

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**



**TESIS DOCTORAL**

**Papel del estradiol y la progesterona en la infección por  
"Chlamydia abortus" en modelos murinos y ovinos:  
influencia sobre la eficacia de la vacunación**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Antonio Murcia Belmonte**

Directores

**Esperanza Gómez-Lucía Duato**

**Lázaro Jesús Salinas Lorente**

**María Rosa Caro Vergara**

Madrid



UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE  
MADRID

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS  
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. Antonio Murcia Belmonte,  
estudiante en el Programa de Doctorado en Veterinaria,  
de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de  
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y  
titulada:

Papel del estradiol y la progesterona en la infección por Chlamydia abortus en modelos murinos y ovinos:  
influencia sobre la eficacia de la vacunación

y dirigida por: María Esperanza Gómez-Lucía Duato  
Lázaro Jesús Salinas Lorente  
María Rosa Caro Vergara

**DECLARO QUE:**

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 1 de julio de 2019

Fdo.: \_\_\_\_\_

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en  
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

A mi hermana y

a mi sobrino.

# AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer profundamente a todas aquellas personas y entidades que han contribuido a que se lleve a cabo este trabajo, y muy especialmente:

A mis directores, la Dra. Esperanza Gómez-Lucía Duato, el Dr. Jesús Salinas Lorente y la Dra M<sup>a</sup> Rosa Caro Vergara, por todos sus consejos, por su ayuda e interés más allá de este trabajo y sobre todo por darme la oportunidad de iniciarme en el mundo de la investigación.

A los miembros del Departamento de Anatomía Patológica Veterinaria y Sala de Necropsias de la facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, por tenerlo todo siempre listo y en especial a los Doctores Antonio Buendía José Antonio Navarro Cámara, por todas sus ideas y puntos de vista alternativos que más de una vez han hecho que pueda seguir adelante.

A la Dra. Nieves Ortega Hernández, por sus ánimos su optimismo, comprensión y experiencia, que me han ayudado a levantar el ánimo muchas veces. Gracias por enseñarme tanto y de tantas cosas todos estos años.

A la Dra. M<sup>a</sup> Carmen Gallego Ruiz, por todo lo que me ha enseñado, por su afecto, sus buenos consejos y por todas las conversaciones triviales que hemos tenido a lo largo de estos años.

Al Dr. Francisco Cuello Gijón, la Dra. Laura del Río Alonso y a Guillermo Segundo Climent, por su interés, su amabilidad y su sentido del humor.

A los miembros del Servicio de Apoyo a la Investigación, del Servicio de Análisis de Imagen, del Animalario y de la Granja Docente de la Universidad de Murcia y en especial a Xiomara Lucas, Juan José Camarasa, Carmen Ródenas, Francisco Laredo and Elena Ríos de las Áreas de Reproducción y Anestesia Veterinaria del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Murcia, por dejarnos utilizar sus instalaciones, sus consejos e ideas y por ayudarnos a realizar las ovariectomías necesarias en los modelos experimentales utilizados en esta tesis.

A la Universidad Complutense de Madrid, por acogerme en su Programa de Doctorado en Veterinaria.

A los miembros del Moredun Research Institute de Escocia, y en especial al Dr. David Longbottom y a Morag Livingstone, por acogerme y enseñarme tanto en tan poco.

Al Ministerio de Economía y Competitividad por la concesión y financiación del proyecto AGL-2013-45868 “Papel del estradiol y la progesterona en la infección por Chlamydia abortus en modelos murinos y ovinos: influencia sobre la eficacia de la vacunación”, financiando la investigación de la que forma parte el presente estudio.

Finalmente, en lo personal me gustaría dar las gracias:

A mi compañero y gran amigo Daniel Álvarez Sánchez, fuente infinita de sinónimos, traductor y máquina infalible de detección de fallos y erratas. Morador de la cueva, caminate lesionado. No sabes toda la ayuda y todo lo que has aportado todos estos años y aunque hayamos terminado esta etapa, siempre nos quedará nuestra amistad para recordarla. No podría haber tenido un compañero mejor.

A mi amigo, Tomás, digo Simón, digo Moisés. Todo el bachillerato y la carrera aguantándonos y el doctorado, también. Quien iba a pensar que después del trabajo de los nematodos, acabarías hasta los más insospechados días y hasta la mismísima hora de cierre de la facultad (o más) en el departamento de parásitos, preparado para soltar alguna de las tuyas que tanto me divierten. Ahora que termino, recuerda que eres el siguiente.

A Clara, María, Risu y resto de doctorandos del Departamento de Parasitología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, por el buen rollo y las tardes en el gimnasio. Recordad Clara y María, que también sois las siguientes.

A mis amigos Francisco, Marina, Miguel, El Adri, Bryan, Carlos, Fanny, Grego, Elena, Noelia, Johanna, María José y un largo etcétera, por distraerme y recordarme que hay más mundo más allá de este trabajo. Os he tenido muy abandonados estos años, pero no me he olvidado de vosotros.

A mis padres Antonio y Monse, por sus ánimos, por aguantarme día a día y por todo lo que me habéis dado siempre. No habría podido hacer esto sin vosotros.

A mi cuñado Andrés, por sus charlas filosóficas y no tan filosóficas. Una buena conversación, siempre es beneficiosa.

A mi hermana, por todo lo que has hecho por mí siempre, por tu cariño, tu experiencia y tus enseñanzas. Vero, has sido siempre una fuente de inspiración y un modelo a seguir. Espero que el pequeñajo de Ibai aprenda tanto de ti como lo he hecho y sigo haciendo yo. Muchas gracias por estar ahí siempre y saber que siempre puedo contar contigo. Sin ti nunca hubiera llegado hasta aquí ni sería quien soy.

<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>1</b>
<b>1. El aborto enzótico ovino.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Taxonomía del orden chlamydiales.....</b>	<b>1</b>
2.1. <i>Chlamydia abortus</i> .....	3
<b>3. Ciclo de desarrollo.....</b>	<b>4</b>
3.1. Generalidades.....	4
3.2. Adhesión y penetración a la célula hospedadora.....	7
3.3. Multiplicación bacteriana.....	9
3.4. Infección crónica. Persistencia.....	9
3.5. Liberación bacteriana.....	13
<b>4. Estructura antigénica.....</b>	<b>13</b>
4.1. Antígenos glicolipídicos.....	13
5.1.1. Lipopolisacárido.....	13
5.1.2. Glicolípido soluble.....	13
4.2. Antígenos proteicos.....	14
4.2.1. Proteína principal de la membrana externa (MOMP).....	14
4.2.2. Proteínas ricas en cisteína...	15
4.2.3. Otras proteínas	15
<b>5. Transmisión, patogenia y manifestaciones clínicas de la infección por <i>C. Abortus</i>.....</b>	<b>16</b>
5.1. Transmisión.....	16
5.2. Patogenia y manifestaciones clínicas.....	17
<b>6. Respuesta inmunitaria frente a <i>C. Abortus</i>.....</b>	<b>19</b>
6.1. Respuesta inmunitaria innata.....	20
6.2. Respuesta inmunitaria adquirida.....	22
6.2.1. Respuesta inmunitaria celular	22
6.2.2. Respuesta inmunitaria humoral.....	23
Respuesta inmunitaria de memoria.	24
6.3. Citoquinas.....	25
<b>7. Esteroides sexuales de la hembra.....</b>	<b>32</b>
7.1. Generalidades y mecanismos de acción.....	32
7.2. Estrógenos.....	34

7.3. Progestágenos.....	36
7.4. Papel de las hormonas sexuales en la respuesta inmunitaria.....	37
7.4.1. Estradiol.....	38
7.4.2. Progesterona.....	38
7.5. Efecto de las hormonas sexuales sobre infecciones bacterianas.....	39
7.6. Efecto de las hormonas sexuales sobre la vacunación.....	42
7.7. Ciclo estral y gestación en la ratona.....	42
7.8. Ciclo estral y gestación en la oveja.....	45
<b>8. Diagnóstico, prevención y control de la infección por <i>C. Abortus</i>.....</b>	<b>49</b>
8.1. Prevención y control.....	50
8.1.1. Manejo.....	50
8.1.2. Tratamiento con antibiótico.....	50
8.1.3. Vacunación.....	51
<b>9. Infección experimental por <i>C. abortus</i> en modelo murino.....</b>	<b>54</b>
<b>10. Infección experimental por <i>C. abortus</i> en modelo ovino.....</b>	<b>56</b>
<b>PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.....</b>	<b>58</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>61</b>
<b>1. Microorganismo.....</b>	<b>62</b>
1.1. Cultivo y producción de <i>C. Abortus</i> .....	62
1.1.1. Cultivo en saco vitelino de embrión de pollo.....	62
1.1.2. Cultivo de la línea celular McCoy.....	63
1.1.2.1. Descongelación, recuento y estimación de la viabilidad de las células.....	63
1.1.2.2. Multiplicación de células McCoy.....	64
1.1.2.3. Infección del tapiz celular.....	65
1.1.2.4. Titulación de suspensiones de <i>C. abortus</i> en células McCoy.....	65
<b>2. Vacunas.....</b>	<b>66</b>
2.1. Producción del antígeno vacunal.....	66
2.1.1. Purificación de <i>C. Abortus</i> ...	66
2.1.2. Protocolo de inactivación...	67
2.1.3. Adyuvante seleccionado y preparación de la vacuna...	67
<b>3. Diseños experimentales.....</b>	<b>68</b>

3.1.	Autorizaciones para la experimentación animal	68
3.2.	Animales utilizados	68
3.3.	Ovariectomía	68
3.4.	Experiencias	70
	3.4.1. Experiencia 1. Efecto del 17 $\beta$ -estradiol y progesterona sobre el curso de la infección y de la respuesta inmunitaria frente <i>C. abortus</i> en ratonas Swiss OF1 ovariectomizadas.....	70
	3.4.2. Experiencia 2. Efecto del 17 $\beta$ -estradiol y progesterona sobre el curso de la infección y de la respuesta inmunitaria frente a <i>C. abortus</i> en ratonas Swiss OF1 ovariectomizadas en Murcia por nuestro equipo y ampliación del estudio hasta el día 11 pi.....	71
	3.4.3. Experiencia 3. Efecto del 17 $\beta$ -estradiol y la progesterona sobre el curso de la infección y de la respuesta inmunitaria frente a <i>C. abortus</i> inducida por una vacuna experimental inactivada en ratonas Swiss ovariectomizadas en Murcia por nuestro equipo.....	73
	3.4.4. Experiencia 4. Efecto del 17 $\beta$ -estradiol y la progesterona en la inducción del efecto protector de dos vacunas (experimental y comercial) contra la infección por <i>C. abortus</i> en ratonas Swiss ovariectomizadas por nuestro grupo.....	74
	3.4.5. Experiencia 5: efecto de la progesterona sobre la infección por <i>C. abortus</i> y sobre la eficacia de la vacunación en un modelo ovino	75
3.5.	Sacrificio y toma de muestras.....	77
3.6.	Análisis de la cinética de la infección clamidial.....	78
	3.6.1. Análisis de la morbilidad medida como pérdida de peso y variación de la temperatura corporal.....	78
	3.6.2. Aislamiento y cuantificación de <i>C. Abortus</i> .....	78

3.6.3. Detección de citoquinas y quimioquinas a partir de suero.....	79
3.6.4. Detección de anticuerpos anti- <i>C. Abortus</i> .....	79
3.6.5. Estudio inmunohistoquímico	80
3.6.5.1. Análisis de imagen	82
Detección de ADN de <i>C. abortus</i> en muestras de órganos mediante qPCR.....	83
<b>4. Estudio estadístico.....</b>	<b>84</b>
	85
<b>RESULTADOS.....</b>	
1. EXPERIENCIA 1. EFECTO DEL 17B-ESTRADIOL Y LA PROGESTERONA SOBRE EL CURSO DE LA INFECCIÓN Y DE LA RESPUESTA INMUNITARIA FRENTE <i>C. ABORTUS</i> EN RATONAS SWISS OF1 OVARIECTOMIZADAS.....	85
1.1. Morbilidad.....	85
1.2. Carga de <i>C. Abortus</i> .....	86
1.3. Inmunohistopatología.....	86
2. EXPERIENCIA 2. EFECTO DEL 17B-ESTRADIOL Y LA PROGESTERONA SOBRE EL CURSO DE LA INFECCIÓN Y DE LA RESPUESTA INMUNITARIA FRENTE A <i>C. ABORTUS</i> EN RATONAS SWISS OF1 OVARIECTOMIZADAS EN MURCIA POR NUESTRO EQUIPO Y AMPLIACIÓN DEL ESTUDIO HASTA EL DÍA 11 pi.....	89
2.1. Morbilidad.....	89
2.2. Carga de <i>C. Abortus</i> .....	90
2.3. Inmunohistopatología.....	92
2.4. Caracterización del infiltrado inflamatorio de las Experiencias 1 y 2.....	94
3. EXPERIENCIA 3. EFECTO DEL 17B-ESTRADIOL Y LA PROGESTERONA SOBRE EL CURSO DE LA INFECCIÓN Y DE LA RESPUESTA INMUNITARIA FRENTE A <i>C. ABORTUS</i> INDUCIDA POR UNA VACUNA EXPERIMENTAL INACTIVADA EN RATONAS SWISS OVARIECTOMIZADAS EN MURCIA POR NUESTRO EQUIPO.....	98
3.1. Morbilidad.....	98
3.2. Carga de <i>C. Abortus</i> .....	99
3.3. Análisis de la producción de anticuerpos.....	10
	1
3.4. Inmunohistopatología.....	10
	1
3.5. Detección de citoquinas y quimioquinas en el suero de las ratonas de las Experiencias 1, 2 y 3.....	10
	7
4. EXPERIENCIA 4. EFECTO DEL 17B-ESTRADIOL Y LA PROGESTERONA EN LA INDUCCIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DE DOS VACUNAS (EXPERIMENTAL Y COMERCIAL) CONTRA LA INFECCIÓN POR <i>C. ABORTUS</i> EN RATONAS SWISS OVARIECTOMIZADAS POR NUESTRO GRUPO.....	11
4.1. Morbilidad.....	11
	0
4.2. Carga de <i>C. abortus</i> en hígado.....	11
	1

4.3. Inmunohistopatología.....	11
	2
5. EXPERIENCIA 5. EFECTO DE LA PROGESTERONA SOBRE LA INFECCIÓN POR <i>C. ABORTUS</i> Y SOBRE LA EFICACIA DE LA VACUNACIÓN EN UN MODELO OVINO.....	11
5.5. Morbilidad.....	3
	11
	3
5.6. Detección de ADN de <i>C. Abortus</i> .....	11
	4
5.7. Detección de anticuerpos y citoquinas en suero.....	11
	5
5.8. Lesiones macroscópicas, histopatología e inmunohistoquímica.....	11
	8
	12
<b>DISCUSIÓN</b> .....	4
1. Introducción.....	12
	4
Experiencias 1 y 2. Efecto del 17 $\beta$ -estradiol y la progesterona sobre el curso de la infección y de la respuesta inmunitaria frente <i>C. Abortus</i> en ratonas swiss OF1 ovariectomizadas.....	12
	5
3. Experiencia 3. Efecto del 17 $\beta$ -estradiol y la progesterona sobre el curso de la infección y de la respuesta inmunitaria frente a <i>C. Abortus</i> inducida por una vacuna experimental inactivada en ratonas swiss ovariectomizadas en Murcia por nuestro equipo.....	13
	2
4. Experiencia 4: efecto del 17 $\beta$ -estradiol y la progesterona en la inducción del efecto protector de dos vacunas (experimental y comercial) contra la infección por <i>C. Abortus</i> en ratonas swiss ovariectomizadas por nuestro equipo.....	13
	5
5. Experiencia 5: efecto de la progesterona sobre la infección por <i>C. Abortus</i> y sobre la eficacia de la vacuna experimental en un modelo ovino el aborto enzótico ovino.....	13
	7
	14
<b>CONCLUSIONES</b> .....	2
	14
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	3
	18
<b>ANEXOS</b> .....	2
1. Composición de los medios de cultivo y tampones....	18
	2
2. Lista de abreviaturas.....	18
	5
	18
<b>SUMMARY AND CONCLUSIONS</b> .....	7
1. SUMMARY.....	18
	7
2. CONCLUSIONS.....	18
	8

RESUMEN.....	19
	0

# REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



## 1. EL ABORTO ENZÓOTICO OVINO

*C. abortus* es el agente causante del aborto enzoótico ovino (AEO). La enfermedad se describió por primera vez en Escocia en 1936 (Greig, 1936), aunque su agente etiológico no se identificó hasta 1950 (Stamp *et al.*, 1950). Esta enfermedad, de distribución mundial (a excepción de Australia y Nueva Zelanda), es la causa principal de aborto infeccioso en pequeños rumiantes en numerosos países, como en Reino Unido (Aitken, 2000), Holanda (van den Brom *et al.*, 2012), Alemania (Runge *et al.*, 2012) y también en España (Navarro *et al.*, 2009). El aborto clamidial también se presenta en cabras, pudiendo afectar a más de un 30% de las hembras preñadas de un colectivo, lo que provoca una reducción drástica en la producción láctea de la explotación y por tanto, importantes pérdidas económicas. Además del alcance económico que implica el AEO, esta infección ha sido reconocida como una zoonosis, capaz de provocar aborto y severas septicemias en mujeres embarazadas (Buxton, 1986; Herring *et al.*, 1987; Entrican *et al.*, 2001; Longbottom y Coulter, 2003).

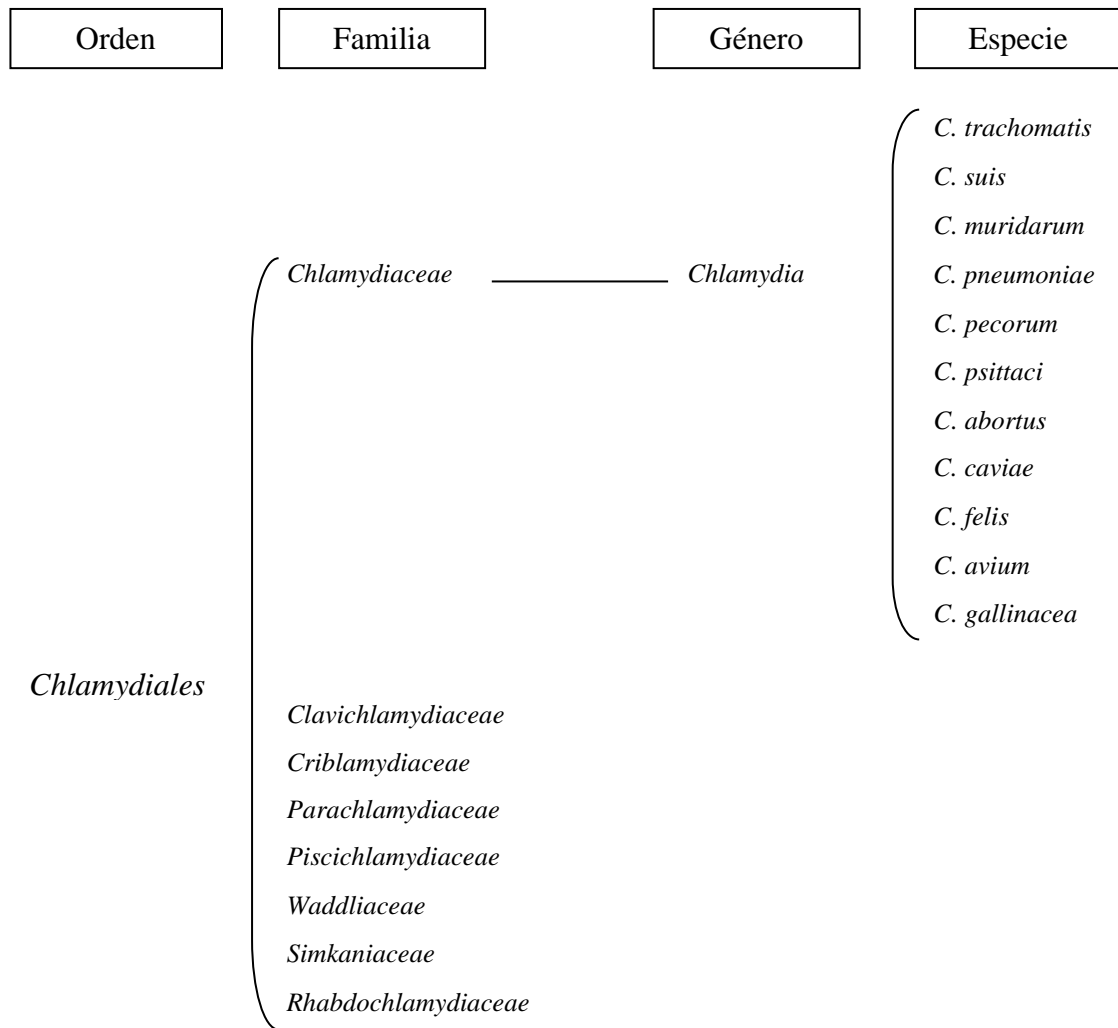
El AEO comienza al introducir animales infectados en un rebaño que era libre de esta enfermedad. Durante el primer año se producirán unos pocos abortos correspondientes a los animales introducidos, siendo en el segundo año cuando se produce un brote en el que hasta el 30 % de las ovejas y el 60 % de las cabras pueden abortar o parir corderos o cabritos débiles. Esta alta incidencia puede mantenerse en próximas parideras, hasta que una gran proporción de los animales haya abortado. A partir de entonces la incidencia anual de abortos se mantendrá en un 5-10% si no se toman medidas de control, aumentando este porcentaje cuando se introducen animales de reposición (Rodolakis y Laroucau, 2015).

## 2. TAXONOMÍA DEL ORDEN *CHLAMYDIALES*

La clasificación actual del orden *Chlamydiales*, queda recogida en el Manual Bergey de Bacteriología Sistemática (Ed. Springer, Nueva York). En el 4º volumen de su segunda edición (2011), se establece la división del orden en las familias *Chlamydiaceae*, *Clavichlamydiaceae*, *Criblamydiacidae*, *Parachlamydiaceae*, *Piscichlamydiaceae*, *Rhabdochlamydiaceae*, *Simkaniaceae* y *Waddliaceae* (Kuo *et al.*, 2011; Sachse *et al.*, 2015). Las bacterias incluidas en el orden *Chlamydiales* tienen en común su pequeño tamaño, una pared celular Gram negativa carente de ácido murámico, un desarrollo intracelular obligado y un ciclo bifásico, característico

y único entre los procariotas, con dos formas bien diferenciadas, una infectiva y otra reproductiva.

De las ocho familias que integran el orden, la familia *Chlamydiaceae* es la que mayor interés suscita desde el punto de vista médico y veterinario, ya que los microorganismos de las otras familias tienen como hospedadores principalmente a invertebrados, peces salmónidos y plantas. Esta familia estaba hasta hace pocos años dividida en los géneros *Chlamydia* y *Chlamydophila* (Everett *et al.*, 1999). Sin embargo, esta división no ha sido utilizada de forma generalizada en la literatura científica, por lo que finalmente se propuso eliminar el género *Chlamydophila* y transferir todas sus especies al género *Chlamydia* (Kuo *et al.*, 2011; Sachse *et al.*, 2015). Esta familia está compuesta por un solo género, integrado por once especies: *C. trachomatis*, *C. suis*, *C. muridarum*, *C. pneumoniae*, *C. pecorum*, *C. psittaci*, *C. abortus*, *C. caviae*, *C. felis*, *C. avium* y *C. gallinacea* (Sachse *et al.*, 2015) (Figura 1). La especie objeto de estudio en este trabajo, será denominada en adelante como *Chlamydia abortus*.



**Figura 1:** Taxonomía del orden *Chlamydiales*. Manual Bergey de Bacteriología Sistemática (Ed. Springer, Nueva York)

### 2.1. *Chlamydia abortus*

Anteriormente denominada como serotipo 1 de *Chlamydia psittaci* (Schachter *et al.*, 1974, 1975; Perez-Martinez y Storz, 1985), posteriormente como *Chlamydophila abortus* (Everett *et al.*, 1999) y actualmente como *Chlamydia abortus*, incluye cepas causantes de cuadros de abortos, principalmente en pequeños rumiantes, pero también en el ganado vacuno (Blumer *et al.*, 2011) y porcino (Salinas *et al.*, 2012), acompañados en algunos casos de esterilidad (Papp *et al.*, 1993) así como posibles casos de epididimitis, artritis, conjuntivitis y neumonía (Rodolakis y Laroucau, 2015). Esta infección, con altas prevalencias en España (Mainar-Jaime *et al.*, 1998), está considerada como la principal causa de aborto infeccioso en los pequeños rumiantes en nuestro país (Navarro *et al.*, 2009), así como en Reino Unido, primer país productor de ovino de Europa (Longbottom y Coulter, 2003). En otros países, la proporción de rebaños

infectados por *C. abortus* de forma enzoótica y subclínica es alta, alcanzando un porcentaje de prevalencia de hasta el 54,7% en estados como Alemania (Runge *et al.*, 2012). Junto a *Brucella melitensis*, constituye una de las principales causas de aborto infeccioso en pequeños rumiantes en prácticamente cualquier región del mundo donde se críe este tipo de ganado, con excepción de Australia y Nueva Zelanda (Rodolakis y Laroucau, 2015). Además, se han descrito casos de aborto clamidial en mujeres embarazadas (Buxton, 1986; Pospischil *et al.*, 2002; Walder *et al.*, 2005), lo que supone un riesgo zoonótico para las mismas. Por otro lado, aunque los hospedadores habituales de *C. abortus* son mamíferos, esta bacteria se ha aislado en seis especies diferentes de aves marinas (Herrmann *et al.*, 2000).

Las distintas cepas de *C. abortus* son muy homogéneas entre sí desde el punto de vista fenotípico (Vretou *et al.*, 1996), antigénico (Salinas *et al.*, 1995) y genómico (Laroucau *et al.*, 2009). Solo tres cepas: las dos griegas LLG y POS (Siarkou *et al.*, 2002) y la francesa AB16 (Laroucau *et al.*, 2000) presentan diversidad antigénica en sus proteínas polimórficas de membrana (Pmp) (Vretou *et al.*, 1996; Laroucau *et al.*, 2000), difieren en la morfología de las inclusiones intracitoplasmáticas y reaccionan de forma diferente al ser expuestas a anticuerpos monoclonales contra la proteína principal de la membrana externa (MOMP) (Vretou *et al.*, 2001). Además, estas tres cepas difieren del resto en cuanto a su virulencia (Bouakane *et al.*, 2003), lo que sugiere que las Pmp juegan un papel importante en la virulencia de *C. abortus*.

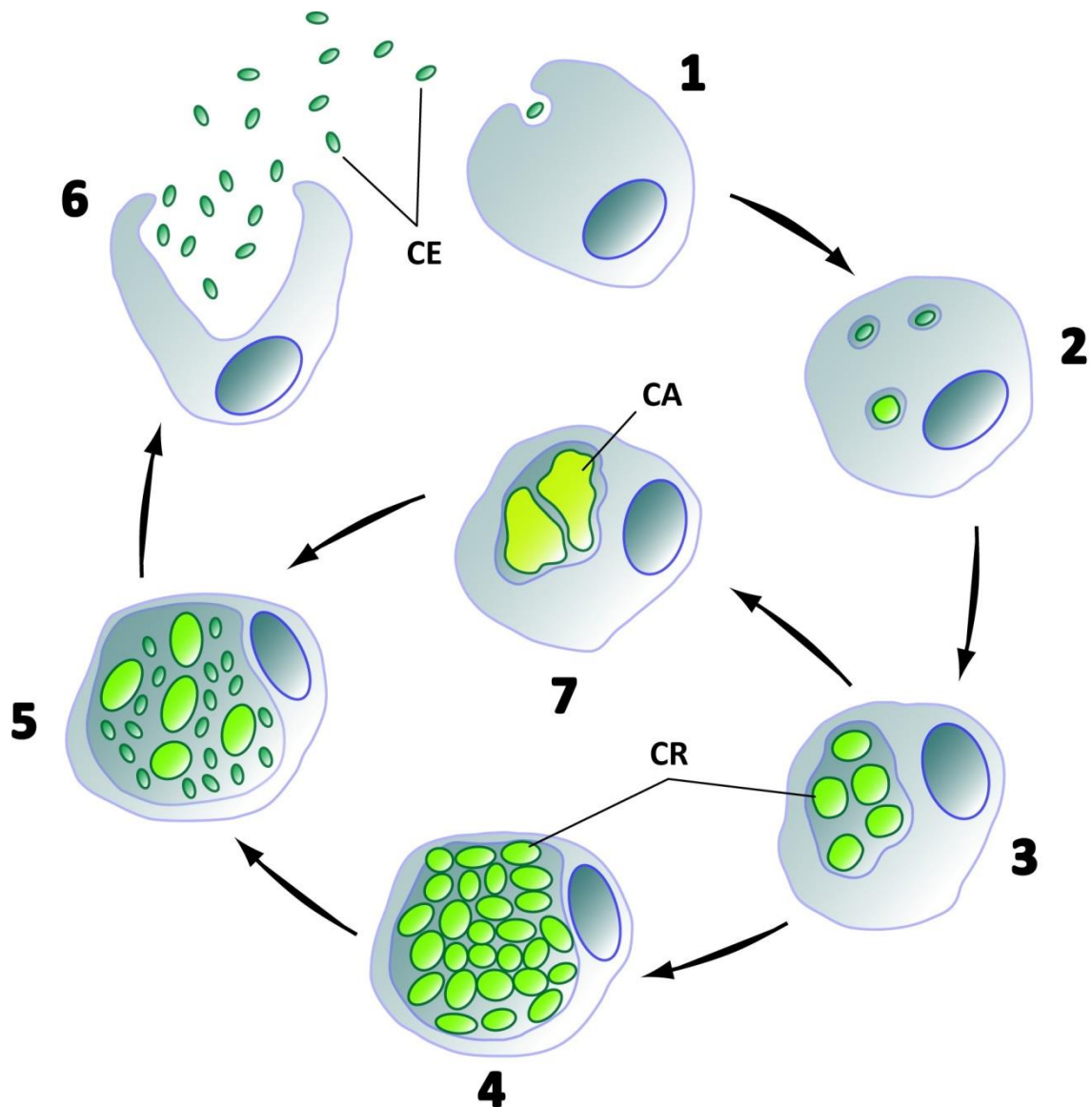
En 2005 se publicó la secuencia genómica completa de *C. abortus*, lo que ha supuesto una valiosa herramienta que permite abordar estudios que están ampliando el conocimiento sobre los mecanismos moleculares e inmunopatológicos de las infecciones clamidiales (Thomson *et al.*, 2005).

### 3. CICLO DE DESARROLLO

#### 3.1. Generalidades

La familia *Chlamydiaceae* engloba una serie de bacterias parásitas intracelulares obligadas, ya que necesitan obtener de las células huéspedes de alta energía e intermediarios metabólicos de bajo peso molecular para la síntesis de sus propios ácidos nucleicos y proteínas. Una característica distintiva de las clamidias es la existencia de un ciclo intracelular bifásico único entre los procariontes (figura 2), en el que se puede apreciar la alternancia de dos formas morfológicamente distintas de clamidia: el cuerpo elemental (CE) y el cuerpo reticular (CR). La

composición, estructura y biología de estas formas están intrínsecamente relacionadas con las funciones que desempeñan en las distintas fases del ciclo de desarrollo.



**Figura 2:** Ciclo de desarrollo clamidial. 1. Adhesión y penetración en la célula hospedadora; 2. Diferenciación primaria (CE a CR); 3. División de los CR; 4. Multiplicación de CR y expansión de la inclusión clamidial; 5. Diferenciación secundaria (CR a CE); 6. Liberación de los CE; 7. Desarrollo de cuerpos aberrantes (CA) (persistencia).

Los CE constituyen la forma extracelular (Longbottom y Coulter, 2003), siendo la forma metabólicamente inactiva e infectante de *C. abortus*. Son incapaces de replicarse, presentan forma esférica con un diámetro de 0,2-0,3  $\mu\text{m}$  y en su interior se aprecia un nucleóide electrodenso con numerosos ribosomas, además de material amorfo (Figura 3) (Matsumoto, 1988). Exteriormente está rodeado por una doble envoltura trilaminar compuesta por una

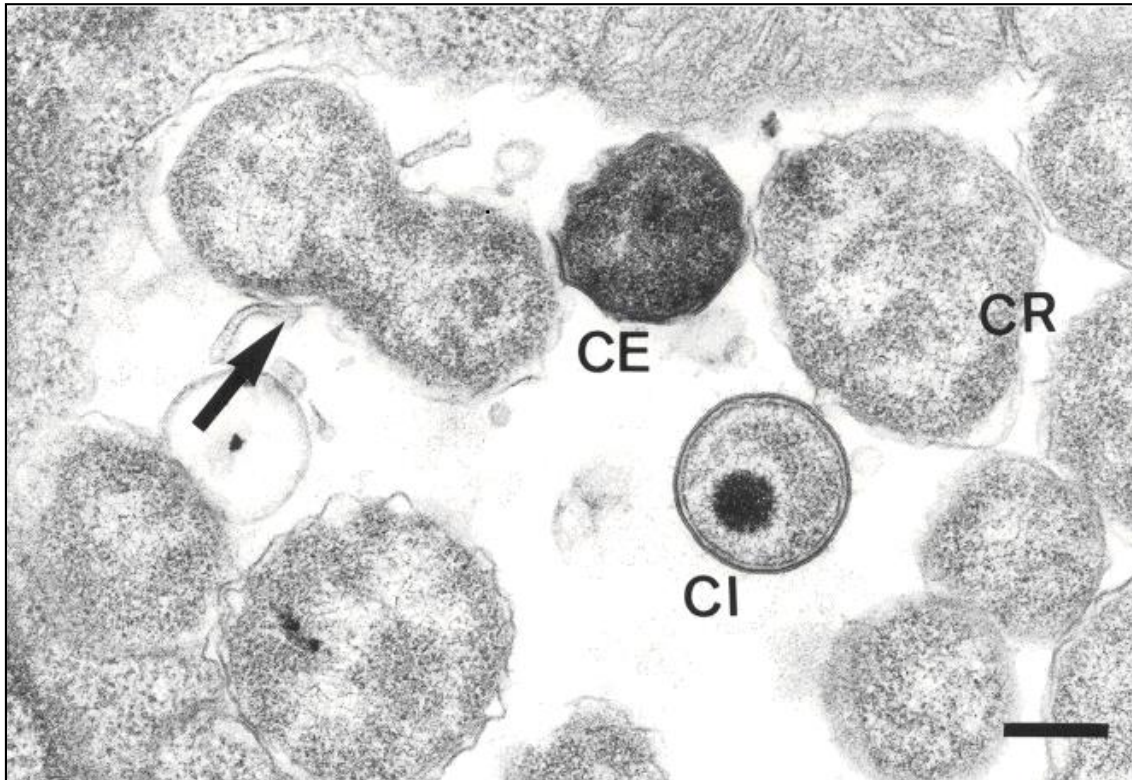
membrana interna o membrana citoplasmática y una membrana externa que se conoce como COMC (de las siglas en inglés Chlamydial Outer Membrane Complex), de la que se hablará más adelante. Esta membrana externa contiene una gran cantidad de proteínas muy ricas en aminoácidos azufrados que forman numerosos puentes disulfuro que son los responsables de su rigidez y escasa permeabilidad (Hatch, 1996). Estas propiedades confieren a los CE una gran estabilidad en el medio externo y cierta resistencia a diversos agentes físico-químicos.

El **CR**, de mayor diámetro, 0,5-1  $\mu\text{m}$ , es la forma intracelular, no infectiva y metabólicamente activa (Longbottom y Coulter, 2003) de *C. abortus* (Figura 3). En su interior se aprecia un material nuclear fibrilar muy poco denso y aspecto granular, debido al desenrollamiento del ADN y gran cantidad de ribosomas presentes. El contenido en ARN de los CR es cuatro veces superior al de los CE, lo que junto con el ADN en su forma desenrollada y la gran cantidad de ribosomas, demuestra una intensa actividad biosintética. Se ha demostrado que los CR pueden sintetizar ciertas proteínas independientemente de la célula hospedadora, e incluso libre de la misma, si se les asegura un aporte adecuado de ATP exógeno (Hatch *et al.*, 1985). Los CR poseen una doble envoltura: membrana interna o membrana citoplasmática y membrana externa, que se corresponde con la pared celular bacteriana. La pared del CR es más delgada y flexible que la del CE, lo que la hace permeable al paso de nucleótidos ricos en energía (Bavoil *et al.*, 1984), pero a la vez hace que el CR sea una estructura sensible y osmóticamente frágil, incapaz de sobrevivir en el medio externo (Matsumoto, 1988).

Además del CE y del CR se describe una forma intermedia entre ambas estructuras denominada cuerpo intermedio (**CI**), que morfológica y estructuralmente representa una etapa de transición en la condensación del material nuclear del CR para originar el CE (Moulder *et al.*, 1984). La capacidad infectante de los CI no ha sido demostrada todavía (Figura 3).

Se ha comprobado que en condiciones *in vitro*, factores como el IFN- $\gamma$ , ciertos antibióticos, y un déficit de algunos factores nutricionales esenciales (glucosa, hierro, triptófano, etc.) inducen la aparición de unos cuerpos reticulares anormales también denominados cuerpos aberrantes (**CA**), incapaces de reorganizarse en CE. El efecto de estos factores inductores de los CA es reversible, ya que cuando se eliminan, los CA pasan a CE normales. La aparición de estas formas fue revisada inicialmente por Beatty *et al.* (1994) y ha sido actualizada por Hogan *et al.* (2004). Los CA permanecen en el interior de la célula como agentes infecciosos o persistentes y se han asociado con la presencia de recidivas en las clamidiosis crónicas/persistentes y con la dificultad de la eliminación total del microorganismo por el hospedador (Beatty *et al.*, 1994;

McKuen *et al.*, 2013). De estas infecciones crónicas/persistentes se hablará con mayor extensión en su apartado correspondiente.



**Figura 3:** Electronografía de las diferentes formas clamidiales. Cuerpo elemental (CE), cuerpo intermedio (CI) y cuerpo reticular (CR), uno de ellos en fisión binaria (flecha). Barra: 0,25  $\mu$ m. Imagen cedida por Antonio Buendía en su tesis doctoral “Estudio de *Chlamydia psittaci* mediante inmunomicroscopía electrónica” defendida en 1998.

### 3.2. Adhesión y penetración a la célula hospedadora

La adhesión de los CE a la célula hospedadora es necesaria como un paso previo a la fagocitosis y posterior replicación intracelular (Moulder, 1991). La capacidad de infectar distintos tipos celulares de diferentes especies indica que las adhesinas implicadas en el proceso reconocen receptores celulares conservados, pero a pesar de la importancia de esta interacción para el estudio de la patología de las clamidiosis, todavía no se conocen todos los mecanismos involucrados en la misma (Abdelrahman y Belland, 2005). Las bacterias de la familia *Chlamydiaceae* carecen de órganos de adherencia como la cápsula o las fimbrias, por lo que su pared juega un papel fundamental en este mecanismo. Algunas de las moléculas por parte de la bacteria que participan en el proceso de adhesión son el lipooligosacárido (LOS), MOMP, OmpA, OmcB, Hsp70, la familia de proteínas Pmp (Becker y Hegemann, 2014; Osaka y Hefty, 2014), así

como los glicosaminoglucanos, todas ellas presentes en la membrana externa de los CE (COMC) y que tienen receptores específicos en la célula hospedadora (Gutierrez-Martin *et al.*, 1997).

Recientes estudios de genómica y proteómica realizados en la última década, sugieren que los CE clamidiales pueden ser también metabólicamente activos en esta fase inicial del ciclo clamidial (Omsland *et al.*, 2012) y producir una serie de proteínas específicas que juegan un papel activo durante la adhesión y penetración en la célula hospedadora (Clifton *et al.*, 2004; Albrecht *et al.*, 2011; Saka *et al.*, 2011; Skipp *et al.*, 2016).

Se ha demostrado que el primer contacto entre los CE y la célula hospedadora se produce por interacciones electrostáticas entre la proteína OmcB de la bacteria y glicosaminoglucanos tipo heparán sulfato de la célula (Su *et al.*, 1996; Moelleken y Hegemann, 2008). Esto explica que la adición de policones como el DEAE-D (dietilaminoetil-dextrano) a un cultivo celular aumente su sensibilidad a la infección clamidial (Kuo *et al.*, 1972). Otro factor que favorece la adhesión de *C. trachomatis* serotipo E en un cultivo, es el pretratamiento de éste con estradiol (Maslow *et al.*, 1988), debido a que esta cepa reconoce una proteína concreta del receptor de estrógenos (Davis *et al.*, 2002).

La internalización de los CE está relacionada con cambios en el citoesqueleto de actina de la célula hospedadora (Carabeo *et al.*, 2002), un proceso que depende de factores procedentes de la bacteria y de la propia célula. La adhesión de la bacteria a la célula desencadena una cascada de reacciones que conducen a alteraciones en los reguladores de actina de las células (Elwell *et al.*, 2008). Al mismo tiempo, los CE secretan proteínas efectoras que modifican el citoesqueleto de la célula antes de su penetración en la misma. Una de las más estudiadas es la fosfoproteína TarP (Clifton *et al.*, 2004), que ha sido propuesta junto a la familia de proteínas Pmp, como un posible determinante de la especificidad de especie o del tropismo por ciertos tejidos que tienen los miembros de la familia *Chlamydiaceae* (Lutter *et al.*, 2010).

Una vez adheridos, los CE son fagocitados e incluidos a la célula hospedadora en fagosomas, vacuolas citoplasmáticas rodeadas por membranas derivadas de la membrana plasmática de la célula infectada. Las clamidias son capaces de modificar las propiedades de la incipiente inclusión intracitoplasmática retrasando su maduración y manteniéndola en las etapas tempranas de la vía endocítica (Hackstadt *et al.*, 1999), para evitar así su fusión con lisosomas. En cambio, los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) sí son capaces de formar fagolisosomas (Register *et al.*, 1986), por lo que tienen un papel fundamental en la respuesta inmunitaria durante los primeros estadios de la infección (Buendia *et al.*, 1999a). Sin embargo,

## Revisión Bibliográfica

la acción de los PMN se limita a las primeras 48-72 horas posinfección (pi), tiempo en el que las bacterias colonizan rápidamente otras poblaciones celulares (Barteneva *et al.*, 1996).

### 3.3. Multiplicación bacteriana

Una vez dentro del fagosoma, comienza la reorganización de los CE, que dan lugar a los CR. El ADN se desenrolla y se distribuye haciéndose más fibrilar y menos denso, los ribosomas aumentan en número y la pared se vuelve más delgada, flexible y permeable para el paso de los nucleótidos ricos en energía (Bavoil *et al.*, 1984). Dos horas después de que la bacteria entre en la célula ya son apreciables cambios morfológicos en la misma (Shaw *et al.*, 2000), culminando el proceso de reconversión de los CE a CR en 12 horas.

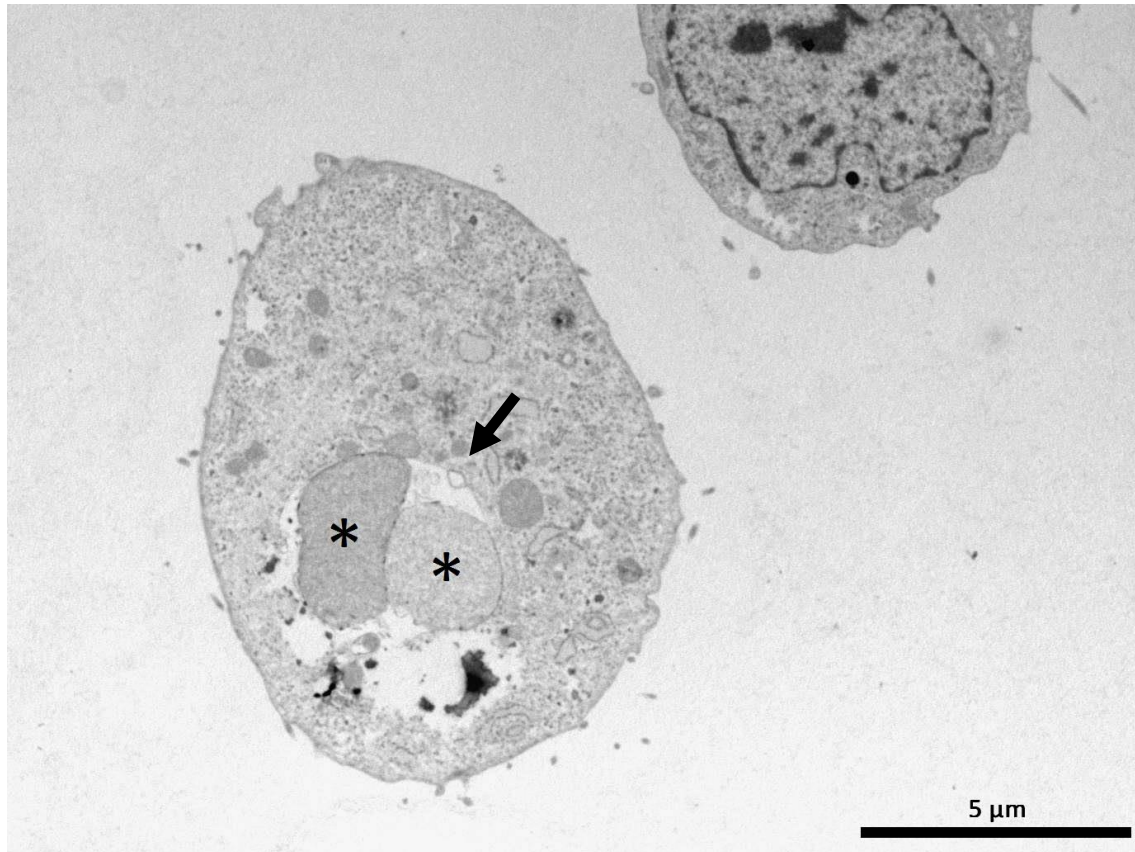
Los CR empiezan a dividirse entonces por fisión binaria sin septación aparente y de forma exponencial, encontrándose a partir de las 10-16 horas pi la mayor parte de los CR en alguna fase de división (tiempo de duplicación de 2-3 horas). A partir de este momento la proporción de formas en división disminuye, si bien el proceso de multiplicación clamidial en el interior de la célula no termina realmente hasta la lisis de ésta, aunque la duración de esta fase depende de factores como la cepa clamidial, línea celular hospedadora y condiciones de cultivo. La multiplicación de los CR tiene lugar dentro de una vacuola rodeada por membranas llamada inclusión intracitoplasmática, que es una extensión de la vacuola fagocítica por la que fue internalizado el CE. Aproximadamente a las 15 horas pi las inclusiones ya son lo suficientemente grandes como para ser vistas en un microscopio de contraste de fases (Kuo *et al.*, 2011). A las 20 horas aproximadamente comienza a producirse la transformación de CR a CE para formar una inclusión madura (Moulder, 1991). Los CR siguen dividiéndose y diferenciándose a CE hasta que la célula hospedadora no puede soportar la carga clamidial. Por lo tanto, no hay un momento exacto para la finalización del ciclo de infección, aunque este suele situarse entre las 48 y las 72 horas pi. En este momento, las tres fases de desarrollo (CR, CI y CE) coexisten en la inclusión (figura 3) (Kuo *et al.*, 2011).

### 3.4. Infección crónica. Persistencia

La persistencia es una vía alternativa de la infección clamidial en la célula, donde una subpoblación bacteriana logra hacerse “invisible” y escapar de la respuesta inmunitaria y de

tratamientos antibióticos a largo plazo, sin ninguna sintomatología o causando pocos síntomas insuficientes para su diagnóstico (*revisado en* Bavoil, 2014). Las infecciones persistentes son también llamadas crípticas, encubiertas, durmientes o silentes. Todos estos términos se refieren a las infecciones producidas por las formas clamidiales que permanecen en un estado de inactividad biológica y de manera prolongada en el interior de las célula infectadas (Beatty *et al.*, 1994). El fenómeno de persistencia que se describe a nivel celular *in vitro* puede estar ligado con un proceso crónico de la infección por clamidias *in vivo*, como es el caso de *C. pneumoniae* y la aterosclerosis (Borel *et al.*, 2014b). En este sentido, las clamidiosis se asocian con estados de infección crónicos en los que los hospedadores alternan periodos de enfermedad clínica con periodos aparentemente asintomáticos. La recidiva de una enfermedad clamidial puede ser debida al fenómeno de persistencia o a infecciones repetidas con especies o genotipos similares, y con frecuencia es difícil discernir entre ambos casos. Sin embargo, es difícil diferenciar entre infecciones agudas y crónicas cuando hay dificultad en desarrollar test y marcadores comerciales que identifiquen un estado “real” de persistencia clamidial en el hospedador, así como los mecanismos moleculares implicados en la inducción, mantenimiento y recuperación de este estado no replicativo de las clamidias, como apuntan Puolakkainen, (2013) y Bavoil, (2014).

Diferentes estudios del estado de persistencia clamidial *in vitro* coinciden en que las bacterias de la familia *Chlamydiaceae* adquieren una estructura distinta a los CE o CR, presentes en un ciclo de desarrollo normal, apareciendo lo que ya se ha definido anteriormente como CA, con apariencia semejante a los CR pero de mayores dimensiones y pleomórficos (*revisado en* Hogan *et al.*, 2004; Wyrick, 2010; Schoborg, 2011) (Figura 4). Además, presentan características de crecimiento alteradas, como incapacidad de diferenciación a CE, inhibición de división por fisión binaria (aunque siguen replicando su cromosoma) y aparición de inclusiones de pequeño tamaño que contienen pocas clamidias. Estos CA son los que permanecerían de forma inactiva en el interior del organismo infectado, pudiendo reactivarse posteriormente. Aunque es difícil detectar estas formas *in vivo*, en algunas especies de clamidia sí se han podido caracterizar, como es el caso de *C. trachomatis* (Phillips y Burillo, 1998) y *C. muridarum* (Phillips Campbell *et al.*, 2012) en cérvix de ratón, *C. suis* en el intestino de cerdos (Pospischil *et al.*, 2009) y *C. pneumoniae* en ateromas coronarios humanos (Borel *et al.*, 2008b).



**Figura 4:** Electronografía de un cultivo clamidial tratado con penicilina. La inclusión intracitoplasmática (flecha) contiene dos cuerpos reticulares anormalmente grandes, compatibles con cuerpos aberrantes (asteriscos). Barra: 5  $\mu\text{m}$ . Imagen cedida por Daniel Álvarez en su tesis doctoral “Influencia de la penicilina y de las hormonas sexuales 17beta-estradiol y progesterona sobre la infección por *Chlamydia abortus* en líneas celulares de endometrio y trofoblasto de origen ovino” defendida en 2018.

