

## **PROFILO DI ESPRESSIONE DI CITOCINE INFIAMMATORIE NELLA MEMBRANA CORION ALLANTOIDEA DI EMBRIONI DI POLLO SPF: RISULTATI PRELIMINARI**

Parigi M.<sup>1,3</sup>, Massi P.<sup>1</sup>, Tosi G.<sup>1</sup>, Fiorentini L.<sup>1</sup>, Turri V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, sezione di Forlì, Via Don E. Servadei 3E/3F, 47122 Forlì;*

<sup>2</sup> *Istituto Romagnolo per lo Studio e la Cura dei Tumori (IRST), Via Maroncelli 40, 47014 Meldola;*

<sup>3</sup> *Istituto Oncologico Romagnolo (IOR) Via A. Costa 28, 47122 Forlì*

### **ABSTRACT**

Cytokines are triggering factors for the immunity response and inflammation. In literature, only few studies investigated the presence and the state of innate immune system in chicken embryos, focusing only on the whole embryo and not on the corion allantoic membrane (CAM). CAM is currently considered a robust experimental platform to study angiogenesis, cancer research and drug development. In this study, we demonstrated the expression patterns of innate immune genes of anti-inflammatory cytokines (IL-6, IFN $\alpha$  e IFN $\gamma$ ) in CAM collected from SPF chicken embryos of different age. Furthermore, we investigated the modification of these cytokines expression pattern following the inoculation in CAM of different inoculum, as Infectious Laringotracheitis Virus (ILT $\nu$ ), phosphate saline buffer (PBS) and a plant virus (Cauliflower Mosaic Virus, CaMV), which is under study as potential vector for oncolytic proteins. As expected ILTV induced the expression of IL-6, IFN $\alpha$  e IFN $\gamma$ , whereas CaMV seemed to be related to a downregulation of the all the genes investigated. The biological significance of this latter result needs to be further investigated together with the expression pattern of more cytokines in order to obtain a detailed picture of the innate response of this extraembryonic membrane.

### **INTRODUZIONE**

Le citochine sono considerati fattori chiave coinvolti nell'induzione della risposta immunitaria e dell'infiammazione; dal punto di vista biochimico sono un gruppo di mediatori in grado di andare ad agire su cellule specifiche e regolare di conseguenza i processi infiammatori e immunitari (Giansanti, Giardi, and Botti 2007). Nei pochi lavori presenti in letteratura in cui è stato indagato il profilo di espressione delle citochine durante lo sviluppo embrionale di pollo (Anastasiadou and Michailidis 2016; Meade et al. 2009), ci si è focalizzati sull'embrione nella fase iniziale dell'embriogenesi (entro i 10 giorni di età), analizzando l'embrione *in toto*. Non ci sono dati, invece, riguardo il profilo di espressione delle citochine nella membrana corion allantoidea (MCA), comparto extraembrionale che per le sue peculiari caratteristiche viene utilizzato come modello per studi di angiogenesi, di farmacocinetica, di tossicologia, oltre che poter ricevere il trapianto di cellule tumorali per studi preclinici di efficacia chemioterapica (Nowak-Sliwinska, Segura, and Iruela-Arispe 2014).

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di indagare il profilo di espressione di 5 citochine, 4 di cui pro-infiammatorie (IL-6, IL-1 $\beta$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) e una antiinfiammatoria (IL-10), a livello di membrana corion allantoidea (MCA) di embrioni *Specific Patho-*

*gen Free (SPF)* di diverse età in modo da verificare lo stato del sistema immunitario innato in un comparto extraembrionale.

Si è poi proceduto con l'analisi delle modificazioni dell'espressione genica in condizioni di inoculo sperimentale, quali inoculo di soluzione di salina antibiotata sterile (PBS), inoculo del virus della Laringotracheite Infettiva Aviaria (LTI) e inoculo di particelle di un virus di origine vegetale, oggetto di studio di un progetto scientifico dell'Istituto Romagnolo per lo Studio e la Cura dei Tumori (IRST) in quanto vettore di proteine potenzialmente oncolitiche. L'inoculazione di questo virus vegetale ha avuto lo scopo di valutare la reazione da parte della membrana corion allantoidea di un potenziale corpo estraneo, incapace di integrarsi all'interno delle cellule, ma potenzialmente in grado di stimolare una risposta immunitaria.

