesta a estrés), *ftsW*, *hctA* (división celular), *euo* (conversión de cuerpos reticulares a cuerpos elementales), *Cpf* (degradación de proteínas) y *sctN* (sistema de secreción tipo III) así como un gen constitutivo como referencia para hacer cuantificación relativa (*16S rRNA*).

Para el diseño de primers utilizamos la herramienta informática OligoPerfect Designer, disponible en la página web de Thermo Fisher Scientific. Posteriormente los posibles primers candidatos fueron evaluados con el programa OligoAnalyzer 3.1, disponible en la web de Integrated DNA Technologies y seleccionados según la menor probabilidad de formación de dímeros inespecíficos.

Para optimizar la reacción de RT-qPCR, antes de analizar las muestras de RNA, los pares de primers elegidos fueron validados funcionalmente mediante qPCR con DNA de *C. abortus* a distintas concentraciones.

### 2.6. RT-qPCR

Las reacciones de síntesis de cDNA (retrotranscripción) y de amplificación se hicieron en un solo tubo mediante una técnica "one-step" siguiendo el protocolo del kit QuantiFast SYBR Green RT-PCR (Qiagen).

La mezcla para la RT-qPCR contenía 1 ng de RNA, 250 nM de cada primer, 1 x mastermix-SYBR Green, 1 x mix-RT y agua hasta completar 20  $\mu\text{l}$  de reacción.

Para cuantificar los niveles de expresión relativa de genes hay que comprobar si los genes objetivo y el gen de referencia son amplificados con eficiencias de reacción comparables. Por ello, se hicieron curvas standard (5 logs) para cada gen y cada par de primers sobre un control positivo de RNA de *C. abortus*.

Todas las reacciones se realizaron por duplicado. La cuantificación relativa se llevó a cabo siguiendo el método "delta-delta" descrito por Pfaffl (2001)[7].

## 3. Resultados y discusión

Siguiendo la metodología obtuvimos los resultados de amplificación para 4 muestras (estradiol y progesterona a las 24 y 72 horas post infección) y sus respectivos controles (no tratados a las 24 y 72 horas post infección) así como la variación en el incremento/disminución ("fold change") de expresión de cada uno de los 10 genes estudiados con respecto a los controles.

Convencionalmente se considera como umbral de significación adecuado un incremento de 2 veces la expresión de un gen con respecto al gen de referencia, en este caso el 16S *rRNA*. Siguiendo la fórmula descrita por Pfaffl (2001) [7], todos nuestros incrementos en los niveles de expresión se encuentran entre 0 y 1, lo que significaría que en nuestro ensayo no encontramos ninguna diferencia significativa entre grupos tratados con hormonas y grupos no tratados. Sin embargo, en estudios recientes realizados con la cercana especie *Chlamydia trachomatis* [8], patógeno del tracto genital femenino humano, cuyo ciclo también se ha relacionado con fluctuaciones hormonales, los autores encontraron diferencias significativas, tanto al alza como a la baja, entre el nivel de expresión de genes de cultivos tratados con hormonas y el de cultivos no tratados, llegando a la conclusión de que el estradiol podría jugar un importante papel en el establecimiento de persistencia clamidial intracelular.

Al tratarse de patógenos intracelulares, es muy probable que el efecto que ejercen las hormonas sobre las clamidias sea una respuesta indirecta a través de cambios que se producen en la célula hospedadora [3]. Así, la línea celular empleada para este tipo de estudios es de vital importancia. Nuestros resultados podrían ser explicados por una falta de respuesta de las células a las hormonas o por usar unas dosis insuficientes de hormonas. En el primer caso, a pesar de existir otros trabajos en el campo de la inmunología en los que se han añadido estradiol sobre la línea RAW 264.7 [5], los macrófagos no son el modelo *in vitro* más característico para trabajar con hormonas, y en cualquier caso, no existen estudios previos sobre esta línea que combinaran tratamiento hormonal e infección intracelular por *C. abortus*. Actualmente se están llevando a cabo ensayos con otras dos líneas celulares: ovLE (procedentes de endometrio ovino) [9] y AH-1 (trofoblasto ovino) [10], en las cuales se ha demostrado la presencia de receptores de estradiol y progesterona o se han utilizado específicamente para el cultivo de *C. abortus* respectivamente. En cuanto a la dosis de hormonas, cabe mencionar que, *in vivo*, los niveles de éstas fluctúan ampliamente a lo largo del ciclo estral y durante la gestación, por lo que utilizar un valor medio puede no ajustarse a la realidad. En la actualidad se están realizando ensayos piloto con las líneas celulares mencionadas anteriormente probando distintas concentraciones de hormonas.

#### 4. Referencias

- [1] Nietfeld, J.C. 2001. Chlamidial infections in small ruminants. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim.* 17: 301-314.
- [2] Hafner, L.M., Cunningham, K., Beagly, K.W. 2013. Ovarian steroid hormones: effects on immune responses and *Chlamydia trachomatis* infections of the female genital tract. *Mucosal immunol.* 6: 859-875.
- [3] Wan, C., Latter, J.L., Amirshahi, A., Symonds, I., Finnie, J., Bowden, N., Scott, R.J., Cunningham, K.A., Timms, P., Beagley, K.W. 2014. Progesterone activates multiple innate immune pathways in *Chlamydia trachomatis*-infected endocervical cells. *Am J Reprod Immunol.* 71: 165-177.
- [4] Prebeck, S., Brade, H., Kirschning, C.J., da Costa, C.P., Dürr, S., Wagner, H., Miethke, T. 2003. The Gram-negative bacterium *Chlamydia trachomatis* L2 stimulates tumor

necrosis factor secretion by innate immune cells independently of its endotoxin. *Microbes Infect.* 5: 463-470.

[5] Panchanathan, R., Choubey, D. Murine BAFF expression is up-regulated by estrogen and interferons: implications for sex bias in the development of autoimmunity. *Mol Immunol.* 53: 15-23.

[6] James G. Fox, Lynn C. Anderson, Franklin M. Loew, Fred W. Quimby. *Laboratory Animal Medicine* 2nd edition.

[7] Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29: e45.

[8] Amirshahi A., Wan C., Beagley K. Latter J., Symonds I., Timms P. 2011. Modulation of the *C. trachomatis* in vitro transcriptome response by the sex hormones estradiol and progesterone. *BMC Microbiol.* 11: 150.

[9] Johnson, G.A., Burghardt, R.C., Newton, G.R., Bazer, F.W., Spencer, T.E. 1999. Development and characterization of immortalized ovine endometrial cell lines. *Biol Reprod.* 61: 1324-1330.

[10] Haldorson, G.J., Stanton, J.B., Mathison, B.A., Suarez, C.E., Baszler, T.V. 2006. *Neospora caninum*: antibodies directed against tachyzoite surface protein NcSRS2 inhibit parasite attachment and invasion of placental trophoblasts in vitro. *Exp Parasitol.* 112: 172-178.

Este trabajo ha sido financiado gracias al proyecto AGL2013-45868-R del MINECO-FEDER.