Varios estudios *in vitro* indican que existen diferentes sistemas de inducción de estos CA. Así, la adición de determinados antibióticos al medio (como la eritromicina, ampicilina, penicilina o la tetraciclina) puede provocar la imposibilidad de los CE de pasar a CR o viceversa y promueve la aparición de inclusiones en las células infectadas con CA en su interior (Matsumoto y Manire, 1970; Lenart *et al.*, 2001; Knittler y Sachse, 2015). Estos CA desaparecen al suprimir la presencia de antibióticos en el medio, lo cual hace pensar que una inadecuada terapia antimicrobiana en el hospedador puede permitir el mantenimiento de la infección clamidial de forma persistente y asintomática (Hogan *et al.*, 2004; Wyrick, 2010; Carey *et al.*, 2013). Del mismo modo, la falta de nutrientes esenciales en el medio como aminoácidos, glucosa (Harper *et al.*, 2000) o hierro (Raulston, 1997) da lugar a la aparición de formas no replicativas de morfología anormal que desaparecen con la adición al medio del nutriente en cuestión. Una

interesante hipótesis indica que las fluctuaciones de hierro en el organismo, debidas por ejemplo a la influencia del estradiol en el endometrio (Kelter *et al.*, 1996), podrían influir en el mantenimiento de la persistencia intracelular de las clamidias. De hecho, parece ser que las hormonas esteroideas, incluido el estradiol, también pueden influir de forma tangencial en los fenómenos de persistencia clamidial, ya que parece existir una correlación entre los niveles de estas hormonas y de IL-10 durante las infecciones clamidiales (Kaushic *et al.*, 2000; Agrawal *et al.*, 2007, 2009a, 2009b).

Así, varios estudios han demostrado que la exposición de cultivos clamidiales a citoquinas, como el IFN- $\gamma$  y la IL-10, inducen infecciones persistentes (Shemer y Sarov, 1985; Beatty *et al.*, 1993; Summersgill *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 2001).

El mecanismo principal para que se produzca este fenómeno de persistencia en la célula infectada se basa en la capacidad del IFN- $\gamma$  de activar de ciertas enzimas catalíticas como la indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) y la sintetasa de óxido nítrico inducible (iNOS) (Rottenberg *et al.*, 2000). La IDO es una enzima que cataliza la degradación del triptófano, aminoácido esencial para las clamidias. Sin embargo, algunas especies de clamidias parecen ser capaces de generar su propio triptófano o adquirirlo por otro mecanismo, inhibiendo la capacidad microbicida de la IDO (Rottenberg *et al.*, 2002). Por otro lado, la adición de triptófano al medio revierte el estado de persistencia. Otras citoquinas como el TNF- $\alpha$  (Summersgill *et al.*, 1995) y la IL-1 (Carlin y Weller, 1995) ejercen un efecto sinérgico al del IFN- $\gamma$  sobre el crecimiento clamidial. Por último, la IL-10, juega un papel inmunoregulador, aminorando, entre otras cosas, una respuesta Th1 exacerbada antagonizando la acción del IFN- $\gamma$  (Ibana *et al.*, 2011) y limitando la maduración de los fagolisosomas (Coutinho-Silva *et al.*, 2003).

Se han observado formas de persistencia *in vitro* utilizando otros sistemas menos estudiados que los anteriores. Por ejemplo, Koehler *et al.* (1997) observaron como las clamidias adquirían características propias de persistencia (organismos viables pero no cultivables), de forma espontánea, al infectar cultivos primarios de monocitos. También se han observado CR anormalmente grandes en cultivos de *C. psittaci* infectados por bacteriófagos (Hsia *et al.*, 2000) así como subpoblaciones de CA pleomórficos junto a CE y CR normales en cultivos continuos de *C. pneumoniae* no expuestos directamente a agentes estresantes (Kutlin *et al.*, 2001).

### 3.5. Liberación bacteriana

El ciclo de multiplicación finaliza con la lisis de la célula y la liberación de los CE al medio, normalmente a las 48-72 horas tras el comienzo del ciclo, cuando se ha desarrollado una vacuola que contiene cientos de clamidias y ocupa prácticamente todo el citoplasma de la célula hospedadora. El mecanismo de liberación no se conoce aún con exactitud. Se han postulado dos vías independientes que ocurren con la misma frecuencia *in vitro* (Hybiske y Stephens, 2007). Una es la exocitosis lenta de la inclusión, que deja la célula hospedadora intacta; y la segunda es la lisis de la inclusión intracelular seguida de la lisis de la célula hospedadora mediada por proteasas.

## 4. ESTRUCTURA ANTIGÉNICA

Las bacterias de la familia *Chlamydiaceae* comparten una estructura antigénica compuesta por determinantes antigénicos comunes y específicos. Según su naturaleza los podemos dividir en dos grupos: glicolípidos y proteicos.

### 4.1. Antígenos glicolipídicos

#### 4.1.1. Lipopolisacárido (LPS)

El LPS es un componente común en las bacterias Gram negativas. En la cepa AB7 de *C. abortus* se describe en la zona externa de los CR y en la interna de los CE (Salinas *et al.*, 1994), lo que puede explicar que durante la respuesta inmunitaria humoral, los anticuerpos específicos anti-LPS no confieran protección (Sandbulte *et al.*, 1996).

#### 4.1.2. Glicolípido soluble

También denominado “exoantígeno glicolipídico” (GLXA), está implicado en la invasión de células hospedadoras por parte de los CE en la primera fase de la infección clamidial (Vora y Stuart, 2003). Este componente puede estar presente en la membrana bacteriana o liberarse al microambiente celular y expresarse en la superficie de células infectadas facilitando la infección de células vecinas (Webley *et al.*, 2004).

## 4.2. Antígenos proteicos

Al conjunto de proteínas que forman parte de la membrana externa que rodea a los CE se conoce como COMC (que, como se indicó más arriba, es el acrónimo de Chlamydial Outer Membrane Complex). El COMC está formado por una red de proteínas ricas en aminoácidos azufrados unidas entre sí por puentes disulfuro intra e intermoleculares. Esta intrincada red aporta rigidez y escasa permeabilidad a los CE (Hatch, 1996), lo que les confiere estabilidad en el medio externo y cierta resistencia a agentes físico-químicos y a estrés osmótico. Las proteínas estructurales más abundantes del COMC son la MOMP (Major Outer Membrane Protein), que representa el 60% del peso de la membrana externa, las proteínas ricas en cisteína OmcA y OmcB (Caldwell *et al.*, 1981), y las Pmp (proteínas polimórficas de membrana).

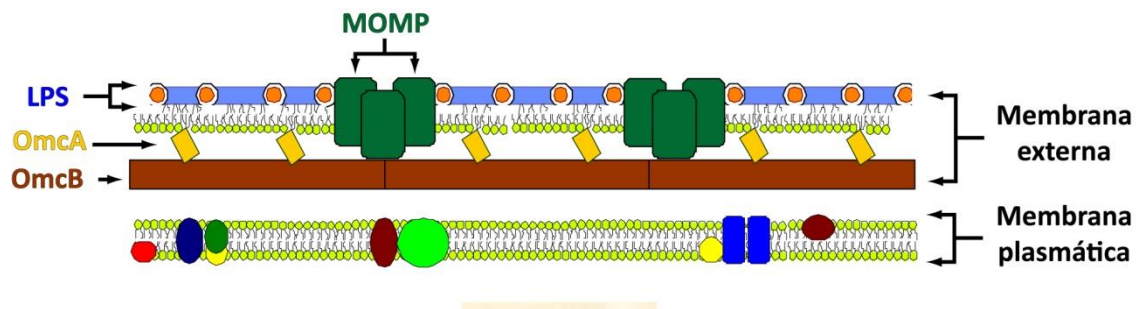
### 4.2.1. Proteína principal de la membrana externa (MOMP)

Esta proteína, ampliamente estudiada, tiene un peso molecular de 38-40 kDa y es la proteína predominante en el COMC. Presenta cinco dominios conservados y cuatro dominios variables que se utilizan para determinar el serotipo dentro de cada especie (Stephens *et al.*, 1987, 1998; Stevens *et al.*, 2010). Algunos de estos dominios están expuestos en la superficie (Figura 5), lo que la hace accesible a los anticuerpos y contienen múltiples epítopos que pueden ser reconocidos por los linfocitos T (péptidos procesados) y B (antígenos nativos). Varios estudios han demostrado su papel inmunógeno por medio de la interacción con estas células, así como mediante la inducción de anticuerpos neutralizantes (Caldwell y Perry, 1982; Baehr *et al.*, 1988; Ortiz *et al.*, 1996; Pal *et al.*, 2005). Las funciones asociadas a la MOMP son muy variadas interviniendo de forma muy diversa en el ciclo vital de la bacteria. Colabora junto a las proteínas ricas en cisteína a mantener la rigidez de los CE (Hatch, 1996), actúa como porina (Bavoil *et al.*, 1984) y también tiene una función adhesina (Swanson and Kuo, 1994; Su *et al.*, 1996). Dadas sus características, hasta la fecha la MOMP es la proteína más adecuada para la formulación de vacunas inactivadas subcelulares y recombinantes (*revisado en Phillips et al.*, 2019).

#### 4.2.2. Proteínas ricas en cisteína

**OmcA**, (Omp3, EnvA, CT444 o Small CRP), es una lipoproteína de menor tamaño con un peso molecular de 12 kDa. Se sabe que no está expuesta en la superficie de los CE, por lo que colabora en la función estructural fijando la proteína Omp3 a la membrana externa (Hatch, 1996).

**OmcB**, conocida también como Omp2, EnvB, CT443 o Large CRP (cysteine-rich protein), es una proteína con un peso molecular de 60 kDa que se encuentra en la membrana externa de los CE. Su transcripción se relaciona estrechamente con el ciclo de desarrollo de la familia *Chlamydiaceae*, puesto que ocurre en el momento de la condensación de los CR en CE (Lambden *et al.*, 1990). Debido a su elevado contenido en aminoácidos azufrados, su función principal es estructural, aunque también se ha postulado una función como adhesina debido a su capacidad de unión a células epiteliales (Ting *et al.*, 1995). Esta proteína también es un potente inmunógeno, lo que la convierte en un marcador útil para estudios serológicos del género *Chlamydia* (Bas *et al.*, 2001).



**Figura 5:** Representación esquemática de la membrana externa clamidial, mostrando la localización de las tres principales proteínas: MOMP, Omp2 y Omp3. Adaptado de Hatch (1996).

#### 4.2.3. Otras proteínas

**Pmp** (Polimorphic membrane proteins): constituyen una familia de proteínas multigénica, con regiones altamente conservadas y de peso molecular cercano a 90 kDa. Las Pmp son un grupo de proteínas autotransportadoras del sistema de secreción Tipo V que se expresan de forma diferente a lo largo del ciclo clamidial (Wheelhouse *et al.*, 2012) y que participan en el proceso de adhesión a la célula hospedadora (Vasilevsky *et al.*, 2016). Una característica de las Pmp es su variabilidad inter e intraespecífica. Las más conservadas en *C. abortus* son Pmp H, D, B y A (Van Lent *et al.*, 2016). Dado su gran poder inmunógeno (Salinas *et*

*al.*, 1995; Vretou *et al.*, 1996) y su exposición en la superficie de la membrana clamidial (Buendia *et al.*, 1997), se han convertido en unas candidatas importantes para el diagnóstico serológico de las infecciones por *C. abortus* (Buendia *et al.*, 2001; Longbottom *et al.*, 2001).

**Hsp** (Heat shock proteins): constituyen un grupo de proteínas con una estructura muy conservada durante la evolución, presentes en todos los organismos, que aparecen como respuesta a situaciones de estrés tales como incrementos de la temperatura y que tienen función chaperona. En las especies clamidiales las cHsp (Chlamydial Heat Shock Proteins) más estudiadas son la cHsp60 y la cHsp70. Estas proteínas intervienen en el transporte, translocación, ensamblaje y plegamiento de proteínas sintetizadas *de novo* (Georgopoulos y Welch, 1993; Srivastava *et al.*, 1998; Zugel y Kaufmann, 1999) y son una de las principales dianas de la respuesta inmunitaria humoral en infecciones por *C. abortus* (Hechard *et al.*, 2004). Asimismo, Kol *et al.* (1999) demostraron que la cHsp60 es capaz de activar a los macrófagos. Se han llevado a cabo experimentos con vacunas de ADN, pero no se han logrado todavía resultados de protección óptimos (Hechard *et al.*, 2003a, 2003b, 2004; Hechard y Grepinet, 2004).

## 5. TRANSMISIÓN, PATOGENIA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA INFECCIÓN POR *C. ABORTUS*

### 5.1. Transmisión

Las clamidias se eliminan principalmente en las secreciones vaginales de animales infectados en los momentos previos y posteriores al aborto y/o parto, así como en las placentas y fluidos presentes tras el mismo. En ganado caprino son más frecuentes las descargas vaginales y comienzan antes que en el caso del ovino (desde dos semanas antes del aborto), lo que explicaría la mayor incidencia de abortos en esta especie (Rodolakis y Laroucau, 2015). Una vez en el medio ambiente, los CE eliminados pueden permanecer viables durante varias semanas o meses (Nietfield, 2001).

El contagio suele producirse por vía oral mediante el lamido o ingesta de restos placentarios. Otra vía de infección es la aerógena, a través de aerosoles presentes en ambientes contaminados (Buxton *et al.*, 1990). También existen otras rutas como son la venérea y a través de la secreción láctea en cabras (Rodolakis *et al.*, 1998).

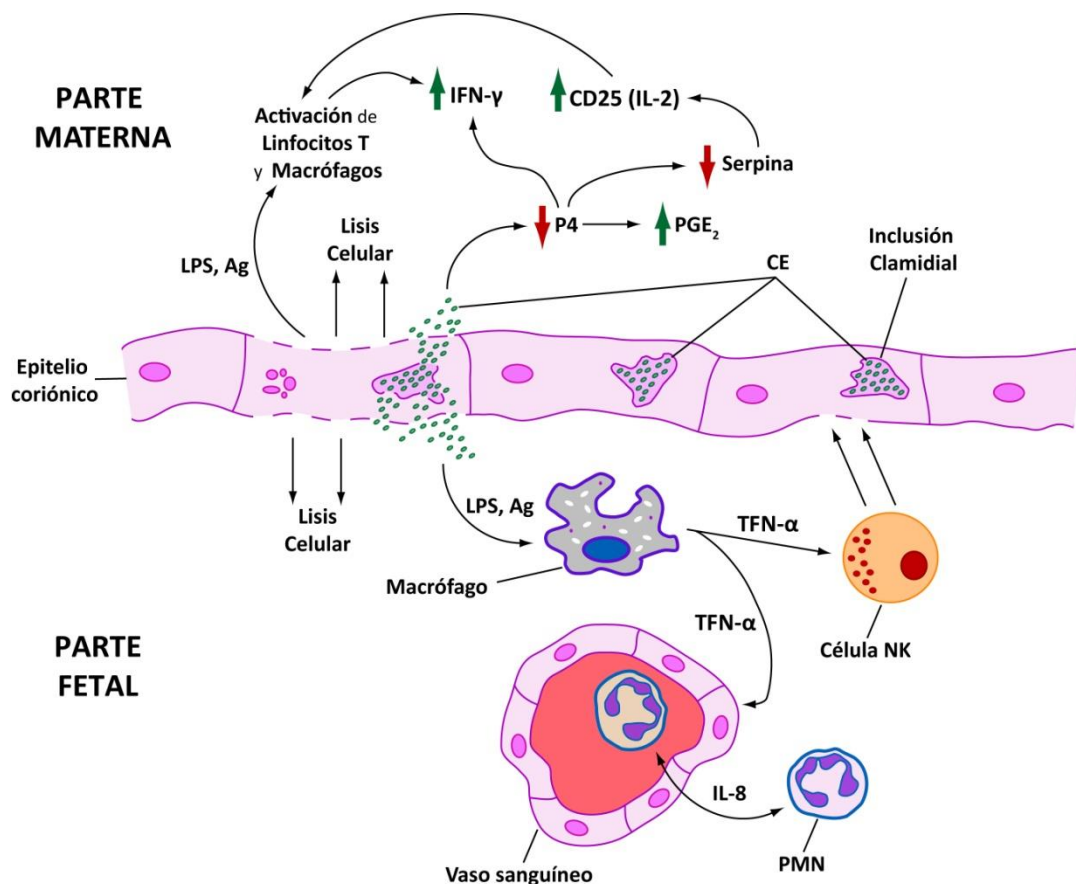
## 5.2. Patogenia y manifestaciones clínicas

Tras la infección oro-nasal, se cree que el microorganismo se establece en los órganos linfoides faríngeos y tras un breve periodo de multiplicación en ellos, se produce la diseminación vía hemolinfática a otros órganos hasta alcanzar la placenta (Nietfield, 2001). Así, el aborto no se producirá en el momento de la infección, permaneciendo las ovejas infectadas como portadoras latentes, hasta que el microorganismo se reactiva en la siguiente gestación. Es en ese momento cuando se produce el aborto, 2 o 3 semanas antes de la fecha estimada de parto, o parto a término de corderos muertos o muy débiles que mueren pocos días después (Aitken, 2000). Las ovejas raramente presentan cuadro clínico y vuelven a ser fértiles tras el aborto. Por el contrario, en la especie caprina resultan frecuentes las retenciones placentarias, endometritis y vaginitis (Rodolakis *et al.*, 1998).

Los cambios patológicos en la placenta, como resultado de la multiplicación de las clamidias, se hacen evidentes a partir de los 90 días de gestación y no antes, hecho que podría estar asociado a cambios hormonales (Leaver *et al.*, 1987). Durante las etapas finales de la gestación (días 125 a 140), la placenta se encuentra masivamente infectada por *C. abortus* y las alteraciones de la unión fetoplacentaria pueden llegar a provocar el aborto. Gracias a las técnicas de inmunocitoquímica, se ha comprobado que la infección placentaria comienza en el lado materno del epitelio coriónico, donde las lesiones producidas por la multiplicación clamidial provocan la lisis celular y la liberación de CE, el LPS clamidial, otros productos microbianos antigénicos y componentes intracelulares, que actúan como señal de alarma activando los macrófagos y los linfocitos T de la cara materna del epitelio coriónico. Como resultado se produce un incremento en la producción de IFN- $\gamma$  (Entrican, 2002).

Posteriormente *C. abortus*, coloniza rápidamente las células del trofoblasto en los placentomas, induciendo una respuesta inflamatoria liderada principalmente por los neutrófilos. La destrucción de las células del corion produce alteraciones en el equilibrio hormonal que pueden desembocar en un brusco descenso de la producción de progesterona y un aumento de los niveles de Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), que eventualmente pueden inducir el parto. Este descenso en la producción de progesterona induce el descenso en la producción de serpina, proteína que regula la proliferación de linfocitos en el útero de la oveja gestante (Peltier *et al.*, 2000). Así, el descenso de serpina, potencia la activación de los linfocitos T que incrementan la producción de IFN- $\gamma$ , lo cual activa a los macrófagos tanto maternos como

fetales, que liberan citoquinas proinflamatorias, como el TNF- $\alpha$ , que activa a las células NK, capaces de atacar a las células del epitelio coriónico infectadas (Entrican, 2002). El TNF- $\alpha$ , también va a provocar la vasoconstricción de los vasos que irrigan la placenta y la liberación de IL-8 por parte del epitelio vascular, causante de fenómenos de trombosis en los vasos afectados. Esto puede provocar lesiones necróticas en las áreas afectadas y el reclutamiento de más neutrófilos hacia el foco de infección (Entrican, 2002) (Figura 6).



**Figura 6. Patogenia del AEO. Acontecimientos ocurridos en el epitelio coriónico materno y fetal.** El daño producido en el epitelio coriónico materno provoca la liberación de los CE, el LPS y otros componentes antigénicos (Ag), que actúan como señal de alarma activando los macrófagos y los linfocitos T. Esto produce un incremento en la producción de IFN- $\gamma$ . Paralelamente la destrucción del epitelio coriónico produce un brusco descenso de la producción de progesterona y un aumento de los niveles de PGE<sub>2</sub>, que pueden inducir el parto. Este descenso de los niveles de progesterona induce el descenso en la producción de la enzima serpina, potenciando la activación de los linfocitos T que incrementan la producción de IFN- $\gamma$ , que activa a los macrófagos. Por el lado fetal, los macrófagos se activan, liberando citoquinas proinflamatorias, como el TNF- $\alpha$  que activa a las células NK, capaces de atacar a las células del epitelio coriónico infectadas. Además, el TNF- $\alpha$  provoca la vasoconstricción de los vasos que irrigan la placenta y la liberación de IL-8 por parte del epitelio vascular, causante de los fenómenos de trombosis que acontecen en los vasos afectados, produciendo, una lesión necrótica en las áreas afectadas, y el reclutamiento de los neutrófilos hacia el foco de infección (Adaptado de Entrican, 2002).

## Revisión Bibliográfica

La placentitis resultante de este proceso puede dar lugar al aborto por distintas causas, siendo una combinación de varias de ellas las causantes del mismo. Por una parte, la inflamación de la barrera placentaria tiene como consecuencia directa una menor eficiencia en el intercambio materno-fetal de gases y nutrientes. Además, la arteritis que se produce en el hilio del placentomo afecta al riego sanguíneo de toda la placenta, pudiendo dar lugar a necrosis. Por otra, la rápida colonización de un gran número de placentomos podría originar la destrucción de las células del trofoblasto y por lo tanto la falta de producción de hormonas placentarias que controlan la gestación, produciéndose los abortos a pesar de la escasa colonización de los fetos por *C. abortus* (Navarro *et al.*, 2004; Sammin *et al.*, 2009). Dicha colonización, aunque escasa, existe, como pone de manifiesto la respuesta inmunitaria fetal temprana (incluso previa a los 90 días de gestación) que describieron (Buxton *et al.*, 1990), si bien estos investigadores no fueron capaces de detectar al microorganismo mediante técnicas inmunocitoquímicas.

La infección induce una respuesta inmunitaria protectora, que protege a las hembras infectadas de abortos sucesivos, aunque sigan excretando *C. abortus* ocasionalmente durante los partos y los estros en los tres años posteriores, favoreciendo de esta manera, el mantenimiento y la diseminación de la enfermedad en el rebaño afectado (Papp *et al.*, 1993; Entrican *et al.*, 1998).

En lo que respecta a las ovejas no gestantes, *C. abortus* es capaz de producir una infección subclínica sin sintomatología aparente, que no estimula una inmunidad protectora, con la consiguiente reactivación y multiplicación del microorganismo durante la siguiente gestación (Longbottom *et al.*, 2013). Como se ha mencionado anteriormente, algunas ovejas infectadas llegan a parir corderos vivos débiles. En los neonatos infectados se han descrito lesiones como neumonía, encefalitis, hepatitis e incluso miocarditis (Miller *et al.*, 1990; Navarro *et al.*, 2004; Longbottom *et al.*, 2013). Esto puede deberse a la inmadurez del sistema inmunitario de estos animales, que sería incapaz de evitar la diseminación del patógeno hacia varios territorios orgánicos (Navarro *et al.*, 2004).

## 6. RESPUESTA INMUNITARIA FRENTE A *C. ABORTUS*

El que los miembros de la familia *Chlamydiaceae*, sean patógenos intracelulares obligados, condiciona el tipo de respuesta inmunitaria. Las clamidias van a poner en marcha mecanismos que les permiten permanecer y multiplicarse en el interior de la célula utilizando la maquinaria metabólica de ésta. Por otro lado, el hospedador debe ser capaz de eliminar las

bacterias “refugiadas” en el interior de las células y así mantener y preservar su integridad morfológica y funcional. Estas interacciones entre el hospedador y el patógeno forman un amplio espectro de mecanismos biológicos conocidos como inmunidad. Las células y moléculas responsables de la inmunidad forman el sistema inmunitario y la respuesta global y coordinada de este sistema es la respuesta inmunitaria, cuya función es proteger al organismo de la invasión y el establecimiento de una infección. Por ello, el éxito del establecimiento de la infección dependerá de la capacidad del hospedador para establecer una respuesta inmunitaria efectiva contra el patógeno. Para estudiar este complejo sistema, la respuesta inmunitaria puede dividirse, desde un punto de vista funcional y de forma teórica en dos clases: respuesta inmunitaria innata, también llamada inespecífica o natural, y adquirida, también llamada específica o adaptativa.

### 6.1. Respuesta inmunitaria innata

La respuesta inmunitaria innata constituye la primera línea de defensa frente a la invasión clamidial, desarrollándose antes que la respuesta adquirida pero de un modo inespecífico, es decir, sin memoria inmunológica. En el desarrollo de la respuesta inmunitaria innata podemos incluir también mecanismos externos de protección, como es la barrera física que supone la piel o el aumento de la temperatura corporal, barreras químicas como la bajada del pH o sustancias antimicrobianas segregadas por el organismo como pueden ser la lisozima o la espermina y barreras biológicas como la microbiota autóctona. Los mecanismos internos de protección van a suponer mecanismos de defensa celular llevados a cabo por células especializadas para tal fin como pueden ser los polimormonucleares neutrófilos (PMN), macrófagos y células NK, a los que se van a sumar la acción de diversos elementos solubles como son el complemento y ciertas citoquinas.

Los **PMN** han sido considerados como el primer filtro defensivo contra la infección, ya que estas células son las primeras en migrar hacia el tejido afectado y tratar de neutralizar al microorganismo. Son los leucocitos mayoritarios en sangre, presentan un núcleo multilobulado característico y presentan gránulos en su citoplasma que no se tiñen con la hematoxilina ni la eosina. Su capacidad defensiva se debe en parte a su rápida movilización, su función fagocítica y a la destrucción de bacterias mediante la liberación de enzimas degradativas. Los PMN tienen la capacidad de liberar gran número de citoquinas inmunomoduladoras, como el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-8 y proteínas inflamatorias de macrófagos (MIP-1 $\alpha$

## Revisión Bibliográfica

(CCL3) y MIP-1 $\beta$  (CCL4)). La importancia de los PMN en la primoinfección frente a bacterias de la familia *Chlamydiaceae* se ha demostrado en estudios *in vitro* (Register *et al.*, 1986), e *in vivo* (Barteneva *et al.*, 1996). Buendia *et al.* (1998) demostraron en un modelo murino gestante el predominio de estas células en placenta durante la infección por *C. abortus* así como su reclutamiento temprano. También sobre un modelo murino gestante infectado con *C. abortus*, se observó, que al deplecionar la población de PMN, los animales presentan una mayor carga bacteriana, se acelera el proceso de aborto y la tasa de mortalidad aumenta (Buendia *et al.*, 1999a). Sin embargo, cuando los animales son infectados por segunda vez con *C. abortus*, el papel de los PMNs es limitado, ya que su ausencia no altera el desarrollo normal de la gestación, aunque afecta a la producción temprana de citoquinas tales como el TNF- $\alpha$  y el IFN- $\gamma$  (Montes de Oca *et al.*, 2000).

Los **Macrófagos** son células fagocíticas que se encuentran presentes en todos los tejidos. De vida prolongada, su función básica consiste en la destrucción de agentes extraños, tanto extracelulares, como células tumorales o infectadas por virus. Participan en procesos de cicatrización y reordenación tisular y además, junto con las células dendríticas, constituyen las células presentadoras de antígeno (CPA) más importantes, funcionando así como intermediarios entre la respuesta innata y la adquirida. Los macrófagos usan reactivos del oxígeno y del nitrógeno, así como proteínas como la lisozima, la lactoferrina o las catepsinas, en el proceso de destrucción de los patógenos dentro del fagosoma. En relación con las infecciones clamidiales, la fagocitosis de estas bacterias por los macrófagos induce la maduración de estos leucocitos y la secreción de IL-12 y TNF- $\alpha$ . La primera de estas citoquinas activa a las células NK para producir IFN- $\gamma$ , que a su vez activa a los macrófagos. Así Ojcius *et al.* (1998) demostraron que los macrófagos infectados con *C. psittaci* pueden fusionar las vacuolas que contienen las bacterias con los lisosomas para favorecer su destrucción, mecanismo que sin embargo se encuentra inhibido en las células epiteliales (Schramm *et al.*, 1996).

Otras células importantes de la respuesta inmunitaria innata son las **células NK**. Éstas se encargan de destruir directamente células infectadas o tumorales por varios mecanismos, por lo que tienen un papel importante en la lucha frente a patógenos intracelulares como las clamidias. Además, son una fuente temprana de IFN- $\gamma$  (Biron *et al.*, 1999), citoquina esencial para controlar la multiplicación clamidial, incluida la especie *C. abortus* (Del Rio *et al.*, 2001). Se ha comprobado que la depleción de esta población celular en animales infectados con *C. abortus* provoca un aumento de la susceptibilidad del animal, con una mayor morbilidad y carga bacteriana en hígado y una disminución sustancial en la concentración de IFN- $\gamma$  en suero (Buendia *et al.*, 2004).

## 6.2. Respuesta inmunitaria adquirida

La respuesta inmunitaria específica se activa cuando los mecanismos inmunitarios innatos no son suficientes para detener la infección. Es una respuesta antígeno-específica, con mecanismos efectores adecuados a cada ocasión y que establece memoria inmunológica, de modo que exposiciones repetidas al mismo antígeno (Ag), provocan una respuesta de mayor rapidez, intensidad y eficacia.

Existen dos tipos de respuesta adquirida: la respuesta humoral, mediada por los anticuerpos (Ac) secretados por las células plasmáticas derivadas a su vez de los linfocitos B; y la respuesta celular, en la que intervienen mayoritariamente los linfocitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>). El que se lleve a cabo una u otra dependerá del espectro de citoquinas secretadas por los linfocitos T *helper* o colaboradores (Th o CD4<sup>+</sup>), activados tras reconocer el determinante antigénico procesado y presentado por las células presentadoras de antígeno (CPA), como las células dendríticas, macrófagos y linfocitos B. Así, en la respuesta inmunitaria humoral juegan un papel predominante los linfocitos Th2, mientras que en la respuesta celular son esenciales los Th1.

En el caso de los patógenos intracelulares como *C. abortus*, la respuesta inmunitaria protectora será principalmente de tipo celular, jugando la humoral un papel relevante en la prevención y/o resolución de las reinfecciones.

### 6.2.1. Respuesta inmunitaria celular

Cuando las CPA, vía Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo II (CMH II), presentan péptidos clamidiales a los linfocitos Th (CD4<sup>+</sup>), estos se activan diferenciándose en células Th1 mediante un mecanismo mediado por la IL-12. Los linfocitos Th1 polarizan la respuesta inmunitaria hacia una respuesta del tipo celular gracias a la liberación de citoquinas, principalmente IL-2 e IFN- $\gamma$ , lo que es esencial para una protección frente a patógenos intracelulares.

En el caso de *C. abortus*, estudios llevados a cabo *in vitro* (Lammert, 1982) y posteriormente confirmados *in vivo* (Buzoni-Gatel *et al.*, 1992), demostraron que, aunque los linfocitos T CD4<sup>+</sup> son las células predominantes en el foco inflamatorio, son las células CD8<sup>+</sup> las

## Revisión Bibliográfica

encargadas del establecimiento de una respuesta inmunitaria eficaz, jugando las CD4<sup>+</sup> un papel limitado en la resolución de la infección. El hecho de que la resolución de la infección utilizando dos cepas de *C. abortus* de diferente grado de virulencia sea más rápida en el caso de la cepa con la que se produce una respuesta más intensa de CD8<sup>+</sup> corrobora esta teoría (Buendia *et al.*, 1999b).

Cuando Montes de Oca *et al.* (2000) estudiaron el papel de los PMN en la respuesta inmunitaria específica frente a *C. abortus*, observaron que esta población celular participaba en el reclutamiento hacia el foco inflamatorio de linfocitos CD8<sup>+</sup>, lo cual se correlaciona con una resolución más rápida de la infección, mientras que la presencia de los PMN no parecían influir en los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Siguiendo en esta línea, Del Río *et al.* (2000) sugieren que la respuesta a una infección primaria frente a *C. abortus* no depende fundamentalmente de una respuesta Th1, sino que parece estar atribuida a un rápido establecimiento de la respuesta inmunitaria innata y a un mayor reclutamiento de linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Este tipo de respuesta celular es parcialmente independiente de la producción de IL-12 y fuertemente dependiente de la producción de IFN- $\gamma$ .

Varios estudios han demostrado que una población de linfocitos llamados linfocitos T reguladores (Treg), son capaces de atenuar la respuesta inmunitaria celular y tienen un papel supresor en la inmunidad innata, previniendo una respuesta inmunitaria excesiva, que podría generar un daño tisular grave con el consecuente aumento de la morbilidad y el cuadro patológico (Antunes y Kassiotis, 2010; Hou *et al.*, 2015). Otras líneas de investigación en modelos murinos sugieren que los Treg pueden ser utilizados por diversos patógenos intracelulares con el objetivo de inmunosuprimir al hospedador y así potenciar su propia supervivencia (Rodrigues *et al.*, 2009; Meng *et al.*, 2014). Los linfocitos Treg se caracterizan por la expresión del correceptor T CD4 y la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2, CD25. Una característica distintiva de estas células es la expresión del factor de transcripción Forkhead box P3 (FoxP3) el cual es ampliamente utilizado en técnicas inmunocitoquímicas como marcador de esta población leucocitaria (Peterson, 2012).

### 6.2.2. Respuesta inmunitaria humoral

Las células plasmáticas son las células efectoras de este tipo de respuesta inmunitaria. Se originan por la diferenciación de los linfocitos B, tras entrar en contacto con el Ag nativo y cooperar con los linfocitos Th. Una vez diferenciados pueden sintetizar gran cantidad de Ac, cuyo isotipo dependerá de la respuesta que predomine. Así, una respuesta de tipo Th1 promueve la

secreción de Ac IgG2a, fijadores del complemento, mientras que en la respuesta Th2 se intensifica la producción de IgG1, anticuerpo neutralizante, IgA e IgE.

Algunos autores, mediante estudios *in vitro*, han demostrado que los Ac son capaces de neutralizar la infección por *C. abortus* (de Sa *et al.*, 1995). Esta neutralización se produce *in vitro* tanto en presencia del complemento, como en ausencia de éste (Lucero y Kuo, 1985; Peterson *et al.*, 1993). También se ha observado que los Ac bloquean la adhesión del microorganismo a la célula hospedadora (Su y Caldwell, 1991) y que pueden permitir la internalización de las clamidias pero inhibiendo su replicación (Caldwell y Perry, 1982), impidiendo así la infección en ambos casos.

Varias líneas de investigación apuntan a que el desarrollo de un adecuado ambiente inmunológico durante la activación de los linfocitos T (como la presencia de IL-12), así como la presencia de anticuerpos específicos (IgG2a e IgA), facilita y acelera el desarrollo de una respuesta protectora contra microorganismos intracelulares, por parte de los linfocitos T (Igietseme *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 2003). De hecho, estos anticuerpos específicos, junto con la IL-12, facilitan la rápida penetración, procesamiento y presentación de los antígenos microbianos por parte de las APC, lo que activa una potente respuesta Th1, que en ocasiones causa importantes lesiones en los tejidos. Estudios llevados a cabo con ratones  $\mu$ MT, carentes de linfocitos B maduros, sugieren un papel inmunorregulador de estas células en los estadios tempranos de la infección primaria, ya que estas células son capaces de proteger al animal de una respuesta inflamatoria exacerbada (Buendia *et al.*, 2002, 2009).

### 6.2.3. Respuesta inmunitaria de memoria

Tras la infección por *C. abortus* se establece una inmunidad de memoria eficaz y protectora que hace que los animales que hayan abortado por esta enfermedad, no vuelvan a abortar por la misma causa (Rodolakis y Souriau, 1980). Sin embargo, no se han descrito con precisión los mecanismos inmunitarios que se llevan a cabo en el hospedador durante la reinfección. Montes de Oca *et al.* (2000b) han referido que el papel de los PMN durante la resolución de la infección secundaria no es tan importante como en una primoinfección, así como que los niveles de IFN- $\gamma$  son notablemente inferiores en las infecciones secundarias. Por otro lado, tanto los linfocitos T como los B, durante el periodo de división y diferenciación necesario para ser activos frente a un Ag determinado, son capaces de diferenciar una población de células de memoria. Así se forma una reserva de linfocitos sensibles al Ag que son capaces

## Revisión Bibliográfica

de reaccionar más rápidamente ante una segunda exposición al mismo. En este sentido, se ha visto que el papel de los linfocitos B de memoria y especialmente, la presencia de Ac específicos, es crucial en evitar las reinfecciones por *C. abortus* (Buendia *et al.*, 2002, 2009).

En otras especies de clamidia, como en el caso de *C. trachomatis*, se sabe que la resistencia a la reinfección es altamente dependiente de los linfocitos B, probablemente en combinación con los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Morrison *et al.*, 2000; Morrison y Morrison, 2001) mientras que el papel de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> es muy limitado. Williams *et al.* (1997) mostraron el importante papel de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> ante una reinfección con *C. trachomatis*, ya que en ausencia de estas células, el IFN- $\gamma$  juega un papel marginal en el control de la reinfección, por lo que se afirma que el TNF- $\alpha$  es más importante que el IFN- $\gamma$ . De hecho, en este trabajo, el TNF- $\alpha$  se describe como la citoquina clave para la resolución de la reinfección.

En el caso de *C. abortus* se ha visto que la presencia de IFN- $\gamma$  es menor durante la reinfección que durante la primoinfección (Montes de Oca *et al.*, 2000b). Igualmente, estos autores han descrito que, a pesar de que los PMN constituyen la primera línea defensiva durante la primoinfección, estas células no son esenciales en la resolución de una reinfección, ya que su ausencia no alteró el curso normal de la gestación. En este mismo trabajo se observa una rápida migración de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> a los focos infecciosos, si bien aún no se ha esclarecido cuál es su función, así como la de las citoquinas IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  durante la infección secundaria por *C. abortus*.

### 6.3. Citoquinas

Las citoquinas son un grupo heterogéneo de proteínas responsables de la comunicación entre las células del sistema inmunitario, entre otras funciones. A continuación se describen algunas citoquinas conocidas que juegan un papel relevante durante el desarrollo de la infección por *C. abortus*.

El **IFN- $\gamma$**  es una de las citoquinas que se encuentran en mayor cantidad durante las primeras fases de la infección clamidial, siendo crucial para el control de sus infecciones (Brown y Entrican, 1996). Se ha demostrado que juega un papel esencial en la defensa contra numerosos patógenos intracelulares, incluyendo bacterias y hongos (Elahi *et al.*, 2000; Bregenholt *et al.*, 2001), aunque tiene un papel limitado en la respuesta frente a ciertos virus (van Den Broek *et al.*, 2000).

Su capacidad clamidiostática ha sido descrita *in vitro*, donde el IFN- $\gamma$  induce cuerpos aberrantes, no infecciosos, incapaces de replicarse (Byrne y Krueger, 1983; Beatty *et al.*, 1993). Este efecto inhibitor puede ser revertido al añadir triptófano al cultivo (Graham *et al.*, 1995). Por otra parte, su actividad clamidiostática *in vivo* fue estudiada por Williams *et al.* (1988), y ha sido avalada por otros (Rank *et al.*, 1992; Igietseme *et al.*, 1993) y se basa en la activación de ciertas enzimas catalíticas como la indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) y la sintetasa de óxido nítrico inducible (iNOS) (Rottenberg *et al.*, 2000). La IDO es una enzima que cataliza la degradación del triptófano, aminoácido esencial para las clamidias. Sin embargo, algunas especies de clamidias parecen ser capaces de adquirir o generar su propio triptófano, inhibiendo la capacidad microbicida de la IDO (Rottenberg *et al.*, 2002). Un estudio con ratones infectados con *C. abortus* sugiere que los altos niveles de IFN- $\gamma$  detectados en el organismo durante los primeros días de la infección, controlan la dispersión de las clamidias hasta la llegada de otras subpoblaciones leucocitarias, como los linfocitos T CD8<sup>+</sup> al foco inflamatorio (Montes de Oca *et al.*, 2000a). No obstante, no se han realizado estudios funcionales con esta citoquina, por lo que todavía no se conoce con exactitud cómo se establece el balance necesario entre una producción suficiente de IFN- $\gamma$  que proteja contra la infección y que al mismo tiempo no produzca una respuesta inflamatoria que pueda ser perjudicial para el organismo. En este sentido, se ha comprobado que altas concentraciones de IFN- $\gamma$  resultan citotóxicas (Yui *et al.*, 1994), por lo que en animales gestantes, la presencia de esta citoquina en la placenta controla el crecimiento de *C. abortus*, pero por otro lado lesiona el trofoblasto placentario, lo que provocaría el aborto (Kerr *et al.*, 2010).

Como ya se ha mencionado anteriormente, el IFN- $\gamma$  ha sido relacionado con un estado de persistencia clamidial. Así, estudios *in vitro*, demuestran que la exposición a bajas dosis de IFN- $\gamma$ , promueve la aparición de CA, relacionadas con las infecciones persistentes. La activación de la IDO y la depleción de triptófano que ésta provoca, parece ser uno de los mecanismos principales por los cuales el IFN- $\gamma$  participa en la aparición de formas de persistencia clamidial (Beatty *et al.*, 1994; Hogan *et al.*, 2004). En un estudio de infección de células ovinas con *C. abortus*, Brown *et al.* (2001) describieron cómo la actividad del IFN- $\gamma$ , junto con una alta disponibilidad de triptófano, puede evitar la persistencia de infecciones latentes, aunque también en este estudio se describió que la actividad bacteriostática del IFN- $\gamma$  está directamente relacionada con la dosis de citoquina presente en el cultivo.

Por otro lado, la **iNOS** es otra enzima secretada por los macrófagos activados por el IFN- $\gamma$  (MacMicking *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2002). Esta enzima media en la producción de óxido nítrico (NO), una molécula altamente microbicida secretado por los macrófagos (Beatty *et al.*,

## Revisión Bibliográfica

1994; Woods *et al.*, 1994; Igietseme, 1996). Varios estudios sugieren que la iNOS es más importante que la IDO durante la infección clamidial (de la Maza *et al.*, 1985; Igietseme, 1996). Sin embargo, en estudios *in vitro* usando varias especies de clamidias, se comprobó que altas concentraciones de NO secretado por la acción de la iNOS, producen la inhibición de la producción de IL-12 por parte de los macrófagos, la inmunosupresión de la respuesta Th1 (MacMicking *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2002) y una respuesta inflamatoria anormal con daño celular (van der Veen, 2001). Así pues, una correcta modulación de la iNOS es importante para lograr una óptima inmunidad protectora y reducir los posibles efectos dañinos causados por el NO durante la infección clamidial (Huang *et al.*, 2002).

El **TNF- $\alpha$**  es una citoquina polimérica derivada de macrófagos y linfocitos T, miembro de una gran familia de proteínas involucradas en la regulación inmunitaria y la inflamación. La producción de esta citoquina tiene especial importancia dado que sirve de señal de alarma para la activación de las células de la inmunidad específica. Media la mayoría de las funciones inmunitarias e inflamatorias y regula el crecimiento de un gran número de tipos celulares. Activa a los macrófagos para incrementar su producción junto con la de IL-1, IL-6, M-CSF y GM-CSF. Es sintetizada por los macrófagos en respuesta a una activación directa, por el LPS bacteriano, o indirecta, por la acción de los linfocitos T (Th) (Jablonska *et al.*, 1999). Tiene la capacidad de atraer al foco inflamatorio PMN y células NK productoras de IL-12 y es responsable, junto con el IFN- $\gamma$ , de dirigir la respuesta inmunitaria específica de tipo celular (Th1) (Perry *et al.*, 1997).

Buendia *et al.* (1999b) sugieren que el TNF- $\alpha$ , producido por los macrófagos activados, puede actuar junto con los linfocitos T CD8<sup>+</sup> en la resolución de la infección clamidial. De hecho, comparando la respuesta inmunitaria frente a dos cepas de distinta virulencia de *C. abortus*, se observó una producción temprana de TNF- $\alpha$  en suero de los animales infectados con la cepa menos virulenta, que son los que resuelven antes la infección.

Al tratarse de una citoquina proinflamatoria, también se le ha asociado un cierto papel en la patogénesis de la infección en animales gestantes, donde parece contribuir al daño placentario, causa principal del aborto (Buxton *et al.*, 2002). En otros estudios, Mjihdi *et al.* (2004) proponen que la producción sistémica y placentaria de TNF- $\alpha$  se halla asociada al aborto, tras la infección con *T. cruzi*.

La **IL-4** es secretada por los linfocitos T activados, mastocitos y basófilos, desempeñando numerosas funciones en la regulación del sistema inmunitario. Entre estas se halla el favorecer el crecimiento de los linfocitos B y el incrementar la expresión en superficie

del CMH-II y del marcador CD23 de los linfocitos B (revisado en Takeda *et al.*, 1997). Además, la IL-4 juega un papel fundamental en el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas. Así, por ejemplo, promueve el cambio de la IgG1 a IgE (Coffman *et al.*, 1993). Se sabe que la producción de citoquinas implicadas en la respuesta Th2 no se activa en ratones deficientes para IL-4 infectados con *Nippostrongylus brasiliensis* (parásito helminto ampliamente utilizado como modelo experimental para inducir respuestas de tipo Th2), demostrando que es crucial para la diferenciación de las células de la respuesta Th2 (Kopf *et al.*, 1993). La IL-4, por tanto, destaca por su papel en la regulación de las respuestas inmunitarias. En el caso de la familia *Chlamydiaceae* parece tener un papel más acusado en el caso de una reinfección (Williams *et al.*, 1997), siendo su producción baja o inexistente en una infección primaria donde se desarrollan respuestas de tipo celular (Th1). Sin embargo, en infecciones por *C. abortus* la podemos detectar en fases avanzadas, donde podría desempeñar un papel regulador de una excesiva respuesta Th1 (Del Rio *et al.*, 2000).

La **IL-6** es una glucoproteína secretada por macrófagos, linfocitos, mastocitos, células endoteliales, queratinocitos y fibroblastos, cuya liberación está inducida por la IL-1 y se incrementa en respuesta a TNF- $\alpha$  (Van Snick, 1990). Tiene actividad pirogénica y regula muchos aspectos de la respuesta inmunitaria, entre ellos la activación de los macrófagos, el desarrollo y diferenciación de linfocitos B, activación de los linfocitos T citotóxicos y células plasmáticas, modula la hematopoyesis y es la responsable, junto con la IL-1, de la síntesis de proteínas de fase aguda hepática, en especial fibrinógeno (Van Snick, 1990; Kopf *et al.*, 1994). Se ha comprobado que la producción temprana de IL-6 puede prevenir respuestas inmunitarias dependientes de IFN- $\gamma$  exacerbadas (Croker *et al.*, 2003). Esto es importante en la patogenia de las infecciones clamidiales, ya que podría explicar muchos aspectos de la fisiopatología de esta enfermedad que todavía necesitan estudios más profundos para su total comprensión (Entrican *et al.*, 2004).

La **IL-10** es una de las principales citoquinas antiinflamatorias. Esta citoquina es secretada por células implicadas en la respuesta inmunitaria tales como macrófagos, células dendríticas y linfocitos B y T (tanto CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>) (Moore *et al.*, 2003; Kamanaka *et al.*, 2006). La IL-10 regula el equilibrio entre las respuestas Th1 y Th2, modulando la actividad de los linfocitos B, células NK, macrófagos y células dendríticas (Sabat *et al.*, 2010; Scapini *et al.*, 2011). Se sabe que esta citoquina suprime la expresión de varias moléculas proinflamatorias involucradas en la respuesta inmunitaria frente a las infecciones clamidiales (Igietseme *et al.*, 2000). Varios estudios revelan que esta citoquina es capaz de inhibir la secreción de IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-6, IL-18 y TNF- $\alpha$  (Powrie *et al.*, 1993; Yilma *et al.*, 2012), así como la actividad de los

## Revisión Bibliográfica

macrófagos (Powrie *et al.*, 1993; Moore *et al.*, 2002; Couper *et al.*, 2008a, 2008b; Yilma *et al.*, 2012). Esta inhibición de los macrófagos y de la respuesta Th1 permite el establecimiento de una respuesta Th2 que protege al hospedador de una excesiva respuesta inflamatoria (Buendia *et al.*, 2009). Así pues, el momento de la infección en que la IL-10 lleva a cabo su actividad reguladora es la clave para el establecimiento de una respuesta inmunitaria protectora. Varios estudios demuestran que es durante las primeras fases de la infección cuando la IL-10 tiene más influencia sobre este hecho (Xin *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2009).

Parece ser que ciertos antígenos clamidiales, tales como la MOMP, están asociados a la producción de IL-10 (Vats *et al.*, 2007; Azenabor *et al.*, 2011; Bermudez-Fajardo *et al.*, 2011). De hecho, varios estudios demuestran que la expresión de IL-10 se incrementa durante la infección clamidial (Han *et al.*, 2006; Rizzo *et al.*, 2008; Azenabor y York, 2010), lo que parece estar asociado con la aparición de infecciones crónicas como apuntan algunos autores en modelos murinos (del Rio *et al.*, 2013, 2018). Yang *et al.* (1996), usando un modelo *in vivo* de infección por *C. trachomatis*, observaron que la neutralización de esta citoquina incrementa la respuesta Th1 y se ha comprobado, que animales deficientes en esta citoquina son más resistentes a la infección clamidial (Igietseme *et al.*, 2000). Sin embargo, estos animales son muy propensos a desarrollar una respuesta inmunitaria con alto grado de destrucción celular y tisular (Penttila *et al.*, 2008). Algunos estudios *in vitro* sugieren la existencia de varias rutas por las cuales la IL-10 puede favorecer la aparición de formas de persistencia clamidial. Una de ellas es la limitación de la maduración de los fagolisosomas, demostrada por Coutinho-Silva *et al.* (2003) en un modelo de infección *in vitro* por *C. trachomatis*.

Por otro lado, como se ha mencionado anteriormente, la IL-10 es capaz de inhibir la secreción de IFN- $\gamma$ . Ibanez *et al.* (2011), en otro modelo de infección *in vitro* por *C. trachomatis*, observaron que la inhibición en la producción del IFN- $\gamma$ , inhibe a su vez la acción de laIDO y por tanto, la depleción de triptófano que ésta produce, contribuyendo en la aparición de formas de persistencia clamidial. Por último, cabe destacar que las hormonas esteroideas, incluido el 17 $\beta$ -estradiol, también pueden mediar en los fenómenos de persistencia clamidial a través de la IL-10, ya que parece existir una correlación entre los niveles de estas hormonas y esta citoquina durante las infecciones producidas por *C. trachomatis* (Kaushic *et al.*, 2000; Agrawal *et al.*, 2007; Agrawal *et al.*, 2009a, 2009b).

En el caso de las infecciones por *C. abortus*, existen varios estudios en modelos murinos que sugieren que después de una elevada producción de IL-10, la presencia de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en suero y el número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en los focos de infección del hígado y bazo disminuyen

(Buendia *et al.*, 1999b; Del Rio *et al.*, 2000). En un estudio reciente, se ha demostrado que la mayor susceptibilidad de la cepa CBA de ratones a la infección por *C. abortus*, expresada ésta en una mayor colonización de bacterias en la placenta y mayor excreción de bacterias vivas tras el parto, estuvo asociada con un mayor nivel de expresión local de IL-10 en la placenta (del Rio *et al.*, 2013). Con posterioridad, Del Rio *et al.* (2018), en un modelo de infección crónica por *C. abortus* utilizando ratones transgénicos con sobreexpresión de IL-10, demostraron que estos ratones mostraban una respuesta inflamatoria moderada a *C. abortus*, compatible con una infección más prolongada dentro de los tejidos, permitiendo el establecimiento de una infección a largo plazo en estos ratones. Esto relaciona a esta citoquina con el establecimiento de infecciones persistentes/crónicas por *C. abortus*. De hecho, la sobreexpresión de la IL-10 en ratones transgénicos permite la supervivencia en macrófagos de otros patógenos como *Leishmania major*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium avium*, o la cronicidad de la infección por *Coxiella burnetii* (Groux *et al.*, 1999; Feng *et al.*, 2002; Meghari *et al.*, 2008).