## **MATERIALI E METODI**

### **1. EMBRIONI SPF NON INOCULATI: RACCOLTA E PROCESSAZIONE DEI CAMPIONI DI MEMBRANA CORION ALLANTOIDEA (MCA)**

I campioni analizzati in questo studio sono stati prelevati da uova embrionate di pollo SPF (Charles River Laboratories International, Inc.) incubate a 37.5°C al 65-75% di umidità relativa fino a 19 giorni. Per valutare e misurare l'espressione genica delle citochine nella MCA in corso di embriogenesi sono stati analizzati campioni prelevati da embrioni di diversa età, nello specifico di 10, 13, 16 e 19 giorni (n=5 embrioni per ogni età). Da ciascun embrione, soppresso mediante congelamento rapido a -20°C per almeno 30 minuti, è stata prelevata un'aliquota di MCA (peso in mg), omogenizzata, risospesa in 750 µL di QIAzol® Lysis Reagent (Qiagen Ltd) e stoccata a -70°C fino all'estrazione dell'RNA totale, eseguita seguendo il protocollo della ditta produttrice. In seguito a quantificazione mediante spettrofotometro, 1µg di RNA è stato retrotrascritto a cDNA utilizzando il kit iScript™ cDNA (Bio-Rad). L'espressione quantitativa delle citochine è stata valutata mediante real-time PCR in un termociclatore Bio-Rad CFX96; la mix di reazione è stata preparata utilizzando il kit SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad), 500nM di ciascun primer (Michailidis et al., (2014) per b-actina, IL-6, IL-10, IL-1b; Nang et al., (2011) per IFNα e IFNγ) in un volume finale di 20 µL utilizzando 1/10 del cDNA sintetizzato. I parametri termici prevedevano 95°C 30 sec, 40 cicli di denaturazione a 95°C per 5 sec e annealing/extension a 58°C per 10 sec, seguiti da una curva di Melt da 65°C a 95°C con lettura ogni 0.5°C per 5 sec per l'identificazione dei prodotti di PCR. Due controlli negativi sono stati inclusi in ogni reazione per monitorare la contaminazione di DNA genomico. I dati di real-time PCR sono stati analizzati mediante Software CFX Maestro™ (Bio-Rad) utilizzando il metodo 2<sup>-DDCt</sup> così da ottenere il livello relativo di espressione di ogni citochina nei confronti della b-actina in ciascun campione. L'espressione dei geni target è stata normalizzata nei confronti dell'espressione rilevata negli embrioni SPF di 10 giorni di età. L'analisi e il confronto dell'espressione di ciascuna citochina nei 4 gruppi di età è stata eseguita mediante test ANOVA (one-way) utilizzando il Software CFX Maestro™ (Bio-Rad); i risultati sono stati espressi come media±SEM e la significatività statistica è stata considerata per valori di p< 0.05.

### **2. INOCULO SPERIMENTALE DI EMBRIONI E PROCESSAZIONE DEI CAMPIONI DI MCA**

Per indagare le modificazioni di espressione delle citochine (IL-6, IL-10, IL-1b, IFNa e IFNg) in condizioni sperimentali, tre diversi inoculi sono stati preparati e inoculati in embrioni di 10 giorni di età (n=6 per gruppo, 0.2 mL di inoculo per uovo) in membrana corion-allantoidea. Nello specifico, nel primo gruppo è stata inoculata una soluzione di PBS antibiotato sterile, normalmente utilizzata come diluente di omogenati di organi da sottoporre ad esame virologico mentre nel secondo gruppo è stato utilizzato un ceppo di campo del Virus della Laringo Tracheite Infettiva Aviare. Il terzo gruppo è stato inoculato con 2 ug/uovo di virus Mosaico del Cavolfiore, virus a DNA, appartenente al gruppo dei Pararetrovirus, isolato e purificato dal Dipartimento di Patologia Vegetale della Scuola di Agraria dell'Università di Bologna.

Le uova sono state mantenute per 9 giorni post inoculazione (p.i) e sopresse mediante congelamento rapido a -20°C per almeno 30 minuti; da ciascun embrione a livello del punto di inoculo è stata prelevata un'aliquota di MCA, sminuzzata e stoccata a -70°C in 750 µL di QIAzol® Lysis Reagent (Qiagen Ltd) fino all'estrazione dell'RNA totale eseguita seguendo il protocollo della ditta produttrice. La retrotrascrizione e l'espressione quantitativa delle citochine è stata valutata mediante real-time PCR seguendo le procedure descritte in precedenza. I dati di real-time PCR sono stati analizzati mediante Software CFX Maestro™ (Bio-Rad) utilizzando il metodo 2<sup>-DDCt</sup> così da ottenere il livello relativo di espressione di ogni citochina nei confronti della b-actina in ciascun campione. In seguito all'interno di ciascun gruppo, l'espressione dei geni target è stata normalizzata nei confronti dell'espressione rilevata negli embrioni SPF di 19 giorni di età.