La **IL-12** es una citoquina heterodimérica producida fundamentalmente por células fagocíticas y células dendríticas en infecciones producidas por patógenos intracelulares, tanto bacterias (Kincy-Cain *et al.*, 1996) como hongos y protozoos (Gazzinelli *et al.*, 1994; Decken *et al.*, 1998). Se ha demostrado también que esta citoquina incrementa la actividad citolítica de las NK y los linfocitos T, así como dirige la diferenciación de la respuesta inmunitaria hacia una respuesta Th1, induciendo la producción de IFN- $\gamma$  y otras citoquinas proinflamatorias (Macatonia *et al.*, 1995; Trinchieri, 1995). La neutralización de IL-12 en un modelo de infección genital por *C. trachomatis* demostró la funcionalidad de esta citoquina como promotora de una respuesta Th1. De esta forma, su ausencia se asoció a una disminución de la secreción de IFN- $\gamma$ , mientras que hubo un incremento en la producción de citoquinas propias de una respuesta Th2, como la IL-4 (Perry *et al.*, 1997). En otros modelos experimentales murinos utilizando también *C. trachomatis*, así como *C. pneumoniae*, esta respuesta se ha definido, al menos en parte, como dependiente de la IL-12 (Lu y Zhong, 1999; Geng *et al.*, 2000). Respecto a *C. abortus*, el tratamiento con IL-12 exógena confiere protección inmediata y a largo plazo en ratones susceptibles BALB/c infectados intranasalmente (Huang *et al.*, 1999). Por otro lado, Buendia *et al.* (1999b) demostraron que la IL-12 se produce en fases tempranas de la infección por *C. abortus*. Sin embargo, Del Rio *et al.* (2001) sugirieron que esta citoquina no es esencial para el establecimiento de una respuesta del hospedador para controlar la infección por *C. abortus*, pudiendo estar involucrada en la patología asociada con la infección, ya que su papel puede ser suplido por otras citoquinas como la IL-18. Este papel ambiguo de la IL-12 encaja con lo observado en otros estudios con otros patógenos, ya que se la ha visto relacionada con

## Revisión Bibliográfica

fenómenos de inmunopatogeneidad en infecciones por *Leishmania* (Satoskar *et al.*, 2000) y *Plasmodium* (Yoshimoto *et al.*, 1998). En otros casos, en infecciones por ciertos virus, la respuesta Th1 se establece incluso en ausencia de la IL-12, y la producción de IFN- $\gamma$  e IgG2a no se ve afectada por la falta de esta citoquina (Oxenius *et al.*, 1999).

El **RANTES**, también llamado CCL5, es una proteína de 8 kDa clasificada como citoquina quimiotáctica o quimioquina. Es quimiotáctico para linfocitos T, eosinófilos y basófilos, presente en estas células así como en mastocitos, plaquetas, células epiteliales, células endoteliales y fibroblastos. Esta quimioquina juega un papel activo en el reclutamiento de leucocitos en los focos inflamatorios. También se ha visto que aumenta la adherencia de los monocitos a las células endoteliales, activa a los basófilos, regulando la liberación de histamina (Schall *et al.*, 1990; Alam *et al.*, 1992; Kuna *et al.*, 1992) y es un potente activador del metabolismo oxidativo específico de los eosinófilos, asociado a un estado de activación celular generalizada, asociadas a procesos como el asma o la rinitis alérgica (Alam *et al.*, 1993). Se ha comprobado que el RANTES, junto a la IL-2 y el IFN- $\gamma$  secretadas por los linfocitos T, también induce la proliferación y activación de las células NK para formar células CHAK, del inglés "CC-Chemokine-activated killer" (Maghazachi *et al.*, 1996).

Buckner *et al.* (2013), en un modelo *in vitro* de infección por *C. trachomatis*, comprobaron que esta bacteria es capaz de disminuir significativamente la secreción de RANTES. Esto podría implicar que *C. trachomatis* impide la migración de linfocitos T, células NK y otras células de la respuesta inmunitaria necesarias para la eliminación clamidial, constituyendo uno de los mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria desarrollado por las clamidias.

El **MIP-2**, también llamado CXCL2 es una quimioquina de 6 kDa secretada por monocitos y macrófagos, siendo quimiotáctica para los leucocitos polimorfonucleares (PMN), linfocitos y las células madre hematopoyéticas (Wolpe *et al.*, 1989; Iida y Grotendorst, 1990; Ohtsuka *et al.*, 2001; Pelus y Fukuda, 2006). El MIP-2 moviliza las células interactuando con un receptor de quimioquina de la superficie de la célula llamado CXCR2 (Pelus y Fukuda, 2006). Participa en la cicatrización de heridas, la metástasis del cáncer y la angiogénesis, en la migración de las células del músculo liso de las vías respiratorias, desempeñando un papel importante en el asma (Al-Alwan *et al.*, 2013) y está asociado con la formación de tejido linfático ectópico (Turhan *et al.*, 2009).

Se ha comprobado la producción de MIP-2 tras la infección *C. pneumoniae*, tanto en los pulmones de ratones infectados experimentalmente, como en condiciones *in vitro* utilizando

líneas celulares epiteliales pulmonares, en respuesta tanto a la propia infección por *C. pneumoniae*, como a un análogo del LPS de esta especie de clamidia (Fitch *et al.*, 2010). En estudios recientes utilizando la misma especie clamidial, se ha visto que esta quimioquina es secretada al inicio de la infección (Edvinsson *et al.*, 2017a, 2017b), lo cual se correlaciona con el reclutamiento temprano de neutrófilos observado en la infección por *C. abortus* (Buendia *et al.*, 1998).

## 7. ESTEROIDES SEXUALES DE LA HEMBRA

### 7.1. Generalidades y mecanismos de acción

Los esteroides sexuales, también conocidos como esteroides gonadales, son hormonas esteroides que interactúan con los receptores androgénicos o estrogénicos de los animales vertebrados controlando así sus procesos reproductivos. La estructura molecular de estas hormonas deriva del núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno, formado por cuatro anillos hidrocarbonados fusionados (Bentley, 2001). Este es el esqueleto químico base del colesterol, molécula a partir de la cual se sintetizan todas las hormonas esteroideas a través de una serie de reacciones enzimáticas que producen moléculas muy parecidas estructuralmente, pero con actividades biológicas significativamente distintas (Walters, 2007).

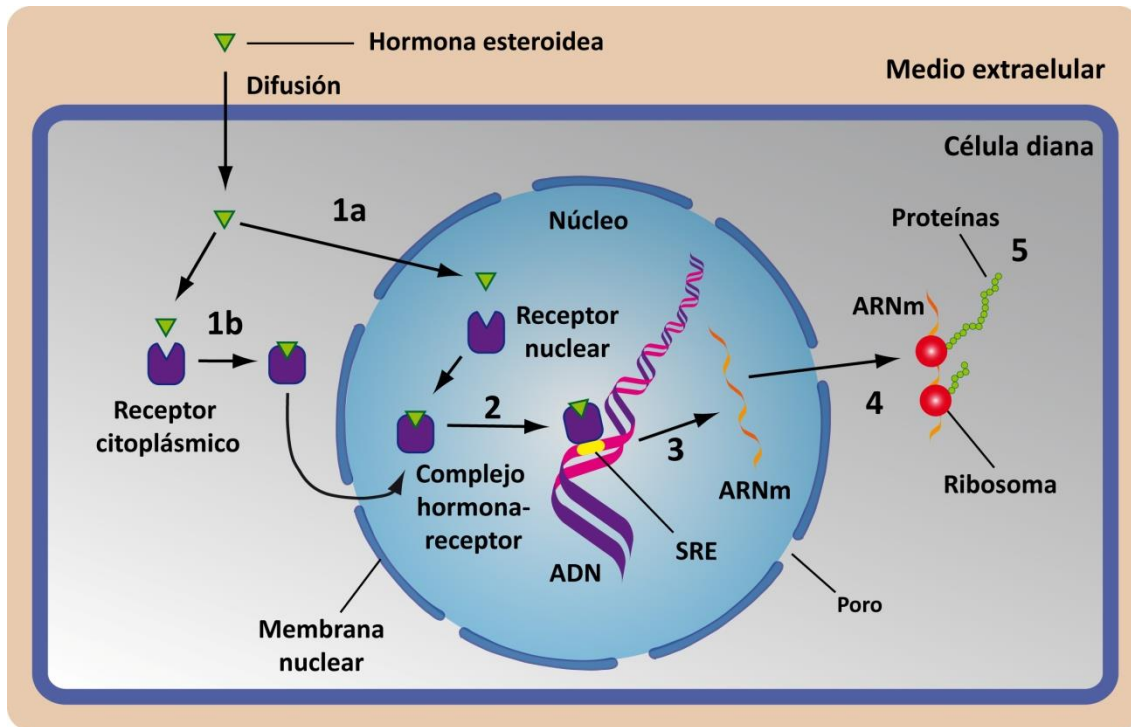
A lo largo de la vida reproductiva de la hembra, los ovarios ejercen principalmente las funciones de crecimiento y maduración de los ovocitos en los folículos y la secreción de hormonas, como el estradiol, la progesterona, la inhibina, la testosterona, la oxitocina y la relaxina. De entre ellas, los esteroides femeninos (estradiol y progesterona), se encuentran entre las hormonas bioquímicamente más activas del sistema reproductor. Su producción está regulada por las gonadotropinas adenohipofisarias LH y FSH, que a su vez están reguladas por señales del sistema nervioso y por las propias hormonas ováricas estableciéndose relaciones de retroalimentación entre ellas.

Las hormonas esteroideas ováricas actúan de forma autocrina, paracrina y endocrina. Pese a que su función más notoria es la de coordinar todos los procesos involucrados en la reproducción, sus actividades se extienden a numerosos órganos y sistemas como cerebro, hígado, riñón, pulmón, sistema inmunitario, sistema cardiovascular y aparato locomotor (Bentley, 2001). Los esteroides son transportados en sangre unidos a albúmina o a proteínas transportadoras específicas, dada a su naturaleza lipofílica. Una vez que alcanzan el tejido diana,

## Revisión Bibliográfica

atravesan la membrana celular por difusión pasiva para unirse a sus receptores que forman complejos macromoleculares con otras proteínas. Estos complejos receptores pueden hallarse en el citoplasma o en el núcleo de las células. Una vez el esteroide se une a su receptor se produce el complejo activo. El complejo esteroide-receptor activado es fosforilado y se unirá a una secuencia específica de ADN cromosómico conocida como elemento de respuesta a esteroides (SRE), localizado en la región reguladora de genes que son regulados por hormonas (Guerriero, 2009). Este ligando interactúa con el complejo de iniciación de la transcripción y modifica la estructura de la cromatina, para así regular la expresión génica mediante la activación o represión de la síntesis de ARNm, lo que se traducirá en una mayor o menor síntesis de proteínas (Hart, 2002) (figura 7).

El mecanismo de acción de modulación de la expresión génica implica un retraso temporal de la respuesta a los esteroides de horas o incluso días. No obstante, existen respuestas como por ejemplo la reacción acrosómica mediada por progesterona (Osman *et al.*, 1989) o la vasodilatación coronaria inducida por el estradiol (Salas *et al.*, 1994), que son mucho más rápidas y tienen lugar en minutos o incluso segundos. Estas respuestas obedecen a mecanismos de acción de los esteroides, conocidos como “no genómicos” o “no transcripcionales”, ya que no precisan de la síntesis de ARN, sino que implican a segundos mensajeros intracelulares y varias cascadas de transducción de señales como modulación de AMP cíclico, flujo de iones y vías proteínas quinasas (Losel y Wehling, 2003). La unión de los esteroides a dos tipos de receptores (clásicos y no clásicos) puede iniciar estos mecanismos. Por un lado, los receptores clásicos de esteroides se encuentran a nivel de membrana y aunque su función principal es modificar la actividad transcripcional, son capaces de iniciar la producción de segundos mensajeros e interactuar con sistemas de señalización celular. Por otro lado, a los receptores de esteroides no clásicos, también localizados en la membrana celular, se les atribuye la acción no genómica de los esteroides, aunque estos no están todavía bien caracterizados (Losel y Wehling, 2003).



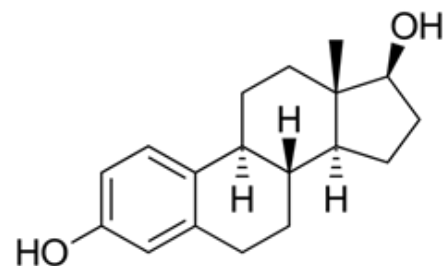
**Figura 7. Mecanismo de acción clásico de los esteroides.** Gracias a su naturaleza lipofílica, las hormonas esteroideas son capaces de atravesar membranas para unirse a sus receptores, que pueden localizarse en el núcleo (**1a**) o en el citoplasma (**1b**), para formar un complejo hormona-receptor, el cual se une a una región concreta del ADN llamada elemento de respuesta a esteroides (SRE) (**2**). Esta unión es capaz de regular la expresión de algunos genes a través de la síntesis de ARNm (**3**), que abandona el núcleo a través de los poros (**4**), para ser traducido en los ribosomas resultando finalmente en una mayor o menor síntesis de proteínas (**5**). Fuente: adaptado de <http://droualb.faculty.mjc.edu/>

## 7.2. Estrógenos

Los estrógenos son un grupo de hormonas que juegan un papel fundamental en el desarrollo del tracto reproductor de la hembra. Tienen efectos neuroendocrinos involucrados en el control de la ovulación. Y desempeñan funciones como el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios y del comportamiento de receptividad sexual durante el estro.

El estrógeno natural bioquímicamente activo más abundante es el **17β-estradiol**, abreviado como **E2** al poseer dos grupos hidroxilos en su estructura molecular (figura 8).

El E2 es sintetizado principalmente en los ovarios por las células de la granulosa. En estas, el complejo enzimático conocido como aromatasa, se encarga de transformar los andrógenos como la

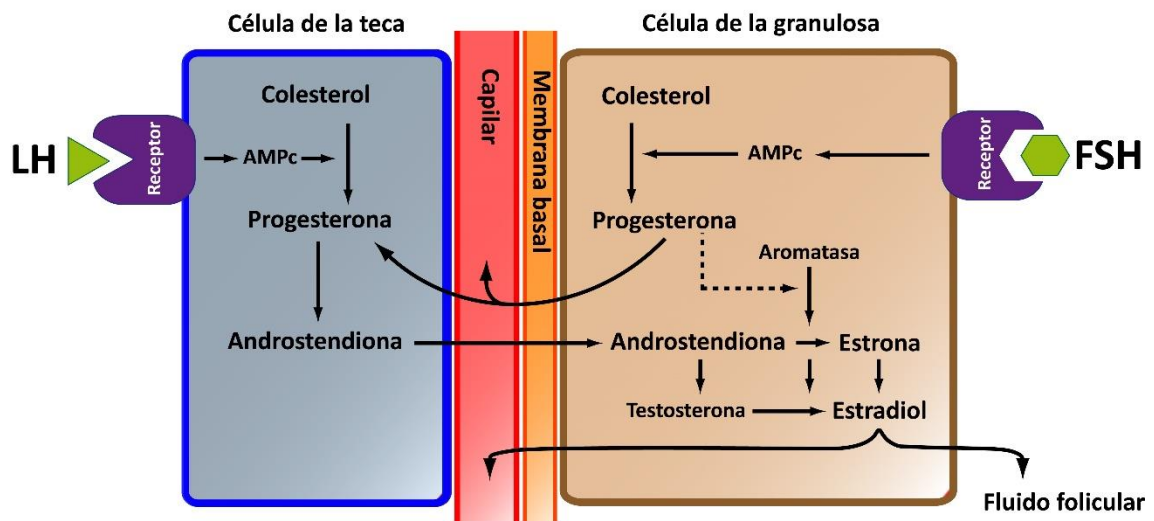


**Figura 8. Estructura química del 17β-estradiol (E2)**

## Revisión Bibliográfica

androstenediona o la testosterona, en estrógenos mediante la aromatización del anillo A. La gonadotropina FSH regula este proceso por el cual la androstenediona es sintetizada en las células de la teca tras el estímulo de otra gonadotropina, la LH, para luego ser transportada por difusión a través de la membrana basal de las células de la granulosa adyacentes. Allí, parte de la androstenediona es convertida a testosterona y los dos andrógenos son finalmente aromatizados a estrona y a estradiol (Figura 9). Así, la producción de estrógenos ováricos requiere de la cooperación de las células teca y de las células de la granulosa bajo la coordinación de las gonadotropinas FSH y LH. Este concepto es conocido como teoría de “dos células-dos gonadotropinas” (Hillier *et al.*, 1994; Walters, 2007) (figura 9).

La mayor parte de los estrógenos circulan en sangre unidos a proteínas. El E2 se une a la globulina transportadora de hormonas sexuales con alta afinidad y especificidad y a la albúmina con baja afinidad. Estas proteínas plasmáticas regulan la concentración de fracción biológicamente activa de E2 libre en sangre y controlan la difusión de la hormona desde los vasos sanguíneos hasta las células (Hammond, 2016). Una vez dentro de la célula diana el E2 se unirá al receptor de estrógenos del tejido donde se encuentra para producir sus efectos por las vías que se han explicado.

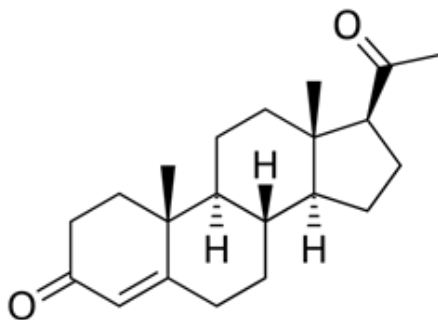


**Figura 9. Diagrama del concepto “dos células - dos gonadotropinas” para la síntesis de hormonas esteroideas ováricas.** Bajo la influencia de la FSH, en las células de la granulosa se produce progesterona que se difundirá a las células de la teca. En éstas, la influencia de la LH produce más progesterona y a partir de ella se producirá androstenediona. La androstenediona difunde a las células de la granulosa para ser convertida en testosterona. En estas células, los andrógenos son aromatizados por el complejo enzimático aromatasa, transformándose en estrógenos (adaptado de Guerriero, 2009).

### 7.3. Progestágenos

Los progestágenos son otro grupo importante de hormonas esteroideas cuyo nombre hace referencia a su función principal de favorecer o mantener la gestación. El progestágeno natural más abundante es la **progesterona (P4)**, hormona que juega un papel clave en la compleja regulación de la función reproductiva en la hembra. Por un lado, tiene efectos en el útero, donde induce la transición o diferenciación del endometrio a fase secretora y reduce la contractilidad del miometrio permitiendo la implantación del embrión. Por otro lado, actúa en la glándula mamaria, favoreciendo junto a la prolactina, la maduración lóbulo-alveolar necesaria para la producción de leche durante la gestación y la lactación tras el parto. Por último, también actúa en el cerebro regulando señales implicadas en el comportamiento sexual y emocional (Graham y Clarke, 1997).

La molécula de P4 posee 21 átomos de carbono y contiene dos grupos cetona y dos grupos metilo (Figura 10). Es sintetizada directamente a partir de la pregnenolona y es un precursor de otras hormonas esteroideas durante la esteroidogénesis (Figura 11). La biosíntesis



**Figura 10. Estructura química de la progesterona (P4)**

de P4 se estimula cuando las células de la granulosa maduran y se hipertrofian, transformándose en células luteínicas (cuerpo lúteo) después del pico de LH y la ovulación (Taraborrelli, 2015). En caso de producirse la gestación, la placenta también participa en el mantenimiento de la concentración plasmática de la progesterona, aunque la importancia de este órgano como productor de P4 varía según la especie. Así, en roedores, vacas,

cerdos, cabras y perros la P4 procedente de los cuerpos lúteos es esencial durante toda la gestación, ya que la producción de la placenta es insuficiente. Por otro lado, en especies como humanos, caballos, ovejas y gatos, la P4 producida por la placenta es suficiente para mantener la gestación.

La P4 se une a la globulina transportadora de corticosteroides (CBG) o transcortina con alta afinidad y a la albúmina con baja afinidad (Hammond, 2016) y ambas la van a transportar en sangre tras su liberación.

Gracias a su naturaleza lipofílica, una vez que alcanza el tejido diana atraviesa las membranas celulares para interactuar a nivel nuclear con los receptores de progesterona. Los

efectos de esta hormona en los distintos tejidos uterinos son mediados por dos isoformas del receptor de progesterona funcionalmente diferentes, lo que condiciona que para cada especie la mayor expresión de uno u otro pueda influir en las respuestas celulares a la P4 (Graham y Clarke, 1997).

### 7.4. Papel de las hormonas sexuales en la respuesta inmunitaria

Es conocido que las hormonas sexuales pueden modular la respuesta inmunitaria. Estas hormonas trabajan juntas manteniendo un equilibrio dosis-dependiente, en el cual la respuesta inmunitaria puede ser modulada por su acción combinada, lo que ha suscitado gran interés en la comunidad científica (Ansar Ahmed *et al.*, 1985; Ghosh y Klein, 2017). Este efecto se evidencia al comparar las respuestas inmunitarias producidas por individuos de distinto sexo ante el mismo estímulo. Así, se ha comprobado que las ratonas generan una respuesta más intensa de linfocitos T y más anticuerpos que los machos (Weinstein *et al.*, 1984) en respuesta a una inmunización. En la especie humana se ha observado que las mujeres poseen mayor cantidad de linfocitos T CD4<sup>+</sup> circulantes de forma fisiológica (Amadori *et al.*, 1995) y que desarrollan respuestas Th2 más intensas que los hombres (Giron-Gonzalez *et al.*, 2000). Poniendo el foco en las hormonas sexuales de la hembra, existen estudios que han demostrado que tanto el estradiol como la progesterona, influyen en la mayoría de los componentes de la inmunidad innata y adquirida (Beagley y Gockel, 2003). Sin embargo, los resultados obtenidos en estos estudios son en muchos casos contradictorios y ambiguos, donde el efecto de estas hormonas sobre los distintos componentes del sistema inmunitario parece depender de variables como la dosis de hormona empleada, el componente concreto del sistema inmunitario que es analizado en cada caso e incluso podría depender de las condiciones individuales en el caso de estudios *in vivo* (Tan *et al.*, 2015; Foo *et al.*, 2017). Todo lo anterior hace que no sea fácil obtener conclusiones generales precisas de este tipo de estudios y añade un nivel de complejidad adicional al trabajo de experimentación con hormonas. No obstante, en la presente tesis se intentará hacer un resumen ilustrativo de las principales acciones que ejercen el E2 y la P4 sobre el sistema inmunitario.

#### 7.4.1. Estradiol

De entre la gran cantidad de acciones que se ha ido mostrando que puede ejercer el E2, una de ellas es la modulación de la inmunidad y la autoinmunidad (Lahita *et al.*, 1987). Uno de los mecanismos por los cuales podría llevar a cabo estas acciones es la regulación de la secreción de citoquinas. En estudios con ratonas ovariectomizadas (Maret *et al.*, 2003) y en ratones machos (Karpuzoglu *et al.*, 2006), la administración de estradiol provocó una fuerte respuesta celular de tipo Th1, con gran cantidad de producción de IFN- $\gamma$ , presencia de linfocitos T y activación de enzimas antimicrobianas como la iNOS. Se sabe de la existencia de un elemento de respuesta a estrógenos en la región promotora del gen del IFN- $\gamma$ , hecho que se correlaciona con el aumento de transcritos de este gen en linfocitos estimulados con estrógenos (Fox *et al.*, 1991).

Por otro lado y al contrario de lo mencionado anteriormente, se ha observado que en los procesos inflamatorios dependientes de linfocitos T, los estrógenos reducen y regulan el número de estos linfocitos en el foco inflamatorio, además de disminuir la expresión del receptor de IL-2 y de marcadores de activación como CD40, CD44 y CD69 (Salem *et al.*, 2000a). Además, bajo las mismas condiciones, los niveles de expresión de IL-2 e IFN- $\gamma$  decrecen y los de IL-4 e IL-10 aumentan (Salem *et al.*, 2000b). Siguiendo esta línea, también se ha observado que los estrógenos inducen un incremento en la producción de citoquinas propias de la respuesta Th2, como la IL-5, así como la disminución de citoquinas Th1 como la IL-2 (Ahmed *et al.*, 1996).

Así pues, el estradiol parece tener un efecto dual sobre la polarización de la respuesta inmunitaria potenciando tanto la producción de citoquinas Th1 como de citoquinas Th2. Se ha observado que altas concentraciones de estradiol (> 5000 pg/ml) estimulan la secreción de IL-10 por parte de clones de los linfocitos T, mientras que bajas concentraciones estimulan la secreción de IFN- $\gamma$ . También se ha demostrado que el estradiol tiene un efecto bifásico en la secreción de TNF- $\alpha$ , potenciando su producción a bajas concentraciones y disminuyéndola a altas (Gilmore *et al.*, 1997; Correale *et al.*, 1998).

#### 7.4.2. Progesterona

Una de las funciones más importantes de esta hormona es la de suprimir o atenuar en gran medida la inmunidad materna contra el feto durante la gestación para que ésta pueda llevarse a cabo. Una de las vías por las cuales la P4 es capaz de lograr este efecto es mediante la modulación de la secreción de citoquinas Th1/Th2 (Piccinni, 2002). Existe el consenso general

## Revisión Bibliográfica

en la comunidad científica de que la progesterona tiene efectos antiinflamatorios, inhibiendo el desarrollo de respuestas tipo Th1 y promoviendo las de tipo Th2 (Piccinni *et al.*, 2000a). Así, se ha descubierto que la progesterona inhibe directamente la expansión clonal de células Th1 mientras que potencian la diferenciación de las células Th2 (Miyaura e Iwata, 2002), así como también induce la secreción de IL-4 e IL-5 (Piccinni *et al.*, 2000b). Una tendencia hacia respuestas tipo Th2 podría beneficiar al feto, mientras que el desarrollo de respuestas tipo Th1 podría ser dañino (Ragusa *et al.*, 2004).

La influencia de la P4 en la polarización de la respuesta inmunitaria también se aprecia en las alteraciones en la secreción de citoquinas durante la fase lútea del ciclo estral. Durante esta fase, en la que los niveles de P4 son altos, la respuesta inmunitaria se polariza hacia una respuesta tipo Th2, reflejada como un incremento en la producción de IL-4 (Faas *et al.*, 2000). Otro ejemplo que apoya el efecto inmunosupresor de la P4 es que regula a la baja los genes asociados a la producción de IFN- $\gamma$  (Verthelyi *et al.*, 2001; Dosiou *et al.*, 2004) y aumentar moderadamente los niveles de IL-10 (Trautman *et al.*, 1997). Sin embargo, los efectos de esta hormona en la producción de anticuerpos aún no están claros. Algunos autores describen que la administración de esta hormona a animales reduce (Lü *et al.*, 2002) o aumenta (Vermeulen *et al.*, 2001) la producción de anticuerpos, mientras que otros autores encontraron que la progesterona no tenía efecto (Nikolaevich *et al.*, 1991).

### 7.5. Efecto de las hormonas sexuales sobre infecciones bacterianas

Aparte del estudio de la influencia del estradiol y la progesterona sobre los distintos elementos del sistema inmunitario, también es interesante el estudio del papel de estas hormonas en la respuesta frente a enfermedades infecciosas, especialmente aquellas cuya patogenia pueda estar relacionada con el ciclo estral y/o el tracto reproductor de la hembra.

La infección por *C. abortus* constituye un buen ejemplo de ello. Un aspecto importante y poco estudiado en la patogenia de esta enfermedad consiste en que, después del aborto y a pesar de adquirir inmunidad protectora frente al patógeno, los animales pueden excretar el microorganismo de sus tractos reproductivos en los siguientes celos y partos, convirtiéndose en portadores que propagan de la infección a otros animales (Wilsmore *et al.*, 1990b) y permitiendo que la infección persista en el rebaño (Papp *et al.*, 1994).

De esta forma, durante la infección clamidial se producen varias fases de latencia: desde la infección del animal hasta la colonización de la placenta y luego desde el aborto, hasta la nueva excreción en los siguientes estros. Este proceso de latencia/multiplicación en ciertos momentos del ciclo estral y durante la gestación, sugiere que las hormonas sexuales de la hembra podrían desempeñar un papel importante en la fisiopatología del AEO, lo que podría afectar el éxito en la resolución de la infección clamidial y también poner en peligro la eficacia de programas de vacunación contra la misma.

A pesar del papel central que este proceso de latencia/reactivación de la infección juega en la patogénesis del AEO, los mecanismos subyacentes que la controlan siguen siendo poco claros. Sin embargo, hay indicios que apuntan a que puede existir una importante relación entre *C. abortus* y las citadas hormonas (Dosiou *et al.*, 2004), tal y como ocurre en infecciones por otros patógenos intracelulares.

En estos estudios se observa que la administración de estradiol a ratonas ovariectomizadas mejora la respuesta inmunitaria frente a patógenos como *Mycobacterium avium* (Tsuyuguchi *et al.*, 2001) o que presentan menor carga bacteriana en hígado y bazo, mostrando también menor cantidad de focos inflamatorios en estos órganos, después de ser infectadas con *Coxiella burnetii* (Leone *et al.*, 2004), bacteria de patogenia abortiva similar a *C. abortus*.

Por otro lado, existen publicaciones que no sólo evidencian el papel de las hormonas sexuales como moduladoras del sistema inmunitario, sino que también muestran los efectos que pueden tener sobre el crecimiento y el metabolismo de las bacterias, así como sobre la expresión de factores de virulencia (García-Gómez *et al.*, 2013). Así, la endocrinología microbiana sugiere que los microorganismos han desarrollado a lo largo de la evolución sistemas para reconocer señales neurohormonales, que están ampliamente conservadas entre los hospedadores, como señales para iniciar su crecimiento y procesos patogénicos (Lyte, 2004; Freestone *et al.*, 2008). En este aspecto, se han descrito proteínas que actúan como receptores de estrógenos en varias especies de bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* (Rowland *et al.*, 1992), *Escherichia coli* o *Staphylococcus aureus* (Sugarman y Mummaw, 1990). Otras bacterias, como las del género *Bacteroides*, patógenos periodontales en la especie humana, son capaces de incorporar el estradiol y la progesterona al interior de la célula y usarlos como sustitutos de la vitamina K, que es un factor de crecimiento esencial (Kornman y Loesche, 1982). Asimismo, el estradiol es capaz de aumentar la actividad de factores de virulencia de estas bacterias, de forma

## Revisión Bibliográfica

dosis y cepa dependiente, Todo ello podría explicar algunas de las causas del aumento de procesos gingivales durante la gestación (Fteita *et al.*, 2015).

Dentro del género *Chlamydia*, estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, sugieren que los esteroides sexuales de la hembra, afectan a la susceptibilidad a la infección por parte de las células hospedadoras. Así, se ha demostrado que la adhesión de CE de *C. trachomatis* a células endometriales humanas en cultivo y el desarrollo de inclusiones clamidiales en ellas se ve favorecido por el pretratamiento de estas células con estradiol, mientras que el tratamiento conjunto de estradiol y progesterona disminuye significativamente la adhesión (Maslow *et al.*, 1988; Hall *et al.*, 2011; Kintner *et al.*, 2015). Otros estudios corroboran estos efectos cuando se observa la mayor susceptibilidad a la infección por *C. suis* de células obtenidas del tracto reproductor de cerdas durante la fase del ciclo estral con predominio de los estrógenos que células obtenidas durante la fase con predominio de la progesterona (Guseva *et al.*, 2003).

Por otro lado, es común que en modelos de infección con *C. muridarum* se administre progesterona a las ratonas por vía vaginal para aumentar la permeabilidad del aparato reproductor a la bacteria y así favorecer la infección vaginal (Morrison *et al.*, 2011). Sin embargo, en modelos con *C. caviae*, las cobayas son más susceptibles a la infección después de la administración de estradiol (Pasley *et al.*, 1985).

En estudios *in vitro* con *C. trachomatis* también se ha demostrado que esta bacteria sufre importantes cambios en su expresión génica tras la adición de progesterona y/o 17 $\beta$ -estradiol a células endometriales infectadas. Estos cambios son similares a las respuestas de estrés que se han hallado en modelos de persistencia clamidial, cuando se administra estradiol, mientras que, al administrarse progesterona a los cultivos infectados, se produjo un aumento de la expresión de genes que codifican elementos del metabolismo energético (Amirshahi *et al.*, 2011).

Aparte de los efectos de las hormonas sexuales de la hembra sobre el sistema inmunitario y sobre los propios microorganismos, es posible que dichos efectos se produzcan de forma indirecta, es decir, que sean una respuesta de la bacteria a cambios producidos en las células por las hormonas. Estudios *in vitro* con *C. trachomatis* han demostrado que la expresión génica de células endometriales humanas infectadas con esta bacteria se modifica tras la adición de progesterona en el cultivo, en relación a las células control donde no se administra esta hormona. Así las células endometriales infectadas y con presencia de progesterona regulan al alza genes implicados en la síntesis de interferón e incrementan sus niveles de ARNm para diversas citoquinas proinflamatorias y factores quimiotácticos (Wan *et al.*, 2014).

Asimismo, Hall *et al.* (2011) demostraron que *C. trachomatis* era capaz de infectar significativamente en mayor grado células endometriales epiteliales en cocultivo con células del estroma, añadiendo estradiol. Además, la adición de estradiol producía un aumento de la expresión de IL-8 e IL-6 tanto en células epiteliales infectadas como en no infectadas. Estos estudios ponen de manifiesto el papel que juegan los esteroides sexuales de la hembra en la susceptibilidad y patogenia de la infección por algunas especies de clamidia. Sin embargo, pese a que se ha hipotetizado sobre la posible implicación de factores endocrinos en la patogenia de la infección por *C. abortus* (Buxton *et al.*, 1990; Kerr *et al.*, 2005), hasta la fecha no se han publicado trabajos al respecto en esta especie.

## 7.6. Efecto de las hormonas sexuales sobre la vacunación

Dada la influencia de las hormonas sexuales sobre las infecciones de patógenos intracelulares, el proceso de vacunación frente a dichos patógenos también puede verse influido por ellas. Varios estudios muestran cómo la presencia de un patrón hormonal u otro es capaz de modular las respuestas inmunitarias generadas tras una vacunación. Así, se demostró en estudios con ratonas, que la respuesta inmunitaria generada en el tracto reproductor por vacunas frente al tétanos y al cólera, se alteraba dependiendo de la fase del ciclo estral en la que se encontraba el animal, aunque el efecto de las hormonas sobre las respuestas inmunitarias variaba en función de la vía de administración de la vacuna (Beagley y Gockel, 2003). También se ha visto que la administración de estradiol en el momento de la vacunación mejoraba la tasa de supervivencia y reducía la excreción vírica de ratonas ovariectomizadas, tras su infección con un tipo de herpes genital al ser comparadas con ratonas vacunadas bajo la influencia de progesterona o de un placebo (Bhavanam *et al.*, 2008). No obstante, no existen estudios en *C. abortus* al respecto.

## 7.7. Ciclo estral y gestación en la ratona

Las ratonas presentan un ciclo reproductivo de tipo poliéstrico continuo, es decir ciclos estrales durante todo el año, interrumpiéndose sólo durante la gestación. Son animales precoces capaces de reproducirse en estado salvaje a partir de las 6 semanas de vida. No

## Revisión Bibliográfica

obstante, en condiciones de laboratorio, al igual que en zonas de climas fríos, la madurez sexual se retrasa hacia las 7-8 semanas (Hill, 1967).

La vida sexual de las ratonas se prolonga hasta la avanzada edad de 13 a 14 meses de vida y las camadas pueden sucederse una tras otra cada tres o cuatro semanas, especialmente durante los primeros meses de vida. En la ratona, el ciclo estral se divide en proestro, estro, metaestro y diestro y su duración se ve alterada por el fotoperiodo, siendo de 4 a 6 días en animales mantenidos con 14 horas de luz y 10 de oscuridad, condiciones normales de animalario (Gardner, 1991).

El proestro y estro culminan en la ovulación y constituyen la fase de liberación de estrógenos mientras que el metaestro y diestro, correspondientes a la gestación o pseudogestación, conforman la fase progestacional o luteal. Durante el proestro se producirá el pico de LH que desencadenará la ovulación 12 horas después, momento que coincide con el estro, fase del ciclo en que la hembra muestra signos de celo y acepta la monta del macho. En la ratona, la ovulación puede darse espontáneamente durante el celo, haya o no ocurrido el apareamiento. Sin embargo, la ovulación puede no darse en cada celo, particularmente en hembras jóvenes sin contacto previo con machos (Togari, 1927), y el celo puede no siempre acompañar la ovulación (Young, 1941). Esto es debido a que el celo y la ovulación tienen diferentes bases endocrinas, ya que el celo depende de las hormonas gonadales (estrógenos), mientras que la ovulación se produce en respuesta a las gonadotropinas (LH). Después de la estimulación del crecimiento folicular provocada por la FSH, los títulos de LH comienzan a aumentar, lo que resulta en un drástico aumento de la secreción de fluido folicular y finalmente, en la ovulación (Hill, 1967).

La duración del estro/celo es de entre 8 y 12 horas aproximadamente. Un rasgo particular de las ratonas, es que son capaces de entrar en celo dentro de las 24 horas posteriores al parto, fenómeno conocido como celo o estro posparto. Este mecanismo permite a las ratonas quedar preñadas inmediatamente tras el parto, aumentando la ya enorme prolificidad de esta especie. Otro rasgo característico de la ratona es que, dada la influencia que el fotoperiodo ejerce sobre su ciclo estral, el control del mismo se emplea frecuentemente en la sincronización de celos en los laboratorios, lo que permite que el apareamiento y la ovulación se acomoden a las necesidades de los investigadores (Poiley, 1960).

A diferencia de otras especies, tras la ovulación, el folículo ovárico sólo se convierte en un cuerpo lúteo funcional, a menos que se haya producido el apareamiento (o la estimulación cervical). El acto de apareamiento produce una activación generalizada del sistema nervioso,

incluido el hipotálamo, que promueve la liberación de prolactina por parte de la hipófisis anterior. Esto provoca que se desarrollen cuerpos lúteos funcionales, que el útero quede bajo los efectos de la progesterona y que se bloquee la ovulación y los ciclos estrales. Se ha comprobado que la administración de LH puede causar luteinización en el ovario del ratón incluso sin ovulación, sin embargo, el desarrollo de un cuerpo lúteo funcional está bajo el control de la prolactina (Hill, 1967) .

La cantidad de óvulos liberados en cada ciclo está ligada a factores genéticos, variando entre distintas cepas. Estas diferencias se deben a la mayor o menor sensibilidad ovárica a la FSH y la LH y no a la concentración de las mismas. De hecho, los niveles máximos de FSH se observan antes del pico de LH, durante el proestro, lo que estimula el desarrollo de grupos de folículos que madurarán y ovularán en el siguiente ciclo. Los óvulos liberados, son transportados rápidamente por una combinación de movimientos ciliares y musculares a la porción proximal del oviducto donde tiene lugar la fecundación, manteniendo su fertilidad durante 10-15 horas (Poiley, 1960).

La implantación de los embriones en la ratona acontece normalmente alrededor de 5 días después de la inseminación, coincidiendo con el aumento de los niveles de progesterona (Forbes y Klein, 1958). La secreción de esta hormona por parte de la placenta es de menor importancia para el mantenimiento de la gestación en esta especie que en muchas otras (como la oveja), siendo las gónadas de mayor importancia en este proceso. De hecho, se ha demostrado que la ovariectomía en cualquier momento durante la gestación provoca la interrupción de la misma (Hill, 1967).

La duración de la gestación es de 19 a 20 días con pequeñas diferencias según la cepa y el tamaño de la masa fetal y no tanto con la cantidad de embriones implantados. También se ha comprobado que la gestación es más corta cuando se trata de camadas híbridas que cuando se trata de camadas provenientes del cruce de cepas puras. Este hecho se ha relacionado con las diferencias antigénicas entre la madre y los fetos (Gardner, 1991).

De forma fisiológica se puede dar un bloqueo de la gestación si durante la etapa previa a la implantación la hembra es expuesta a un macho extraño o sus feromonas. Este fenómeno es conocido como “efecto Bruce” (Bruce, 1959) y subraya la importancia de las feromonas en los procesos reproductivos de los ratones. Así, si la hembra es separada del macho con el que se apareó inmediatamente después de la cópula y después de un tiempo de aproximadamente 6 horas, vuelve con el mismo macho o se dispone junto a otro, se producirá el bloqueo de la gestación. Esto implica que es necesario que ambos convivan al menos entre 4 o 6 horas para

## Revisión Bibliográfica

que la ratona reconozca como “familiares” a las feromonas del macho. Tras el apareamiento y la exposición a las feromonas del macho, la memoria olfativa de la ratona perdura entre 30 y 50 días, pasados los cuales, el macho con el que se apareó ya no es reconocido.

Otro aspecto propio de la fisiología del ciclo reproductivo de la ratona es la aparición de pseudogestaciones. La pseudogestación es un estado que resulta de cópulas estériles, o que aparece en hembras aisladas o agrupadas entre sí. Una hembra aislada presenta ciclos de 5 a 6 días de duración, a veces irregulares y con la aparición de pseudogestación espontánea. Del mismo modo, también se puede dar en hembras agrupadas sin la presencia de machos, más frecuentemente cuando son grupos pequeños, o pueden entrar en anestro si se agrupan en mayor número. Las primeras fases de la pseudogestación son indistinguibles de una gestación verdadera, ya que la progesterona es segregada del mismo modo que en ésta. Sin embargo, tras 7 u 8 días, se produce la regresión de los cuerpos lúteos y la caída de los niveles de progesterona. Pese a ello, la duración de la pseudogestación oscila por término medio entre 10-13 días y puede durar el mismo periodo que una gestación verdadera, dependiendo de la edad de la ratona.

Tanto en hembras aisladas como agrupadas sin macho, se produce una supresión del celo, que algunos autores sugieren que es debida a una inhibición de la liberación de FSH y el aumento de la LH, situación que desencadena el proceso de pseudogestación (Whitten, 1956). Este bloqueo del ciclo regular se explicaría por la presencia de feromonas estrógeno-dependientes, ya que ratonas ovariectomizadas no son capaces de inhibir el celo en hembras enteras. Si las hembras aisladas son luego ubicadas junto a machos enteros o su olor, comienzan a presentar ciclos con regularidad, su ciclo estral se sincroniza y la mayoría estará receptiva al tercer día. Este efecto del macho sobre el ciclo es inducido por feromonas andrógeno-dependientes presentes en la orina del macho, segregadas por las glándulas prepuciales (Whitten *et al.*, 1968).

### 7.8. Ciclo estral y gestación en la oveja

Al igual que en la ratona, en la oveja el ciclo estral se divide en proestro, estro, metaestro y diestro, añadiéndose una fase de ausencia de actividad cíclica ovárica llamada anestro. Son animales poliéstricos estacionales, con ciclos ovulatorios durante la época del año con fotoperiodo decreciente y anestro durante el resto del año. La estacionalidad del ciclo depende en gran medida de la raza y del origen geográfico de las ovejas, siendo más marcada en aquellas criadas en zonas de alta latitud y siendo casi inexistente en regiones de latitud media

y clima tropical o subtropical (Rosa y Bryant, 2003) En nuestro país, la mayoría de razas autóctonas muestran una estacionalidad muy reducida, con periodos de anestro de 3-4 meses durante la primavera, en los que entre un 15-30% de ovejas se mantienen cíclicas o presentan ovulaciones esporádicas (Valls Ortiz, 1983; Santiago-Moreno *et al.*, 2000).

En la oveja el ciclo estral tiene una duración de 16-17 días, con un margen de 14 a 19. Al igual que en la ratona, se considera como día 0 el día en el que se produce el pico de LH (Figura 12), momento que en esta especie también coincide con el estro y se muestran receptivas a la cubrición. La duración del celo es variable, dependiendo de la edad, la raza, la prolificidad, etc. pero como término medio es de 30-36 horas.

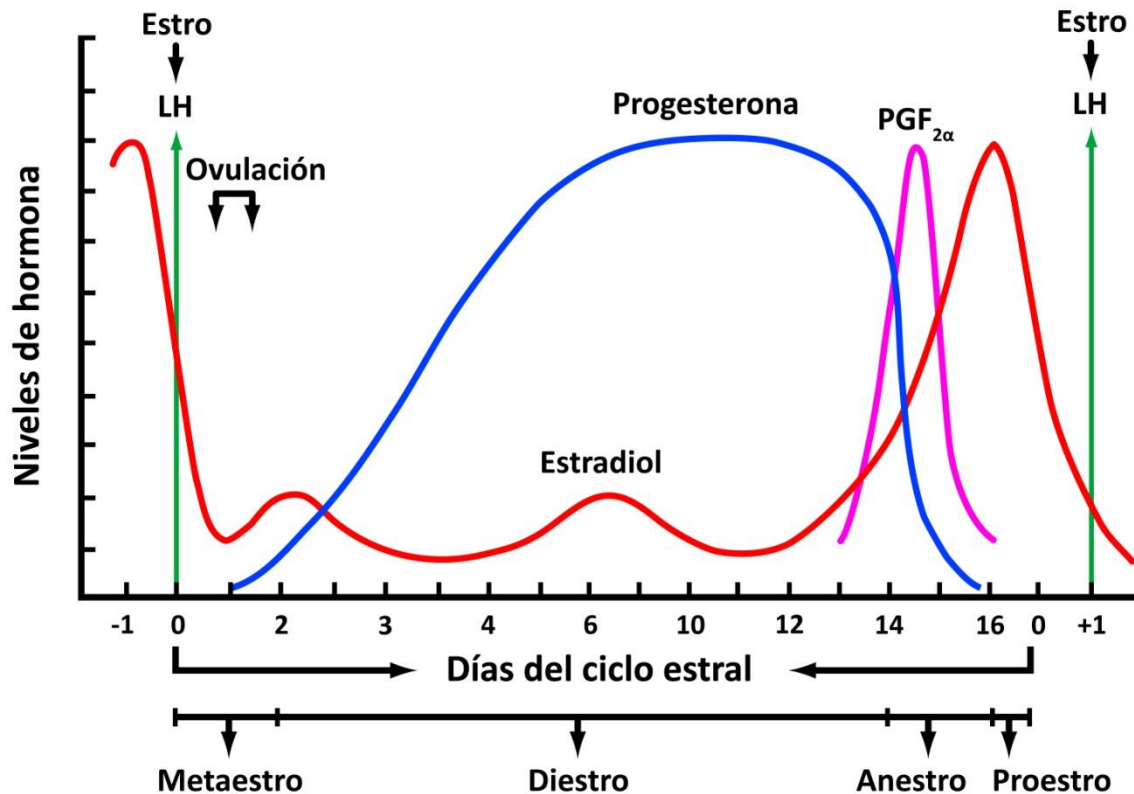
Tanto en la ratona como en la oveja, el cambio de comportamiento producido durante el celo es debido al aumento en la concentración plasmática de estrógenos producidos por los folículos en desarrollo. Cuando la concentración de estrógenos alcanza su punto máximo, se produce el pico de LH, que provoca el fin del estro y la ovulación, momento de salida del óvulo del folículo que posteriormente ha de ser fecundado (si hay monta o inseminación artificial) por los espermatozoides del macho. El número de óvulos liberados en cada ciclo ovárico depende de diversos factores como la edad, raza/línea, estado corporal, etc.

El número de óvulos liberados para las razas españolas es generalmente de uno a tres, llegando en algunas razas extranjeras, caracterizadas por su prolificidad, hasta los cinco óvulos liberados por ciclo estral.

Después de la ovulación, el folículo ovulatorio se transforma en un cuerpo lúteo funcional, principal fuente de progesterona en la oveja cíclica (Rahman, 2008). Esta hormona, tiene, entre otras, la función de frenar el proceso de maduración folicular, paralizando el ovario en este sentido y evitando por tanto nuevos ciclos estrales. La duración de la actuación de la progesterona depende de la persistencia del cuerpo lúteo en el ovario y este a su vez depende de que haya habido monta y fecundación posterior, pues si no se ha producido ésta, la persistencia del cuerpo lúteo es corta (6-7 días) y a los 16-17 días habrá un nuevo ciclo ovárico. En caso de producirse la fecundación, el cuerpo lúteo se mantendrá durante toda la gestación hasta el momento del parto. Así, los niveles de P4 son muy bajos durante el estro (menos de 1 ng/ml), aumentando durante el diestro hasta alcanzar su nivel máximo (3 ng/ml aproximadamente) en torno al día 8 del ciclo. Los niveles de esta hormona permanecerán elevados hasta el día 11-12 (Bartlewski *et al.*, 1999b, 2011). De no producirse la gestación, se produce una regresión del cuerpo lúteo (luteolisis mediada por PGF2 $\alpha$ ), que provoca una rápida disminución de la concentración plasmática de P4. Una vez que cesa la actividad inhibitoria de

## Revisión Bibliográfica

La P4 sobre el eje hipotálamo-hipófisis, la gonadotropina coriónica (GnRH) y FSH comienzan a liberarse de nuevo. Esto estimula el crecimiento de los folículos, que a su vez producirán concentraciones crecientes de estrógenos hasta producir un nuevo pico de LH, dando comienzo a un nuevo ciclo. En la oveja, se producen de 3 a 4 ondas foliculares por intervalo interovulatorio, que se corresponden con aumentos en la concentración plasmática de estradiol. Esta alcanza su pico máximo (en torno a 21 pg/ml) justo antes del pico de LH, durante el estro (Bartlewski *et al.*, 1999a).



**Figura 12. Cambios en las concentraciones de estradiol y progesterona durante el ciclo estral en la oveja.** Los pulsos de PGF<sub>2α</sub> previos al estro causan la lisis del cuerpo lúteo, dando lugar a la caída brusca de la concentración plasmática de progesterona y permitiendo el aumento de los niveles de estradiol que anticipan el pico de LH y la ovulación. Adaptado de Nasar, 2006.

Las concentraciones de hormonas ováricas (E2 y P4) experimentan cambios cíclicos asociados a los periodos de desarrollo de los folículos ováricos o del cuerpo lúteo. Estos cambios ejercen un efecto directo en el crecimiento y en el metabolismo de las células de los tejidos del tracto reproductor, preparándolos para una posible gestación.

De producirse la fecundación, el embrión debe anunciar su presencia en el tracto reproductivo materno. Este proceso es conocido como reconocimiento materno de la gestación. De no llevarse a cabo, la prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) destruirá el cuerpo lúteo, lo que impedirá

la producción de progesterona, hormona fundamental para el establecimiento y mantenimiento de la gestación. En los rumiantes este mecanismo está mediado el interferón *tau* (IFN- $\tau$ ) secretado por las células del trofoectodermo (Bazer *et al.*, 1997) entre los días 11 y 21 de gestación. Esta citoquina es una proteína perteneciente a la familia de los interferones tipo 1 que inhibe la expresión de receptores de oxitocina en las células epiteliales y glandulares endometriales, bloqueando la producción pulsátil de PGF2 $\alpha$  mediada por oxitocina (Bazer, 2013) y regulando la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad clase I en el endometrio, silenciándola en las células del epitelio luminal y glandular superficial, y aumentándola en el estroma (Choi *et al.*, 2003). Este último hecho podría constituir uno de los mecanismos de tolerancia materna hacia el embrión, evitando sea rechazado por el sistema inmunitario materno. Además, como otros tipos de interferón, el IFN- $\tau$  ha demostrado en condiciones *in vitro* tener buena eficacia antivírica (Chon y Bixler, 2010), lo que podría sugerir su participación en la lucha contra otras infecciones, especialmente las producidas en el tracto reproductor.

Una vez producido el reconocimiento materno del embrión, en la oveja las concentraciones plasmáticas de P4 van incrementándose paulatinamente durante la primera mitad de la gestación para, alrededor del día 90, empezar a aumentar de forma mucho más marcada hasta alcanzar un punto máximo de aproximadamente 13 ng/ml. Este aumento marcado de la concentración de progesterona tiene importancia dentro de la fisiopatología del AEO, puesto que coincide exactamente con la aparición de las primeras inclusiones clamidiales en el epitelio coriónico de la placenta de ovejas infectadas (Buxton *et al.*, 1990) con *C. abortus*. Más tarde, en torno al día 125 post-cubrición, las concentraciones de progesterona comienzan a descender bruscamente hasta el momento del parto (Bassett *et al.*, 1969).

La producción y el mantenimiento de unos niveles adecuados de progesterona dependen del cuerpo lúteo durante el primer tercio de gestación. Sin embargo, a partir del día 60 la principal fuente de progesterona pasa a ser la placenta. Así pues, a diferencia de la ratona, una ovariectomía en cualquier momento durante la gestación no provoca la interrupción de la misma ni compromete el desarrollo fetal (Al-Gubory *et al.*, 1999).

Resulta interesante que cuando *C. abortus* coloniza la placenta, se multiplica principalmente en el epitelio trofoblástico de las vellosidades coriales de los placentomas ovinos (Navarro *et al.*, 2004). De hecho, se ha demostrado que la concentración plasmática de progesterona en ovejas infectadas con *C. abortus* era significativamente menor en comparación con ovejas no infectadas (Howie *et al.*, 1989), lo que podría alterar el equilibrio hormonal necesario para el correcto mantenimiento de la misma.

## 8. DIAGNÓSTICO, PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA INFECCIÓN POR *C. ABORTUS*

Los signos clínicos que evidencian los animales afectados por *C. abortus* no son suficientes para llegar a un diagnóstico certero de la enfermedad. Algunos datos epidemiológicos en rebaños ovinos, como la presencia continua de abortos y la afectación mayoritaria de primíparas con abortos tardíos, nacidos débiles o mortinatos, así como la observación macroscópica de placentas con lesiones necrótico-hemorrágicas, pueden hacer sospechar al clínico de la presencia de AEO como primer diagnóstico diferencial. Sin embargo, existen otras enfermedades abortivas en los pequeños rumiantes que pueden cursar con cuadros similares, como la toxoplasmosis, la brucelosis o la fiebre Q, por lo que la única forma de emitir un diagnóstico certero implica la confirmación laboratorial (Borel *et al.*, 2014a).

Las técnicas laboratoriales que se pueden emplear para el diagnóstico de *C. abortus*, pueden clasificarse en directas e indirectas. Las primeras persiguen la identificación de *C. abortus* en las muestras recibidas (bacterioscopía mediante tinción, técnicas inmunológicas directas, aislamiento o PCR). Tradicionalmente se ha considerado el aislamiento como la técnica “gold standard” para el diagnóstico de las infecciones clamidiales. Sin embargo este procedimiento presenta varios inconvenientes. Por un lado la toma, almacenamiento y transporte de la muestra, deben cumplir unos requisitos especiales para asegurar la viabilidad de los microorganismos y evitar la contaminación. Además, la técnica en sí requiere mucho tiempo, dinero y la pericia de un técnico experto. Por ello, Sachse *et al.* (2009) sugirieron considerar como técnica de referencia para el diagnóstico clínico la técnica de qPCR en combinación con un microarray de ADN específico (ArrayTube™) cuya sensibilidad ha sido previamente validada en muestras clínicas (Sachse *et al.*, 2005, 2009; Borel *et al.*, 2008a; Pantchev *et al.*, 2010).

Por otra parte, las técnicas de diagnóstico indirecto tratan de detectar productos de la respuesta inmunitaria dejada en el animal por el padecimiento de la infección y están basadas en la detección y cuantificación de anticuerpos específicos (respuesta humoral), como en la puesta en evidencia de una reacción inmunitaria de base celular. Este tipo de diagnóstico, si bien no es el utilizado como de referencia, su aplicación es importante en el AEO, donde es especialmente relevante la inmunidad de rebaño, tratándose de conocer más el estado sanitario del rebaño, que el del individuo. De entre las pruebas más empleadas en el diagnóstico indirecto del AEO, destacan la inmunofluorescencia indirecta (IFI), la reacción de fijación del complemento (RCF) o las técnicas de ELISA (Sachse *et al.*, 2009). Estas técnicas tienen como

principales inconvenientes que muchas de ellas no permiten diferenciar infecciones crónicas/latentes de las recientes y que su sensibilidad y especificidad son menores que las técnicas de diagnóstico directo.

## 8.1. Prevención y control

En la prevención y control de la clamidiosis en pequeños rumiantes se establecen tres tipos de medidas:

### 8.1.1. Manejo

El objetivo de estas medidas va a ser evitar la introducción de animales infectados en rebaños libres de la enfermedad, manteniendo estos últimos bajo un sistema cerrado o incorporando animales de reposición procedentes de granjas libres de *C. abortus*. Si el patógeno ya está en el rebaño, se debe aislar inmediatamente a los animales que aborten, retirar los restos del aborto y limpiar y desinfectar la paridera para limitar en la medida de lo posible la diseminación de la enfermedad (Longbottom y Coulter, 2003). Estas medidas son de difícil aplicación debido a la presencia de portadores asintomáticos y la imposibilidad de distinguir animales vacunados de infectados mediante diagnóstico serológico convencional (Gerber *et al.*, 2007; Entrican *et al.*, 2012).

### 8.1.2. Tratamiento con antibióticos

Hay disponible una amplia gama de antibióticos y terapias para el tratamiento de las infecciones clamidiales dependiendo del tipo de clamidia, el sitio de infección y la especie del hospedador infectado. Las tetraciclinas son los antibióticos más usados en rebaños de ovejas gestantes infectadas por *C. abortus* para reducir la incidencia de abortos y muertes perinatales (Aitken, 2007). Sin embargo, hay varias cuestiones que advierten contra una dependencia excesiva de su uso ya sea profiláctica o terapéuticamente. La primera es que el uso de antibióticos no garantiza evitar el aborto ni la eliminación de patógenos al ambiente durante el parto (Longbottom y Coulter, 2003). La segunda es que existe el riesgo de la resistencia a los antibióticos. Aunque no se ha reportado resistencia a la tetraciclina en *C. abortus*, sí se ha encontrado en cepas de *Chlamydia suis* aisladas de cerdos (Lenart *et al.*, 2001; Dugan *et al.*,

## Revisión Bibliográfica

2004; Borel *et al.*, 2016). Aunque la resistencia a los antibióticos en las clamidias sigue siendo un hallazgo clínico relativamente raro *in vivo*, se ha demostrado que en condiciones *in vitro*, *C. suis* es capaz de desarrollarlas a través de la acumulación de mutaciones puntuales bajo presión antibiótica selectiva (Sandoz y Rockey, 2010). Además, la resistencia a la tetraciclina puede transferirse horizontalmente, lo que sugiere que una presión sostenida podría impulsar la propagación de la resistencia (Suchland *et al.*, 2009).

Otro punto a tener en cuenta es, además de la duración del tratamiento, el momento de éste en relación con el momento en que se contrajo la infección. Existen indicios de que los antibióticos puedan generar estados de persistencia clamidial que contribuirían a mantener la infección dentro del rebaño (Hogan *et al.*, 2004). Así, mientras que las infecciones clamidiales no complicadas tienden a responder bien a los antibióticos, las infecciones persistentes/crónicas requieren un tratamiento más largo e incluso pueden ser refractarias a la terapia antibiótica, lo que podría confundirse con una resistencia a los antibióticos adquirida genéticamente (Sandoz y Rockey, 2010). Esto aboga por un tratamiento rápido después de la infección. Sin embargo, se ha formulado la hipótesis de que estas estrategias están contribuyendo a un aumento de las tasas de reinfección, ya que los antibióticos restringen la progresión de la infección y al hacerlo interfieren con el desarrollo de la inmunidad protectora, lo que resulta en una mayor susceptibilidad a la reinfección (Karunakaran *et al.*, 2010). Por otro lado merece destacar el hecho de que las dosis terapéuticas indicadas en la ficha técnica para tratamientos frente a determinadas infecciones en ovino utilizando tetraciclinas no son efectivas estando muy alejadas de la concentración mínima inhibitoria (CMI) (Bello, 2019)

A todo lo anterior, hay que sumar los últimos cambios a nivel normativo europeo que restringen el uso de antibióticos (REGLAMENTO (UE) 2019/6 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 11 de diciembre de 2018 sobre medicamentos veterinarios y por el que se deroga la Directiva 2001/82/CE) junto con la posible presencia de residuos de los mismos en alimentos de origen animal, hace que el tratamiento con estos fármacos no deba ser rutinario para controlar la infección, sino que se debe reservar para casos excepcionales (Longbottom y Coulter, 2003).

### 8.1.3. Vacunación

Como ya se ha mencionado anteriormente, tras una primoinfección con *C. abortus* seguida del aborto, los animales generan una respuesta inmunitaria de memoria eficaz que hace

que no vuelvan a sufrir problemas reproductivos en posteriores contactos con el agente infeccioso, de ahí que la vacunación sea la medida más eficaz para el control y prevención de la enfermedad.

En la actualidad existen dos tipos de vacunas disponibles comercialmente, las inactivadas y las vivas atenuadas. Las dos contribuyen al control de la enfermedad, pero ninguna en la actualidad confiere protección total frente al desafío natural ni elimina completamente la diseminación del agente infeccioso en el rebaño. Sin embargo, los animales vacunados expuestos a la infección, experimentan un número significativamente menor de abortos y una reducción de la eliminación de clamidias durante un periodo que abarca entre dos y tres gestaciones con posterioridad a la vacunación (Manual terrestre de la OIE, 2012).

Las vacunas inactivadas fueron las primeras en utilizarse poco después del descubrimiento de la causa de la enfermedad, en la década de los 50 (McEwen *et al.*, 1951). Algunos estudios han puesto de manifiesto la ineficacia de las vacunas inactivadas disponibles comercialmente hasta la fecha, tanto en modelo murino (Caro *et al.*, 2001) como en ovino (García de la Fuente *et al.*, 2004). En el caso del hospedador natural se ha comprobado en ensayos de eficacia de estas vacunas comerciales, que no existen diferencias significativas entre animales vacunados y no vacunados en cuanto a la prevención de fallos reproductivos y excreción de clamidias en los días posteriores al parto/aborto, aunque sí que se observa un efecto positivo de la vacunación sobre el peso de los corderos nacidos vivos (García de la Fuente *et al.*, 2004; García-Seco *et al.*, 2016). El principal problema que plantea el uso de las vacunas inactivadas que existen en el mercado actualmente es que no impiden la excreción de clamidias en el momento del parto, favoreciendo la persistencia de la infección de forma enzoótica en el rebaño vacunado. Este hecho puede provocar que exista una selección a favor de aquellas cepas más virulentas (Rodolakis y Souriau, 1979; Wilsmore *et al.*, 1990a; García de la Fuente *et al.*, 2004).

La vacuna atenuada comercial es una cepa mutante del microorganismo (cepa 1B) obtenida por inducción química y termosensible (Rodolakis y Souriau, 1983), es decir, crece como una cepa normal a 37 °C, pero a 39,5 °C (temperatura corporal normal de las ovejas), su crecimiento es, en teoría, muy limitado. Esta vacuna demostró ser muy efectiva en condiciones de campo, reduciendo el número de animales infectados, la gravedad de la infección y la excreción de clamidias (Chalmers *et al.*, 1997). Sin embargo, a pesar de estos buenos resultados, la naturaleza “viva” de una vacuna siempre implica riesgos y limitaciones en su uso, más aún en el caso de *C. abortus*, que puede causar una grave zoonosis en mujeres embarazadas. Además,

## Revisión Bibliográfica

esta vacuna no puede administrarse a animales gestantes o a animales tratados con antibióticos, lo que restringe aún más su uso. Existe también el riesgo de que las cepas atenuadas reviertan a virulentas y causen enfermedad y aborto en animales vacunados. Algunos estudios han demostrado la conexión entre esta vacuna y la aparición de brotes de AEO, sobre todo cuando es empleada a dosis bajas (Laroucau *et al.*, 2010, 2018; Wheelhouse *et al.*, 2010; Sargison *et al.*, 2015; Longbottom *et al.*, 2018), e incluso que una de las cepa más utilizadas en este tipo de vacunas no está realmente atenuada (Longbottom *et al.*, 2018), lo cual hace que su uso resulte cada vez menos atractivo para veterinarios y ganaderos.

Otro inconveniente de las vacunas inactivadas y atenuadas es la imposibilidad de diferenciar, con las pruebas serológicas convencionales, animales vacunados de infectados (DIVA) (Borel *et al.*, 2005). Una forma de evitar este y otros inconvenientes de las vacunas anteriormente descritas, sería el desarrollo de una vacuna subcelular que contenga aquellas moléculas clamidiales que intervengan específicamente en la inducción de una respuesta inmunitaria efectiva. La principal proteína candidata es la MOMP, que induce protección administrada en su forma oligomérica nativa (de Sa *et al.*, 1995). Sin embargo, la purificación de esta proteína a partir de cultivos es una técnica demasiado costosa para la elaboración de vacunas para el ganado, y ensayos hechos con distintas formas recombinantes de la proteína no han tenido buenos resultados (Longbottom, 2003). Por otra parte, los ensayos con antígenos recombinantes y péptidos no han conseguido igualar o mejorar los resultados de eficacia protectora de la vacuna inactivada o atenuada, por lo que la investigación se ha centrado en mejorar la presentación de dichos antígenos mediante la selección de adyuvantes, vehículos y vías de inoculación (Longbottom y Livingstone, 2006).

Finalmente, gracias a la secuenciación del genoma de *C. abortus* también se está trabajando en la síntesis de vacunas de ADN. El potencial de las vacunas de ADN en concreto ha llamado la atención de los investigadores debido a los buenos resultados de protección obtenidos en modelo murino (Zhang *et al.*, 2009). Aunque, generalmente, las vacunas de ADN no consiguen la misma efectividad en grandes animales que en ratones debido a una transfección deficiente (Babiuk *et al.*, 2003), recientemente se ha analizado la respuesta inmunitaria inducida por una vacuna de ADN basada en el gen *ompA* y vehiculada en el bacteriófago  $\lambda$  sobre lechones y se han conseguido niveles de protección, a nivel humoral y celular, significativamente superiores a los obtenidos con la vacuna viva atenuada 1B (Ou *et al.*, 2013).

Otro aspecto a considerar son los adyuvantes, sustancias químicas o componentes microbianos capaces de potenciar la respuesta inmunitaria generada por los antígenos vacunales a los que se asocian. Generalmente su investigación se ha relegado a un segundo lugar con respecto a la búsqueda de nuevos antígenos protectores. Sin embargo, la elección del adyuvante en la elaboración de vacunas es de vital importancia ya que son capaces de polarizar la respuesta inmunitaria hacia un tipo específico de inmunidad y hacer que al final una vacuna sea eficaz o no. De hecho, varios autores empleando modelos murinos de infección con *C. abortus*, han ensayado numerosos adyuvantes, seleccionándose los que mejor resultado de protección han ofrecido (Caro *et al.*, 2003). Posteriormente, García de la Fuente *et al.* (2004), describieron que vacunas experimentales inactivadas de *C. abortus* adyuvadas con la saponina QS-21 o el Montanide ISA 773 inducían mejor protección en ovejas al compararlas con vacunas comerciales adyuvadas con hidróxido de aluminio. Recientemente, ha sido publicado, un nuevo estudio que avala los buenos resultados del adyuvante QS-21, en un modelo de infección experimental en ovino (hospedador natural), utilizando las vías de infección intratraqueal e intranasal (Alvarez *et al.*, 2015).

## 9. INFECCIÓN EXPERIMENTAL POR *C. ABORTUS* EN MODELO MURINO

Aunque el ratón no es el hospedador natural de *C. abortus*, el modelo murino se ha utilizado ampliamente para estudiar la patogénesis y los mecanismos inmunitarios que ocurren tras la infección, dadas las similitudes entre la enfermedad inducida de forma experimental en ratones y la que se manifiesta en los hospedadores naturales (oveja y otros pequeños ruminantes). Además, el modelo murino presenta la ventaja de ser mucho más económico y de fácil gestión y manejo, que otros modelos experimentales que usan el modelo ovino (hospedador natural). De hecho, el modelo murino ha sido ampliamente utilizado para el estudio de los mecanismos inmunopatológicos que acontecen durante la infección por *C. abortus*, así como para evaluar la eficacia de vacunas comerciales y experimentales frente a *C. abortus* (revisado en Caro *et al.*, 2009).

El modelo murino, ha sido pues ampliamente validado para reproducir de forma controlada la infección y estudiar en detalle los mecanismos implicados, en la respuesta inmunitaria frente a *C. abortus*. Estos aspectos son más complicados de realizar con el hospedador natural, ya que no existen ciertos reactivos biológicos para ovino, como anticuerpos contra marcadores leucocitarios, tests de detección de citoquinas, etc., cuya utilización puede ser

## Revisión Bibliográfica

interesante o incluso imprescindible en el estudio pormenorizado de la respuesta inmunitaria frente a *C. abortus*. Además, el modelo murino se ha utilizado y sigue utilizándose como modelo idóneo de validación de la eficacia de vacunas contra las bacterias de la familia *Chlamydiaceae*, antes de testarlas en el hospedador definitivo; conocidos son, por ejemplo, los ensayos llevados a cabo con vacunas frente a *C. trachomatis* (Longbottom y Livingstone, 2006), y con vacunas frente a *C. abortus* (revisado en Caro *et al.*, 2009).

En ratones no gestantes, tras la infección con una dosis no letal de *C. abortus*, éstos padecen un síndrome febril con letargia, anorexia, debilidad y erizamiento del pelo, lo que les provoca una pérdida de peso que alcanza su máximo los días 6 o 7 pi, a partir del día 8 los animales comienzan a recuperarse y la enfermedad se resuelve sin dejar ningún tipo de secuela en el animal.

En un análisis microscópico, los órganos más afectados son el hígado, que sufre una leve hepatitis multifocal, y el bazo en el que se aprecia una pérdida de diferenciación entre la pulpa roja y blanca, ambas lesiones revierten a partir del día 10 pi. En el caso de que estos animales sean reinfectados con *C. abortus*, los animales no muestran cuadro clínico y la única lesión evidente será la aparición en el día 3 pi de pequeños focos de infiltrado linfocitario en bazo e hígado que desaparecen en días sucesivos (Buendia *et al.*, 1999b; Del Rio *et al.*, 2000).

La cinética de la respuesta inmunitaria se ha estudiado en modelos murinos infectados por distintas vías. Así, se han utilizado las vías de infección intraperitoneal e intravenosa (Buendia *et al.*, 1998), intranasal (Buendia *et al.*, 2007) e intragástrica (del Rio *et al.*, 2013). El cuadro clínico y lesional varía según la vía escogida. Por ejemplo, en modelos infectados de forma intraparenteral, los animales sufren una infección sistémica caracterizada por un síndrome febril con letargia, anorexia, debilidad y erizamiento del pelo, que es controlado por el ratón a los 4-8 días pi y que provoca el aborto en animales gestantes (Rodolakis, 1976; *revisado en Caro et al.*, 2009). Por el contrario, la infección intranasal induce una grave neumonía que puede ser letal en función de la dosis y producir abortos en animales gestantes (Buendia *et al.*, 2007). Por otra parte, la infección intragástrica produce signos leves de infección sistémica y abortos tardíos (del Rio *et al.*, 2013). El cuadro clínico observado en estas dos últimas vías de infección se asemeja más al descrito en el hospedador natural (oveja).

## 10. INFECCIÓN EXPERIMENTAL POR *C. ABORTUS* EN MODELO OVINO

A pesar de las evidentes ventajas que ofrece el modelo murino, resulta imprescindible la investigación en el hospedador natural para obtener una visión más cercana a la realidad y comprobar posibles diferencias respecto a los modelos experimentales murinos, relacionadas con la fisiología propia de cada una de las especies empleadas.

Pese a ser teóricamente el modelo ideal para el estudio de la fisiopatología del AEO en todas sus posibles variantes, el modelo ovino presenta una serie de desventajas que hacen más recomendable el uso de otros modelos, como el murino descrito anteriormente. Entre las principales desventajas del empleo de ovejas en el estudio de la infección clamidial, podemos citar su elevado coste y complicada gestión y manejo. Al elevado coste de los propios animales, hay que sumar los costes de la alimentación, la cama y el agua, además se tiene que contar con instalaciones adecuadas y acondicionadas para este tipo de animales en cada fase del experimento, especialmente cuando los animales están infectados, donde la limpieza periódica de las mismas y la correcta eliminación de los residuos generados es fundamental. A parte de todo lo anterior, una vez terminada la experiencia con los animales, a la hora de procesar las muestras recogidas para la obtención de datos, en ocasiones no es posible encontrar en el mercado todos los reactivos biológicos para esta especie, como anticuerpos contra ciertos marcadores leucocitarios, tests de detección de citoquinas de reciente descubrimiento, etc., cuyo empleo puede ser de gran interés en el estudio pormenorizado de los mecanismos inmunológicos asociados a la infección por *C. abortus*.

A pesar de sus limitaciones principalmente económicas y logísticas, como se ha dicho anteriormente, el empleo del modelo ovino resulta imprescindible para el estudio del AEO de la forma más parecida posible a como se desarrolla en un escenario real. Así, este modelo se ha utilizado en varios estudios sobre la respuesta inmunitaria, la histopatología y sobre la propia patogenia de la infección por *C. abortus*. Podemos citar estudios para la valoración de la eficacia de diversas vacunas comerciales, tanto atenuadas como inactivadas en solitario (Rodolakis y Souriau, 1983; Garcia-Seco *et al.*, 2016), en combinación con otras bacterias abortigénicas atenuadas como *Brucella melitensis* y *Salmonella abortus ovis* (Souriau *et al.*, 1988), así como la comparación de la eficacia de vacunas inactivadas experimentales (García de la Fuente *et al.*, 2004).

En estudios histopatológicos y de respuesta inmunitaria inducida durante la infección, varios autores han descrito que cuando se produce la colonización placentaria por *C. abortus*,

## Revisión Bibliográfica

ésta se multiplica en el epitelio trofoblástico de las vellosidades coriales de los placentomas ovinos y que pese a la escasa colonización de los fetos por *C. abortus*, los neonatos infectados pueden presentar lesiones como neumonía, encefalitis, hepatitis e incluso miocarditis, posiblemente debidas a la inmadurez del sistema inmunitario de estos animales (Navarro *et al.*, 2004; Sammin *et al.*, 2006; Gutierrez *et al.*, 2011). Posteriormente Longbottom *et al.* (2013), en un estudio de infección experimental con distintas dosis por vía intranasal de ovejas previamente a la gestación, concluyeron que el aborto estaba condicionado con las dosis infectivas utilizadas en la experiencia, de tal forma que a dosis bajas, mayor fue el porcentaje de ovejas que abortaron. Los autores sugirieron que podía ser debido a un posible establecimiento de infección latente en estos animales, posiblemente por una menor estimulación del sistema inmunitario con la producción de bajas concentraciones de IFN- $\gamma$  que podrían favorecer las infecciones latentes.

El empleo del modelo ovino también ha sido una importante fuente de información sobre la patogenia de la enfermedad. Así, el modelo ovino gestante se ha utilizado para estudiar la patogénesis de la infección por *C. abortus* a nivel placentario y fetal (Buxton *et al.*, 1990), para evaluar la susceptibilidad de la mucosa vaginal a la infección clamidial haciendo posible la transmisión venérea (Papp y Shewen, 1996) y para realizar estudios sobre la localización (Papp y Shewen, 1996a), y excreción (Papp *et al.*, 1994) del patógeno durante las siguientes épocas reproductivas posteriores al primer aborto.

Por otro lado, Alvarez *et al.* (2015) compararon la vía de infección intranasal e intratraqueal para valorar el efecto de cada una de ellas en la eficacia de la vacunación frente a *C. abortus*. Así, la inoculación intranasal de *C. abortus* no produjo lesiones evidentes ni se pudo detectar la presencia de antígeno clamidial en los pulmones de estos animales, mientras la infección intratraqueal, provocó una neumonía temprana confirmando la idoneidad de esta vía de infección experimental para ensayos con vacunas en el hospedador natural.

# PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

## 1. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

*Chlamydia abortus* (*C. abortus*) es el agente causal del aborto enzoótico ovino (AEO), una enfermedad que afecta principalmente a los pequeños rumiantes domésticos y produce importantes pérdidas económicas en este sector ganadero en todo el mundo, así como supone un indudable riesgo para la mujer embarazada, dado su carácter zoonótico. Esta bacteria intracelular obligada produce en animales no gestantes una infección que cursa inicialmente de forma asintomática, pudiendo permanecer de forma subclínica o latente durante varios meses, hasta que el animal queda gestante. Es entonces cuando se produce una reactivación de la infección y el microorganismo coloniza la placenta y se multiplica. Estos hechos desembocan en procesos patológicos durante el último tercio de gestación provocando finalmente abortos o partos prematuros de mortinatos o corderos débiles (Essig y Longbottom, 2015). Después de estos acontecimientos, los animales adquieren inmunidad protectora y no experimentan más episodios abortivos por este microorganismo. Sin embargo, se convierten en portadores que diseminarán la bacteria en los siguientes estros a través de sus tractos reproductivos, contribuyendo a la propagación de la infección a los animales no expuestos previamente al microorganismo (Wilsmore *et al.*, 1990, Papp *et al.*, 1994; Papp y Shewen, 1996). Este proceso de latencia/multiplicación activa que desencadena la reactivación del ciclo clamidial en ciertos momentos de la gestación y del ciclo estral, sugiere que las hormonas sexuales de la hembra podrían desempeñar un papel importante en la fisiopatología del AEO y también afectar al sistema inmunitario, condicionando el éxito de la resolución de la infección clamidial del organismo y la eficacia de la prevención activa mediante la vacunación.

Estudios previos han demostrado en ciertas bacterias intracelulares, incluyendo otras especies de clamidias como *C. trachomatis*, que el 17 $\beta$ -estradiol (E2) y la progesterona (P4) son capaces de modular la respuesta inmunitaria frente a estas bacterias así como influir en la interacción patógeno intracelular-célula hospedadora.

Existe el consenso general en la comunidad científica de que la P4 tiene efectos antiinflamatorios, inhibiendo el desarrollo de respuestas tipo Th1 y promoviendo las de tipo Th2 (Piccinni *et al.*, 2000a), mientras que el E2 parece tener un efecto dual sobre la polarización de la respuesta inmunitaria potenciando tanto la producción de citoquinas Th1 como de citoquinas Th2, dependiendo de su concentración (Gilmore *et al.*, 1997; Correale *et al.*, 1998).

## Planteamiento y objetivos

Dentro del género *Chlamydia*, varias líneas de investigación sugieren que las fluctuaciones de las hormonas mencionadas podrían actuar como factores desencadenantes para la reactivación de infecciones clamidiales latentes (Guseva *et al.*, 2003), así como de ser capaces de modular las respuestas inmunitarias contra ellas e influir en las interacciones entre las clamidias y las células hospedadoras (Beagley y Gockel, 2003; Amirshahi *et al.*, 2011; Wan *et al.*, 2014).

Varios estudios tanto *in vitro* como *in vivo* sugieren que las hormonas mencionadas afectan a la susceptibilidad a la infección por parte de las células hospedadoras. Así, se ha demostrado que el tratamiento con E2 favorece la adhesión y el desarrollo de inclusiones de *C. trachomatis* en células endometriales humanas en cultivo, mientras que el tratamiento conjunto de E2 y P4 disminuye significativamente la adhesión (Maslow *et al.*, 1988; Hall *et al.*, 2011; Kintner *et al.*, 2015). Otros estudios en *C. suis* corroboran estos efectos, pues las células del tracto reproductor eran más susceptibles a la infección al ser recolectadas en fases del ciclo estral con predominio de los estrógenos que cuando se obtenían en fases con predominio de la P4 (Guseva *et al.*, 2003). Por otro lado, en modelos de infección con *C. muridarum* se suele administrar P4 a las ratonas por vía vaginal para aumentar la permeabilidad del aparato reproductor a la bacteria y así favorecer la infección vaginal (Morrison *et al.*, 2011). Sin embargo, las cobayas son más susceptibles a la infección por *C. caviae* después de la administración de E2 (Pasley *et al.*, 1985a). Estudios *in vivo* con *C. trachomatis* muestran que esta bacteria desarrolla cambios en su expresión génica, similares a los observados en las respuestas de estrés halladas en modelos de persistencia clamidial, cuando se les administra E2. Por otro lado, la administración de P4 produce un aumento de la expresión de genes que codifican elementos del metabolismo energético (Amirshahi *et al.*, 2011).

Todos estos estudios ponen de manifiesto el papel que podrían jugar los esteroides sexuales de la hembra en la susceptibilidad y patogenia de las infecciones clamidiales. Sin embargo, pese a que se ha hipotetizado en numerosas ocasiones sobre la posible implicación de factores endocrinos en la patogenia de la infección por *C. abortus* (Leaver *et al.*, 1989; Buxton *et al.*, 1990; Kerr *et al.*, 2005), hasta la fecha no se han publicado trabajos al respecto en esta especie.

A sí pues, la hipótesis de partida de la presente tesis doctoral es que las hormonas sexuales de la hembra son capaces de modular la respuesta inmunitaria frente a *C. abortus*, afectando al curso de la infección, a la inducción de la inmunidad protectora y a la eficacia de la vacunación. Así, nuestra hipótesis inicial es que los estrógenos, como el 17 $\beta$ -estradiol, pueden

favorecer la respuesta inmunitaria celular frente a la infección, facilitando el establecimiento de una respuesta inmunitaria vacunal mediada por anticuerpos y la eficacia de la misma. Por otro lado, la P4, dado su carácter inmunosupresor, podría alterar la regulación de la respuesta inmunitaria generando una respuesta menos efectiva frente a la infección clamidial o durante el proceso de vacunación frente a ella.

Por lo tanto, a partir de la hipótesis planeada, el objetivo principal de esta tesis doctoral, ha sido analizar el efecto de las hormonas sexuales,  $17\beta$ -estradiol y progesterona, sobre la cinética de la infección y la respuesta inmunitaria inducida por *C. abortus* en modelos experimentales ovinos y murinos.

Para poder cumplir con el objetivo principal, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Analizar el efecto del estradiol y la progesterona sobre la respuesta inmunitaria y el curso de la infección por *C. abortus* en un modelo murino.
- Describir el efecto del estradiol y la progesterona sobre ratones vacunados e infectados por *C. abortus*.
  - Efecto de las hormonas durante la vacunación sobre la inducción de una respuesta inmunitaria protectora.
  - Efecto de las hormonas durante la infección sobre la protección de animales previamente vacunados.
- Estudiar el efecto de la progesterona sobre la eficacia de la vacunación analizando el curso de la infección en un modelo ovino de desafío intratraqueal.

Para ello, se utilizaron animales ovariectomizados tratados con las hormonas propuestas y se analizó el efecto inducido por las mismas durante la infección, controlando su morbilidad, los posibles cambios en su curso (cinética de la infección), las alteraciones histopatológicas inducidas por la bacteria y las características de la respuesta inmunitaria tanto innata como adquirida. Igualmente, se analizó el efecto de las hormonas en el momento de la inmunización con la vacuna (fase inductora de la inmunidad vacunal) y su efecto en el momento de la infección de animales vacunados (fase efectora de la inmunidad vacunal). Por otra parte, en el modelo ovino, se analizaron los mismos parámetros que en los modelos murinos pero sólo bajo la administración de progesterona, dados los impedimentos legales del uso del  $17\beta$ -

## Planteamiento y objetivos

estradiol en animales de abasto y con la perspectiva de acercar la experiencia a situaciones reales en el entorno ganadero como pueden ser la sincronización de celo mediante la aplicación de esponjas vaginales con progestágenos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

## 1. MICROORGANISMO

En todos los experimentos, se usó la cepa AB7 de *Chlamydia abortus* aislada a partir de un aborto ovino (Faye *et al.*, 1972) y cedida a nuestro laboratorio en 1991 por la Dra. Anie Rodolakis de la Unidad de Clamidiosis de la Station de Pathologie Infectieuse et Immunologie (INRA-Nouzilly, Francia). El motivo de la elección de esta cepa radica en su carácter virulento, extensamente probado tanto en modelos murinos (*Revisado en: Caro et al.*, 2009) como en el hospedador natural (*Revisado en: Rodolakis y Laroucau*, 2015).

### 1.1. Cultivo y producción de *C. abortus*

#### 1.1.1. Cultivo en saco vitelino de embrión de pollo

Con el fin de obtener una cantidad suficiente de clamidias viables para la infección de los animales y la elaboración de las vacunas, se procedió a cultivar la bacteria en saco vitelino de embrión de pollo. El cultivo se realizó mediante inoculación de 0,2 mL de una suspensión de  $2 \times 10^6$  unidades formadoras de inclusiones (UFI) de *C. abortus* en tampón fosfato salino 0,1M pH 7,2 (PBS) estéril en huevos de gallina fecundados y libres de patógenos, de 7 días de incubación en estufa a 37 °C y con sistema de volteo cada 30 minutos.

Para ello, se delimitó la cámara de aire del huevo mediante un ovoscopio, inoculando la suspensión bacteriana con una aguja de 0,9 x 40 mm, depositando el inóculo en el lado opuesto al que ocupaba el embrión. Tras sellar el punto de inoculación con cera, los huevos inoculados se mantuvieron en incubadora a una temperatura de 37,5 °C y con humedad constante, observándose diariamente con ovoscopio para detectar las posibles muertes embrionarias. La muerte de los embriones durante los 3-4 días siguientes a la infección no se consideró provocada por ésta, sino a posibles problemas traumáticos o tóxicos del procedimiento. Así pues se eliminaron los huevos cuyo embrión murió antes de los 4 días post infección (dpi). La infección por *C. abortus* provoca la muerte embrionaria a los 6 u 8 días, por lo que sólo se utilizaron los huevos que sobrevivieron a la primera semana tras la inoculación, momento en el cual se abrieron para poder obtener el cultivo.

Previamente a su apertura, los huevos se mantuvieron a 4 °C durante 2 horas, para facilitar la manipulación del saco vitelino. Una vez extraído, el saco vitelino se diluyó a 1/3 (peso/volumen) en PBS, macerándose en un mortero de loza con arena de mar lavada estéril

## Material y métodos

(Panreac®). El macerado se centrifugó 10 min a 175 x g para eliminar, por un lado, la fracción lipídica, localizada en la parte superior del sobrenadante y por otro, los restos celulares más groseros, que sedimentan, recogiendo la porción intermedia de este centrifugado, que es la más rica en bacterias.

Una vez recogidas las bacterias y antes de distribuir las en alícuotas, se realizó un control de esterilidad, sembrando una muestra en agar Columbia enriquecido con 5% de sangre de cordero (bioMérieux®) incubándose durante 24 horas a 37 °C.

Paralelamente, algunos huevos embrionados se inocularon con PBS estéril, para obtener macerados de sacos vitelinos que se emplearon como controles negativos de infección o de antígeno en las técnicas serológicas ELISA empleadas en esta tesis. Tras un tratamiento similar al descrito, se distribuyeron en alícuotas y se conservaron a -80 °C.

Para determinar la riqueza en *C. abortus* de las membranas vitelinas obtenidas, se realizó una extensión de cada macerado obtenido, secándose por calor y tiñéndose seguidamente por el método de Stamp *et al.* (1950).

Cada muestra se valoró mediante observación directa en microscopio óptico, clasificando subjetivamente las muestras de 0 a 5 puntos, según la cantidad de *C. abortus* encontrada. Sólo se seleccionaron las membranas vitelinas puntuadas con 4 o 5. Todos los lotes de sacos vitelinos fueron titulados siguiendo la metodología descrita en el apartado 1.1.2.4.

### 1.1.2. Cultivo de la línea celular McCoy

Para poder realizar las diferentes experiencias desarrolladas en la presente tesis, se procedió a realizar un cultivo clamidial en células McCoy. Esta línea celular procede de células epiteliales humanas cultivadas junto con fibroblastos murinos y son especialmente sensibles a la infección clamidial. La línea celular se conserva en nitrógeno líquido en la Sección de Cultivo de Tejidos, integrada en el Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia.

#### 1.1.2.1. Descongelación, recuento y estimación de la viabilidad de las células

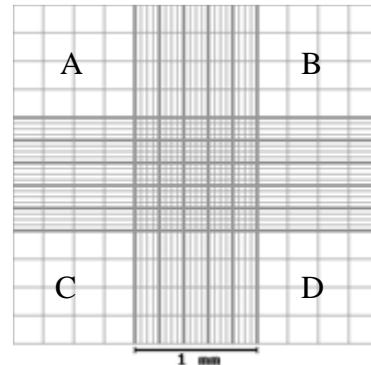
La descongelación de las células se llevó a cabo rápidamente en el criotubo en el que se hallaban, introduciéndolo en un baño a 37 °C en agitación suave. Una vez descongeladas, se resuspendieron en 9 mL de Medio Esencial Mínimo de Eagle (MEM) suplementado (Ver anexo) y se centrifugaron durante 10 minutos a 200 x g. Tras la centrifugación, las células se

resuspendieron en 5 mL de MEM suplementado y se distribuyeron en frascos de 25 cm<sup>2</sup> (Falcon®, NUNC).

Para estimar la concentración de células viables, se realizó una tinción vital con Azul Tripán. Para realizar la tinción, se depositaron 50-100 µL de la suspensión celular en un tubo de 1mL, al que se añadió el mismo volumen de una solución filtrada de Azul Tripán al 1% en PBS. La mezcla se agitó suavemente y se depositó en la cámara interior de un hemocitómetro de Neubauer que fue observado en un microscopio óptico de campo claro (Zeiss®).

Para realizar el recuento, usando el objetivo de 10x del microscopio óptico, se enfocó la rejilla tallada en la cámara (figura 13) y se contaron las células presentes en los 16 cuadros de cada área A, B, C y D. Las células vivas son refringentes al conservar intacta su membrana y las alteradas se tiñen de azul. Se calculó la concentración de células viables usando la siguiente fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ células viables/mL} = \frac{A+B+C+D}{4} \times 2 \times 10000$$



**Figura 13.** Hemocitómetro de Neubauer

#### 1.1.2.2. Multiplicación de células McCoy

Las células McCoy se multiplicaron hasta obtener la cantidad necesaria para realizar las titulaciones de las suspensiones clamidiales y para la producción de antígeno clamidial. Para ello, los cultivos en los que se forma un tapiz confluyente se sometieron a varios subcultivos o pases.

Para llevarlo a cabo, el tapiz celular formado en el fondo de la botella se disgregó mediante tratamiento enzimático, añadiendo 1,5 mL de una solución de 0,2 mg/mL de tripsina en PBS y 0,4 mg/mL de ácido etilen-diaminatetraacético (EDTA) en PBS dejándola actuar durante 4 minutos a 37 °C. Pasado ese tiempo se comprobó al microscopio invertido que las células se habían desprendido de la superficie de cultivo. A continuación se añadieron 3,5 mL de medio de cultivo suplementado para neutralizar la actividad de la tripsina (5 mL en el caso de frascos de 75 cm<sup>2</sup>). En un nuevo frasco de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> se añadieron 4 mL de medio de cultivo suplementado (12 mL en el caso de los frascos de 75 cm<sup>2</sup>) y, una vez calculado el número de células viables, tal y como se ha descrito previamente, se sembró el número de células adecuado (1 mL de suspensión celular en el caso de frascos de 25 cm<sup>2</sup> y 2,5 mL en los de 75 cm<sup>2</sup>) y se incubaron a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.

## Material y métodos

Transcurridos 2 o 3 días, cuando el tapiz fue confluyente, las células se tripsinizaron de nuevo y se hizo un nuevo pase a otra botella de cultivo celular o se transfirieron a placas de 96 pocillos (Iwaki®).

### 1.1.2.3. Infección del tapiz celular

Una vez obtenida la cantidad de células McCoy óptima, se infectaron con la cepa AB7 de *C. abortus*, siguiendo la técnica descrita por Salinas *et al.* (1994). Para ello, el inóculo infectante fue diluido en un tampón de PBS (pH 7,2) con 100 µg/mL de Dietilaminoetil Dextrano (DEAE-D), se añadió a un cultivo de células McCoy y se dejó incubar durante 90 minutos a 37 °C. Pasado ese tiempo, se centrifugó a 840 x g durante 30 minutos para favorecer la adhesión y penetración de las clamidias en las células y se lavó suavemente con PBS. Tres días más tarde, se añadió cicloheximida a una concentración final de 2 µg/mL en MEM suplementado, para inhibir la multiplicación celular. Esto permite la multiplicación clamidial evitando el excesivo crecimiento de las células McCoy. El cultivo se mantuvo durante 6-7 días a 37 °C.

### 1.1.2.4. Titulación de suspensiones de *C. abortus* en células McCoy

Con el fin de conocer el número de UFI presentes en las suspensiones de sacos vitelinos para poder estimar la carga bacteriana de los inóculos para la infección de los animales o de las muestras procedentes de los animales de los modelos experimentales, se cultivaron células McCoy en una placa de 96 pocillos, a una concentración de 20.000 células viables por pocillo, en 100 µL. Las placas se incubaron en estufa de 37 °C con atmósfera de CO<sub>2</sub> (5%) durante 24 horas, hasta que se formó un tapiz confluyente apto para su infección. Pasado ese tiempo, se retiró el medio de la placa y se añadió la muestra de suspensión clamidial a titular, diluida en una solución de DEAE-D en PBS a 1/10.000 (PBS-DEAED), en diluciones decimales, desde 10<sup>-2</sup> hasta 10<sup>-7</sup>. Las placas se incubaron durante 90 minutos a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>, centrifugándose a continuación a 1400 x g durante 30 minutos. Una vez centrifugadas, se eliminó el sobrenadante de cada pocillo y se lavó añadiendo 100 µL de PBS estéril. Después de retirar el PBS se añadieron 100 µL por pocillo de MEM suplementado y las placas se incubaron en estufa de CO<sub>2</sub> a 37 °C durante 48 horas. Pasado ese tiempo, se retiró el medio de cultivo y tras lavar con 100 µL de PBS, las células se fijaron añadiendo a cada pocillo 100 µL de acetona al 80% en PBS (v/v) a -20 °C. Las placas se conservaron a esta temperatura hasta su procesamiento.

Para visualizar y contar las inclusiones clamidiales formadas en los cultivos de células McCoy, se realizó el método de inmunofluorescencia indirecta, usando anticuerpos monoclonales (AcMo) anti-MOMP específicos de *C. abortus*, según el método descrito por Salinas *et al.* (1995). Para ello, tras retirar la acetona de las placas, los pocillos se lavaron usando 150-200  $\mu\text{L}$  de PBS por pocillo. Tras eliminar este PBS, se añadieron 50  $\mu\text{L}$ /pocillo de un AcMo anti-MOMP clamidial diluido al 1/1000 en PBS y se incubó durante 45 min a 37 °C. Transcurrido ese tiempo, se lavó dos veces con PBS. Como anticuerpo secundario, se utilizó un anticuerpo anti-IgG de ratón obtenido en cabra y conjugado al isotiocianato de fluoresceína (Sigma), a una dilución 1/100 y azul de Evans (Sigma) como colorante de contraste a una dilución 1/5000 en agua. Se depositaron 50  $\mu\text{L}$  por pocillo de esta mezcla y se incubó 45 minutos a 37 °C. Finalmente se hicieron tres lavados en PBS y uno final con agua destilada, con precaución de no dañar el tapiz celular. A continuación, se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de PBS-Glicerol (1:9 v/v) pH 8,6, con el objeto de favorecer la visualización de la fluorescencia.

La observación de las inclusiones clamidiales se realizó en un microscopio invertido dotado de equipamiento para epifluorescencia (Nikon TE2000-U), utilizando un objetivo de fluorita 20x. Contando el número de cuerpos de inclusión de cada pocillo de las diluciones que contenían menos de 150 inclusiones por pocillo, se procedió a calcular el título de la cepa, o de muestra problema, expresado en número de UFI por mL de suspensión de saco vitelino o gramo de muestra patológica.

## 2. VACUNAS

### 2.1. Producción del antígeno vacunal

#### 2.1.1. Purificación de *C. abortus*

Después de infectar el tapiz celular, se procedió a la purificación de las clamidias. Para ello se recurrió a una técnica de centrifugación diferencial en gradiente de amidotriazoato sódico y meglumínico 10:66 (Urografín®, Schering). Las células infectadas fueron tripsinizadas y sonicadas dos veces durante 15 segundos cada sesión, con una aguja de 40T (127 mm de longitud y 4 mm de diámetro), con el fin de romper las células y dejar libres las clamidias de su interior. Posteriormente se centrifugó a 170 x g a 20 °C durante 10 minutos para eliminar los restos celulares más groseros. Se recuperó el sobrenadante se depositó sobre 8 mL de

## Material y métodos

Urografín® al 35% en tampón Tris-KCl (pH 7,5) y se centrifugó durante 1 hora a 50.000 x g a 4 °C. Finalizada la centrifugación se recogió el sedimento con las clamidias, se diluyó en tampón Tris-KCl y se volvió a centrifugar a 50.000 x g, durante 1 hora a 4 °C. El sedimento obtenido, se resuspendió en PBS y se sonicó suavemente durante 10 segundos en las mismas condiciones que antes, para disgregar las clamidias y poder obtener el antígeno de interés (PONER CÔMO SE CALCULA LA CANTIDAD DE ANTÍGENO).

### 2.1.2. Protocolo de inactivación

La técnica elegida para la inactivación de las clamidias fue la técnica de inactivación química de la etilenimida binaria (BEI) (Caro *et al.*, 2001). Una vez preparada la solución de BEI 0,1M, se procedió a la inactivación de las clamidias, añadiendo lentamente y con agitación constante 1,5 mL de una solución 0,1 M de BEI, por cada 100 mL de suspensión clamidial a inactivar. Posteriormente, se incubó a 37 °C durante 24-48 horas con agitación constante. Finalizada la inactivación, se neutralizó la solución de BEI mediante adición de tiosulfato sódico al 30%, en las siguientes proporciones: 0,5 mL por cada 100 mL de suspensión clamidial inactivada (concentración final de tiosulfato sódico 0,15%).

## 2.2. Adyuvante seleccionado y preparación de la vacuna

El adyuvante utilizado en la elaboración de la vacuna fue el QS-21, un derivado purificado semisintético de la saponina procedente de la corteza del árbol *Quillaja saponaria*, ampliamente utilizado en ratón y que se ha comprobado que mejora la presentación del antígeno e induce una inmunidad mediada por células o respuesta Th1 (Kensil *et al.*, 1998; Mikloska *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2002). La proporción que se utilizó con respecto al antígeno fue de 1:1.

La vacuna fue elaborada en condiciones asépticas, con un contenido de 90 µg/mL de proteína de *C. abortus* inactivada. El QS-21 se preparó en solución acuosa a una concentración de 150 µg/mL y se mezcló a partes iguales con la suspensión de antígeno. La vacuna se conservó a 4 °C hasta el momento de su utilización, según lo descrito por Caro *et al.*, (2003).

### 3. DISEÑOS EXPERIMENTALES

#### 3.1. Autorizaciones para la experimentación animal

Todos los experimentos realizados con animales de experimentación en esta tesis fueron autorizados por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad de Murcia así como por la autoridad competente correspondiente de la Dirección General de Ganadería de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia, con el código: A13150203 con fecha de 24 de febrero de 2015.

#### 3.2. Animales utilizados

Para conseguir los objetivos del presente trabajo de Tesis Doctoral, se llevaron a cabo distintas experiencias con sus correspondientes modelos experimentales desarrollados en ratonas y ovejas. La línea de ratón empleada fue la Swiss OF1 (Janvier Lab), que ha sido frecuentemente utilizada en el estudio de cinética de infección por *C. abortus* realizados en investigaciones anteriores por otros investigadores, así como por nuestro grupo (*revisado en: Caro et al., 2009*).

Por otro lado, en las experiencias sobre el hospedador natural, se utilizaron ovejas de raza segureña procedentes de un rebaño libre y no vacunado de AEO localizado en el término municipal de Fuente Álamo (Murcia).

#### 3.3. Ovariectomía

La ovariectomía es un procedimiento quirúrgico por el que se realiza la ablación o extirpación de los ovarios, en nuestro caso en ratonas de laboratorio y ovejas. La ovariectomía en animales de laboratorio es una técnica muy empleada para eliminar la producción de hormonas sexuales y/o establecer modelos experimentales de estudio en los que las hormonas sexuales pueden interferir de alguna forma.

En las ratonas, la intervención se llevó a cabo por el equipo de Microbiología e Inmunología de la Universidad de Murcia según se describe en el N° 65 de 2015 de la revista de la Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL, páginas 36 a 39). Así, el procedimiento comenzó con la anestesia de los animales mediante la administración por vía

## Material y métodos

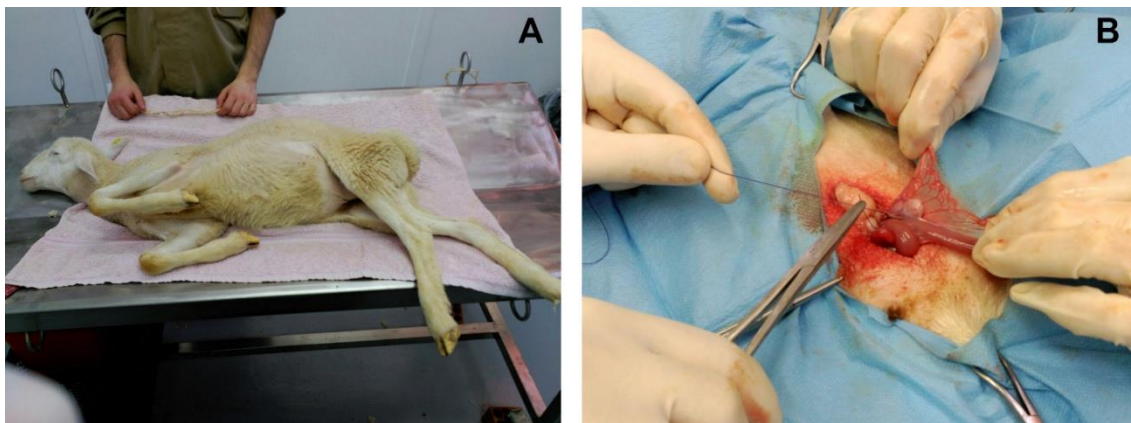
subcutánea de buprenorfina a dosis de 0,1 mg/kg como analgésico, 30 minutos antes de la cirugía. Junto a ésta, se les administró, también por vía subcutánea, enrofloxacin a dosis de 6 mg/kg como antibiótico para prevenir posibles infecciones postoperatorias. Transcurridos los 30 minutos en los que empieza a hacer efecto el analgésico, los animales fueron anestesiados con isoflurano al 5% durante la inducción y 2-3% en el mantenimiento anestésico durante la cirugía. Una vez totalmente anestesiados, los animales se colocaron en decúbito esternal y se rasuraron y desinfectaron con clorhexidina en medio de la masa lumbar, medio centímetro por detrás de las dos últimas costillas (figura 14). En ese lugar se realizó una única incisión cutánea seguida de otra en el plano muscular para alcanzar la cavidad abdominal. Con la ayuda de unas pinzas, se buscó y exteriorizó el ovario tirando de la grasa blanca que lo rodea. Se pinzó el pedículo ovárico con un hemocauterio y se extirparon los ovarios junto con la sección que los rodea. Por último, se volvió a colocar el cuerno uterino en su lugar y suturó el plano muscular y el cutáneo cerrando la incisión. Tras el procedimiento los animales se colocaron bajo una fuente de calor hasta que despertaron de la anestesia poco tiempo después (figura 14). Tras esto, se dispusieron en grupos reducidos con enriquecimiento ambiental a base de lecho de fibra larga y pipas de girasol.