L'espressione di ciascuna citochina è stata confrontata nei 3 gruppi utilizzando il test ANOVA (one-way) ed i risultati sono stati espressi come media±SEM; la significatività statistica è stata considerata per valori di p< 0.05.

Alla fine del I° passaggio e all'interno di ciascun gruppo, la presenza di DNA virale di LTI e di CaMV da ciascun embrione è stata confermata mediante real-time PCR, utilizzando protocolli presenti in letteratura (Callison et al. 2007; Wolf et al. 2000).

## **RISULTATI**

### **1. VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI CITOCHINE IN EMBRIONI SPF DI DIVERSA ETÀ**

Tutti i campioni analizzati sono risultati positivi per il gene della b-actina, indicando una corretta estrazione dell'RNA e retrotrascrizione a cDNA. Per quanto riguarda l'espressione delle citochine ricercate (IL-6, IL-10, IL-1b, IFNa, IFNg), tutti i campioni sono risultati negativi per IL-10, mentre per IL-1b non è stato possibile effettuare una valutazione dell'espressione a causa della mancanza di curve di Melt specifiche. Tutti i campioni analizzati alle diverse età sono risultati positivi per la presenza di mRNA di IL-6 e IFNa, mentre per IFNg sono risultati positivi solo i campioni di MCA prelevati da embrioni di 19 giorni.

Normalizzando il dato di espressione dei trascritti rispetto agli embrioni di 10 giorni di età, è stato osservato un aumento del livello di espressione di IFNa e di IL-6 all'aumentare dell'età, in particolare fino ad 8 volte per IFNa e 7 volte per IL-6 nelle MCA di 19 giorni (p<0.05, Fig.1)

### **2. VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI CITOCHINE IN EMBRIONI INOCULATI**

Nessun embrione è morto spontaneamente nei 9 giorni p.i. nei 3 gruppi inoculati. Inoltre in ciascun gruppo inoculato, tutti i campioni di MCA prelevati sono risultati positivi per la presenza di DNA virale di LTI e di CaMV; tutti i campioni inoculati con PBS antibiotato sono risultati negativi.

Come rilevato dall'analisi dei campioni prelevati da embrioni SPF, tutti i campioni analizzati alla fine del I° passaggio sono risultati positivi per il gene della b-actina, indice di una corretta estrazione dell'RNA e retrotrascrizione a cDNA. Di nuovo, tutti i campioni sono risultati negativi per IL-10, mentre per IL-1b non è stato possibile effettuare una valutazione dell'espressione a causa della mancanza di curve di Melt specifiche. Inoltre, nel gruppo inoculato con il PBS antibiotato non sono state identificate curve di Melt specifiche per l'IFN $\gamma$ .

Dalla normalizzazione del livello di espressione delle citochine con il dato degli embrioni SPF, è stato osservato un aumento dell'espressione di IL-6, IFN $\alpha$  e IFN $\gamma$  nelle MCA inoculate con il virus della LTI e una diminuzione della loro espressione nel gruppo di embrioni inoculati con virus CaMV (Fig. 2). Questa differenza rilevata nei 3 gruppi è risultata statisticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

## DISCUSSIONE

Gli studi presenti in letteratura riguardo l'espressione genica di citochine infiammatorie sono molto esigui e riguardano solitamente l'embrione SPF *in toto* (Anastasiadou and Michailidis 2016; Bhanja et al. 2015; Meade et al. 2009). La membrana corion allantoidea, annesso importantissimo nello sviluppo embrionale e oggetto di interesse scientifico per la sua facile accessibilità, non era stata ancora studiata dal punto di vista della competenza immunitaria.

A tal proposito l'aver evidenziato un profilo di espressione di diverse citochine nelle MCA di embrioni SPF di diversa età è un dato nuovo e indicativo di come questo organo, seppur extraembrionale, abbia potenziali capacità di risposta immunitaria a fattori stressogeni esterni, soprattutto nelle fasi finali dell'embriogenesi. In particolare questo rilievo può essere interessante se consideriamo che, nel campo della ricerca oncologica, vengono impiegati test di valutazione dell'efficacia di protocolli chemioterapici che utilizzano proprio la MCA di embrioni di pollo di 9-10 giorni di età come sito di impianto di linee tumorali umane, primarie o continue. Quindi, il possibile instaurarsi di una risposta infiammatoria locale potrebbe condizionare, in positivo od in negativo, la buona riuscita degli esperimenti.