**Figura 14:** Ovariectomía de las ratonas. (A) Extracción del ovario izquierdo. (B) Recuperación de un animal bajo un foco calefactor.

En el caso de las ovejas, fueron ovariectomizadas por el personal del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Murcia en colaboración con los miembros de nuestro equipo. Los animales se mantuvieron 8 horas en ayuno antes de la cirugía tras lo cual se procedió a efectuar su sedación mediante la administración por vía intramuscular de xilacina a una dosis de 0,2 mg/kg y meloxicam por vía subcutánea a una dosis de 1 mg/kg, junto con butorfanol a una dosis de 0,05 mg/kg como analgésico, todo ello 1 hora antes de la intervención. Una vez sedados, se les rasuró el cuello y la zona caudal del abdomen (zonas de administración de fármacos y de intervención en cada caso) y se les anestesió con ketamina intravenosa a dosis de 5 mg/kg. Los

animales anestesiados fueron colocados en decúbito supino sobre mesas de cirugía con la cabeza levemente inclinada hacia abajo para evitar ahogamientos por un posible exceso de salivación producto de la acción de la ketamina. A continuación, se procedió a desinfectar con clorhexidina la zona caudal del vientre, justo por encima de las ubres, para poder realizar un corte en la línea alba y otro en la capa muscular con los que tener acceso a la cavidad abdominal. Seguidamente se exteriorizaron los ovarios y se realizó una ligadura de transfixión alrededor de cada pedículo ovárico creando la hemostasia suficiente para poder extirpar los ovarios (Figura 15). Después de recolocar los cuernos uterinos en su lugar, se suturó la capa muscular y la piel y se administraron directamente en la herida 3 mL de lidocaína diluida en otros 3 mL de suero fisiológico. Por último, los animales fueron colocados en boxes con cama limpia y agua y comida *ad libitum* donde despertaron en pocos minutos.



**Figura 15:** Ovariectomía de las ovejas. (A) Animal sedado y anestesiado preparado para la cirugía. (B) Detalle de la extracción de un ovario.

### 3.4. Experiencias

#### 3.4.1. Experiencia 1. Efecto del $17\beta$ -estradiol y progesterona sobre el curso de la infección y de la respuesta inmunitaria frente *C. abortus* en ratonas Swiss OF1 ovariectomizadas

Se utilizaron un total de 30 ratonas Swiss OF1 ovariectomizadas en el animalario de origen (Janvier Lab). Los animales fueron distribuidos en 4 grupos: Control (Ctrl), Estradiol (E2), Progesterona (P4) y Dexametasona (Dex). Todos los animales fueron tratados por vía subcutánea, los días -2, -1, 1 y 4 posinfección (pi) con las siguientes dosis de estradiol (grupo E2),

## Material y métodos

progesterona (grupo P4), dexametasona (grupo Dex) vehiculadas en 0.2 mL de aceite de sésamo; o en su caso (grupo Ctrl), sólomente con dicha cantidad de aceite de sésamo:

- Grupo E2 (8 ratonas): 3 µg de 17β-estradiol.
- Grupo P4 (8 ratonas): 3 mg de progesterona.
- Grupo Ctrl (8 ratonas): 0,2 mL de aceite de sésamo.
- Grupo Dex (6 ratonas): 75 µg de dexametasona

El grupo Dex (Dexametasona) fue incluido como grupo Control de Inmunosupresión de la respuesta inmunitaria contra *C. abortus* dadas las conocidas propiedades antiinflamatorias e inmunosupresoras de esta molécula y su naturaleza química análoga a las hormonas esteroideas, tal y como demostraron Corr *et al.* (2014) en una infección por *Chlamydia muridarum* en ratón. Asimismo, se empleó aceite de sésamo para vehicular las hormonas y la dexametasona, dada la naturaleza lipídica de estas sustancias y la solubilidad que presentan en otros lípidos como el aceite de sésamo. Además este excipiente ha sido utilizado con éxito como vehículo de hormonas sexuales en diferentes estudios (Ström *et al.*, 2012; Lasarte *et al.*, 2013).

El desafío de los animales se realizó en el día 0 pi, inoculando por vía intraperitoneal la cepa AB7 de *C. abortus* con un de título  $5 \times 10^9$  UFI/mL, a una dosis de  $5 \times 10^6$  UFIs en 0,2 mL de PBS, 10 veces más que en la experiencia 1.

Se sacrificaron 4 animales de cada grupo, salvo en el grupo Dex (3 animales por grupo), esta vez sólo los días 4 y 8 pi, según lo descrito en el apartado 3.5..

### 3.4.2. Experiencia 2. Efecto del 17β-estradiol y progesterona sobre el curso de la infección y de la respuesta inmunitaria frente a *C. abortus* en ratonas Swiss OF1 ovariectomizadas en Murcia por nuestro equipo y ampliación del estudio hasta el día 11 pi

Teniendo en cuenta los buenos resultados obtenidos en la experiencia 1, se decidió volver a repetirla añadiendo un tercer día de sacrificio y dos nuevos grupos de ratonas, uno no infectado pero tratado con aceite de sésamo y otro tratado con ambas hormonas simultáneamente e infectado. En esta experiencia, las ratonas fueron ovariectomizadas por el equipo de Microbiología e Inmunología de la Universidad de Murcia con el apoyo del personal técnico del animalario de la misma universidad, según se describe en apartado 3.3. Este cambio de estrategia se debe al alto coste de los ratones ovariectomizados procedentes de las empresas

suministradoras, conjuntamente con las limitaciones presupuestarias que teníamos en el proyecto que financia esta tesis doctoral. Este hecho nos supuso una ampliación de los procedimientos de experimentación animal empleados en este proyecto, lo que fue autorizado por el comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad de Murcia y por la autoridad competente (Comunidad Autónoma de la Región de Murcia), con el código: A13150203 con de fecha 1 de diciembre de 2015.

En esta experiencia se utilizaron un total de 49 ratonas Swiss OF1 ovariectomizadas, que fueron distribuías en 5 grupos: Control No Infectado (Ni), Control de infección (Ctrl), Estradiol (E2), Progesterona (P4) y Estradiol + Progesterona (Mix). Todos los animales fueron tratados por vía subcutánea, en los días -2, -1, 1, 4 y 8 pi (se incluyó un día más en relación a la Experiencia 1) y con las mismas dosis de hormona que en la Experiencia 1, o en su caso (grupos Ni y Ctrl) con aceite de sésamo, que actuaba como vehículo:

- Grupo E2 (11 ratonas): 3 µg en 0,2 mL de aceite sésamo.
- Grupo P4 (11 ratonas): 3 mg en 0,2 mL de aceite de sésamo.
- Grupo Ctrl (11 ratonas): 0,2 mL de aceite de sésamo vía subcutánea.
- Grupo Mix (12 ratonas): 3 µg de estradiol y 3 mg de progesterona en 0,2 mL de aceite de sésamo.
- Grupo Ni (4 ratonas): Grupo control de morbilidad. Se trató con 0,2 mL de aceite de sésamo sin hormonas.

El grupo Mix fue incluido en esta experiencia para determinar posibles sinergias o antagonismos entre las dos hormonas empleadas. Asimismo, el grupo Ni, fue incluido para determinar el posible efecto de la inoculación de aceite de sésamo en los ratonas.

Al igual que en la experiencia 1, el desafío de los animales se realizó inoculando por vía intraperitoneal la cepa AB7 *C. abortus* con un de título  $5 \times 10^9$  UFIs/mL, a una dosis de  $5 \times 10^6$  UFIs en 0,2 mL de PBS.

En esta experiencia y a diferencia de las anteriores, en los días 4 y 8 pi se sacrificaron 3 animales de los grupos E2, P4 y Ctrl, al objeto de comprobar la repetitividad de los resultados de la experiencia 1, y 4 animales del grupo Mix. En el día 11 pi, introducido en esta experiencia para obtener datos de una fase más tardía de la infección clamidial, se sacrificaron 5 animales de los grupos E2, P4 y Ctrl, y 4 del grupo Mix. Por otro lado, las 4 ratonas del grupo Ni, fueron sacrificadas los días 8 y 11 pi, a razón de dos animales por día.

### 3.4.3. Experiencia 3. Efecto del 17 $\beta$ -estradiol y la progesterona sobre el curso de la infección y de la respuesta inmunitaria frente a *C. abortus* inducida por una vacuna experimental inactivada en ratonas Swiss ovariectomizadas en Murcia por nuestro equipo

En esta experiencia se utilizaron un total de 33 ratonas Swiss ovariectomizadas de igual forma que en la Experiencia 2. Los animales fueron distribuidos en 4 grupos con dos subdivisiones cada uno Vacunado (V) y No Vacunado (NV)): Control No Infectado (V-Ni y NV-Ni), Control de infección (V-Ctrl y NV-Ctrl) y Estradiol (V-E2 y NV-E2) o Progesterona (V-P4 y NV-P4). Diecisiete de los 33 animales (grupos V) fueron vacunados los días -43 y -29 pi. Todos los animales fueron tratados hormonalmente por vía subcutánea, en los días -2, -1 y 1 pi con las mismas dosis de hormona que en las Experiencias 1 y 2 o en su caso (grupos Ni y Ctrl) con aceite de sésamo, que actuaba como vehículo. Los grupo sestaban formados por 10 ratonas, excepto el Ni que sólo incluía 3.

- Grupo E2 (10 ratonas: 5 V-E2 y 5 NV-E2): 3  $\mu$ g de 17 $\beta$ -estradiol en 0,2 mL de aceite sésamo vía subcutánea (igual que en las experiencias 2 y 3).
- Grupo P4 (10 ratonas: 5 V-P4 y 5 NV-P4): 3 mg de progesterona en 0,2 mL de aceite de sésamo vía subcutánea (igual que en las experiencias 2 y 3).
- Grupo Ctrl (10 ratonas: 5 V-Ctrl y 5 NV-Ctrl): 0,2 mL de aceite de sésamo vía subcutánea.
- Grupo Ni (3 ratonas: 2 NiV y 1 NiNV): Grupo control de morbilidad. Se trató con 0,2 mL de aceite de sésamo sin hormonas vía subcutánea.

En esta experiencia se decidió no incluir un grupo Mix (estradiol + progesterona) para no incrementar excesivamente la complejidad del estudio y dados los resultados tan parecidos que obtuvo este grupo con respecto al grupo P4 en la experiencia 3.

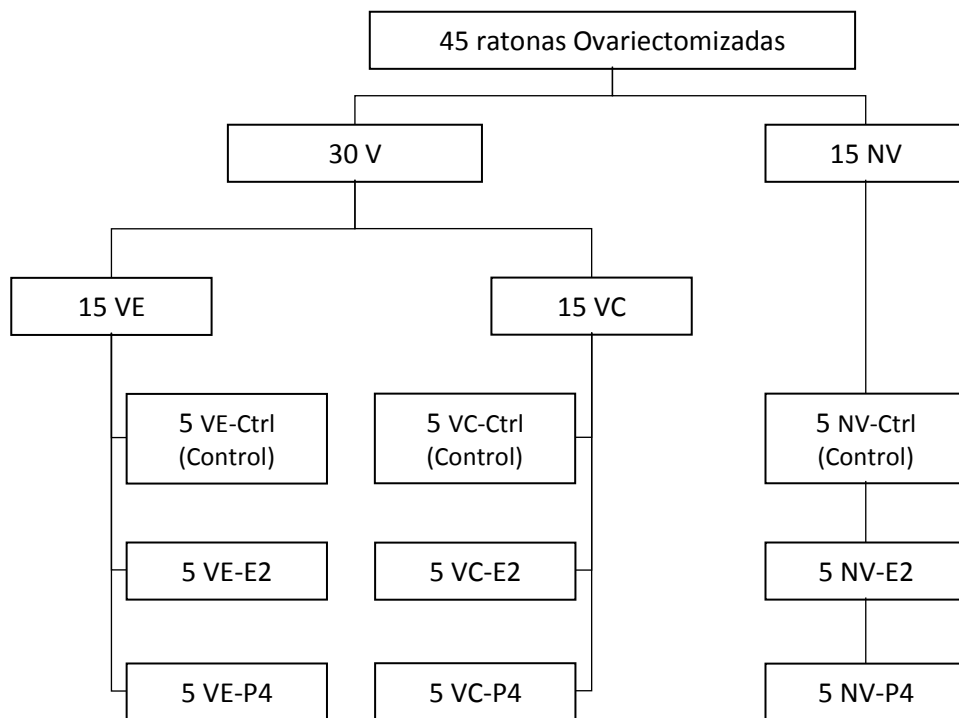
Los animales vacunados fueron inmunizados con la vacuna experimental elaborada con 15  $\mu$ g de antígeno por dosis y adyuvada con la saponina sintética QS21, descrita en el apartado 2. La eficacia de esta vacuna ha sido comprobada en numerosos estudios publicados por nuestro grupo de investigación (*Revisado en: Caro et al., 2009; Álvarez et al., 2015*).

Al igual que en el resto de experiencias, el desafío de los animales se realizó inoculando por vía intraperitoneal la cepa AB7 *C. abortus* con un de título  $5 \times 10^9$  UFI/mL, a una dosis de  $5 \times 10^6$  UFI en 0,2 mL de PBS. Se seleccionaron 10 animales para determinar el nivel de anticuerpos previo a su infección (grupo Preinf). Para ello, se les extrajo sangre mediante punción del seno venoso submandibular, como describen Golde *et al.* (2015).

Todos los animales se sacrificaron en el día 4 pi según lo descrito en el apartado 3.5., ya que hubiese sido imposible obtener datos de las ratonas vacunadas más allá de este día debido a la protección inducida por la vacuna y la eliminación de las clamidias inoculadas que acarrea.

**3.4.4. Experiencia 4.** Efecto del  $17\beta$ -estradiol y la progesterona en la inducción del efecto protector de dos vacunas (experimental y comercial) contra la infección por *C. abortus* en ratonas Swiss ovariectomizadas por nuestro grupo

En esta experiencia se utilizaron un total de 45 ratonas Swiss ovariectomizadas según lo descrito en el apartado 3.3. Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en 3 grupos con 3 subdivisiones cada uno tal como se explica en la figura 16:



**Figure 16:** Distribución de los animales en 9 grupos. V: vacunados; VE: vacuna experimental; VC: vacuna comercial; NV: no vacunados; E2: estradiol; P4: progesterona; NT: no tratados

Treinta de los 45 animales (grupos V) fueron vacunados, bien con la misma vacuna experimental utilizada en la experiencia 3 (grupos VE), o bien con otra vacuna inactivada comercial (grupos VC), con el fin de analizar las posibles diferencias producidas por el

## Material y métodos

17 $\beta$ -estradiol y la progesterona en el efecto protector inducido por cada una de las vacunas empleadas. Por su parte, el grupo NV, se utilizó como control no vacunado.

La pauta de vacunación empleada fue la misma que en la experiencia 3, es decir los días -43 y -29 pi. La dosis fue la misma que en la experiencia 3 para la vacuna experimental y de 0,2 mL por vía subcutánea para la vacuna comercial. Las ratonas fueron tratadas hormonalmente o se les inyectó aceite de sésamo (grupos controles NT) por vía subcutánea, los días -1, 1 y 7 tras la primera dosis de vacuna, y los días -1 y 1 tras la segunda dosis.

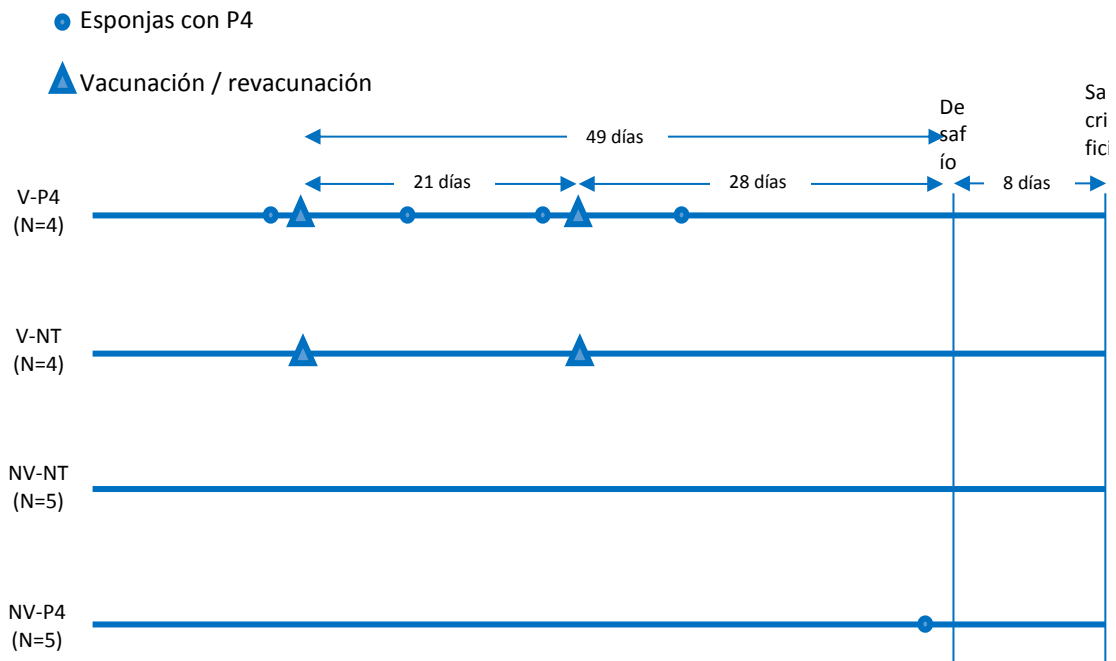
Al igual que en las experiencias 1, 2 y 3, el desafío de los animales se realizó inoculando por vía intraperitoneal la cepa AB7 *C. abortus* con un de título  $5 \times 10^9$  UFI/mL, a una dosis de  $5 \times 10^6$  UFI en 0,2 mL de PBS.

Todos los animales se sacrificaron en el día 4 pi de igual manera y por los mismos motivos que en la experiencia 3.

### 3.4.5. Experiencia 5: efecto de la progesterona sobre la infección por *C. abortus* y sobre la eficacia de la vacunación en un modelo ovino

Se utilizaron 18 ovejas de raza segureña de 3 meses de edad procedentes de una explotación ovina situada en el Término Municipal de Fuente Álamo (Región de Murcia) con código de Registro General de Explotaciones Ganaderas (REGA) n° 8S30030544001. Esta explotación fue seleccionada por estar exenta de problemas abortivos en los últimos tres años según fuentes de la ADS que gestiona esta explotación ganadera. No obstante, los animales se sometieron a una evaluación serológica previa a la experiencia mediante una prueba ELISA comercial (descrita en el apartado 3.6.4.) para asegurar que fueran seronegativas para anticuerpos específicos contra *C. abortus*. Todos los animales fueron ovariectomizados por el personal del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Murcia en colaboración con los miembros de nuestro equipo de investigación tal como se detalla en el apartado 3.3. Tras la ovariectomía, los animales fueron divididos en 2 grupos de 4 animales y 2 grupos de 5 (figura 17):

- Grupo 1: 4 ovejas vacunadas y tratadas con progesterona durante la vacunación: V-P4.
- Grupo 2: 4 ovejas Vacunadas y No Tratadas: V-NT.
- Grupo 3: 5 ovejas No Vacunadas y No Tratadas: NV-NT.
- Grupo 4: 5 ovejas No Vacunadas, tratadas antes de la infección: NV-P4.



**Figura 17:** Cronograma de la experiencia 6 y distribución de los animales en 4 grupos. V-P4: ovejas vacunadas y tratadas con progesterona; V-NT: ovejas vacunadas y no tratadas; NV-NT: ovejas no vacunadas y no tratadas; NV-P4: ovejas no vacunadas y tratadas antes de la infección.

Las ovejas del grupo no vacunado y tratado con progesterona (NV-P4), se utilizaron para determinar el efecto de la progesterona sobre la infección por *C. abortus* en relación con el grupo de control no vacunado y no tratado (NV-NT). Estos animales se trataron con esponjas intravaginales comerciales impregnadas con acetato de medroxiprogesterona (Esponjavet®, Laboratorios Hipra, España) dos días antes de la infección.

Los animales de los grupos vacunado y tratado con progesterona (V-P4) y, vacunado y no tratado (V-NT), así como el grupo NV-NT mencionado anteriormente, se utilizaron para determinar el efecto de la progesterona sobre la eficacia de vacunación contra *C. abortus*. Para esto, las ovejas del grupo V-P4 también fueron tratadas con esponjas intravaginales comerciales impregnadas con acetato de medroxiprogesterona que se reemplazaron periódicamente cada 10 días, tal y como se indica en la figura 17, hasta el día de la infección con el fin de mantener constante el nivel de progesterona.

Los animales del grupo NV-NT no fueron vacunados ni tratados, siendo utilizados como un grupo de control de infección. Dadas las restricciones legales, a nivel estatal y europeo, que prohíben la administración de ciertas hormonas en el ganado y en especial del  $17\beta$ -estradiol y sus derivados (Real Decreto 2178/2004, de 12 de noviembre), se decidió no emplear esta hormona en esta experiencia. Por otra parte la administración de progesterona o moléculas análogas, es ampliamente empleada en programas de sincronización el celo en el ganado ovino,

## Material y métodos

por lo que la utilización de esponjas intravaginales comerciales impregnadas con acetato de medroxiprogesterona, acerca la metodología empleada en esta experiencia a un posible escenario real en el mundo de la ganadería ovina.

El desafío de los animales se realizó inoculando por vía intratraqueal 1 mL de la cepa AB7 de *C. abortus* a una concentración de  $10^8$  UFI/mL según lo descrito en Álvarez *et al.* (2015). Todas las corderas fueron sacrificadas a los 8 días postinfección por el método de la bala cautiva tal cual se describe en el apartado 3.5..

### 3.5. Sacrificio y toma de muestras

Todas las ratonas utilizadas en las distintas experiencias fueron sacrificadas mediante inhalación de CO<sub>2</sub>, un agente recomendado para el sacrificio de animales de experimentación de acuerdo al Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, confirmándose su muerte por observación de ausencia de respiración, pérdida de reflejos y ausencia del latido cardíaco. Por otra parte, las ovejas se sacrificaron por el método de bala cautiva según lo establecido por el Real Decreto mencionado anteriormente. Una vez sacrificados los animales, se procedió a realizar su necropsia y estudio lesional macroscópico, en base al cual se procedió a la toma de muestras. Tanto los sacrificios como las posteriores necropsias se realizaron en el animalario de la Universidad de Murcia en el caso de las ratonas y en la sala de necropsias de la Facultad de Veterinaria de la misma Universidad, en el caso de las ovejas.

Con el fin de analizar la producción de anticuerpos específicos frente *C. abortus*, citoquinas (IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) y quimioquinas (MIP-2 y RANTES), se extrajo sangre de las ratonas mediante punción intracardiaca en el momento del sacrificio, de la que se obtuvo suero tras su coagulación. En el caso de la experiencia 5, para analizar la producción de anticuerpos se tomaron muestras de sangre de las ovejas mediante punción yugular durante la vacunación, la revacunación, el desafío y el sacrificio. También se extrajo sangre por punción yugular (BD Vacutainer®, venojet) para realizar el análisis de citoquinas (IFN- $\gamma$  e IL-10), en este caso durante el desafío y el sacrificio.

Para evaluar la cinética de la infección mediante aislamiento y cuantificación de *C. abortus*, se tomaron muestras de hígado que fueron congeladas a -80 °C hasta el momento de su empleo. Para realizar el estudio histopatológico e inmunohistoquímico con la caracterización de los diferentes tipos celulares del infiltrado inflamatorio, se tomaron muestras de hígado y bazo, para ser fijadas en formol al 10% o en una solución de sales de Zinc (BD, Madrid, España) respectivamente. Las sales de Zinc preservan los epítomos antigénicos de una manera más eficaz

en comparación con los fijadores convencionales representados por los aldehídos (Hicks *et al.*, 2006), lo que hace que estos fijadores sean más adecuados para estudios inmunohistoquímicos. Dado el bajo poder de penetración de este fijador, las muestras se preservaron a 4 °C hasta el momento de su inclusión en parafina antes de las 48-72 horas.

En el caso de la Experiencia 5 se tomaron muestras de pulmón, tonsilas y nódulos mediastínicos, traqueobronquiales y retrofaríngeos, órganos de mayor afectación en caso de infecciones intratraqueales (Álvarez *et al.*, 2015). Las muestras fueron fijadas en formol o zinc con los mismos fines que en el resto de experiencias o congeladas a -80 °C para determinar la presencia de ADN clamidial mediante qPCR (quantitative real-time PCR) tal y como se detalla en el apartado 3.6.6.

### 3.6. Análisis de la cinética de la infección clamidial

#### 3.6.1. Análisis de la morbilidad medida como pérdida de peso y variación de la temperatura corporal

Todas las ratonas empleadas en las diferentes experiencias, fueron pesadas diariamente desde el día de su infección hasta su sacrificio, con objeto de medir de forma objetiva la morbilidad de la infección clamidial inducida.

En el caso de la Experiencia 5, la morbilidad se midió mediante el registro diario de la temperatura de las ovejas tras su infección.

También se controló diariamente a los animales en todas las experiencias para detectar la posible aparición de signos clínicos asociados a la infección clamidial, tales como pelo erizado, anorexia, decaimiento, etc.

#### 3.6.2. Aislamiento y cuantificación de *C. abortus*

Para determinar la carga bacteriana en el hígado y bazo, se utilizó la técnica de aislamiento *in vitro* de *C. abortus* sobre células McCoy. Las muestras, una vez diluidas al 1/10 (p/v) en una solución de PBS-DEAED, fueron maceradas y homogeneizadas en condiciones estériles. Posteriormente, se recogió 1 mL de cada una de las muestras diluidas y homogeneizadas y se centrifugaron a 300 x g durante 10 minutos a 4 °C con el fin de eliminar los restos celulares. Se recogió el sobrenadante y se realizaron diluciones decimales del mismo

## Material y métodos

en PBS-DEAED, desde puro hasta  $10^{-2}$ . Como testigo positivo, se prepararon las mismas diluciones pero con la cepa AB7 cultivada en saco vitelino de embrión de pollo. Una vez preparadas las diluciones de las muestras y del control positivo, éstas fueron procesadas por duplicado tal y como se describe en el apartado 1.1.2.4.

### 3.6.3. Detección de citoquinas y quimioquinas a partir de suero

La detección de citoquinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-6, IL-10 e IL-12) así como de quimioquinas (MIP-2 y RANTES) de los sueros de una selección aleatoria de las ratonas de las Experiencias 1, 2 y 3, se llevó a cabo utilizando una técnica de inmunoensayo multiplex basada en tecnología Luminex xMAP® (Thermo Fisher Scientific). Esta tecnología consiste en la obtención de perfiles multianalito a través de microesferas magnéticas, con un código de color diferente asignado a cada una mediante combinación de distintos fluorocromos. Cada tipo de esfera se conjuga con un anticuerpo de captura específico para cada analito de interés, permitiendo la detección y cuantificación simultánea de varios analitos. Así, se utilizó un kit MILLIPLEX MAP, con el panel de 8 citoquinas y quimioquinas citadas anteriormente, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las placas se leyeron en un sistema MAGPIX, que utiliza una tecnología basada en los principios de la microscopía de fluorescencia cuantitativa, y el software xPONENT 4.2.

En el caso de la Experiencia 5, la detección de IFN- $\gamma$  e IL-10 se realizó en el suero de las ovejas extraído a lo largo del estudio, mediante un kit ELISA comercial (Sheep IFN- $\gamma$  and Sheep IL-10 ELISA Kit®, Cusabio, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 3.6.4. Detección de anticuerpos anti-*C. abortus*

Con el fin de evaluar la respuesta inmunitaria humoral generada tras la vacunación de las ratonas de las experiencias 3 y 4, se realizó un test ELISA que empleó un antígeno producido en sacos vitelinos de huevos embrionados al objeto de evitar las reacciones no específicas contra las proteínas de las células McCoy utilizadas para la elaboración de la vacuna experimental empleada.

Para ello, se procedió a la sensibilización de placas ELISA Maxisorp® (NUNC, Dinamarca) diluyendo antígeno (cuerpos elementales, CE) purificado a una concentración de 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en un tampón carbonato-bicarbonato pH 9,6 y se depositándose en volúmenes de 100  $\mu\text{L}$  por pocillo. Las placas se mantuvieron a 4 °C durante 18 horas para permitir que el antígeno se fijara al

poliestireno. Pasado ese tiempo, se lavaron tres veces añadiendo 300  $\mu$ L/pocillo de una solución PBS-Tween (Anexo).

A continuación se añadió el suero problema a razón de 100  $\mu$ L/pocillo. Se utilizó un tampón dilución (1/100) para ELISA comercial (ELISA diluent<sup>®</sup>, Invitrogen) incubándolo durante 60 minutos a 37 °C. Como control negativo se utilizó un *pool* de sueros de cinco ratonas no infectadas y como control positivo, el suero procedente de cinco ratonas infectadas en dos ocasiones en un intervalo de un mes, con 10<sup>6</sup> UFI de *C. abortus* y sacrificados a las dos semanas de la segunda infección. Se lavaron 3 veces en agitación con 300  $\mu$ L de PBS-Tween por pocillo.

Tras eliminar el PBS-Tween restante, se añadió los AcMo anti-IgG de ratón obtenido en cabra conjugado con peroxidasa a la dilución de trabajo recomendada por el fabricante (Sigma) y en volúmenes de 100  $\mu$ L por pocillo. Las placas se incubaron 1 hora a 37 °C y finalmente se lavaron 3 veces en las mismas condiciones que en las fases anteriores.

Por último y para visualizar la reacción, se añadieron 100  $\mu$ L de la solución de sustrato ABTS (Invitrogen) a cada pocillo y se mantuvieron a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, se realizó la lectura en un espectrofotómetro (lector Labtech LT-4000 Microplate Reader<sup>®</sup>) con una longitud de onda de 405 nm. Los resultados se expresaron en densidad óptica (D.O.).

En el caso de la Experiencia 5, se determinó la producción de anticuerpos específicos de *C. abortus* en las muestras de suero mediante una ELISA comercial (ID Screen *Chlamydophila abortus* indirect multispecies<sup>®</sup>, IDvet, Montpellier, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las densidades ópticas se expresaron como un porcentaje del control positivo mediante la siguiente fórmula:

$$(\text{D.O. de la Muestra} / \text{D.O. del Control Positivo}) \times 100.$$

Las muestras con valores de  $\geq 60\%$  se consideraron positivas, las muestras entre 50% y 60% dudosas y las muestras de  $\leq 50\%$  negativas.

### 3.6.5. Estudio inmunohistoquímico

Las muestras de hígado fijadas en formol o sales de Zinc, fueron deshidratadas en concentraciones crecientes de alcoholes y xiloles para ser incluidas en parafina utilizando un procesador automático Leica TP 1050<sup>®</sup> (Leica). La parafina empleada (Polywax<sup>®</sup>, Medical and Veterinary Supplies), tiene un punto de fusión entre 55 y 58 °C, lo que permite preservar la capacidad antigénica de las moléculas requeridas para las pruebas inmunohistoquímicas posteriores. Tras la inclusión en parafina, se formaron bloques utilizando el equipo Tissue Tek<sup>®</sup>

## Material y métodos

(Miles Scientific). De los bloques se obtuvieron secciones de 4 µm de grosor mediante corte con micrótopo Leica RM 2155® (Leica). El estudio histopatológico se realizó a partir de muestras fijadas en formol y teñidas con Hematoxilina-Eosina (H/E).

El estudio inmunohistoquímico se llevó a cabo sobre las muestras fijadas en formol para detectar la presencia de antígeno clamidial y sobre las muestras fijadas en Zinc para la detección de iNOS y caracterización del infiltrado inflamatorio, mediante los correspondientes anticuerpos monoclonales (Tabla 1), utilizando la técnica del Complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa (ABC) (Hsu *et al.*, 1981) como sigue:

Una vez desparafinadas y rehidratadas durante 5 minutos, las muestras fueron sumergidas durante 20 minutos en una solución de peróxido de hidrógeno al 1,5% en metanol para inhibir la peroxidasa endógena del propio tejido. Posteriormente, se lavaron en tampón Tris-Salino (TBS) a pH 7,6 y se incubaron con suero normal de la especie en que se desarrolló el anticuerpo secundario (DakoCytomation®, USA), diluido en TBS con un 3% de albúmina sérica bovina (Sigma) al 1:100, durante 20 minutos para impedir posibles uniones inespecíficas del anticuerpo secundario que pudieran enmascarar el resultado final de la técnica. Las secciones fueron incubadas con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 1) durante 1 hora a 30 °C. Finalizado este paso y tras un lavado en TBS, las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario biotinado durante 30 minutos (IgG de caballo frente a IgG de conejo en el caso de los anticuerpos policlonales; o IgG de conejo frente a IgG de rata o ratón en el caso de los monoclonales (Tabla 1)).

Tras otro lavado en TBS, se añadió el complejo avidina-biotina-peroxidasa y se dejó incubar a 30 °C otros 30 minutos. Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda para evitar la desecación de las secciones de las muestras. Finalizada la última incubación y tras un nuevo lavado con TBS, se procedió al revelado de la inmunorreacción con una solución de cromógeno de diaminobencidina (DAB) (DakoCytomation®, USA) 5 minutos a temperatura ambiente. Una vez completado el revelado y tras un último lavado con agua corriente durante 5 minutos, las muestras fueron contrastadas con hematoxilina de Harris, deshidratadas, aclaradas y montadas en Eukitt®.

**Tabla 1:** Especificidad, especie de procedencia, laboratorio y dilución de los anticuerpos utilizados.

Anticuerpo	Especificidad	Especie donde se ha desarrollado	Laboratorio	Dilución
<b>Policlonal Chlamydia</b>	LPS Chlamydia	Conejo	Abcam (USA)	1:1000
<b>Policlonal iNOS</b>	iNOS (ovinos y murinos)	Conejo	Upstate (USA)	1:50
<b>Policlonal CD3</b>	Linfocitos T (ovinos y murinos)	Conejo	Dakocytomation (USA)	1:200
<b>Policlonal Foxp3</b>	Linfocitos Treg (ovinos)	Conejo	Abcam (USA)	1:400
<b>Monoclonal CD163</b>	Macrófagos (ovinos)	Ratón	Bio-Rad (UK)	1:200
<b>Monoclonal F4/80</b>	Macrófagos (murinos)	Rata	Caltag laboratorios (USA)	1:50
<b>Monoclonal NIMP-R14</b>	Polimorfonucleares Neutrófilos (PMN) (murinos)	Rata	Santa Cruz Biotechnology (USA)	1:100

### 3.6.5.1. Análisis de imagen

El estudio cuantitativo del antígeno clamidial, la detección de iNOS y la caracterización de los diferentes tipos celulares del infiltrado inflamatorio (PMN, macrófagos y linfocitos) en cada una de las muestras analizadas de las Experiencias 1, 2 y 3, se realizó en la sección de análisis de imagen del Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Murcia (SAI). Para ello las muestras inmunoteñidas se analizaron usando el programa de análisis de imagen Leica Qwin Pro®, que permite obtener de forma objetiva el área total inmunomarcada por campo observado, determinándose sobre un total de 10 campos (objetivo 10x) por muestra para abarcar toda la superficie del corte del órgano afectado.

En el caso de las Experiencias 4 y 5, el estudio cuantitativo del antígeno clamidial, la detección de iNOS y la caracterización de los diferentes tipos celulares del infiltrado inflamatorio, se evaluó contando las células positivas de diez campos de 10000  $\mu\text{m}^2$  por muestra al microscopio óptico, como describen Montes de Oca *et al.* (2000a). Este cambio de metodología en la experiencia 5, se debió a que las muestras consistían en las áreas lesionadas de los órganos afectados por la infección clamidial. En ese caso la técnica empleada en las

## Material y métodos

experiencias anteriores no era la más conveniente al no ser posible determinar el área total inmunomarcada del órgano afectado.

### 3.6.6. Detección de ADN de *C. abortus* en muestras de órganos mediante qPCR

Con el fin de detectar la presencia de *C. abortus* en muestras de, pulmón, tonsilas y nódulos mediastínicos, traqueobronquiales y retrofaríngeos de las ovejas utilizadas en la experiencia 5, se utilizó un kit comercial de extracción de ADN (FavorPrep Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit®, Favorgen), siguiendo el protocolo de trabajo proporcionado por el fabricante. Una vez extraído el ADN de las muestras, se procedió a evaluar la cantidad y calidad del mismo por espectrofotometría (NanoDrop 2000®, Thermo Fisher Scientific). Finalmente, congelamos las muestras de ADN alicuotadas a -20 °C hasta su posterior uso en una qPCR para la detección de ADN clamidial según lo descrito por Pantchev *et al.* (2010).

Para ello, la mezcla de cada reacción de qPCR se realizó en un volumen final de 25 µL. Cada reacción contenía 12,5 µL de una mezcla comercial de Taq polimerasa, buffer de reacción, dNTPs y MgCl<sub>2</sub> (Kapa Probe Fast qPCR Master Mix, Kapa Biosystems), 2,5 µL de cada uno de los primers específicos de *C. abortus* CpaOMP1-F y CpaOMP1-R (0,9 µM) (tabla 2), 2,5 µL de la sonda TaqMan CpaOMP-S (0,2 µM) y 0,4 µL de fluorocromo de normalización ROX low. Se añadió 2,6 µL de agua ultrapura para completar el volumen final de la reacción.

Como control positivo se usó ADN extraído de la cepa AB7 de *C. abortus* multiplicada en saco vitelino de huevos embrionados y como control negativo, agua ultrapura.

Para realizar las qPCRs se utilizó un termociclador Applied Biosystems 7500 Fast® (Thermo Scientific). Las condiciones de amplificación consistieron un ciclo inicial de activación de la enzima a 95 °C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos con una etapa de desnaturalización a 95 °C durante 3 segundos y una etapa de hibridación y extensión a 60 °C durante 3 minutos.

Todas las qPCRs se hicieron por duplicado, tomándose la media de los dos valores como resultado definitivo para cada muestra analizada. Las muestras con valores de Ct ≤ 35 fueron consideradas positivas, mientras que las muestras con valores Ct > 35 fueron consideradas negativas.

**Tabla 2:** Primers empleados para la cuantificación de *C. abortus* en tejidos (Pantchev *et al.*, 2010).

Primers y sonda	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	Gen diana	Tamaño amplicón
<b>CpaOMP1-F</b>	GCAACTGACACTAAGTCGGCTACA	ompA	82 pb
<b>CpaOMP1-R</b>	ACAAGCATGTTCAATCGATAAGAGA		
<b>CpaOMP1-S</b>	FAM-TAAATACCACGAAT GGCAAGTTGGTTTAGCG-TAMRA		

#### 4. ESTUDIO ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el paquete de software Sigmapstat (SPSS). Para ello, se usaron las pruebas t student, ANOVA de una vía, el método de Dunn y la prueba t con la corrección de Bonferroni, según el caso para comparar grupos entre sí, fijando un nivel de confianza en comparación de medias de un 95%. La significación estadística mínima se fijó en  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS



## 1. EXPERIENCIA 1. EFECTO DEL 17 $\beta$ -ESTRADIOL Y LA PROGESTERONA SOBRE EL CURSO DE LA INFECCIÓN Y DE LA RESPUESTA INMUNITARIA FRENTE *C. ABORTUS* EN RATONAS SWISS OF1 OVARIECTOMIZADAS

### 1.1. Morbilidad

La morbilidad de la infección inducida fue medida de forma objetiva mediante el control de la pérdida de peso a lo largo de todo el experimento (Figura 18). Se pudo comprobar que todos los grupos de ratones perdieron peso a partir de la infección por *C. abortus*, salvo el grupo tratado con dexametasona (Dex) que comenzó a perderlo un día después de ella. A partir del día 3 pi los animales de los grupos Ctrl y E2 comenzaron a ganar peso, recuperando su peso inicial entre los días 6 y 7 pi, respectivamente. A partir de ese momento los ratones de los grupos Ctrl y E2 incrementaron su peso hasta el final del estudio. Por otra parte, los animales de los grupos Dex y P4, continuaron perdiendo peso tras el desafío hasta los días 4 y 5 pi respectivamente, donde se produjo un incremento de peso. Los animales del grupo Dex, recuperaron su peso inicial en el día 8 pi. Mientras que ninguno de los animales del grupo P4 recuperó su peso inicial al inicio del tratamiento (Figura 18).

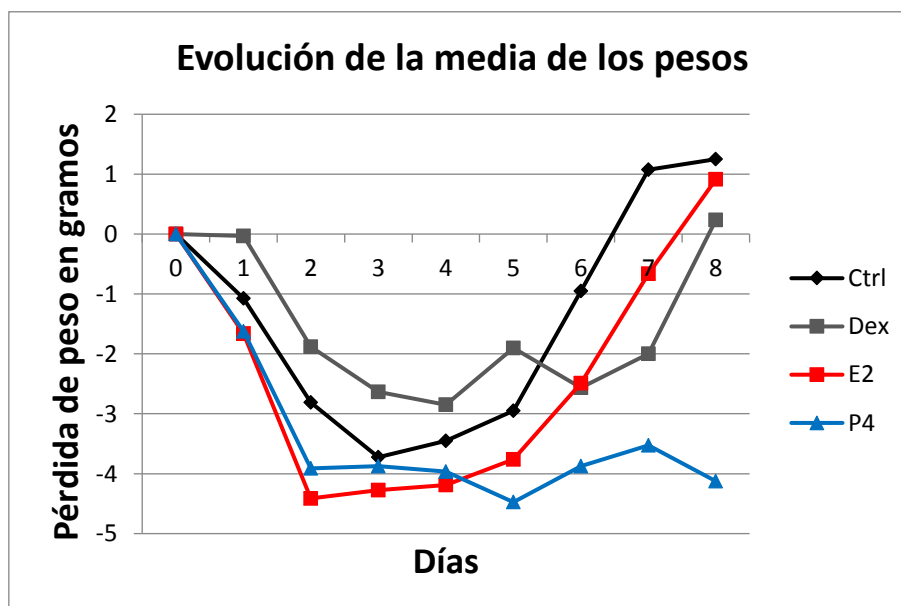
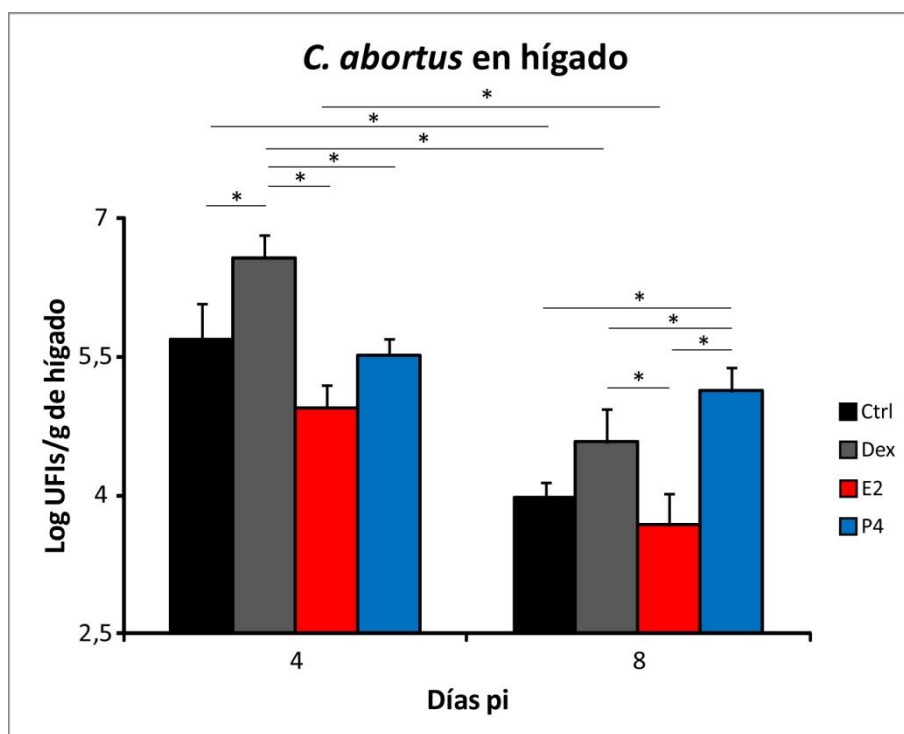


Figura 18: Morbilidad de la infección medida como pérdida de peso desde el día de la infección.

## 1.2. Carga de *C. abortus*

La presencia de *C. abortus*, cuantificada mediante aislamiento *in vitro* sobre células McCoy, tal como se describe en el apartado 3.6.2. del Material y Métodos, fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) en el grupo Dex durante el día 4 pi con respecto al resto de los grupos (Figura 19). En el día 8 pi, la carga clamidial descendió en todos los grupos con respecto al día 4 pi, siendo más alta en los animales del grupo P4 respecto al resto y en los del grupo Dex con respecto a los del E2.

Por otra parte, se hallaron diferencias estadísticamente significativas en la carga clamidial detectada en los grupos Ctrl, Dex y E2, entre los días 4 y 8.



**Figura 19:** Carga de *C. abortus* (UFIs/gramo de hígado) en ratonas de la Experiencia 1.

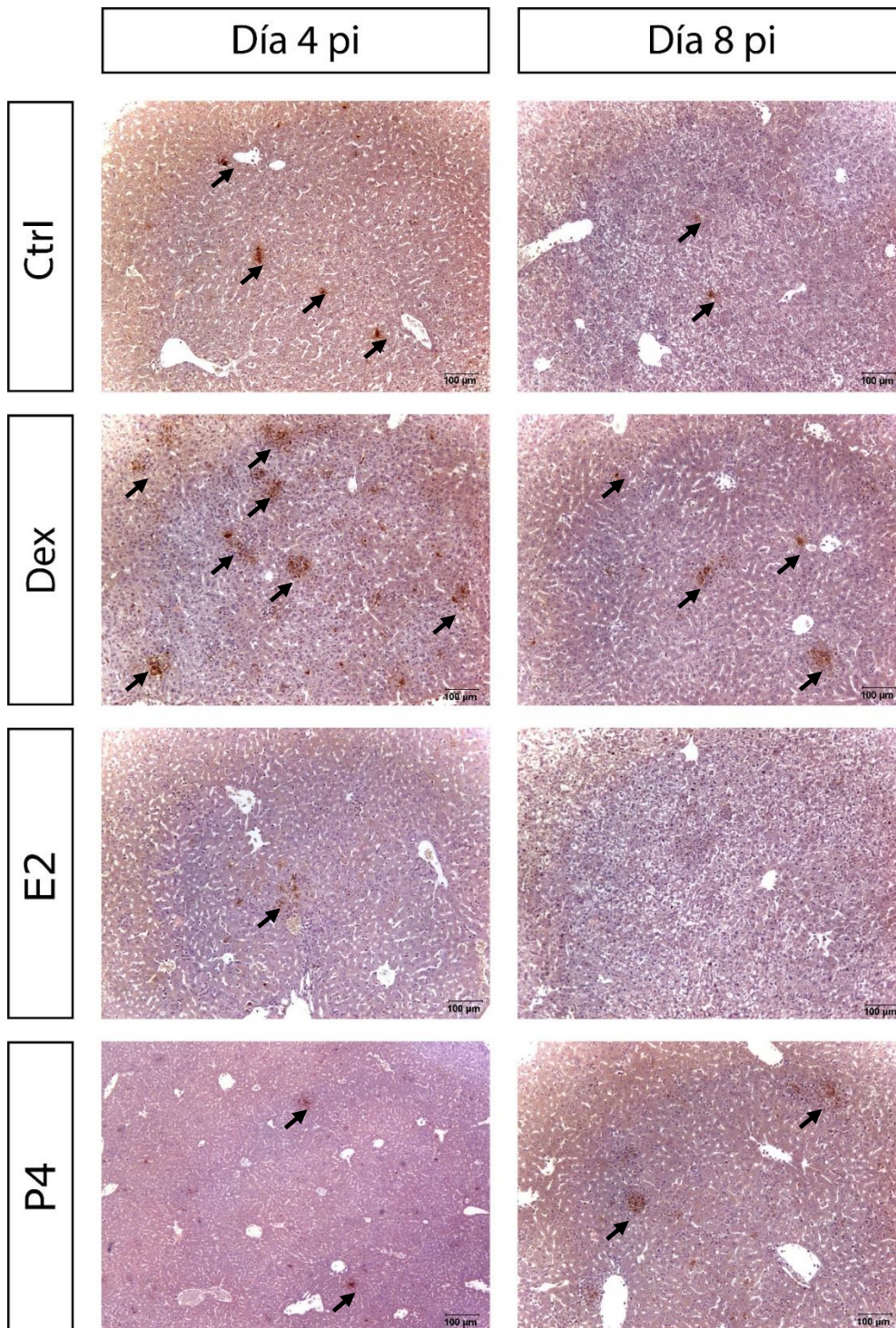
\*: p valor < 0,05

## 1.3. Inmunohistopatología

Los animales de todos los grupos desarrollaron hepatitis multifocal, de más gravedad en el día 4 pi, especialmente en los animales del grupo P4. El análisis mediante visualización por microscopía óptica de las muestras de hígado inmunoteñidas para la detección de antígeno clamidial, reveló unos resultados similares a los observados en la carga clamidial. Así, los animales del grupo Dex fueron los que mostraron mayor presencia de antígeno clamidial

## Resultados

durante el día 4 pi. Por su parte, la presencia de antígeno clamidial en los animales de los grupos Ctrl, P4 y E2, fue similar en este día pi, siendo en las ratonas del grupo Ctrl, en las que se detectó mayor presencia de antígeno. Durante el día 8 pi, al igual que en el día 4 pi, los animales del grupo Dex presentaron la mayor presencia de antígeno clamidial, mientras que en el resto de grupos, sólo se detectaron pequeños focos de antígeno, ligeramente más abundantes en el grupo P4 (Figura 20).



**Figura 20:** Detección de antígeno clamidial en muestras de hígado de animales de la experiencia 1. Imágenes representativas de animales de cada grupo. La presencia de antígeno clamidial (áreas marrones) fue decreciendo a lo largo del estudio en todos los grupos. Tanto en el día 4 como en el 8 pi, la mayor presencia de antígeno clamidial fue detectada en las ratonas del grupo Dex, mientras que la menor presencia fue detectada en los animales del grupo E2. En general, la presencia de antígeno clamidial fue superior en los animales de los grupos Dex y Ctrl, e inferior en los animales del grupo E2 a lo largo de todo el estudio.

### 2. EXPERIENCIA 2. EFECTO DEL 17 $\beta$ -ESTRADIOL Y LA PROGESTERONA SOBRE EL CURSO DE LA INFECCIÓN Y DE LA RESPUESTA INMUNITARIA FRENTE A *C. ABORTUS* EN RATONAS SWISS OF1 OVARIECTOMIZADAS EN MURCIA POR NUESTRO EQUIPO Y AMPLIACIÓN DEL ESTUDIO HASTA EL DÍA 11 PI

#### 2.1. Morbilidad

Al igual que en la experiencia anterior, la morbilidad de la infección inducida fue medida de forma objetiva mediante el control de la pérdida de peso a lo largo de toda la experiencia (Figura 21).

Salvo las ratonas del grupo Ni, el resto de animales de todos los grupos perdieron peso tras el desafío por *C. abortus*, volviendo a incrementar su peso a partir del día 4 pi y a recuperar su peso al inicio del tratamiento entre los días 8 y 9 en los grupos Ctrl y E2. A partir de los mencionados días, el peso de los animales del grupo P4, se mantuvo al alza hasta el final del estudio. Por otro lado, las ratonas de los grupos E2 y Mix experimentaron una caída de peso a partir de los días 8 y 9 pi para luego volver subir a partir del día 10 pi. Sin embargo, sólo las ratonas del grupo Ctrl permanecieron por encima de su peso inicial.

Por su parte, el peso de los animales del grupo Ni, fluctuó mínimamente durante gran parte de la experiencia, para luego incrementarse hacia el final del experimento (Figura 21).

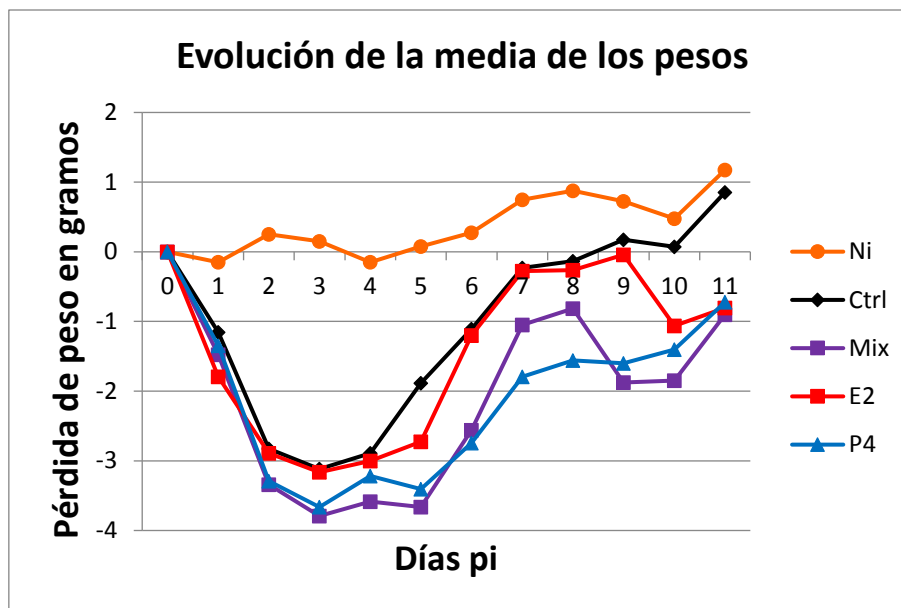


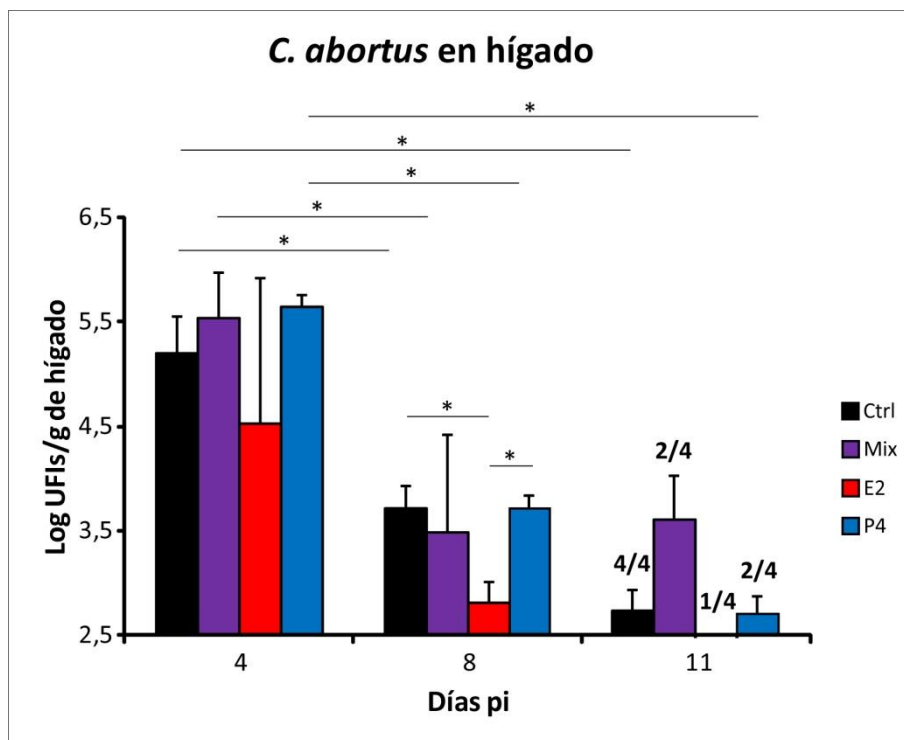
Figura 21: Morbilidad de la infección medida como pérdida de peso desde el día del desafío.

## 2.2. Carga de *C. abortus*

En la experiencia 2 se decidió realizar la determinación de la carga de *C. abortus* también a partir de muestras de bazo dado que, junto al hígado, son órganos diana de la infección clamidial y los datos obtenidos en este órgano podrían aportar información complementaria a la aportada por el hígado sobre la carga clamidial y la cinética de la infección en los distintos días del estudio.

Así, en el hígado, la carga clamidial fue más alta en el día 4 pi que en el resto de días del estudio. En este día 4 pi la carga de *C. abortus* fue mayor en los animales de los grupos P4 y Mix, seguidos por los de los grupos Ctrl y E2, aunque sin que se hallaran diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de ellos. En el día 8 pi la carga clamidial fue significativamente menor en los animales del grupo E2 comparados con los de los grupos P4 y Ctrl. Por su parte, en el día 11 los animales de los grupos Mix y Ctrl, fueron los que mostraron mayor carga clamidial, seguidos por los animales de los grupos P4 y con menor carga, los del grupo E2 que no llegaron al límite de detección de la técnica. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos durante este día pi. Por otra parte, se hallaron diferencias estadísticamente significativas en la carga clamidial detectada en los grupos Ctrl, Mix y P4, entre los días 4 y 8; en el grupo Ctrl entre los días 8 y 11, y en los grupos P4 y Ctrl entre los días 4 y 11 (Figura 22).

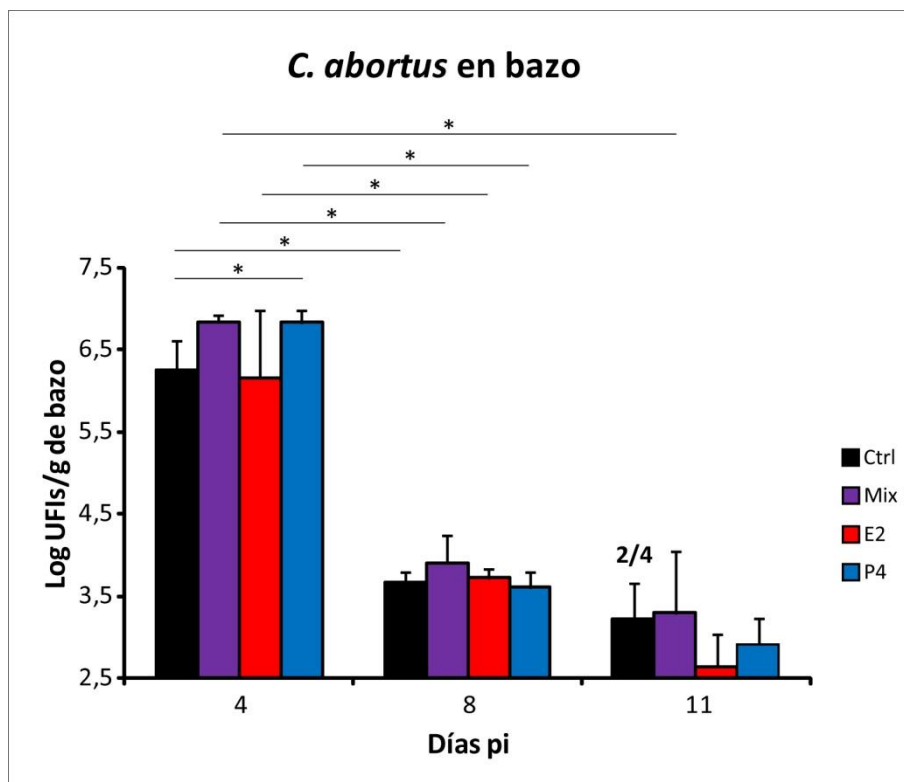
## Resultados



**Figura 22:** Carga de *C. abortus* (UFIs/gramo de hígado) en ratonas de la Experiencia 2.

\*: p valor < 0,05.

La carga de *C. abortus* en bazo, mostró resultados similares a los obtenidos en el hígado. Así, la carga clamidial fue más alta en el día 4 pi, descendiendo a lo largo del estudio. En el día 4 se detectó mayor carga clamidial en los animales del grupo P4, que mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto a los del grupo Ctrl. En el día 8 pi la carga clamidial fue mayor en los animales del grupo Mix, mostrando los del resto de grupos valores similares entre sí, sin diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de ellos. Por último, en el día 11 los animales de los grupos Mix y Ctrl, fueron los que mostraron mayor carga clamidial, seguidos por los animales de los grupos P4 y con menor carga, los del grupo E2, aunque de nuevo sin hallarse diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos. Sin embargo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la carga clamidial detectada en los grupos Ctrl, Mix, E2 y P4, entre los días 4 y 8, y Mix, E2 y P4 entre los días 4 y 11 pi (Figura 23).



**Figura 23:** Carga de *C. abortus* (UFIs/gramo de bazo) en ratonas de la Experiencia 2. \*: p valor < 0,05

### 2.3. Inmunohistopatología

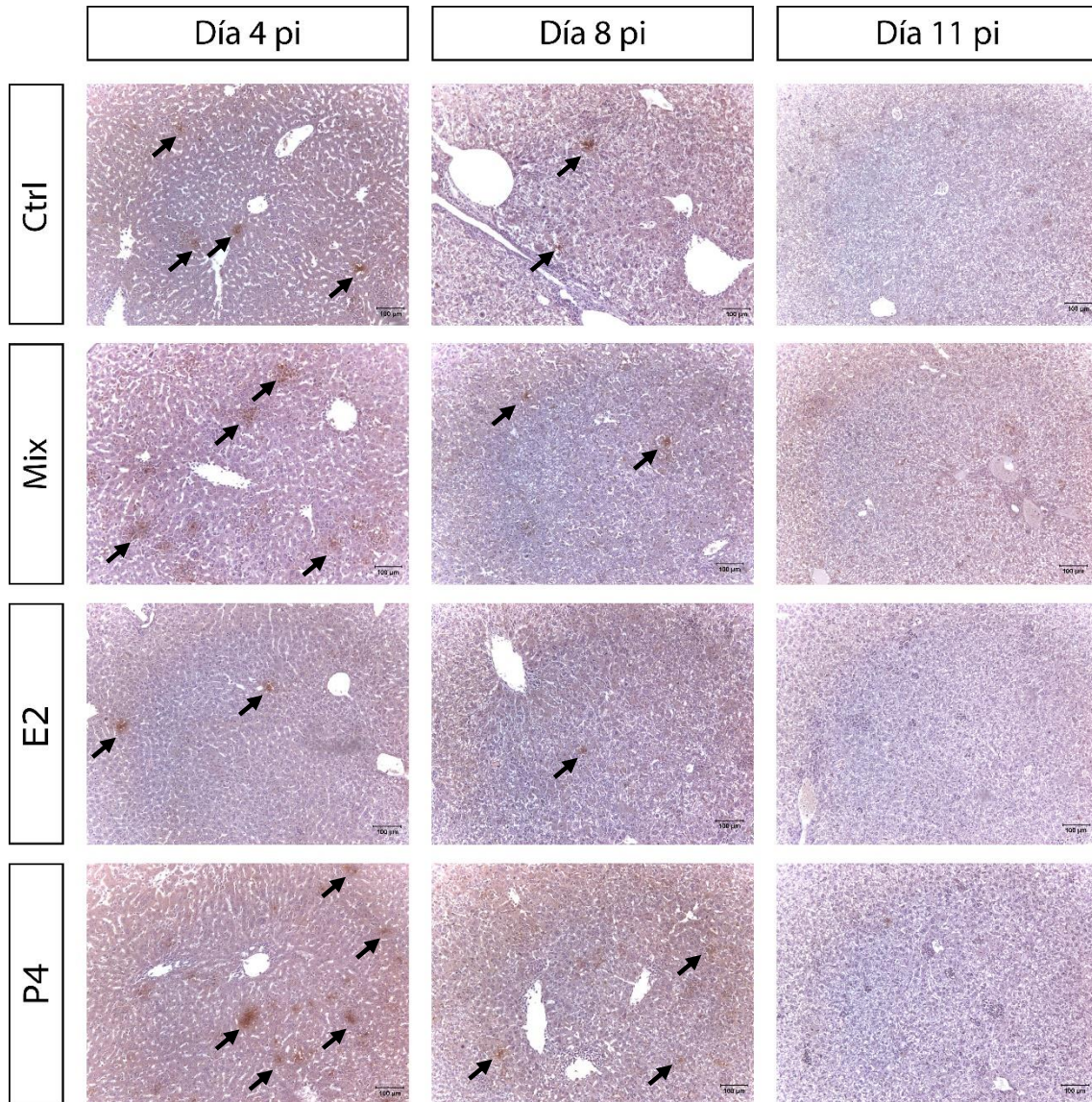
Las lesiones microscópicas de las muestras de hígado eran compatibles con una hepatitis granulomatosa multifocal más grave en el día 4 pi y en concreto en las ratonas del grupo P4 (Figura 24).

El análisis mediante visualización subjetiva por microscopía óptica de las muestras de hígado y bazo inmunoteñidas para la detección de antígeno clamidial, reveló unos resultados similares a los de la Experiencia 1. Así pues, todos los animales de todos los grupos mostraron mayor presencia de antígeno clamidial, tanto en hígado como en bazo, durante el día 4 pi. Aunque todos los grupos mostraron una presencia similar de antígeno durante este día pi, fue en los animales del grupo P4 donde fue mayor en relación a los animales de los grupos Mix, Ctrl y E2.

Durante el día 8 pi y al igual que en el día 4 pi, los animales del grupo P4 presentaron la mayor presencia de antígeno clamidial, en hígado y bazo, mientras que en el resto de grupos sólo se detectaron pequeños focos de antígeno. Estos resultados son muy similares a los obtenidos en la Experiencia 1, donde para el día 8 pi la mayor presencia de antígeno clamidial

## Resultados

se detectó en los animales del grupo P4, sólo superados por los del grupo Dex, no incluido en esta experiencia. Por otro lado, durante el día 11 pi, sólo se detectó una pequeña cantidad de antígeno en el hígado de los ratones de todos los grupos (Figura 24) en este último día pi, la mayor presencia de antígeno clamidial se observó en el bazo de los animales del grupo Mix, seguido por los de los grupos P4, E2 y, por último del grupo Ctrl.



**Figura 24:** Detección de antígeno clamidial en muestras de hígado de animales de la Experiencia 2. Imágenes representativas de animales de cada grupo. La presencia de antígeno clamidial (áreas marrones) fue decreciendo a lo largo del estudio en todos los grupos. Tanto en el día 4 como en el 8 pi, la mayor presencia de antígeno clamidial fue detectada en las ratonas del grupo P4, mientras que la menor presencia fue detectada en los animales del grupo E2. Para el día 11 pi, la presencia de antígeno clamidial había decrecido mucho en todos los grupos, siendo más abundante en el grupo Mix. En general, la presencia de antígeno clamidial fue superior en los

animales de los grupos P4 y Mix, e inferior en los animales del grupo E2 a lo largo de todo el estudio.

## 2.4. Caracterización del infiltrado inflamatorio de las Experiencias 1 y 2

Dado que los animales pertenecientes a los grupos Ctrl, E2 y P4 de las Experiencias 1 y 2, se encontraban bajo las mismas condiciones experimentales en ambas experiencias, se decidió unirlos con el fin de aumentar el número de animales de cada grupo y poder detectar mejor las posibles diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

Se utilizaron anticuerpos frente a iNOS, F4/80 para marcar los macrófagos, NIMP-R14 para los PMN y CD3 para los linfocitos T, presentes en cortes de hígado fijados con Zn, tal como se describió en el apartado 3.6.5. del Material y Métodos (Figuras 26 y 27). Para la cuantificación del área inmunomarcada, se utilizó el programa de análisis de imagen Leica Qwin Pro® del Servicio de Apoyo a Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia. Este programa permite calcular de forma objetiva el área total inmunomarcada por campo observado, determinándose de un total de 10 campos (objetivo 10x) de 10000  $\mu\text{m}^2$  por muestra (Figura 25).

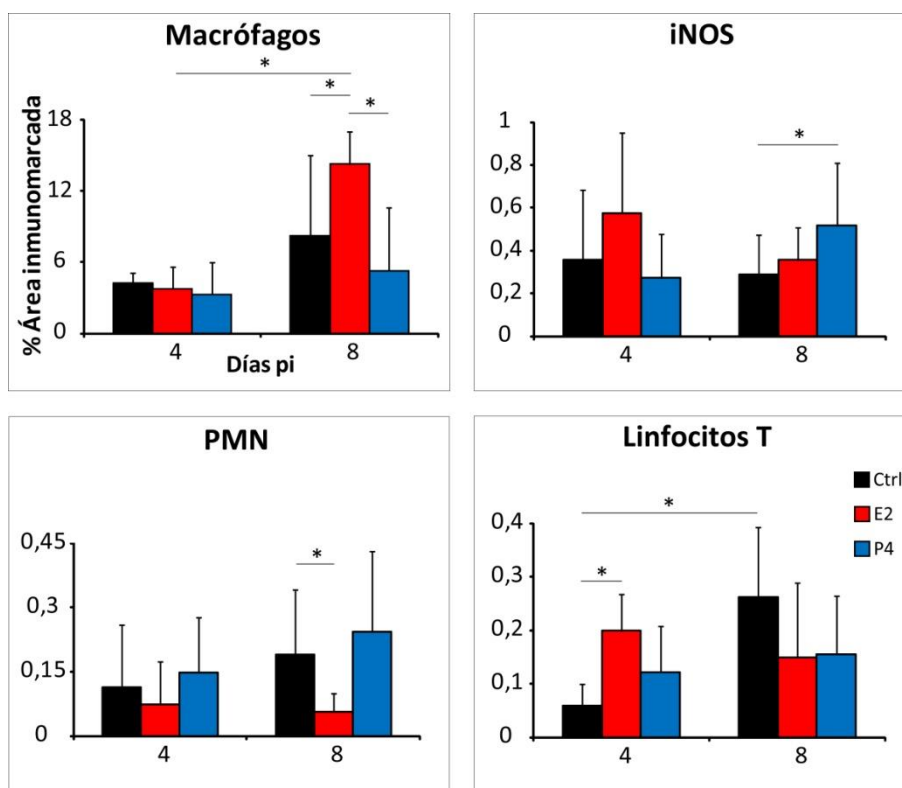
Así se observó que el área ocupada por los macrófagos en el día 4 pi, fue similar en todos los grupos, sin hallarse diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de ellos. En el día 8 pi los macrófagos ocuparon un porcentaje de área inmunomarcada mayor que en el día 4, siendo estadísticamente significativo más alto en los animales del grupo E2 respecto a los de los grupos P4 y Ctrl. Se hallaron diferencias estadísticamente significativas en el grupo E2 entre los días 4 y 8 pi (Figuras 25, 26 y 27).

En el caso de la iNOS, en el día 4 pi, el porcentaje de área inmunomarcada fue mayor en los animales del grupo E2, seguidos por los del grupo Ctrl y los del grupo P4, aunque no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los animales de ningunos de los grupos. En el día 8 pi, fueron los animales del grupo P4 los mostraron el porcentaje de área inmunomarcada, siendo estadísticamente significativo respecto al porcentaje de los animales del grupo Ctrl. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre días en ninguno de los grupos (Figuras 25, 26 y 27).

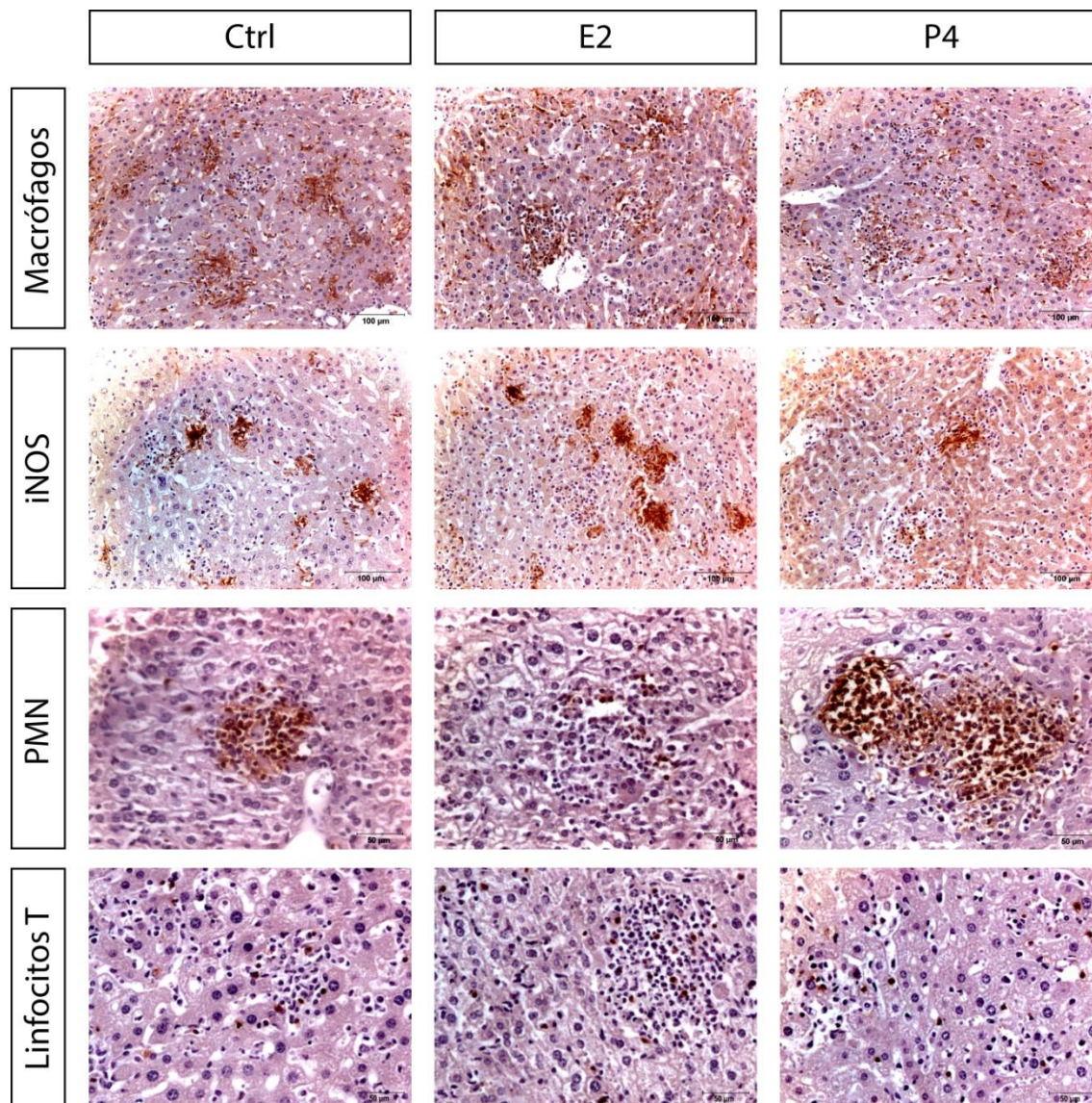
## Resultados

El porcentaje de área inmunomarcada ocupado por PMN, fue mayor en los animales del grupo P4 en el día 4 pi, seguidos por los del grupo Ctrl y los del grupo E2, aunque no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos en este día. Por otro lado, en el día 8 pi, el porcentaje de área inmunomarcada ocupado por PMN se incrementó en todos los grupos salvo en el grupo E2, siendo de nuevo mayor en los animales del grupo P4, seguidos por los del grupo Ctrl con diferencias estadísticamente significativas entre las ratonas del grupo Ctrl y las del grupo E2. De nuevo, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre días en ninguno de los grupos (Figura 25).

Para los linfocitos T, el porcentaje de área inmunomarcada fue superior en las ratonas del grupo E2 en el día 4 pi, con diferencias estadísticamente significativas entre los animales de este grupo y los del grupo Ctrl. En el día 8 pi, el porcentaje de área inmunomarcada fue mayor en las ratonas del grupo Ctrl, seguida por las de las ratonas de los otros dos grupos, que mostraron porcentajes similares en este día pi. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas en el día 8 pi entre ninguno de los grupos, pero sí entre los días 4 y 8 pi en los animales del grupo Ctrl (Figuras 25, 26 y 27).

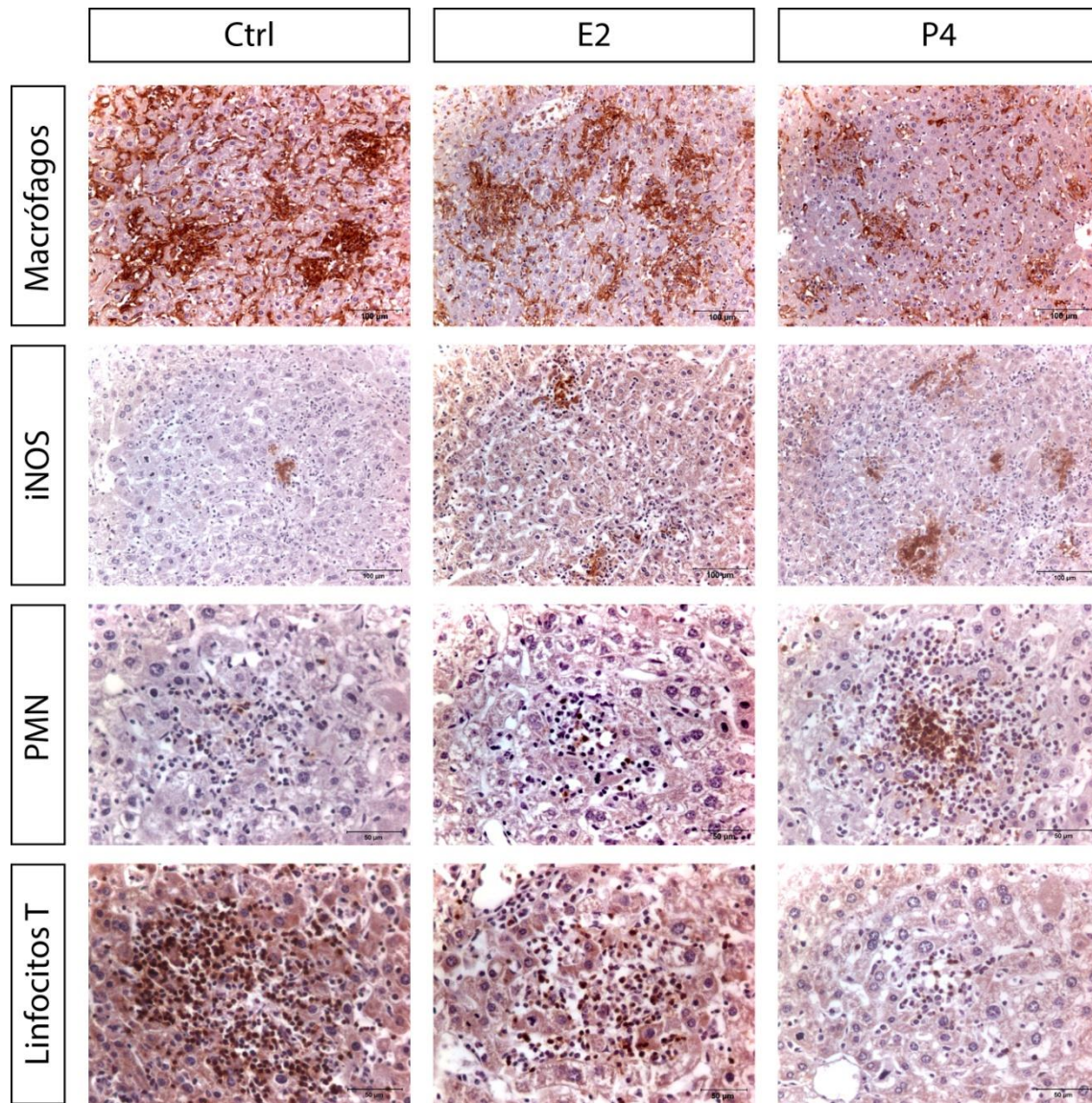


**Figura 25:** Porcentaje de área inmunomarcada por campo observado ocupado Macrófagos, iNOS, PMN y linfocitos T CD3<sup>+</sup>. \*: p valor < 0,05



**Figura 26:** Estudio inmunohistoquímico de muestras de hígado de ratonas de las Experiencias 1 y 2 en el día 4 pi. Imágenes representativas de animales de cada grupo. La caracterización del infiltrado inflamatorio celular en hígado estuvo formada por PMN, macrófagos y linfocitos T, estos últimos distribuidos de forma difusa por el parénquima hepático. Las ratonas tratadas con P4 mostraron mayor presencia de PMN y menor presencia de linfocitos T en relación con el resto de grupos. La presencia de macrófagos fue similar en todos los grupos. Sin embargo, la de iNOS fue mayor en el grupo E2 que en los grupos Ctrl y P4.

## Resultados



**Figura 27:** Estudio inmunohistoquímico de muestras de hígado de ratonas de las Experiencias 1 y 2 en el día 8 pi. Imágenes representativas de animales de cada grupo. El infiltrado inflamatorio celular en hígado estuvo formado principalmente por PMN, macrófagos y linfocitos T, distribuidos entorno a focos inflamatorios. Al igual que en el día 4 pi, las ratonas tratadas con P4 mostraron una mayor presencia de PMN. La presencia de macrófagos fue mayor en los animales E2, no obstante, la presencia de iNOS fue mayor en el grupo P4. Por último, la presencia de linfocitos T fue ligeramente superior que las ratonas del grupo E2 e inferior a las del grupo Ctrl.

### 3. EXPERIENCIA 3. EFECTO DEL 17 $\beta$ -ESTRADIOL Y LA PROGESTERONA SOBRE EL CURSO DE LA INFECCIÓN Y DE LA RESPUESTA INMUNITARIA FRENTE A *C. ABORTUS* INDUCIDA POR UNA VACUNA EXPERIMENTAL INACTIVADA EN RATONAS SWISS OVARIECTOMIZADAS EN MURCIA POR NUESTRO EQUIPO

#### 3.1. Morbilidad

Al igual que en el resto de experiencias, la morbilidad de la infección inducida fue medida de forma objetiva mediante el control de la pérdida de peso a lo largo de todo el experimento (Figura 28). Se pudo comprobar que todos los grupos no vacunados (NV), perdieron más peso que los vacunados (V). Así, los animales NV comenzaron a perder peso a partir del momento del desafío hasta el día 3 pi, momento en el que se estabiliza su peso. De entre los ratones NV, los grupos que perdieron más peso fueron el NV-E2 y el NV-Ctrl.

Por otra parte, entre los grupos vacunados (V), los animales del grupo V-Ctrl comenzaron a perder peso a partir del día 1 pi, hasta el día 3 pi, cuando comenzaron a ganar peso sin llegar nunca al inicial. Los animales de los grupos V-P4 y V-E2 comenzaron a perder peso ligeramente a partir del día 1 y 2 pi respectivamente, siendo esta pérdida más acusada en el caso del grupo V-E2, donde el peso de los ratones se mantuvo por debajo del peso inicial hasta el final del estudio. Los ratones del grupo V-P4 nunca bajaron de su peso inicial, aumentando este a lo largo del estudio.

Por otro lado, el peso de los ratones no infectados (NiNV y NiV) fluctuó por debajo del peso inicial a lo largo del estudio para volver a superarlo ligeramente por el grupo NiNV (Figura 28).

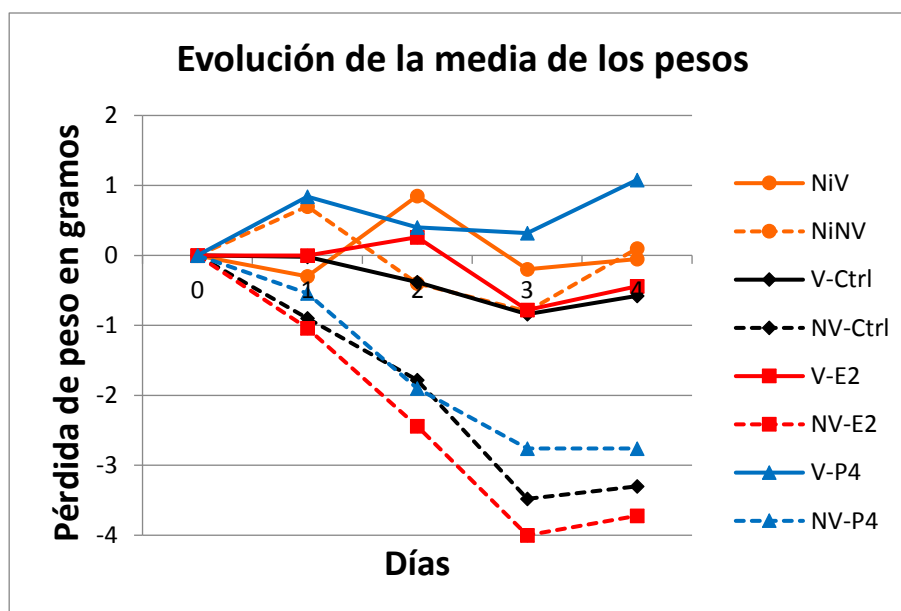


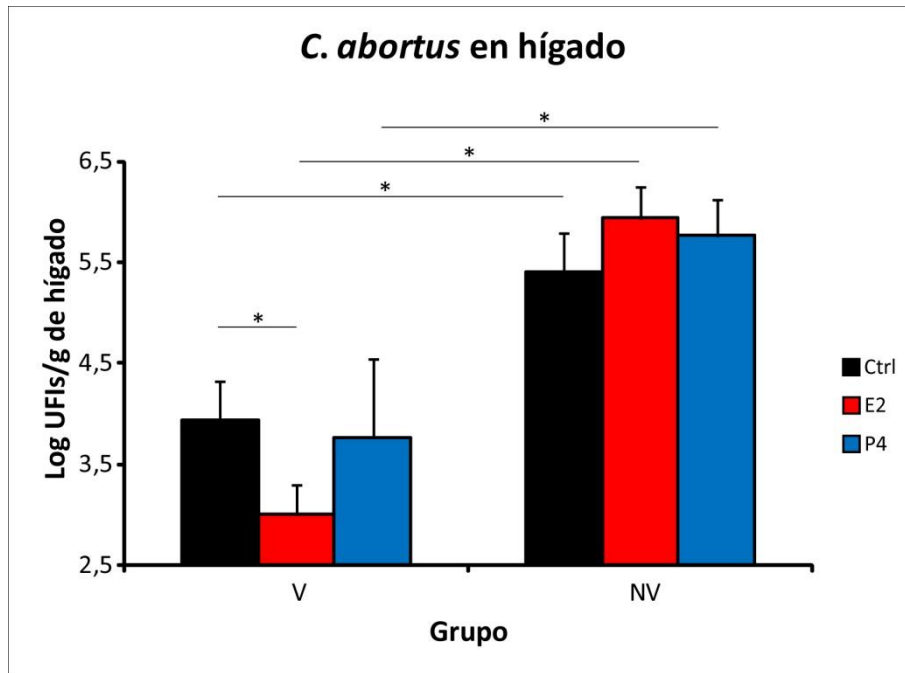
Figura 28: Morbilidad de la infección medida como pérdida de peso desde el día del desafío.

### 3.2. Carga de *C. abortus*

Se determinó la carga clamidial en hígado y bazo de los animales infectados en hígado y bazo, mediante aislamiento *in vitro* sobre células McCoy, tal como se describe en el apartado 3.5.2.2 del Material y Métodos. Así, en el día 4 pi, la carga bacteriana más alta se detectó en ambos órganos en todos los grupos no vacunados (NV). En estos grupos, la carga clamidial detectada tanto en hígado (Figura 29) como en bazo (Figura 30), fue mayor en los animales tratados con estradiol (NV-E2), seguidos por los tratados con progesterona (NV-P4) y por último, los controles (NV-Ctrl). Sólo se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los animales del grupo NV-E2 y los del NV-Ctrl en el bazo.

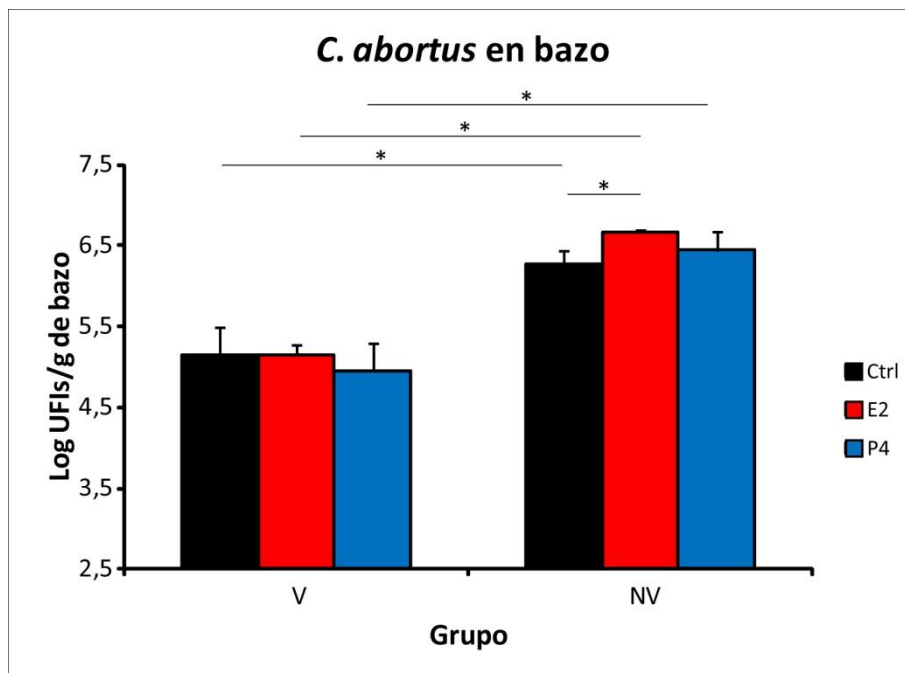
Por otra parte, en los grupos vacunados (V), la mayor carga clamidial se detectó en los animales del grupo V-Ctrl, seguidos de la del grupo V-P4 y V-E2, en el caso del hígado, habiendo diferencias estadísticamente significativas entre las ratonas del grupo V-Ctrl y las del V-E2 en este órgano. En el caso del bazo los grupos V-E2 y V-Ctrl presentaron una carga clamidial muy similar, siendo ligeramente superior en el grupo V-E2, no hallándose diferencias estadísticamente significativas entre los animales de ninguno de los grupos en este órgano.

Por último, se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos de animales vacunados y no vacunados en el caso del hígado y entre V-P4 y NV-P4, y V-Ctrl y NV-Ctrl en el bazo (Figuras 29 y 30).



**Figura 29:** Carga de *C. abortus* (UFIs/gramo de hígado) en ratonas de la Experiencia 3.

\*: p valor < 0,05



**Figura 30:** Carga de *C. abortus* (UFIs/gramo de hígado) en ratonas de la Experiencia 3.

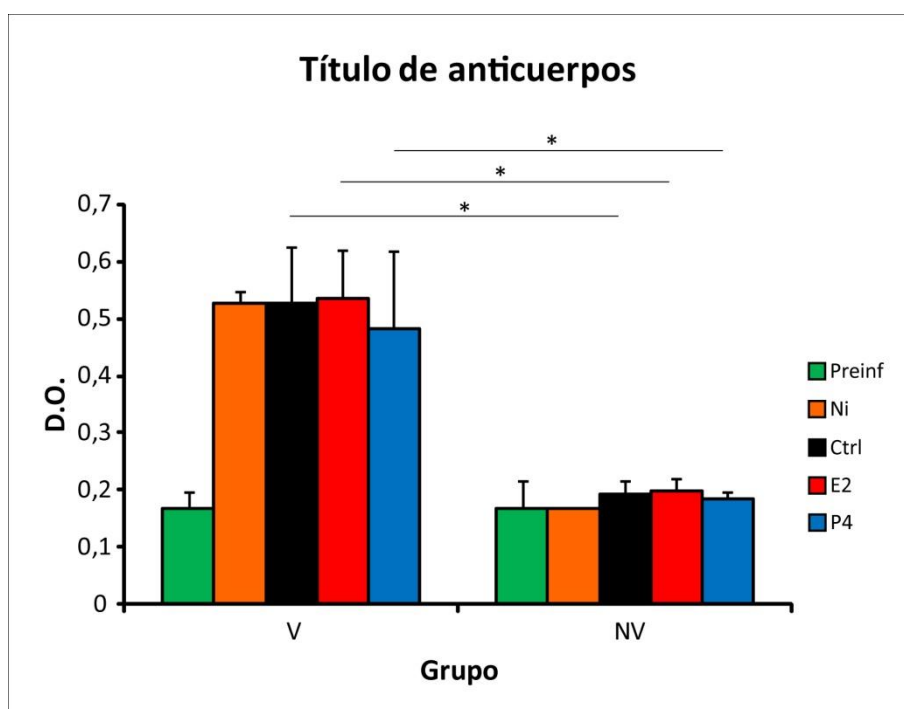
\*: p valor < 0,05

## Resultados

### 3.3. Análisis de la producción de anticuerpos

El nivel de anticuerpos frente *C. abortus* en suero, se determinó mediante una técnica ELISA no comercial y fue mucho mayor en los grupos de animales vacunados (V) que en los grupos no vacunados (NV).

En general, el nivel de anticuerpos fue similar entre los grupos de animales V. Por otro lado, en los animales de los grupos NV, el nivel de anticuerpos fue más bajo que en los animales V, detectándose diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos de animales V y NV después del desafío (Figura 31). Los niveles de anticuerpos frente a *C. abortus* entre los animales de los distintos grupos NV fueron similares entre sí y cercanos al valor de los sueros preinmunización.

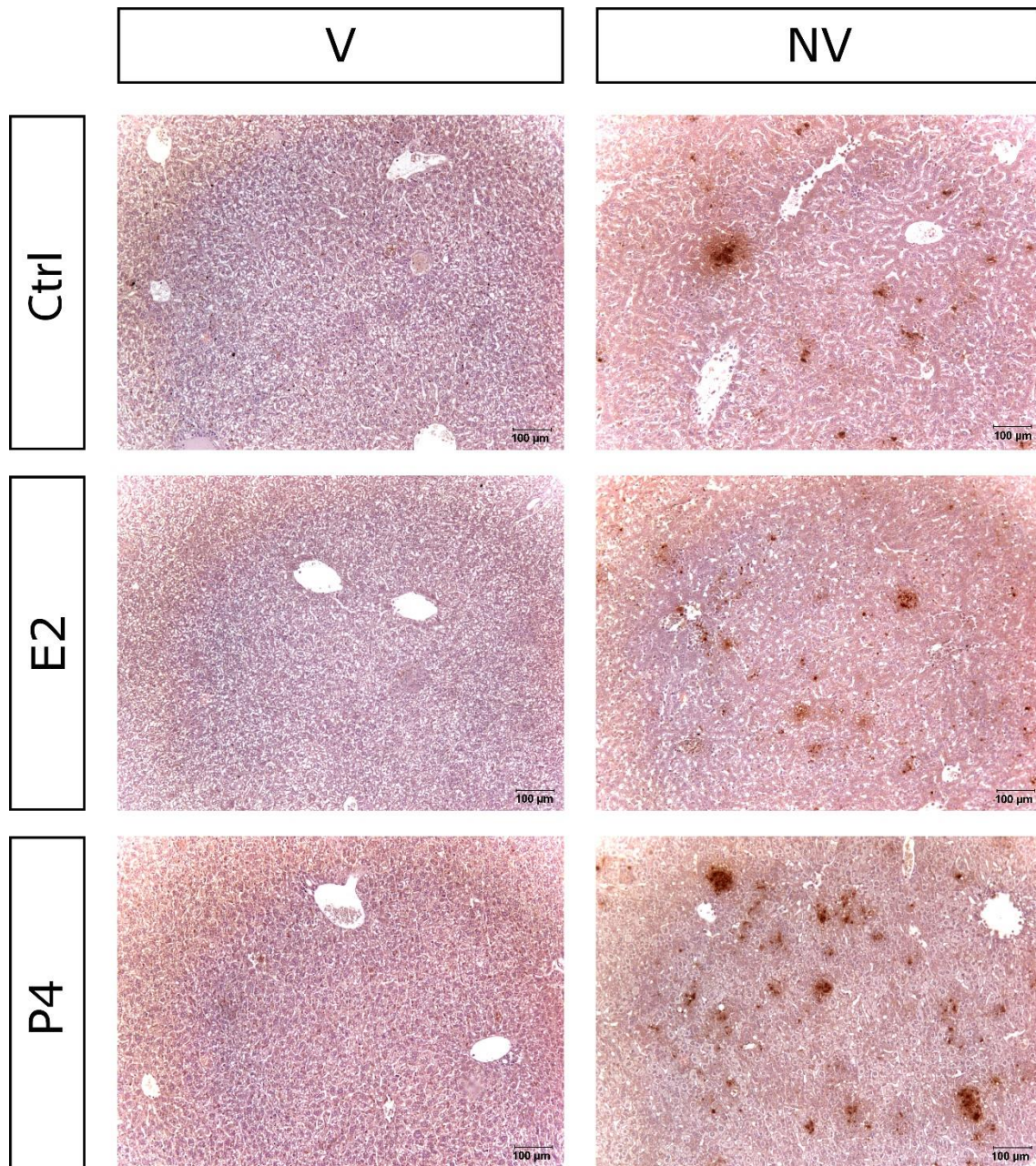


**Figura 31:** Niveles de anticuerpos anti-*C. abortus* en suero en el día del sacrificio (4 pi).  
\*: p valor < 0,05.

### 3.4. Inmunohistopatología

El análisis mediante visualización por microscopía óptica de las muestras de hígado inmunoteñidas para la detección de antígeno clamidial reveló que todos los grupos NV mostraron mayor presencia de dicho antígeno. En concreto, fue en las ratonas del grupo NV-E2 en donde se detectó la menor presencia, seguido de los grupos NV-Ctrl y NV-P4. En los grupos

V, la presencia de antígeno clamidial fue menor que en los grupos NV, especialmente en el grupo V-E2, seguido de los grupos V-Ctrl y V-P4 (Figura 32).



**Figura 32:** Detección de antígeno clamidial en muestras de hígado de ratonas de la Experiencia 3. Imágenes representativas de animales de cada grupo. La presencia de antígeno clamidial (áreas marrones) fue siempre mayor en las ratonas de los grupos NV. De entre ellos, fue superior en los animales del grupo NV-P4.

Se utilizaron anticuerpos frente a iNOS, F4/80 para marcar los macrófagos, NIMP-R14 para los PMN y CD3 para los linfocitos T de los cortes de hígado, tal como se describió anteriormente en el apartado 3.6.5. del Material y Métodos (Figuras 34 y 35). Para la cuantificación del área

## Resultados

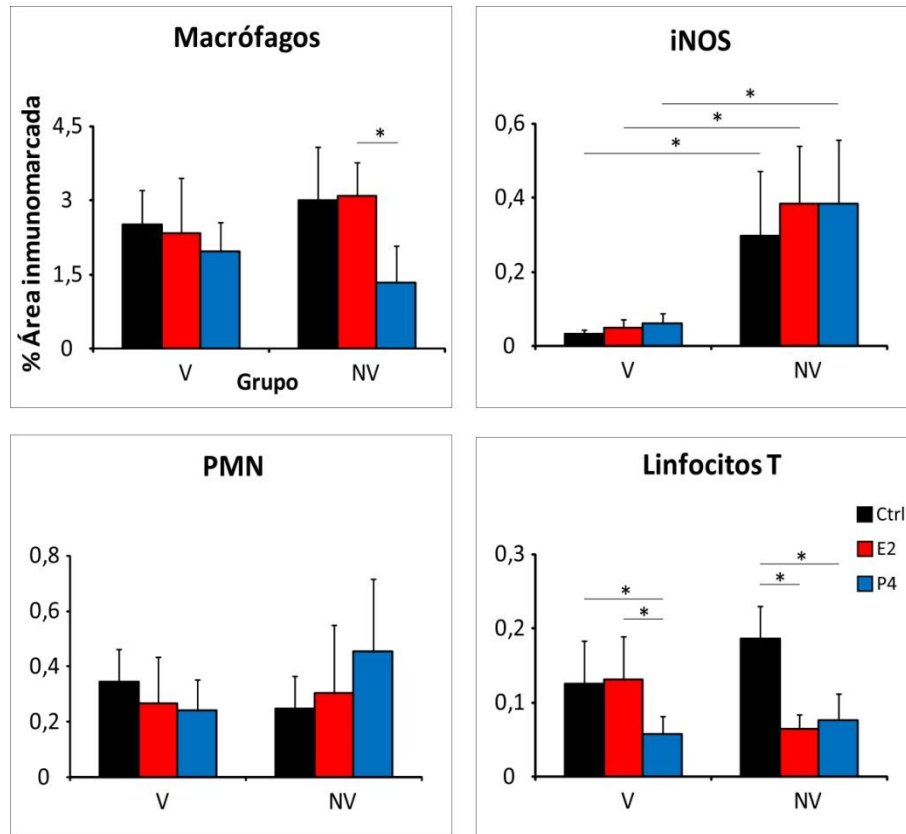
inmunomarcada, se utilizó el programa de análisis de imagen Leica Qwin Pro® del Servicio de Apoyo a Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia. Este programa permite calcular de forma objetiva el área total inmunomarcada por campo observado, determinándose de un total de 10 campos (objetivo 10x) de 10000  $\mu\text{m}^2$  por muestra (Figura 33).

Así, se observó que el área ocupada por los macrófagos en los animales vacunados, fue similar en todos los grupos, sin hallarse diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de ellos. Sin embargo, en los animales no vacunados, los macrófagos ocuparon un porcentaje de área inmunomarcada mayor en el grupo E2, siendo estadísticamente significativo respecto a los del grupo P4. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre vacunados y no vacunados independientemente de su tratamiento hormonal (Figuras 33, 34 y 35).

Para la enzima iNOS, el porcentaje de área inmunomarcada fue similar en todos los grupos V, sin mostrar diferencias estadísticamente significativas. Las ratonas NV, mostraron una carga superior a las V, hallándose diferencias estadísticamente significativas respecto a estos, aunque no entre tratamientos (Figuras 33, 34 y 35).