Il confronto tra i nostri dati e quelli pubblicati nei due lavori presenti in letteratura risulta difficile, in quanto il profilo di espressione genica ricercato e ritrovato risulta essere diverso e discordante (Anastasiadou and Michailidis 2016; Bhanja et al. 2015). Possiamo comunque affermare che a livello di MCA abbiamo riscontrato un incremento dell'espressione dell'mRNA di IL-6 e di IFN $\alpha$  nelle MCA di 13,16, e 19 giorni di età rispetto ai 10 giorni.

Per quanto riguarda i 3 gruppi inoculati sperimentalmente, l'induzione dell'espressione di tutte e tre le citochine proinfiammatorie negli embrioni inoculati con il virus della LTI, rispetto agli embrioni SPF, è stato un rilievo atteso. Questo herpesvirus aviario trova infatti nella membrana corion allantoidea degli embrioni di pollo il sito di replicazione ideale, tanto che l'inoculo in MCA viene ancora oggi utilizzato per la produzione di vaccini vivi attenuati per LTI oltre che a livello diagnostico per l'isolamento virale. In particolare, abbiamo osservato un incremento nell'espressione

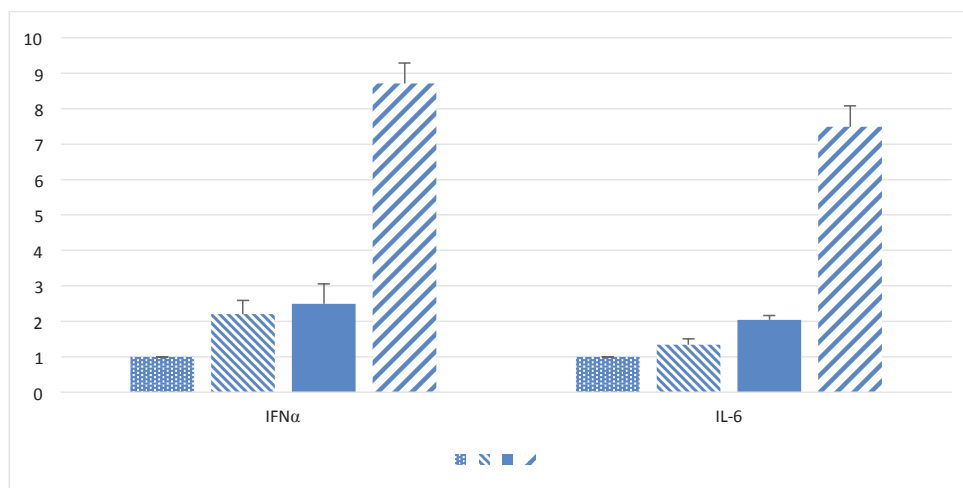
di IFN $\gamma$ , mediatore chimico con nota attività antivirale (Giansanti et al. 2007), che già nel 1985 era stato rilevato da Krempien e collaboratori a livello embrionale in risposta ad infezione con il virus dell'influenza aviaria (Krempien, Redmann, and Jungwirth 2011).

La diminuita espressione, invece, dei geni codificanti per le 3 citochine evidenziata nel gruppo inoculato con virus CaMV, rispetto agli embrioni SPF, è un dato interessante che può essere spunto per alcune considerazioni. Il riscontro di DNA del virus CaMV in tutti i campioni analizzati e la significatività statistica dei risultati ci permettono di supporre che l'effetto osservato sia una conseguenza delle particelle virali inoculate. Si può infatti ipotizzare che il contatto con un antigene non di origine animale comporti la downregolazione della risposta infiammatoria e una conseguente diminuzione dell'espressione dei geni a livello di membrana. Tale diminuzione, inoltre, potrebbe essere mediata da qualche antigene proteico presente nel virione del CaMV in grado di silenziare l'espressione genica delle citochine ricercate.