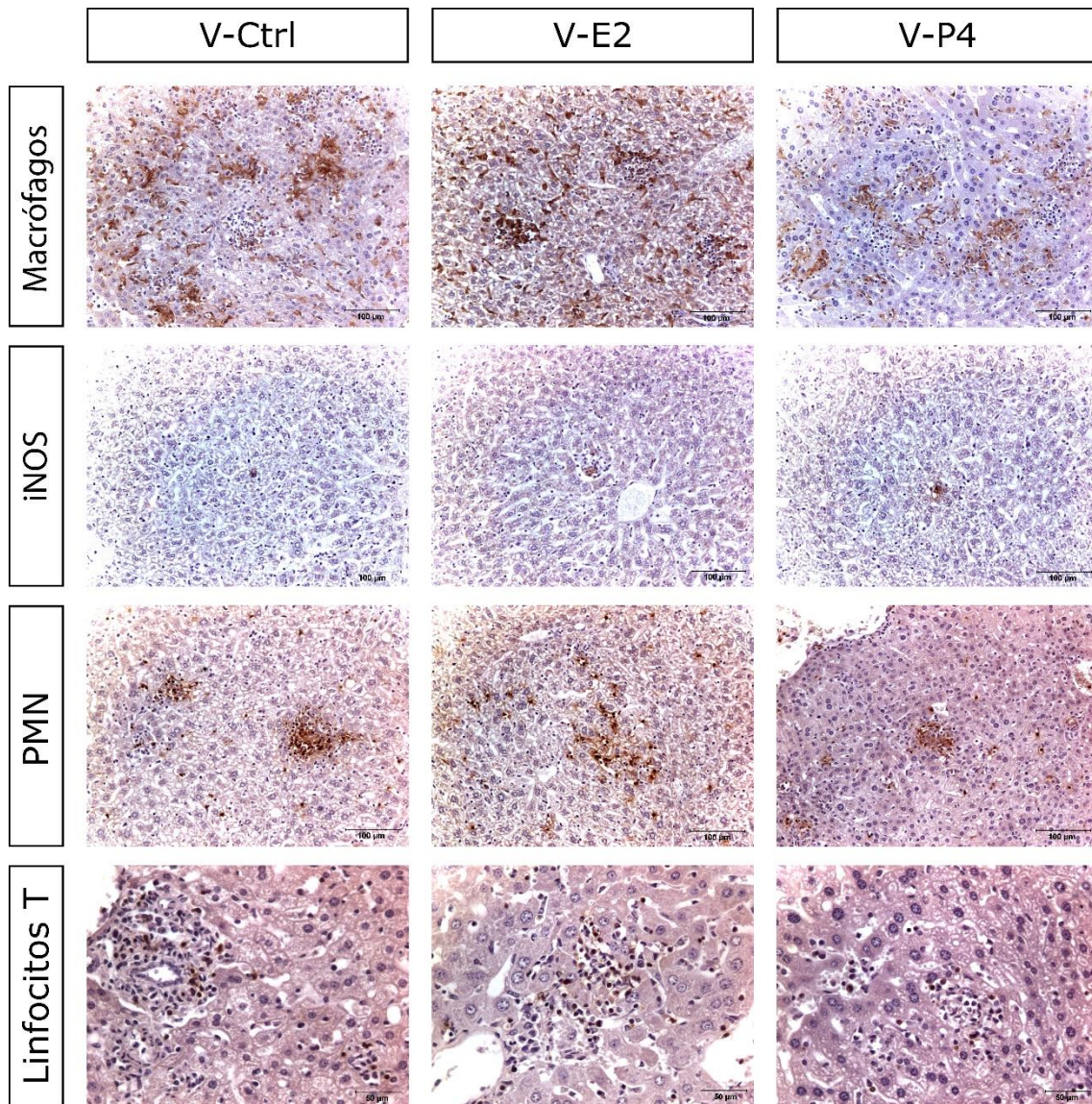
El porcentaje de área inmunomarcada ocupado por PMN en los animales vacunados, fue mayor en los animales del grupo V-Ctrl y menor en los del grupo V-P4, aunque no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos. Por otro lado, en los animales NV, el porcentaje ocupado por PMN se incrementó ligeramente respecto a los animales V en todos los grupos salvo en el grupo NV-Ctrl, aunque sin hallarse diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ni entre V y NV (Figuras 33, 34 y 35).

En el caso de los linfocitos T, en las ratonas V el porcentaje de área inmunomarcada fue mayor en los animales del grupo V-E2, y menor en los del V-P4, hallándose diferencias estadísticamente significativas entre los animales de este grupo con respecto a los de los grupos V-E2 y V-Ctrl. Por otro lado, en los animales NV, los linfocitos T ocuparon mayor porcentaje en los animales del grupo NV-Ctrl que en el resto de grupos, habiendo diferencias estadísticamente significativas entre los animales de este grupo y los de los grupos NV-P4 y NV-E2 (Figuras 33, 34 y 35).

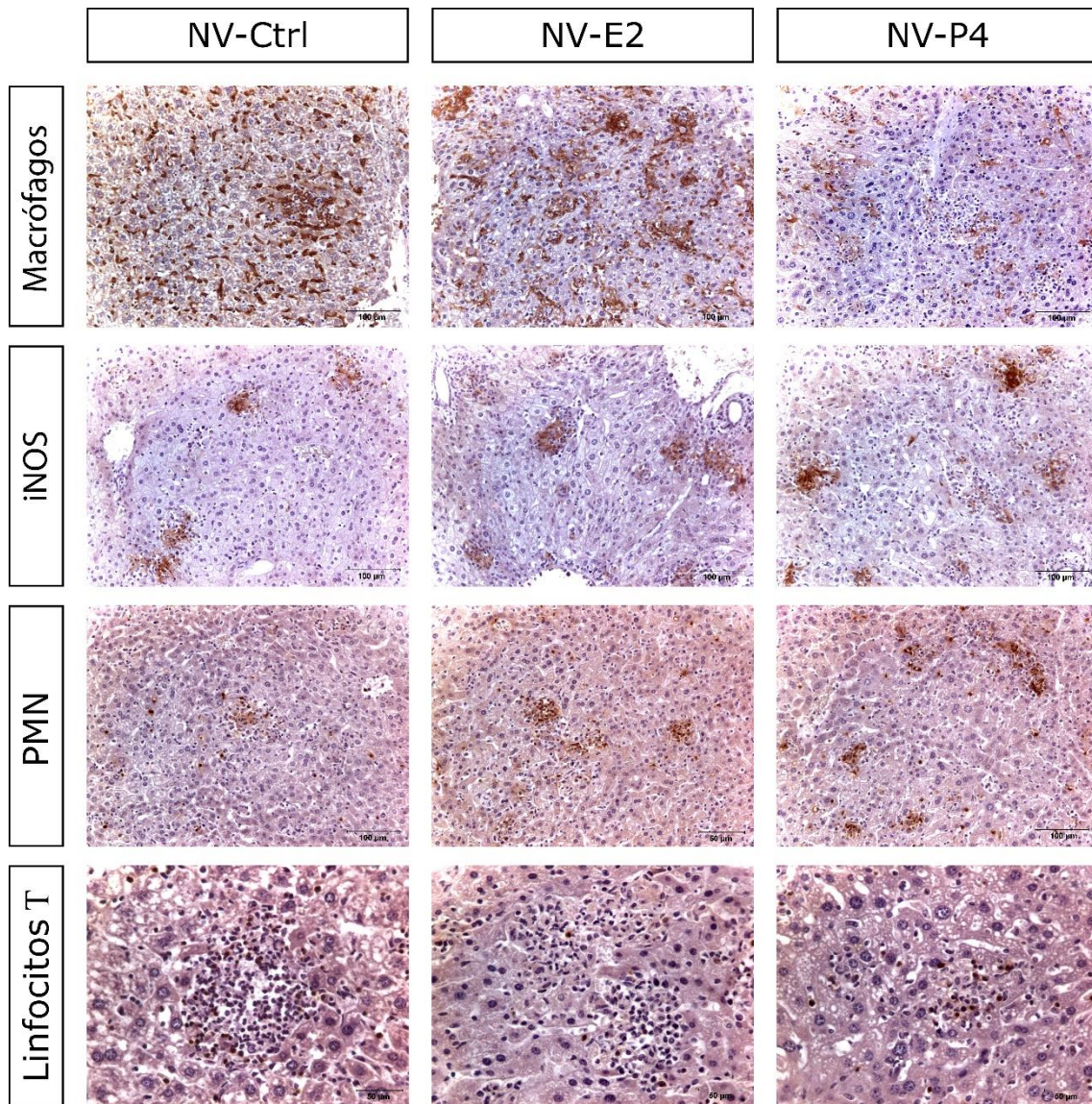


**Figura 33:** Porcentaje de área inmunomarcada por campo observado ocupado Macrófagos, iNOS, PMN y linfocitos T CD3<sup>+</sup>. \*: p valor < 0,05.

## Resultados



**Figura 34:** Análisis inmunohistoquímico de muestras de hígado de ratonas de los grupos V de la Experiencia 3 en el día 4 pi. Imágenes representativas de animales de cada grupo. El infiltrado inflamatorio celular en hígado estuvo formado por PMN, macrófagos y linfocitos T. Las ratonas del grupo Ctrl mostraron una mayor presencia de PMN y macrófagos, siendo los animales tratados con P4, los que menor presencia de estas poblaciones celulares presentaron. La presencia iNOS fue similar entre los todos los grupos, aunque menor en los animales del grupo Ctrl y mayor en los del P4. Por otra parte, las ratonas de los grupos Ctrl y E2, mostraron una presencia similar de linfocitos T, siendo mayor a la observada en los animales del grupo tratado con P4.



**Figura 35:** Análisis inmunohistoquímico de muestras de hígado de ratonas de los grupos NV de la Experiencia 3 en el día 4 pi. Imágenes representativas de animales de cada grupo. El infiltrado inflamatorio celular en hígado estuvo formado por PMN, macrófagos y linfocitos T. En esta ocasión fueron las ratonas tratadas con P4 las que mostraron una mayor presencia de PMN y menor de macrófagos. La presencia de iNOS fue, al igual que en los animales V, similar entre los todos los grupos, aunque menor en los animales del grupo Ctrl y mayor en los del P4. Por último, la presencia de linfocitos T, fue mayor en los animales del grupo Ctrl y menor en los del grupo E2.

### 3.5. Detección de citoquinas y quimioquinas en el suero de las ratonas de las Experiencias 1, 2 y 3

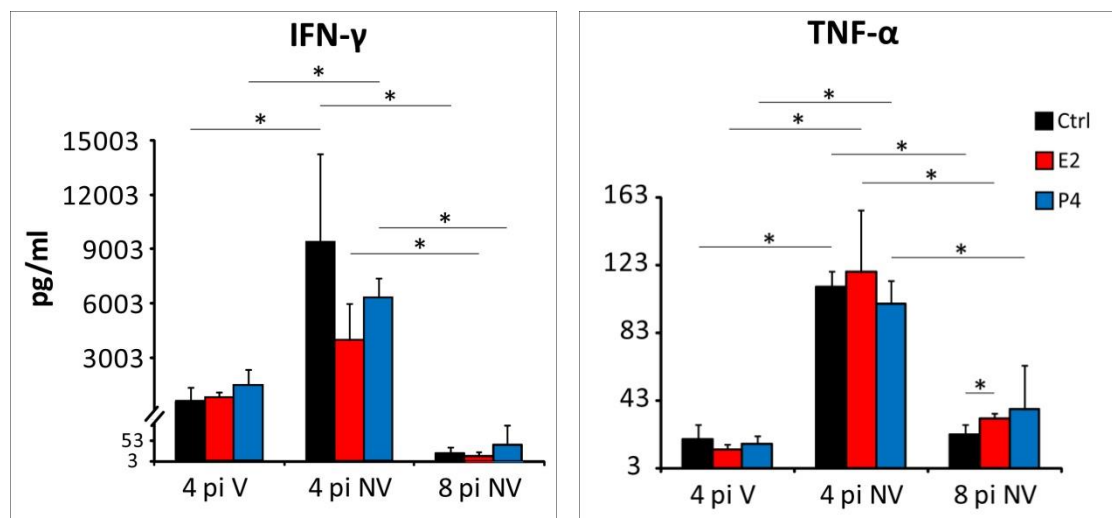
La detección de citoquinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-6, IL-10 e IL-12) así como de quimioquinas (MIP-2 y RANTES) en los sueros de las ratonas de las Experiencias 1, 2 y 3 se llevó a cabo mediante una técnica de inmunoensayo multiplex basada en tecnología Luminex xMAP® (Thermo Fisher Scientific) tal cual se detalla en el apartado 3.6.3..

Dado que los animales pertenecientes a los grupos Ctrl, E2 y P4 de las Experiencias 1 y 2, y los pertenecientes a los mismos grupos no vacunados de la experiencia 3 estuvieron bajo las mismas condiciones experimentales en ambas experiencias, se decidió unirlos con el fin de aumentar el número de animales de cada grupo y poder detectar mejor las posibles diferencias estadísticamente significativas entre ellos y compararlos con los vacunados de la Experiencia 3. Así, a continuación se representarán los resultados de una combinación de animales de las Experiencias 1, 2 y 3, obtenidos en el día 4 pi, dónde se comparan animales V y NV; y en el día 8 pi, dónde se comparan los NV.

Las mayores concentraciones de **IFN- $\gamma$**  se detectaron en las ratonas NV en el día 4 pi, siendo los animales del grupo NV-Ctrl los que presentaron valores más altos de esta citoquina, sin diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en este día pi. En el día 8 pi, las concentraciones de esta citoquina decrecieron drásticamente hasta valores próximos al límite de detección de la técnica. Tampoco se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en este día pi, pero sí en todos los grupos respecto al día 4 pi. En las ratonas V, la mayor concentración de IFN- $\gamma$  volvió a detectarse en los animales tratados con progesterona (V-P4), aunque de nuevo sin hallarse diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. No obstante, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre V-P4 y NV-P4, y entre V-Ctrl y NV-Ctrl (Figura 36).

El **TNF- $\alpha$**  fue detectado en mayor concentración en los animales NV en el día 4 pi. De entre ellos destacó el grupo NV-E2, aunque sin diferencias estadísticamente significativas entre las ratonas de ninguno de los grupos NV en ese día pi. Las concentraciones de esta citoquina en el día 8 pi decrecieron con respecto a las observadas en el día 4 pi, siendo más alta en los animales del grupo NV-P4, con diferencias estadísticamente significativas entre los grupos NV-Ctrl y NV-E2 en el día 8 pi y entre los días 4 y 8 pi en los animales de todos los grupos. Por último, los animales vacunados mostraron concentraciones más bajas que los animales NV del día 4 pi,

siendo más alta en el grupo V-Ctrl. Se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos V y NV, pero no entre tratamientos (Figura 36).



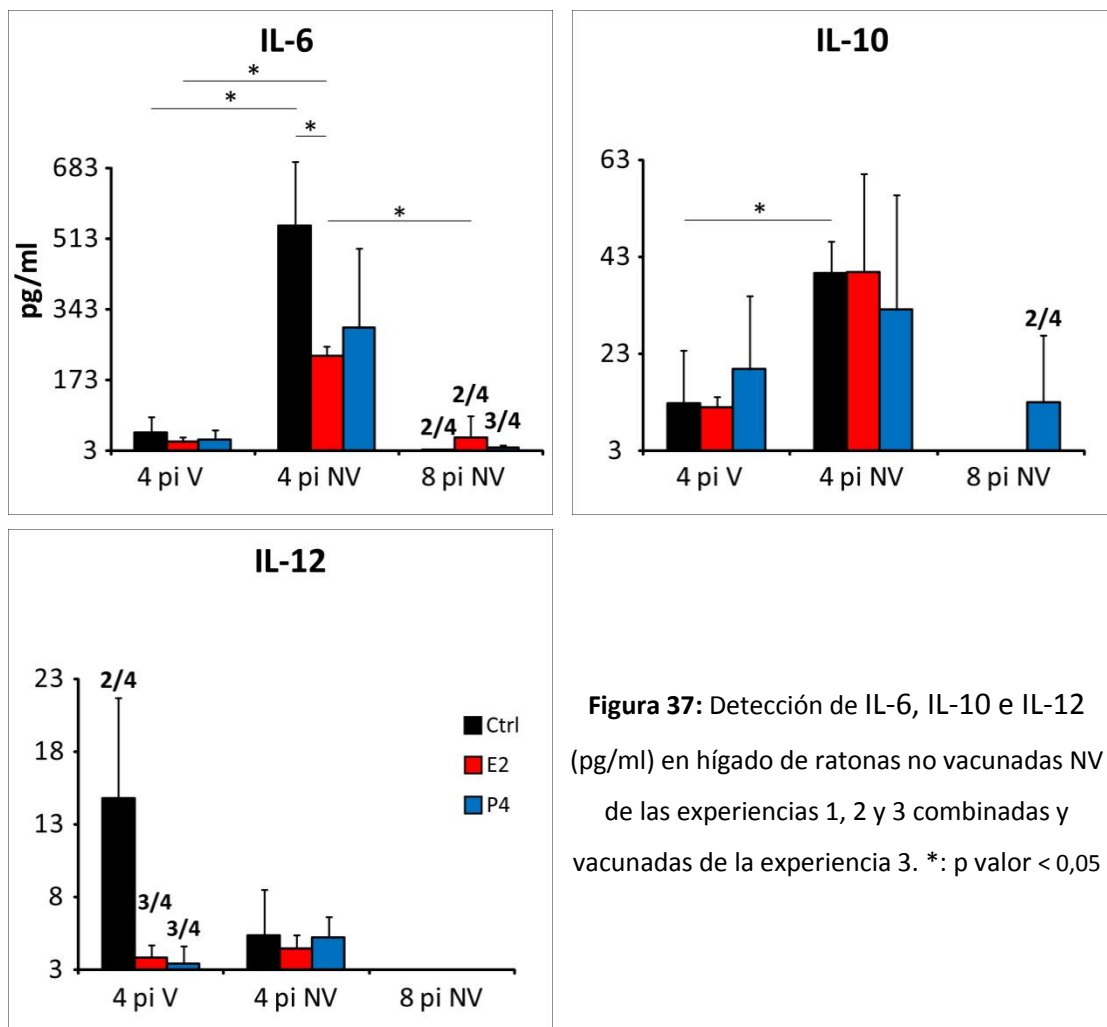
**Figura 36:** Detección de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (pg/ml) en hígado de ratonas no vacunadas NV de las experiencias 1, 2 y 3 combinadas y vacunadas de la experiencia 3. \*: p valor < 0,05

La mayor concentración de **IL-6** fue detectada en los grupos NV en el día 4 pi, en concreto en el grupo NV-Ctrl. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo NV-Ctrl y los tres grupos V, y el grupo NV-E2 en el día 4 pi y en el grupo NV-E2 entre los días 4 y 8 pi (En rojo por sólo haber 2 ratonas en el NV-E2 del día 8 pi (Figura 37)).

En el caso de la **IL-10**, los animales NV volvieron a presentar las mayores concentraciones de esta citoquina en el día 4 pi, destacando los grupos NV-E2 y NV-Ctrl. En el día 8 pi, todas las ratonas de los grupos NV salvo 2 de 4 animales del grupo P4, mostraron valores por debajo del límite de detección de la técnica. En los animales V, el grupo P4 fue el que mayor concentración de IL-10 presentaba. Por último, se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de IL-10 de los animales de los grupos V-Ctrl y NV-Ctrl (Figura 37).

Las concentraciones más altas de **IL-12** se detectaron en los animales de los grupos NV en el día 4 pi. Sin embargo, la concentración más alta encontrada se observó en 2 de 4 animales del grupo V-Ctrl. En el día 8 pi, el valor de IL-12 de ningún animal de ningún grupo llegó al límite de detección de la técnica para esta citoquina. No se halló ninguna diferencia estadísticamente significativa entre ningún grupo o tratamiento (Figura 37).

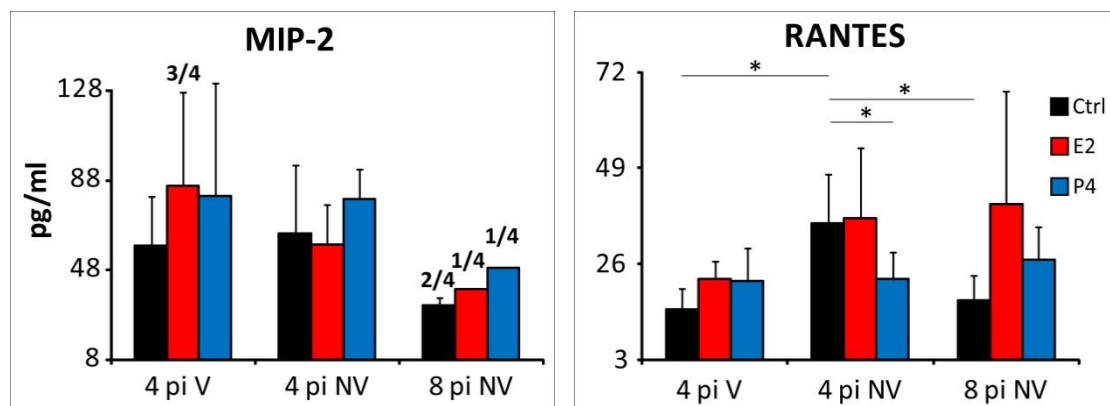
## Resultados



Las concentraciones de **MIP-2** fueron mayores en los animales V que en los NV, salvo en el grupo V-Ctrl, que no alcanzaron los niveles mostrados por los NV. En las ratonas NV, las concentraciones de esta quimioquina, fueron mayores en el día 4 pi que en el día 8 pi, siendo más altas en el grupo NV-P4 en los dos días pi estudiados. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, días o grupos V y NV (Figura 38).

En el caso del **RANTES**, las ratonas de los grupos V-E2 y V-P4 mostraron concentraciones muy similares de esta quimioquina, siendo superiores a las obtenidas para las ratonas del grupo V-Ctrl, aunque sin detectarse diferencias significativas entre tratamientos. En los animales NV, las concentraciones fueron similares en los animales de los grupos NV-Ctrl y NV-E2 en el día 4 pi, siendo inferiores en los del grupo NV-P4. En este día se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones mostradas por los animales de los grupos NV-Ctrl y NV-P4, así como entre V-Ctrl y NV-Ctrl. Por último, en el día 8 pi, las concentraciones de RANTES

fueron más altas en los animales del grupo NV-E2 y menores en los del grupo NV-Ctrl, habiendo diferencias significativas en las ratonas del grupo NV-Ctrl entre este día y el 4 pi (Figura 38).

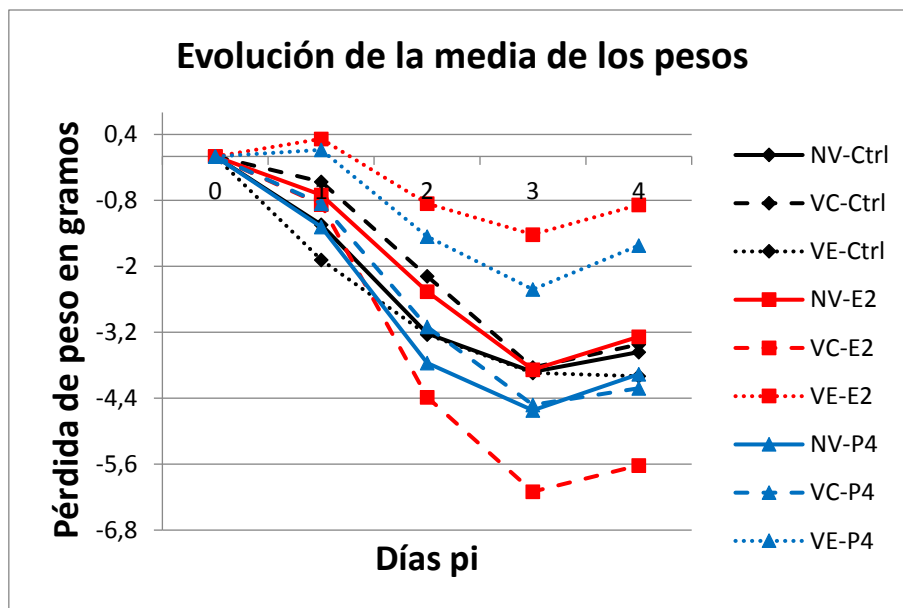


**Figura 38:** Detección de MIP-2 y RANTES en hígado de ratonas no vacunadas NV de las experiencias 1, 2 y 3 combinadas y vacunadas de la experiencia 3. \*: p valor < 0,05

#### 4. EXPERIENCIA 4. EFECTO DEL 17B-ESTRADIOL Y LA PROGESTERONA EN LA INDUCCIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DE DOS VACUNAS (EXPERIMENTAL Y COMERCIAL) CONTRA LA INFECCIÓN POR *C. ABORTUS* EN RATONAS SWISS OVARIETOMIZADAS POR NUESTRO GRUPO

##### 4.1. Morbilidad

Al igual que en las experiencias descritas anteriormente, la morbilidad de la infección inducida fue medida de forma objetiva mediante el control de la pérdida de peso a lo largo de todo el experimento. Así, todos los animales de los grupos incluidos en esta experiencia comenzaron a perder peso a partir del momento del desafío, salvo los animales de los grupos VE-E2 y VE-P4 que empezaron a perder peso un día después. A partir del día 1 pi, todas las ratonas de todos los grupos perdieron peso hasta el día 3 pi. A partir de este día pi, se observó un incremento del peso de los animales de todos los grupos, aunque sin llegar ninguno de ellos a alcanzar su peso inicial. Las ratonas que más peso perdieron tras el desafío fueron las del grupo VC-E2, mientras que las que menos pertenecieron a los grupos VE-E2 y VE-P4 (Figura 39).

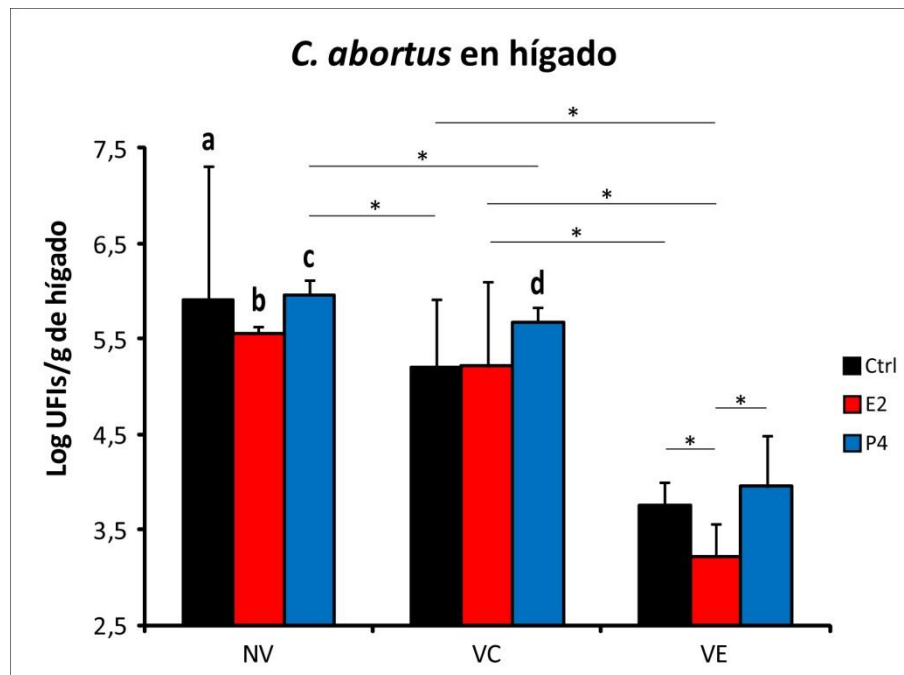


**Figura 39:** Evolución del peso de ratonas tratadas con  $17\beta$ -estradiol (E2) o progesterona (P4) o no tratadas (Ctrl) vacunadas con una vacuna comercial (VC) yo experimental (VE) y no vacunadas (NV) desde el día del desafío.

#### 4.2. Carga de *C. abortus* en hígado

La presencia de *C. abortus* fue mayor en las ratonas NV, sin diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de ellos. Por otro lado, en las ratonas VC, las ratonas del grupo tratado con progesterona (VC-P4) volvieron a ser las que presentaron la mayor carga clamidial, seguidas en este caso, por las del grupo VC-E2, que presentaban valores muy próximos a las del grupo VC-Ctrl. De nuevo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos de ratonas VC. Por último, la menor carga clamidial fue detectada en las ratonas VE, siendo menor en los animales del grupo VE-E2 y mayor en el grupo VE-P4. En este caso se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los animales de los grupos VE-P4 y VE-Ctrl, así como entre los de los grupos VE-E2 y VE-Ctrl.

También, se hallaron diferencias estadísticamente significativas en la carga clamidial detectada ante diferentes vacunaciones. Así, hubo diferencias significativas en las ratonas Ctrl entre NV y VE, en los animales tratados con progesterona entre NV y VE, NV y VC, y VE y VC, así como en las ratonas tratadas con estradiol entre NV y VE, y VC y VE (Figura 40).

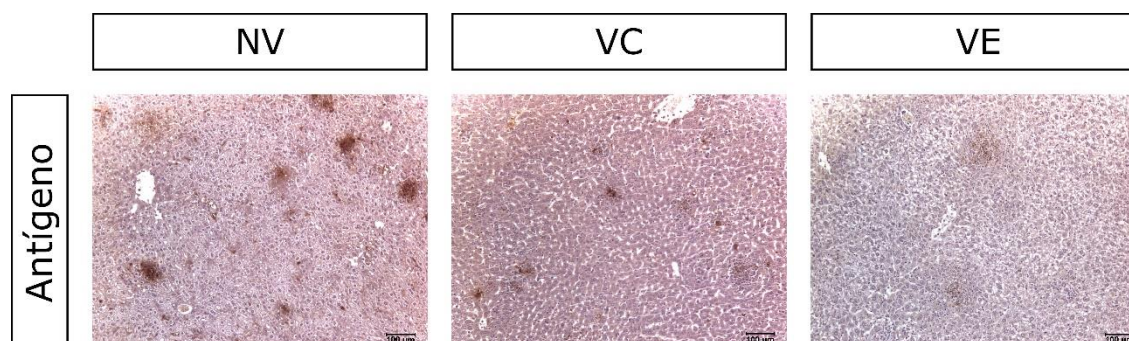


**Figura 40:** Carga de *C. abortus* (UFIs/gramo de hígado) en ratonas de la Experiencia 4. a: diferencias estadísticamente significativas entre los animales del grupo NV-Ctrl y todos los VE. b: diferencias estadísticamente significativas entre los animales del grupo NV-E2 y todos los VE. c: diferencias estadísticamente significativas entre los animales del grupo NV-P4 y todos los VE. d: diferencias estadísticamente significativas entre los animales del grupo VC-P4 y todos los VE. \*: p valor < 0,05

### 4.3. Inmunohistopatología

El análisis mediante visualización por microscopía óptica de las muestras de hígado inmunoteñidas para la detección de antígeno clamidial reveló que en todos los grupos de animales se observó la presencia de hepatitis granulomatosa multifocal, más grave en las ratonas NV, seguidas de las ratonas VC y casi inexistente en las VE. El grupo NV mostró la mayor presencia de antígeno clamidial. Los animales del grupo VE mostraron unos resultados opuestos a los observados en las ratonas NV, mientras que las VC mostraron resultados intermedios a los descritos para los otros dos grupos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en relación con los tratamientos hormonales en ninguno de los grupos (Figura 41).

## Resultados

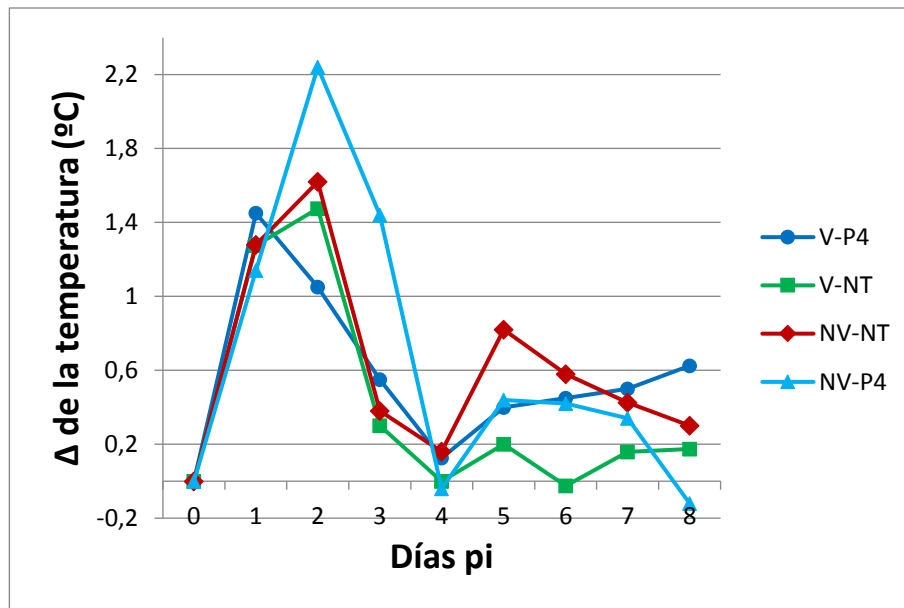


**Figura 41:** Inmunotinción de cortes histológicos de hígado de ratonas no vacunadas (NV), vacunadas con vacuna comercial (VC) o experimental (VE) teñidos con el anticuerpo monoclonal frente a *C. abortus*. Las imágenes son representativas de cada grupo. Las muestras se tomaron en el día 4 pi tras el desafío. Imágenes representativas de animales de cada grupo. Los animales del grupo NV, mostraron la mayor presencia de antígeno clamidial (áreas inmunoteñidas de color marrón), al contrario que las ratonas del grupo VE. Los animales del grupo VC mostraron valores intermedios tanto en detección de antígeno clamidial .

## 5. EXPERIENCIA 5. EFECTO DE LA PROGESTERONA SOBRE LA INFECCIÓN POR *C. ABORTUS* Y SOBRE LA EFICACIA DE LA VACUNACIÓN EN UN MODELO OVINO

### 5.5. Morbilidad

La temperatura de todos los animales aumentó entre los días 1 y 2 pi, siendo los animales del grupo NV-P4 los que mostraron el mayor aumento (hasta 2,24 °C) en el día 2 pi. Se observó un segundo aumento de la temperatura en el grupo NV-NT en el día 5 pi. A partir del quinto día la temperatura de todos los animales volvió a los valores normales (Figura 42).



**Figura 42:** Variación de la temperatura corporal después del desafío en ovejas vacunadas (V) y no vacunadas (NV). La temperatura más alta se detectó en NV-P4 el día 2 pi. Se observó un segundo incremento de temperatura en día 5 pi, siendo más alto en el grupo NV-NT.

### 5.6. Detección de ADN de *C. abortus*

El día del sacrificio se extrajo ADN de los diferentes órganos para detectar la carga de *C. abortus*. La qPCR fue negativa en todas las muestras de nódulos linfáticos mediastínicos y traqueobronquiales de todos los grupos. Las muestras de tonsilas y nódulos linfáticos y retrofaríngeos mostraron resultados dispares, con valores altos en  $C_t$ , como se muestra en la Tabla 3. Por el contrario, la mayoría de las muestras de pulmón fueron positivas en todos los grupos excepto V-P4, donde sólo una oveja (de los 4 animales del grupo) fue positiva. Las muestras positivas en pulmón mostraron valores inferiores a 30 ciclos.

## Resultados

**Tabla 3:** Detección por PCR de *C. abortus* en muestras de órganos en el día 8 pi. No se hallaron muestras positivas ( $Ct \leq 35$ ) de nódulos traqueobronquiales y mediastínicos.

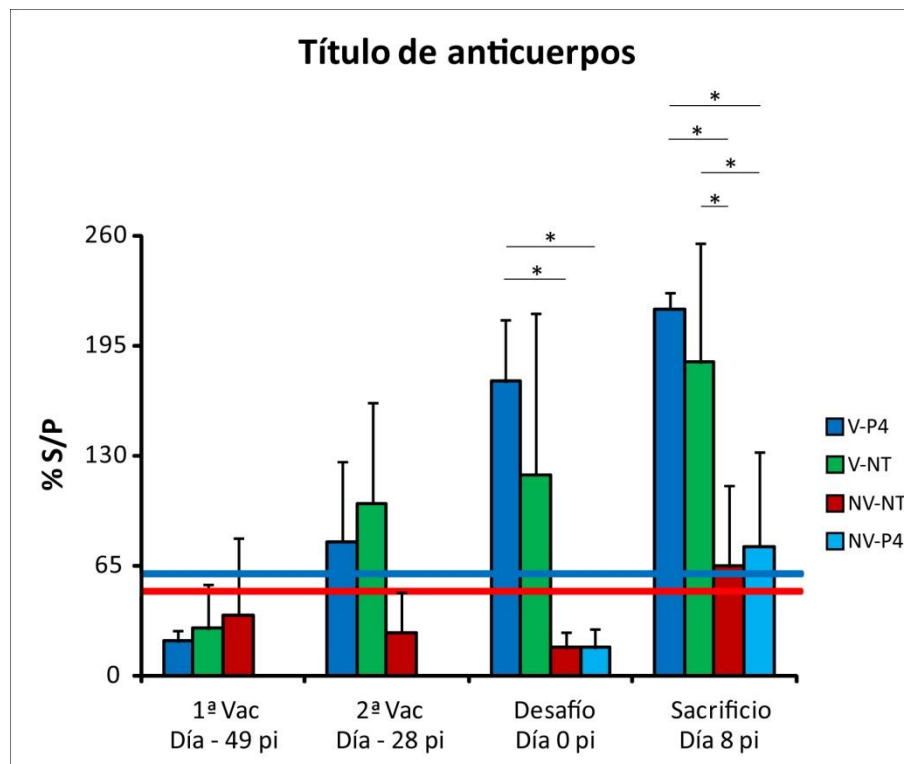
	Oveja	Pulmón	Tonsilas	Nódulo retrofaríngeo
		Media Ct	Media Ct	Media Ct
<b>V-P4</b>	1	<b>27,86</b>	<b>34,76</b>	<b>34,81</b>
	2	35,29	<b>34,82</b>	35,39
	3	35,37	35,08	35,07
	4	35,69	35,34	<b>34,44</b>
	Media del grupo	33,55 (1/4)	35,00 (2/4)	34,93 (2/4)
<b>V-NT</b>	1	<b>31,07</b>	<b>34,80</b>	<b>34,62</b>
	2	35,69	35,11	<b>34,84</b>
	3	<b>28,42</b>	<b>34,82</b>	35,33
	4	<b>31,07</b>	<b>34,98</b>	35,12
	Media del grupo	31,56 (3/4)	34,93 (3/4)	34,98 (2/4)
<b>NV-NT</b>	1	<b>32,20</b>	<b>34,96</b>	35,14
	2	<b>26,83</b>	35,35	<b>34,99</b>
	3	<b>28,63</b>	35,04	35,74
	4	35,31	35,17	35,06
	5	<b>29,03</b>	35,40	35,25
	Media del grupo	30.40 (4/5)	35.18 (1/5)	35.24 (1/5)
<b>NV-P4</b>	1	35,21	35,15	<b>34,90</b>
	2	35,59	35,30	35,32
	3	<b>28,91</b>	<b>34,89</b>	<b>34,95</b>
	4	<b>28,49</b>	<b>34,45</b>	<b>34,95</b>
	5	<b>28,18</b>	35,62	35,30
	Media del grupo	31.28 (3/5)	35.08 (2/5)	35.08 (3/5)

### 5.7. Detección de anticuerpos y citoquinas en suero

Las ovejas de los grupos vacunados manifestaron seroconversión después de la primera vacunación (día -28 pi), siendo el título de anticuerpos más alto en el grupo V-NT (Figura 43). Sin embargo, el título de anticuerpos fue mayor en el grupo V-P4 en el día del desafío (día 0 pi), con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre este grupo y los grupos no vacunados. Por otro lado, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos V-NT y no vacunados. El desafío provocó una marcada respuesta humoral específica, que se determinó el día del sacrificio (día 8 pi) mediante un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) en el título de anticuerpos en los grupos vacunados en comparación con los grupos no vacunados. La seroconversión de animales no vacunados sólo se observó al final del estudio.

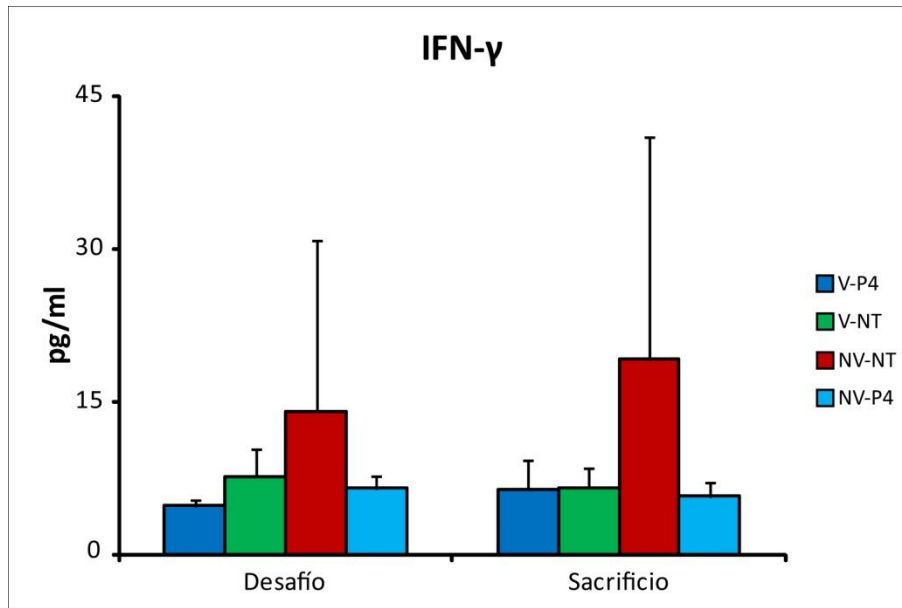
En el caso de las citoquinas, aunque los valores más elevados de IFN- $\gamma$  correspondieron a ovejas NV-NT, no se observaron diferencias estadísticamente significativas para esta citoquina entre grupos o días (Figura 44). Por otro lado, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) para las concentraciones de IL-10 entre los animales NV-NT y NV-P4 en

el día del desafío, siendo mayores en el grupo NV-P4 (Figura 45). Sin embargo, los valores de IL-10 fueron bajos (alrededor de 12 pg/ml) y cercanos al límite de detección del ELISA comercial (5 pg/ml) en todos los grupos.

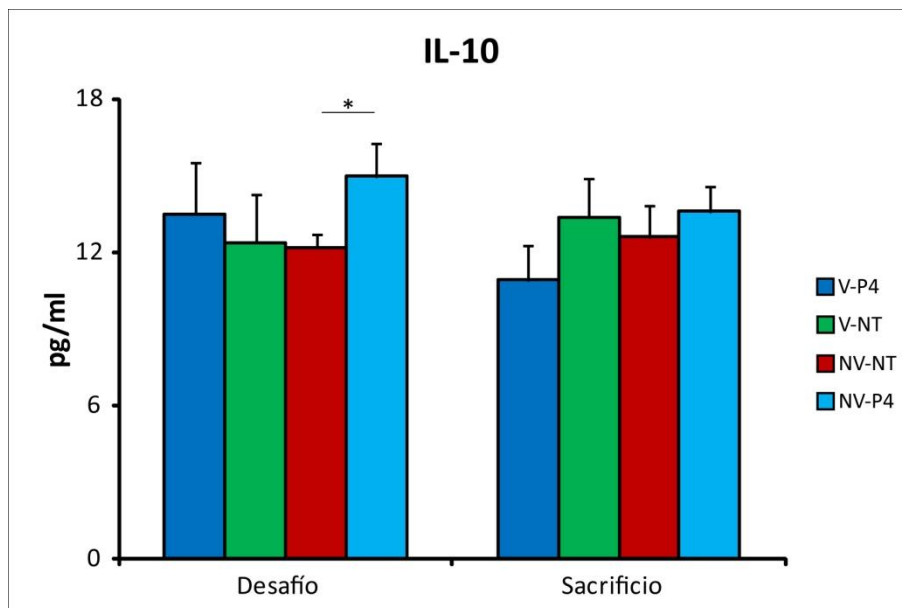


**Figura 36:** Media y desviación estándar de los niveles de anticuerpos contra *C. abortus*. Las líneas horizontales representan el límite entre resultados negativos y dudosos (línea inferior roja) y entre resultados dudosos y positivos (línea superior azul. % S/P: relación muestra/control positivo  
\*:  $p < 0,05$ .

## Resultados



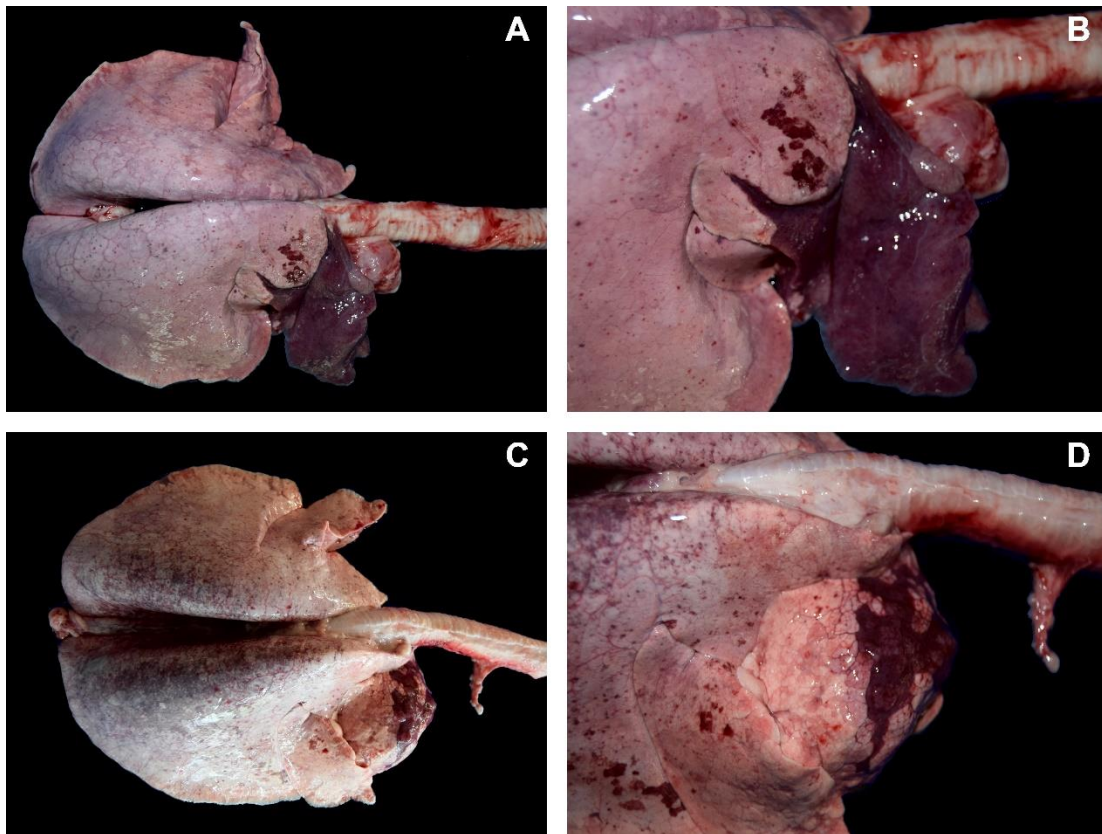
**Figura 37:** Media y desviación estándar de los niveles de IFN- $\gamma$  detectados en los diferentes grupos de ovejas en el día del desafío (0 pi) y el sacrificio (8 pi). \*: p valor < 0,05



**Figura 38:** Media y desviación estándar de los niveles de IL-10 en los diferentes grupos de ovejas en el día del desafío (0 pi) y el sacrificio (8 pi). \*: p valor < 0,05

### 5.8. Lesiones macroscópicas, histopatología e inmunohistoquímica

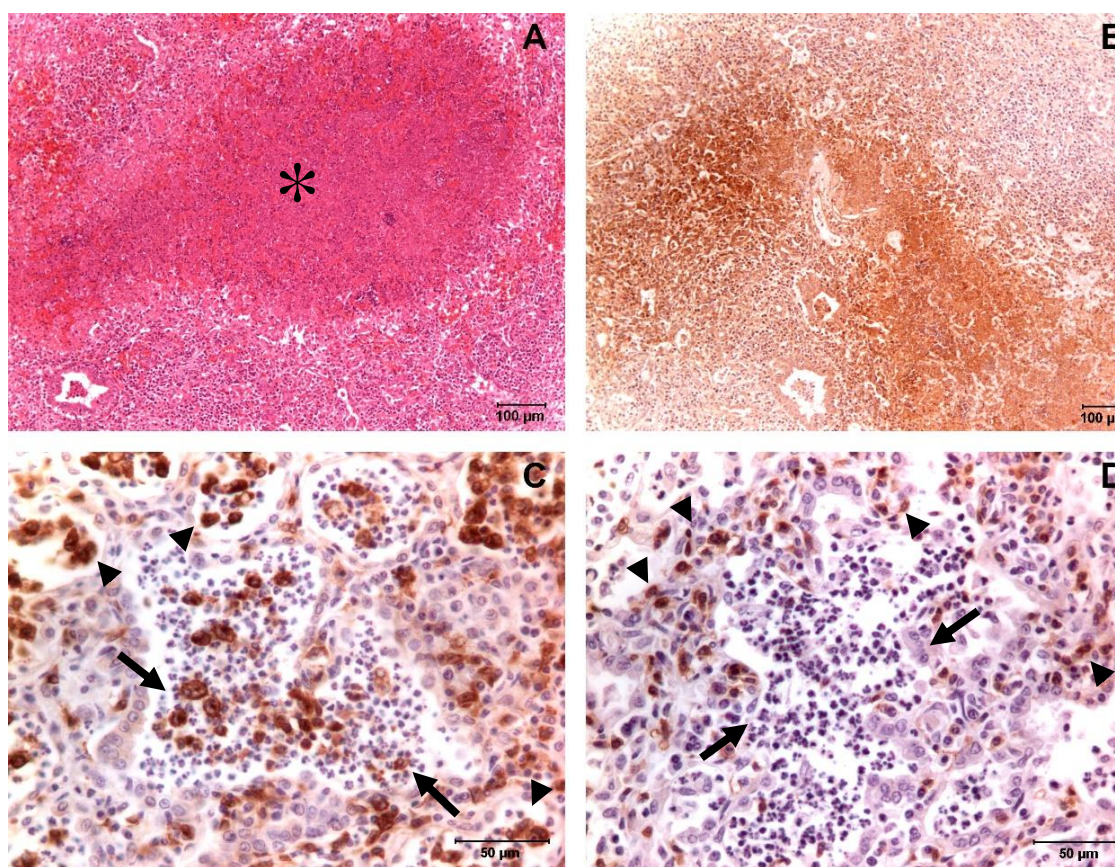
Los animales no vacunados desarrollaron lesiones pulmonares en los lóbulos superior y medio, consistentes en áreas de color rojo grisáceo de consolidación irregular y material purulento (Figura 46, A y B). Siete de las 10 ovejas no vacunadas, también mostraron agrandamiento de los nódulos linfáticos traqueobronquiales. En los grupos vacunados, todas las ovejas del grupo V-NT (Figura 46, C y D) y sólo una del grupo V-P4 (la que fue positiva a la qPCR) mostraron pequeñas áreas de consolidación pulmonar en la porción craneal del lóbulo craneal con una textura firme y de color gris. Los 3 animales restantes del grupo V-P4 mostraron sólo pequeñas áreas deprimidas con textura firme y color púrpura. Los nódulos linfáticos traqueobronquiales de los animales vacunados aumentaron de tamaño, mostrando una cápsula tensa y con superficie sobresaliente al corte.