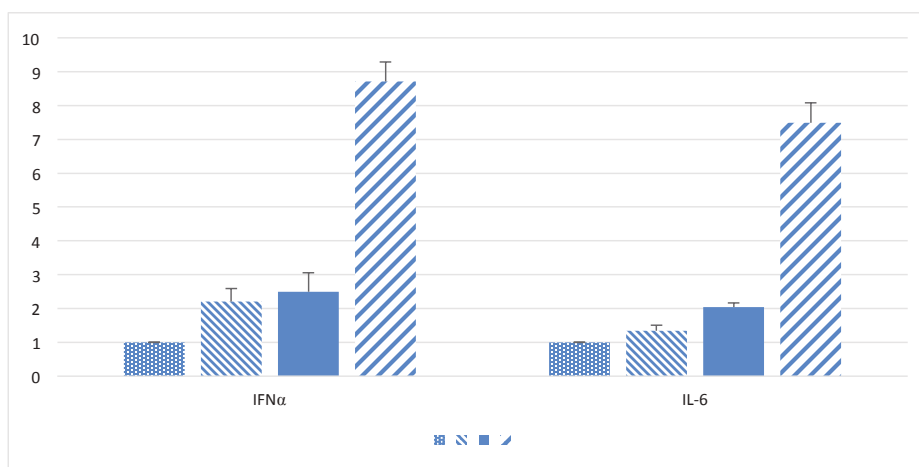
## CONCLUSIONI

I risultati preliminari di questo lavoro indicano la presenza di un profilo genico in grado di indurre risposta infiammatoria innata anche a livello di MCA. Considerando lo studio e l'utilizzo di questo comparto extraembrionale in diversi campi della ricerca scientifica risulta essere necessario aumentare il numero di citochine di cui indagare il profilo di espressione in modo da delineare un quadro più completo e utile in corso di inoculazioni sperimentali.

Inoltre, il significato biologico degli effetti indotti dal virus CaMV di origine vegetale deve essere sicuramente approfondito e integrato con la valutazione dei profili delle singole proteine del virione. Questi approfondimenti si rendono necessari soprattutto considerando l'interesse scientifico di questo virus nel campo della ricerca oncologica.



**Fig.1:** Embrioni SPF: espressione dei trascritti di mRNA di IFN $\alpha$  e IL-6 relativa agli embrioni SPF di 10 gg.



**Fig.2:** Embrioni inoculati: espressione dei trascritti di mRNA di IFN $\alpha$ , IL-6 e IFN $\gamma$  relativa agli embrioni SPF di 19 gg.

#### BIBLIOGRAFIA

1. A., Papparini and Romano-Spica V. 2006. "Gene Transfer and Cauliflower Mosaic Virus Promoter 35S Activity in Mammalian Cells." *Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* 41(4 PG-437-49):437–49.
2. Anastasiadou, M. and G. Michailidis. 2016. "Research in Veterinary Science Cytokine Activation during Embryonic Development and in Hen Ovary and Vagina during Reproductive Age and Salmonella Infection." *YRVSC* 109:86–93.
3. Bhanja, Subrat K. et al. 2015. "In Ovo Administration of Silver Nanoparticles and/or Amino Acids Influence Metabolism and Immune Gene Expression in Chicken Embryos." *International Journal of Molecular Sciences* 16(5):9484–9503.
4. Callison, S. A. et al. 2007. "Development and Validation of a Real-Time Taqman® PCR Assay for the Detection and Quantitation of Infectious Laryngotracheitis Virus in Poultry." *Journal of Virological Methods* 139(1):31–38.
5. Giansanti, F., M. Giardi, and D. Botti. 2007. "Avian Cytokines - An Overview." *Current Pharmaceutical Design* 12(24):3083–99.
6. Krempien, U., Redmann, I. and Jungwirth, J. 2011. "Purification of Chick Interferon by Zinc Chelate Affinity Chromatography and Sodium Dodecylsulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis." *Journal of Interferon Research* 5(1):209–14.
7. Meade, Kieran G., Rowan Higgs, Andrew T. Lloyd, Seamus Giles, and Cliona O'Farrelly. 2009. "Differential Antimicrobial Peptide Gene Expression Patterns during Early Chicken Embryological Development." *Developmental and Comparative Immunology* 33(4):516–24.
8. Nowak-Sliwinska, Patrycja, Tatiana Segura, and M. Luisa Iruela-Arispe. 2014. "The Chicken Chorioallantoic Membrane Model in Biology, Medicine and Bioengineering." *Angiogenesis* 17(4):779–804.
9. Wolf, Christian et al. 2000. "Detection of Cauliflower Mosaic Virus by the Polymerase Chain Reaction: Testing of Food Components for False-Positive 35S-Promoter Screening Results." *European Food Research and Technology* 210(5):367–72.