**Figura 46:** Lesiones macroscópicas. (A) Pulmón de una oveja del grupo NV-P4 con consolidación gris-rojiza del lóbulo craneal y también en áreas del lóbulo medio. (B) Detalle de las lesiones mostradas en (A). (C) Pulmón de una oveja V-NT que muestra una pequeña área de consolidación gris-rojiza en la porción craneal del lóbulo superior. (D) Detalle de la lesión mostrada en (C).

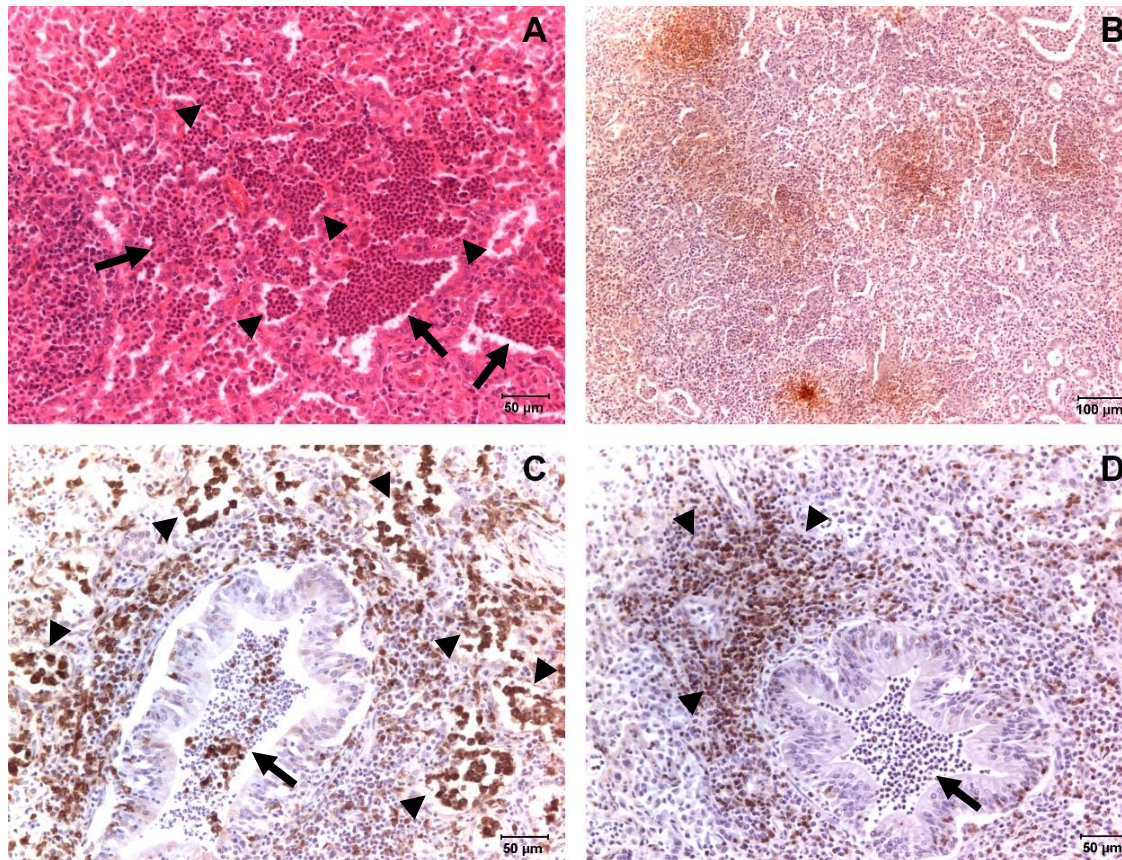
## Resultados

El estudio histopatológico e inmunohistoquímico de las lesiones mostró que los animales de los grupos no vacunados (NV-NT y NV-P4) desarrollaron una bronconeumonía supurativa con abundante exudado inflamatorio en la luz de los alvéolos, bronquios y bronquiolos (figuras 47 y 48). Este exudado estaba formado principalmente por PMN y macrófagos (CD163+). Además, en las paredes alveolares, septos y alrededor de los bronquios, bronquiolos y vasos se localizó un infiltrado mononuclear compuesto principalmente de linfocitos T (CD3+). Las ovejas del grupo NV-NT (Figuras 47) también mostraron pequeñas áreas necróticas con licuefacción del parénquima pulmonar. Asimismo, en los animales NV, se detectó una alta presencia de antígeno clamidial asociado al exudado neutrofílico, especialmente en zonas de necrosis, siendo menor en el grupo NV-P4 (Figuras 47 y 48).



**Figura 47:** Estudio histopatológico e inmunohistoquímico de un animal NV-NT. (A) Sección inmunoteñida con H/E de una zona de necrosis (\*) con licuefacción del parénquima pulmonar. (B) Sección inmunoteñida por el método ABC contrastada con hematoxilina mostrando la asociación entre las zonas de necrosis y la inmunorreacción positiva al antígeno clamidial (zonas marrones). (C) Detalle de una sección inmunotinteñida para la detección de macrófagos. Obsérvese la presencia de estas células en la luz de los bronquiolos (flechas) y alvéolos (puntas de flecha) junto con la presencia de PMN. (D) Detalle de una sección inmunotinteñida para la detección de linfocitos T. Nótese la escasa presencia de estas células en las paredes alveolares (puntas de

flecha), septos y alrededor de bronquiolos y vasos (flechas) y la alta presencia de PMN en el lumen de bronquiolos (flechas) y alvéolos (puntas de flecha).

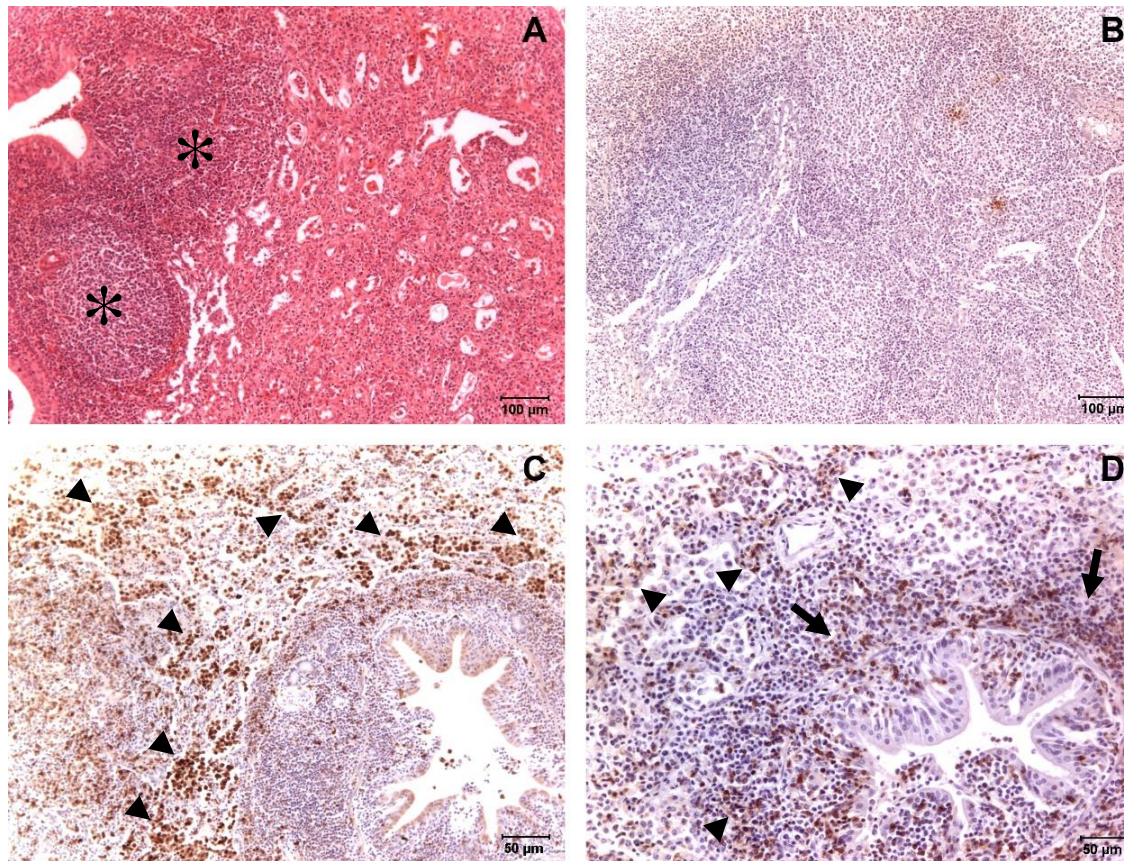


**Figura 48:** Estudio histopatológico e inmunohistoquímico del pulmón de una oveja NV-P4. (A) Sección inmunoteñida con H/E en la que se aprecia una bronconeumonía supurativa con abundante exudado compuesto de PMN y macrófagos en el lumen de los alvéolos (puntas de flecha), bronquios y bronquiolos (flechas). (B) Sección inmunoteñida por el método ABC contrastada con hematoxilina que muestra la asociación de las lesiones con una inmunorreacción positiva al antígeno clamidial (zonas marrones). Se detectó menor presencia de antígeno clamidial que en los animales NV-NT (Figura 4B). (C) Detalle de una sección inmunotinteñida para la detección de macrófagos. Obsérvese la presencia de estas células en la luz de los bronquiolos (flechas) y alvéolos (puntas de flecha) junto con los PMN. (D) Detalle de una sección inmunotinteñida para la detección de linfocitos T. Nótese la presencia de estas células en las paredes alveolares, los septos y alrededor de los bronquiolos (puntas de flecha) junto con la presencia de PMN en la luz de los bronquiolos y alvéolos (flecha).

Por otro lado, hay que destacar que todas las ovejas del grupo V-NT (Figura 49), pero sólo una del grupo V-P4, desarrollaron una bronconeumonía intersticial con abundante infiltrado linfoide compuesto principalmente de linfocitos T (CD3+), localizadas en las paredes alveolares, septos y alrededor de los bronquios, bronquiolos y vasos. Estos animales también mostraron

## Resultados

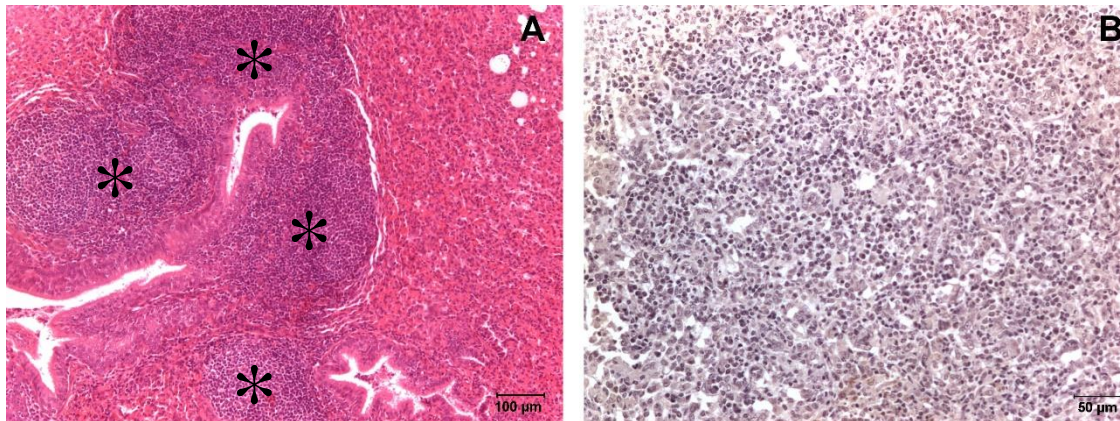
hiperplasia y persistencia de neumocitos tipo II, fibrosis de las paredes alveolares y macrófagos (CD163+) en el lumen de bronquiolos y alvéolos, donde se asociaron con una escasa presencia de antígeno clamidial. Además, se observó hiperplasia del tejido linfoide asociado a los bronquios (BALT).



**Figura 49:** Estudio histopatológico e inmunohistoquímico del pulmón de una oveja V-NT. (A) Sección teñida con H/E en la que se aprecia una bronconeumonía intersticial e hiperplasia de BALT (\*). (B) Sección inmunoteñida por el método ABC y contrastada con hematoxilina, mostrando pequeñas áreas con una inmunorreacción positiva al antígeno clamidial (áreas marrones). La detección del antígeno clamidial fue más débil en estos animales que en los grupos no vacunados (Figuras 47 B y 48 B). (C) Detalle de una sección inmunoteñida para la detección de macrófagos. Nótese la presencia de estas células en la luz de los alvéolos (puntas de flecha) sin presencia de PMN. (D) Detalle de una sección inmunoteñida para la detección de linfocitos T. Obsérvese la abundancia de estas células en las paredes alveolares (puntas de flecha), septos y alrededor de los bronquiolos y vasos (flechas).

Las tres ovejas restantes del grupo V-P4 desarrollaron hiperplasia de BALT con folículos prominentes asociados a atelectasia, correspondiente a las áreas deprimidas previamente

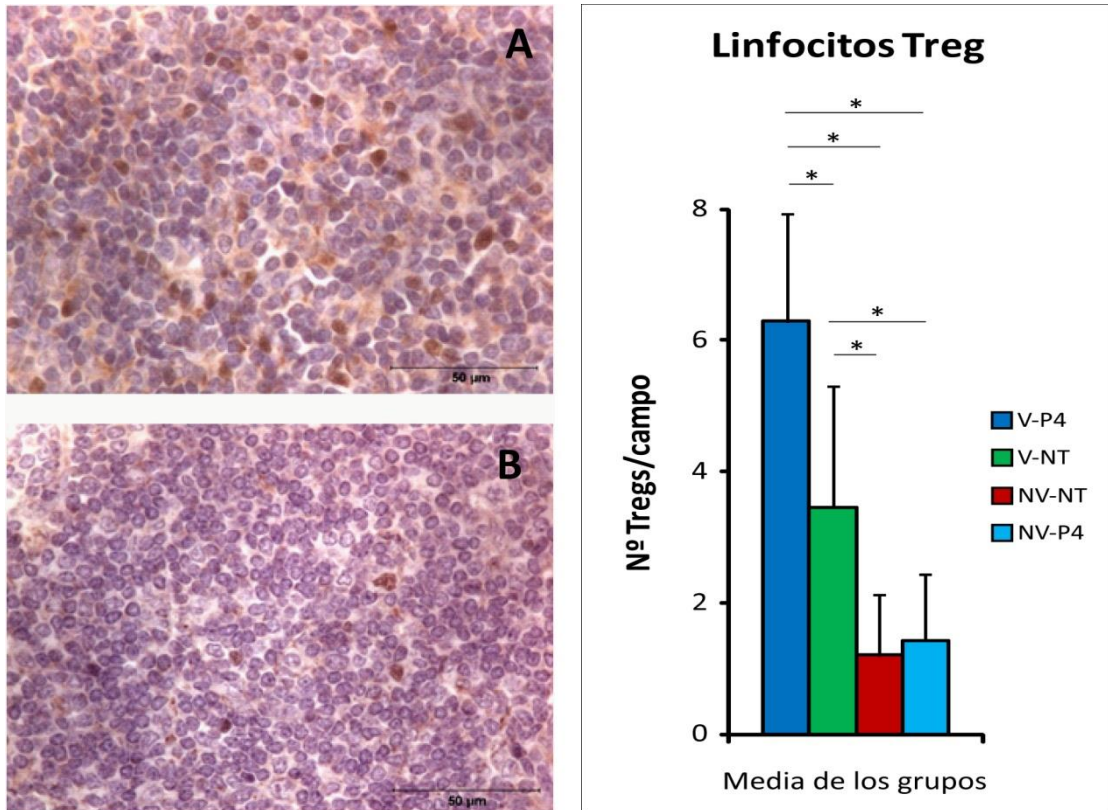
descritas en el análisis macroscópico. No se observó antígeno clamidial en estos animales (Figura 50).



**Figura 50:** Estudio histopatológico e inmunohistoquímico del pulmón de una oveja V-P4. (A) Sección teñida con H/E mostrando hiperplasia de BALT con folículos prominentes (\*). (B) Sección inmunoteñida por el método ABC y contrastada con hematoxilina para la detección del antígeno clamidial. No se detectó antígeno clamidial en este grupo.

Los nódulos linfáticos regionales de los animales no vacunados (NV) mostraron hiperplasia linfoide folicular con un centro folicular activo y un aumento de la corteza interna. Sin embargo, se observó una baja presencia de linfocitos Treg (Foxp3+). En contraste, en los animales vacunados, se encontró abundante presencia de linfocitos Treg (Foxp3+) en folículos, áreas interfoliculares y corteza interna en los nódulos linfáticos regionales, asociadas con una fuerte hiperplasia folicular y un aumento de la corteza interna. El aumento de los linfocitos Treg observado fue estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) en el grupo V-P4 en comparación con los grupos V-NT y NV-NT. Además, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los animales V-NT y NV-NT (Figura 51).

## Resultados



**Figura 51:** Detalle de una sección inmunoteñida para la detección del antígeno Foxp3+. Obsérvese la gran cantidad de linfocitos positivos detectados en el centro germinal de un folículo del nódulo linfático traqueobronquial de una oveja vacunada (A) en comparación con una oveja no vacunada (B) (la tinción del antígeno es intranuclear). (C) Número de linfocitos Treg por campo (objetivo de 63x). \*: p valor < 0,05.

## DISCUSIÓN

## 1. INTRODUCCIÓN

*Chlamydia abortus* es el agente causal del aborto enzoótico ovino (AEO). Esta bacteria, produce en animales no gestantes, una infección que cursa de forma asintomática y puede permanecer de forma subclínica o latente hasta que el animal queda gestante. Se produce entonces una reactivación de la infección y la colonización de la placenta, que desemboca en procesos patológicos durante el último tercio de gestación que darán lugar a la aparición de abortos en la explotación. Posteriormente al aborto, los animales quedarán como portadores que excretarán la bacteria en los siguientes estros. Este proceso de latencia/multiplicación activa que desencadena la reactivación del ciclo clamidial en ciertos momentos de la gestación y del ciclo estral parece estar relacionado con las hormonas sexuales. Estudios previos han demostrado en ciertas bacterias intracelulares, incluyendo otras especies de clamidias como *C. trachomatis*, que el 17 $\beta$ -estradiol (E2) y la progesterona (P4) son capaces de modular la respuesta inmunitaria frente a estas bacterias, así como influir en la interacción patógeno intracelular-célula hospedadora (Beagley y Gockel, 2003; Amirshahi *et al.*, 2011; Wan *et al.*, 2014). Sin embargo, pese a que se ha hipotetizado en numerosas ocasiones sobre la posible implicación de factores endocrinos en la patogenia de la infección por *C. abortus* (Leaver *et al.*, 1987; Buxton *et al.*, 1990; Kerr *et al.*, 2005), hasta la fecha no se han publicado trabajos al respecto sobre estos factores en esta especie.

Así pues, para aportar conocimiento en este campo, se analizó el efecto del estradiol y la progesterona sobre la respuesta inmunitaria y el curso de la infección por *C. abortus* (Experiencias 1 y 2), se describió el efecto de estas hormonas durante la infección sobre la protección de animales previamente vacunados (Experiencia 3), así como durante la vacunación, sobre la inducción de una respuesta inmunitaria protectora (Experiencia 4), utilizando para ello un modelo murino de infección clamidial con ratonas ovariectomizadas. Posteriormente, se estudió el efecto de la progesterona sobre la eficacia de la vacunación analizando el curso de la infección en un modelo ovino de desafío intratraqueal previamente validado (Alvarez *et al.*, 2015), con ovejas ovariectomizadas (Experiencia 5).

## 2. EXPERIENCIAS 1 Y 2. EFECTO DEL 17 $\beta$ -ESTRADIOL Y LA PROGESTERONA SOBRE EL CURSO DE LA INFECCIÓN Y DE LA RESPUESTA INMUNITARIA FRENTE *C. ABORTUS* EN RATONAS SWISS OF1 OVARIECTOMIZADAS

La carga clamidial detectada en el hígado de las ratonas tratadas con dexametasona (grupo Dex) fue significativamente mayor en el día 4 pi respecto a las tratadas con estradiol (grupo E2), progesterona (grupo P4) o las del grupo Control (Ctrl). Las propiedades antiinflamatorias e inmunosupresoras de los glucocorticoides, incluida la dexametasona, son ampliamente conocidas. Este hecho, unido a su naturaleza química análoga a las hormonas esteroideas, que implica su administración en soluciones con aceite de sésamo, justificó el empleo de la dexametasona para el establecimiento de un grupo “Control positivo de Inmunosupresión” de la respuesta inmunitaria contra *C. abortus* que validara la metodología empleada. Así, Corr *et al.* (2014), en un estudio con *C. muridarum*, determinaron que el tratamiento con dexametasona incrementa la carga bacteriana de los animales tratados con ella. En nuestro estudio, en el día 4 pi no sólo la carga clamidial fue más alta en los animales del grupo Dex, si no que éstos mismos animales también mostraron mayor presencia de antígeno clamidial que el resto de grupos. Así, los resultados obtenidos en nuestro estudio concuerdan con los observados por Corr *et al.* (2014), e indican que la dexametasona también favorece la infección por *C. abortus*, validando, por tanto, la metodología que emplea el aceite de sésamo en todos los experimentos de nuestro estudio realizados en modelos murinos.

Por otra parte, en el día 8 pi la carga clamidial se redujo significativamente respecto a la del día 4 pi. No obstante, continuó siendo significativamente más elevada en las ratonas del grupo Dex respecto a la observada en los grupos Ctrl y E2, pero no respecto al grupo P4.

La carga clamidial también se mantuvo alta, tanto en hígado como en bazo, en las ratonas del grupo Ctrl. A pesar de ello, se produjo una reducción estadísticamente significativa de la misma entre los días 4 y 8 pi. Así, en los animales de este grupo, durante el día 4 pi se detectaron concentraciones significativamente más altas de IL-6 respecto al grupo E2, de RANTES respecto al grupo P4, así como concentraciones elevadas de IFN- $\gamma$ . Asimismo, el infiltrado inflamatorio de estas ratonas estuvo formado mayoritariamente por gran cantidad de macrófagos. Por otra parte, se detectaron concentraciones muy similares al resto de grupos, de citoquinas como la IL-10, IL-12, MIP-2 y TNF- $\alpha$ , enzimas como la iNOS y poblaciones leucocitarias como los PMN, remarcando una baja presencia de linfocitos T (CD3<sup>+</sup>).

La IL-6 y el RANTES desempeñan numerosas funciones en la respuesta inmunitaria, participando en la activación de los macrófagos y en el reclutamiento y activación de linfocitos T, respectivamente. En el caso específico del IFN- $\gamma$ , éste ha sido descrito como una citoquina crucial para el control de las infecciones clamidiales, encontrándose, como en este caso, en mayor cantidad durante las primeras fases de la misma (Brown y Entrican, 1996; Buendia *et al.*, 1999b; Del Rio *et al.*, 2000). Así pues, las altas concentraciones de estas citoquinas halladas en los animales del grupo Ctrl en el día 4 pi, junto a la gran cantidad de macrófagos, indican el establecimiento de una respuesta inmunitaria activa frente a *C. abortus* al comienzo de la infección, todavía liderada por la respuesta innata, donde la fuente de ese IFN- $\gamma$  temprano podrían ser las células NK, tal y como describen Buendia *et al.* (2004). Pese a que las concentraciones de todas las citoquinas mencionadas decrecieron significativamente en el día 8 pi, sus propiedades quimiotácticas podrían explicar el aumento de la presencia de macrófagos y el aumento significativo de la presencia linfocitos T en el día 8 pi respecto a la observada en el día 4 pi.

Los macrófagos y la iNOS juegan un papel importante en la infección clamidial, pues son necesarios para la correcta eliminación de la bacteria que induce la secreción de IL-12 y TNF- $\alpha$ . La primera de estas citoquinas induce la producción de IFN- $\gamma$ , que a su vez activa a los macrófagos (Ojcius *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2002). Sin embargo, en nuestro estudio la gran cantidad de macrófagos detectada en el infiltrado inflamatorio de los animales del grupo Ctrl en el día 8 pi, no se correlaciona con concentraciones altas de iNOS, IL-12 o TNF- $\alpha$ , lo que sugiere la presencia de un bajo porcentaje de macrófagos activados que puedan hacer frente a la infección clamidial de manera eficiente.

Por otra parte, numerosos estudios avalan el importante papel que juegan los linfocitos T en la resolución de las infecciones clamidiales (Buzoni-Gatel *et al.*, 1992; Buendia *et al.*, 1999b; Del Rio *et al.*, 2000; Martinez *et al.*, 2006). En nuestro estudio, se produjo un aumento estadísticamente significativo de la presencia de linfocitos T en el día 8 pi, que podría estar relacionada con la reducción estadísticamente significativa de la carga clamidial observada en este día respecto a la del día 4 pi. Sin embargo, la presencia de *C. abortus* continuó siendo significativamente mayor que la detectada en las ratonas del grupo E2.

Los resultados obtenidos en las ratonas del grupo P4 parecen indicar que el curso de la infección clamidial fue similar al observado en los grupos Dex y Ctrl. Así, en el día 4 pi la carga de estos animales fue muy similar a la detectada en los animales del grupo Ctrl. Sin embargo, el perfil de la respuesta inmunitaria fue totalmente distinto. Por ejemplo, en los animales del grupo

## Discusión

P4, durante el día 4 pi, se detectaron mayores concentraciones de MIP-2, así como mayor predominio de PMN en los focos inflamatorios que en el resto de los grupos, aunque sin diferencias significativas con ellos. Por otra parte, se detectaron concentraciones intermedias a las del resto de grupos de IL-6 y linfocitos T; o muy similares pero inferiores a las del grupo Ctrl, de IL-12, TNF- $\alpha$ , iNOS y macrófagos, así como las concentraciones más bajas de IL-10 y RANTES.

El MIP-2, es una quimioquina quimiotáctica para PMN (Wolpe *et al.*, 1989; Iida y Grotendorst, 1990; Ohtsuka *et al.*, 2001; Pelus y Fukuda, 2006), una población leucocitaria cuya importancia en la primoinfección frente a *C. abortus* ha sido ampliamente demostrada (Buendia *et al.*, 1998, 1999a), siendo necesarios para el reclutamiento de linfocitos T, que como se ha dicho previamente, son clave para la eliminación de la infección por *C. abortus* (Del Rio *et al.*, 2000; Montes de Oca *et al.*, 2000a; Martínez *et al.*, 2006). Así, la mayor concentración de MIP-2 presente en las ratonas del grupo P4 en el día 4 pi se podría correlacionar con la mayor cantidad de PMN presente en el infiltrado inflamatorio de estos animales. Sin embargo, la gran presencia de PMN no se correlaciona en estas ratonas ni con una mayor presencia de linfocitos T, ni con una baja carga clamidial al comienzo de la infección, como la observada en las ratonas del grupo E2, ni tampoco con una reducción evidente de la misma entre el día 4 y el 8 pi, parecida a la observada en los animales de los grupo Ctrl y E2. De hecho, la presencia de *C. abortus* en los animales del grupo P4 continúa siendo elevada en el día 8 pi, siendo mayor que en el grupo Ctrl y significativamente mayor que en el grupo E2. Esto podría indicar que la respuesta inmunitaria desarrollada por las ratonas del grupo P4 es menos eficiente que la desarrollada en los animales de los grupos Ctrl y E2.

En los animales del grupo P4, al igual que en las ratonas del grupo Ctrl, se produjo un descenso en los niveles de todas las citoquinas en el día 8 pi. No obstante, volvieron a mostrar la mayor presencia de PMN, que fue significativamente más elevada que la observada en las ratonas del grupo E2. Además, las ratonas del grupo P4 mostraron mayores niveles de IL-10 y MIP-2 y se detectaron concentraciones más altas de TNF- $\alpha$  e iNOS, siendo las de esta última enzima significativamente más elevadas que las observadas en los animales del grupo Ctrl. Por otro lado, las concentraciones de IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-12 y RANTES, así como la presencia de linfocitos T, mostraron valores intermedios comparados con los detectados en los grupos Ctrl y E2. Respecto a los macrófagos, se produjo un aumento estadísticamente significativo respecto a los valores observados en el día 4 pi. Sin embargo, volvió a ser el grupo en el que se encontraron en menor cantidad, siendo significativamente menor que en el grupo E2.

La iNOS es una enzima que media en la producción de óxido nítrico (NO), una molécula altamente microbicida secretado por los macrófagos activados (Beatty *et al.*, 1994; Woods *et al.*, 1994; Igietseme, 1996), que como se ha dicho anteriormente, juegan un papel importante en la infección clamidial, pues son necesarios para la correcta eliminación de la bacteria (Ojcius *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2002). Así, el hecho de que los animales del grupo P4 mostrasen la mayor presencia de esta enzima junto con la menor presencia de macrófagos nos indica la existencia de una gran proporción de macrófagos activados en estos animales en el día 8 pi. Los macrófagos activados son grandes productores de TFN- $\alpha$ , lo cual explica la mayor concentración de esta citoquina detectada en este día pi. El TFN- $\alpha$  es producido por los macrófagos y tiene la capacidad de atraer PMN al foco inflamatorio (Perry *et al.*, 1997), lo que podría contribuir a la mayor presencia de PMN detectada en los animales P4.

Sin embargo, la elevada carga clamidial en el día 8 pi sugiere que la activación de los macrófagos y la producción de iNOS no es clave para la resolución clamidial en este momento de la infección clamidial, o que llega tarde para ser efectiva. Asimismo, la mayor presencia de PMN en el 8 pi sugiere una prolongación de la respuesta inmunitaria innata en los animales del grupo P4 o bien, el retraso del establecimiento de una respuesta inmunitaria adquirida, clave en la completa resolución de la infección clamidial.

Existe el consenso general en la comunidad científica de que la progesterona tiene efectos antiinflamatorios, inhibiendo el desarrollo de respuestas inmunitarias de tipo celular (Piccinni *et al.*, 2000a, 2000b; Miyaura y Iwata, 2002; Ragusa *et al.*, 2004). La respuesta inmunitaria celular generada en la lucha efectiva contra la infección por *C. abortus* se caracteriza por una gran presencia de linfocitos Th1 y altos niveles de citoquinas proinflamatorias como el IFN- $\gamma$ , citoquina esencial en la resolución de la infección por esta bacteria (Buzoni-Gatel *et al.*, 1992; Brown y Entrican, 1996; Buendia *et al.*, 1999b). Por otro lado, se tiene constancia de que la P4 es capaz de regular a la baja los genes asociados a la producción de IFN- $\gamma$  (Verthelyi *et al.*, 2001; Dosiou *et al.*, 2004) y aumentar moderadamente los niveles de IL-10 (Trautman *et al.*, 1997). Estos estudios sugieren que, en nuestras experiencias, la alta carga clamidial observada en las ratonas del grupo P4, puede estar asociada a la falta de una cantidad adecuada de linfocitos Th1 e IFN- $\gamma$ . Sin embargo, los animales del grupo P4 mostraron una presencia intermedia de linfocitos T respecto a los animales de los grupos Ctrl y E2, tanto en el día 4 como en el día 8 pi, niveles intermedios de IFN- $\gamma$  en el día 4, así como niveles muy próximos al límite de detección de la técnica en el día 8 pi. También se detectó la concentración más baja de IL-10 en el día 4 pi, si bien, ésta pudo ser detectada durante el día 8 pi, al contrario que en el resto de los grupos. Es posible que la menor proporción de elementos de la respuesta inmunitaria

## Discusión

adquirida en los animales del grupo P4, se haya compensado con un mayor protagonismo de la respuesta inmunitaria innata que en los grupos Ctrl y E2, como un mecanismo de equilibrio inmunológico en la lucha frente a la infección por *C. abortus*. Siguiendo esta línea de discusión, Wan *et al.* (2014), en un estudio *in vitro* con *C. trachomatis*, observaron que la progesterona estimula múltiples vías inmunitarias innatas en las células epiteliales sensibles a las hormonas. Así, es posible que una respuesta innata temprana generada tras la infección clamidial se haya prolongado o esté impidiendo el desarrollo de la inmunidad adquirida, más eficaz en la lucha contra el microorganismo. La mayor cantidad de PMN detectada en los animales del grupo P4 tanto en el día 4 como en el 8 pi, y sobre todo la mayor presencia de los mismos en este último día pi, parece apoyar estas hipótesis. Sin embargo, varios estudios han demostrado que la progesterona inhibe la secreción de MIP-2 (Kavandi *et al.*, 2012; Goddard *et al.*, 2013), lo que impide explicar, por esta vía, la mayor concentración de esta citoquina observada en los animales P4, así como la mayor presencia de PMN atraídos por ella.

Por otra parte, numerosos estudios demuestran que la progesterona inhibe la activación de los macrófagos y la producción de iNOS (Miller y Hunt, 1996; Jones *et al.*, 2008; Menzies *et al.*, 2011). Esto explicaría el menor nivel de iNOS en los animales del grupo P4 durante el día 4 pi, pero no el aumento de esta enzima detectado en el día 8 pi, ni que sus niveles fuesen más altos que en el resto de grupos y significativamente más altos que los del grupo Ctrl en este día.

Así pues, los datos obtenidos de los animales del grupo P4 no muestran la inmunosupresión esperada de antemano por el tratamiento con progesterona, pero tampoco ayudan a explicar el porqué de la mayor carga clamidial detectada en estas ratonas.

Comparado con los animales de los grupos Ctrl y P4, las ratonas del grupo E2 desarrollaron una respuesta inmunitaria más rápida y efectiva contra *C. abortus*, puesto que fue el grupo en el que menor carga clamidial se detectó tanto en el día 4 como en el día 8 pi. Así, el infiltrado inflamatorio en el día 4 pi estuvo formado principalmente por linfocitos T, siendo su presencia significativamente mayor que la observada en el grupo Ctrl. La mayor presencia de estos leucocitos, claves en la lucha frente a *C. abortus*, en los animales del grupo E2 podría ser debida a la mayor concentración de RANTES detectada en estos mismos animales. Sin embargo, las concentraciones de esta citoquina sólo fueron ligeramente superiores a las detectadas en el grupo Ctrl y no hubo diferencias significativas entre ninguno de los grupos. Por otro lado, los animales del grupo E2 mostraron niveles más altos de iNOS en el día 4 pi, siendo la presencia de macrófagos similar a la del resto de grupos en ese día pi. Esto parece indicar una activación

temprana de los macrófagos que, junto a la mayor cantidad de linfocitos y a la mayor concentración TFN- $\alpha$ , permite a los animales del grupo E2 enfrentarse a la infección clamidial antes, o de manera más eficiente, que los del grupo P4.

Cabría esperar que en el éxito de la respuesta inmunitaria instaurada en el día 4 pi estuvieran involucrados otros elementos que tradicionalmente se asocian a la respuesta frente *C. abortus*, como altos niveles de IFN- $\gamma$ , IL-6 o IL-12 (Brown y Entrican, 1996; Lu y Zhong, 1999; Geng *et al.*, 2000; Entrican *et al.*, 2004). Sin embargo, las ratonas del grupo E2 presentaron los niveles más bajos de todas estas citoquinas en este día pi.

Se ha demostrado que el IFN- $\gamma$  se produce durante las primeras fases de la infección clamidial (Brown y Entrican, 1996; Del Rio *et al.*, 2000; Caro *et al.*, 2003). De hecho, Caro *et al.* (2003) demostraron que la carga de *C. abortus* influye de manera directamente proporcional en los niveles de IFN- $\gamma$ . Esto podría indicar que la menor presencia de IFN- $\gamma$  detectada en las ratonas del grupo E2 se debió a la menor carga clamidial detectada en este grupo. Asimismo Buendía *et al.* (1999b) demostraron que la IL-12 también se produce en fases tempranas de la infección por *C. abortus*. Es posible que los animales del grupo E2 mostraran un aumento temprano tanto de IFN- $\gamma$  como de IL-12 justo después de la infección, detectándose en el día 4 una concentración menor a la de este hipotético pico. Esto ayudaría a explicar no sólo los inesperados bajos niveles de estas citoquinas, sino también el alto porcentaje de macrófagos activados, la mayor concentración de iNOS y la mayor presencia de linfocitos T detectada en el infiltrado inflamatorio desarrollado en el día 4 pi, que tomarían el relevo en la lucha contra la infección tras la bajada de los niveles de IFN- $\gamma$ , como observaron Montes de Oca *et al.* (2000a).

Por otro lado, Del Rio *et al.* (2001) sugirieron que la IL-12 no es esencial para el establecimiento de una respuesta del hospedador para controlar la infección por *C. abortus*, pudiendo estar involucrada en la patología asociada a la infección. Esto concuerda con la mayor morbilidad observada en las ratonas del grupo E2 durante los primeros días pi, que estaría asociada a la intensa respuesta inmunitaria generada por la reciente infección clamidial. Sin embargo, de haberse producido un pico de IL-6 antes del día 4 pi, la producción temprana de esta citoquina habría podido prevenir los efectos nocivos de una respuesta inmunitaria dependiente de IFN- $\gamma$  (Croker *et al.*, 2003), que explicaría la rápida recuperación en la morbilidad de los animales del grupo E2 observada en los siguientes días.

Entre el día 4 y el 8 pi los animales del grupo E2 mostraron un descenso significativo de los niveles de TFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-6. Pese a ello, los animales de este grupo continuaron presentando en el día 8 pi los mayores niveles de IFN- $\gamma$  e IL-6, así como un ligero aumento de la

## Discusión

concentración de RANTES. El aumento de esta última citoquina no se correlacionó con un aumento en el número de linfocitos T en los focos inflamatorios en este día pi. De hecho, la presencia de estos leucocitos decreció hasta situarse por debajo, pero muy cercana, a la observada en el grupo P4 y significativamente por debajo de la del grupo Ctrl. Las mayores concentraciones de RANTES, IFN- $\gamma$  e IL-6 detectadas en el día 8 pi, podrían considerarse residuales y producidas por la mayor cantidad de linfocitos y macrófagos activados observada en el día 4 pi. Por otro lado, en los animales del grupo E2 la presencia de macrófagos se incrementó significativamente en el día 8 pi, pero la concentración de iNOS disminuyó en este día. Este dato nos indica la presencia de una menor proporción de macrófagos activados que, sin embargo, dado su número, podrían contribuir a la mayor presencia de las citoquinas anteriormente mencionadas, así como a la erradicación del microorganismo. La significativa reducción de la carga clamidial en los animales del grupo E2, entre el día 4 y el 8 pi, y la carga significativamente más baja en este último día, parecen reforzar este razonamiento.

El efecto inmunoregulador del E2 ha sido ampliamente estudiado y parece tener un efecto dual sobre la polarización de la respuesta inmunitaria dependiendo de su concentración (Gilmore *et al.*, 1997; Correale *et al.*, 1998). En varias líneas de investigación se ha observado que en los procesos inflamatorios dependientes de linfocitos T, los estrógenos reducen y regulan el número de estos linfocitos en el foco inflamatorio, además de disminuir la expresión de varias citoquinas proinflamatorias y marcadores de activación de leucocitos (Salem *et al.*, 2000a). Además, bajo las mismas condiciones, los niveles de expresión de citoquinas como el IFN- $\gamma$  decrecen y los de IL-4 e IL-10 aumentan (Salem *et al.*, 2000b).

Sin embargo en otros estudios con ratonas ovariectomizadas (Maret *et al.*, 2003) y con esplenocitos de ratones machos estimulados con concanavalina A o anticuerpos frente CD3 (Karpuzoglu *et al.*, 2006), la administración de estradiol provocó una fuerte respuesta de tipo celular, con gran cantidad de producción de IFN- $\gamma$ , presencia de linfocitos T y activación de enzimas antimicrobianas como la iNOS, tal y como se desarrolla en las ratonas del grupo E2 de nuestro estudio. Se sabe de la existencia de un elemento de respuesta a estrógenos en la región promotora del gen del IFN- $\gamma$ , hecho que se correlaciona con el aumento de transcritos de este gen en linfocitos estimulados con estrógenos (Fox *et al.*, 1991), lo que apoya la hipótesis del pico temprano de IFN- $\gamma$  comentada anteriormente.

El efecto dual del estradiol en la polarización de la respuesta inmunitaria se puede apreciar en la presencia de macrófagos e iNOS. Existen estudios en los que el estradiol inhibe la producción de iNOS (Nweze *et al.*, 2012), otros en los que esta hormona no tiene efecto sobre

ella (Ohtani *et al.*, 2007) y otros en los que la aumenta (You *et al.*, 2003; Karpuzoglu *et al.*, 2006). Nuestros resultados en el modelo murino utilizado se encuentran más en sintonía con los últimos estudios mencionados, sugiriendo que el estradiol puede ser responsable o contribuir en la mayor concentración de iNOS detectada en el día 4 pi en las ratonas del grupo E2. Igualmente, se ha demostrado que el estradiol es capaz de aumentar la proliferación de los macrófagos (Cutolo *et al.*, 2003). Así, el estradiol también podría influir en la mayor presencia de estas células en el día 8 pi en las ratonas del grupo E2.

Cabe resaltar el hecho de que el tratamiento conjunto con progesterona y estradiol (grupo Mix), produjera una carga similar a la observada en las ratonas del grupo P4. Esto parece indicar una prevalencia de los efectos inmunosupresores de la progesterona sobre los inmunoprotectores del estradiol en nuestro modelo, tal y como ha sido previamente demostrado en modelos *in vitro* con *C. trachomatis* (Kintner *et al.*, 2015). Por otra parte, en nuestro modelo, el tratamiento conjunto con las dos hormonas parece entorpecer o ralentizar la lucha contra la infección por *C. abortus* más que el tratamiento sólo con estradiol o progesterona, en días avanzados de la infección. Así, mientras que las ratonas del resto de grupos reducían su carga clamidial entre el día 8 y 11 pi, las del grupo Mix, permanecieron en el día 11 pi con prácticamente la misma carga que en el día 8 pi.

### 3. EXPERIENCIA 3. EFECTO DEL 17 $\beta$ -ESTRADIOL Y LA PROGESTERONA SOBRE EL CURSO DE LA INFECCIÓN Y DE LA RESPUESTA INMUNITARIA FRENTE A *C. ABORTUS* INDUCIDA POR UNA VACUNA EXPERIMENTAL INACTIVADA EN RATONAS SWISS OVARECTOMIZADAS EN MURCIA POR NUESTRO EQUIPO

En general, el efecto de la vacunación produjo que en los animales de los grupos vacunados (V) se detectase una carga clamidial significativamente menor que en los no vacunados (NV). En las ratonas de los grupos V se desarrolló una intensa respuesta humoral con títulos de anticuerpos contra *C. abortus* significativamente más altos que los detectados en las ratonas NV, que se mantuvieron en un nivel basal. Estos datos ponen de manifiesto la contrastada eficacia de la vacuna experimental empleada (Caro *et al.*, 2003; Buendia *et al.*, 2007) y confirman el éxito de la vacunación en nuestro estudio. Sin embargo, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el título de anticuerpos entre animales tratados con diferentes hormonas ni con los controles, tanto dentro de los grupos V, como de los NV.

## Discusión

Los efectos del estradiol y la progesterona en la producción de anticuerpos aún no están claros y existe controversia al respecto. Algunos estudios describen que el tratamiento con estradiol incrementa la producción de anticuerpos vacunales (Klein *et al.*, 2008; Pennock *et al.*, 2009). Mientras tanto, otros describen justo lo contrario (Rank y Barron, 1987). Algo similar ocurre respecto a la progesterona. Algunos autores describen que la administración de esta hormona a animales reduce (Lü *et al.*, 2002) o aumenta (Vermeulen *et al.*, 2001) la producción de anticuerpos, mientras que otros autores encontraron que la progesterona no tenía efecto (Nikolaevich *et al.*, 1991) sobre la respuesta inmunitaria humoral. Nuestros resultados muestran que en nuestro modelo, ni el estradiol ni la progesterona ejercen ningún efecto crítico en la producción de anticuerpos específicos frente a *C. abortus*. Hay que tener en cuenta que las bacterias del género clamidia son patógenos intracelulares obligados. Así, se ha sugerido que los anticuerpos no parecen ser el principal componente protector de la respuesta inmunitaria adaptativa del hospedador contra la AEO (Entrican *et al.*, 2012). Sin embargo, la respuesta humoral contra *C. abortus* es importante para el establecimiento de una respuesta inmunitaria protectora adecuada y completa después de la vacunación en modelos experimentales (de Sa *et al.*, 1995; Buendia *et al.*, 2009), tal y como vemos en nuestro estudio.

Al contrario de lo ocurrió en las experiencias anteriores (Experiencias 1 y 2), no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre la carga clamidial en las ratonas de los grupos NV. Esto puede ser debido al ya comentado efecto ambiguo de las hormonas empleadas sobre el sistema inmunitario.

Tampoco se halló ninguna evidencia estadísticamente significativa de que el tratamiento con estradiol o progesterona afectara al establecimiento de la respuesta inmunitaria de memoria provocada por la vacuna, con la única excepción de los animales tratados con estradiol (grupo V-E2). Así, las ratonas de este grupo fueron las que mostraron menor carga clamidial, siendo significativamente menor que la observada en los animales del grupo Control (V-Ctrl), que mostraron mayor carga que el resto de grupos. De manera análoga a lo ocurrido en las experiencias anteriores, este hecho podría ser debido a la mayor presencia de linfocitos T encontrada en las ratonas del grupo V-E2, que fue significativamente mayor respecto a la observada en los del V-P4. No obstante, la presencia de estos leucocitos detectada en los animales del grupo V-E2 fue muy similar a la observada en el grupo V-Ctrl, lo que resta importancia a la influencia del estradiol sobre los linfocitos T, asociada a una menor carga clamidial observada en los animales de este grupo. Otra explicación plausible es que la proporción de linfocitos T de memoria es mayor en las ratonas del grupo V-E2. Estos linfocitos

tienen un papel fundamental en el establecimiento de una respuesta inmunitaria de memoria protectora contra la infección por *C. abortus* (Del Rio *et al.*, 2000; Buendia *et al.*, 2007).

Pese a no encontrar diferencias estadísticamente significativas, los animales del grupo V-Ctrl fueron los que mostraron mayor presencia de macrófagos, pero también niveles más bajos de iNOS. Esto podría estar asociado a una menor proporción de macrófagos activados, que se traduciría en una respuesta innata menos intensa a la observada en los animales del grupo V-E2, lo que explicaría la carga clamidial significativamente más alta encontrada en los animales del grupo V-Ctrl.

Por otro lado, las ratonas vacunadas y tratadas con progesterona (V-P4) mostraron significativamente menor presencia de linfocitos T respecto a las de los grupos V-Ctrl y V-E2. Este hecho también sugiere un posible efecto inmunosupresor de la progesterona en nuestro estudio. Dada la tendencia observada en las diferentes experiencias analizadas hasta ahora, esta baja presencia de linfocitos debería provocar una mayor carga clamidial en los animales de este grupo. Sin embargo, su carga clamidial no fue tan alta como la observada en los animales del grupo V-Ctrl. La mayor proporción de macrófagos activados y mayores niveles de iNOS e IFN- $\gamma$  hallados en las ratonas del grupo V-P4, podrían explicar este hecho.

A pesar de los resultados observados en cada grupo y las hipótesis planteadas en relación a los mismos, la ausencia de diferencias estadísticamente significativas, obliga a asumir, bajo nuestras condiciones experimentales, que el estradiol y la progesterona, administrados en el momento de la infección, no afectan a la protección conferida por una vacuna inactivada contra *C. abortus*. Sin embargo, los resultados sí nos indican las evidentes diferencias entre ratones vacunados y no vacunados, que confirman la efectividad de la vacuna experimental previamente empleada.

#### 4. EXPERIENCIA 4: EFECTO DEL 17 $\beta$ -ESTRADIOL Y LA PROGESTERONA EN LA INDUCCIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DE DOS VACUNAS (EXPERIMENTAL Y COMERCIAL) CONTRA LA INFECCIÓN POR *C. ABORTUS* EN RATONAS SWISS OVARIECTOMIZADAS POR NUESTRO EQUIPO

A diferencia de la Experiencia 3, en este ensayo se analizó el efecto de las hormonas mencionadas durante la vacunación sobre la inducción de una respuesta inmunitaria protectora. Para ello, el tratamiento hormonal se realizó durante la inmunización de los animales.

La efectividad de la vacuna inactivada experimental empleada volvió a ser contrastada en esta experiencia. Así, las ratonas de todos los grupos vacunados con ella (grupos VE), mostraron significativamente menor carga clamidial que las de los grupos no vacunados (grupos NV), así como con la mayoría de las ratonas de los grupos vacunados con la vacuna comercial (grupos VC). En general, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre la carga clamidial de las ratonas de los grupos NV y las de los grupos VC, a excepción de las del grupo no vacunado y tratado con progesterona (NV-P4), cuya carga clamidial fue significativamente más alta que la detectada en los animales de todos los grupos VC. Además, las ratonas NV desarrollaron una hepatitis granulomatosa multifocal, más grave y con mayor presencia de antígeno clamidial que las del resto de grupos, siendo seguidas por las ratonas VC y siendo casi inexistente en las VE.

Estudios previos ya habían puesto de manifiesto que el éxito de una protección vacunal eficaz frente a *C. abortus* dependía en gran medida del empleo de un adyuvante adecuado que fuese capaz de generar una potente respuesta inmunitaria celular de tipo Th1 frente a la infección clamidial, sin provocar al mismo tiempo respuestas exacerbadas o con excesivo predominio de componentes de respuestas tipo Th2 (Caro *et al.*, 2003, 2005). En nuestro estudio, el adyuvante utilizado fue la saponina sintética QS-21, que ha demostrado proporcionar mayor protección y menor número de reacciones adversas que otros adyuvantes tales como el hidróxido de aluminio o el Montanide, comúnmente empleados en la formulación de vacunas comerciales frente a *C. abortus*, como la utilizada en este estudio (Caro *et al.*, 2003, 2005; Buendia *et al.*, 2007; Ortega *et al.*, 2007).

Al igual que en la Experiencia 3, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos hormonales en los animales NV, ni tampoco en los VC. Sin embargo, y a diferencia de la experiencia anterior, sí se detectaron entre las ratonas VE, siendo

las tratadas con estradiol (VE-E2) las que presentaron significativamente menor carga clamidial que las del grupo tratado con progesterona (VE-P4) y las del grupo no tratado (VE-Ctrl). Como ya hemos visto, el estradiol es capaz de incrementar la respuesta inmunitaria de diferentes formas (Maret *et al.*, 2003; Karpuzoglu *et al.*, 2006). En estudios con otros patógenos, la administración de estradiol en el momento de la vacunación mejoraba la tasa de supervivencia y reducía la excreción vírica de ratonas ovariectomizadas, tras su infección con un tipo de herpes genital al ser comparadas con ratonas vacunadas bajo la influencia de progesterona o de un placebo (Bhavanam *et al.*, 2008). Estos estudios concuerdan con los resultados obtenidos en nuestro ensayo y ayudan a explicar las diferencias encontradas con la Experiencia 3, en la que la administración de las dos citadas hormonas después de la vacunación, no producía ninguna diferencia estadísticamente significativa. Así, nuestros ensayos sugieren que ni el estradiol ni la progesterona, juegan un papel relevante en la protección de animales previamente vacunados, pero que el estradiol sí afecta a la inducción de una respuesta inmunitaria protectora vacunal, potenciándola.

Por otro lado, se pudo observar un tímido efecto de las hormonas al comparar animales de diferentes grupos (NV, VC y VE) de manera independiente según su tratamiento. Así, como ya se ha comentado, las ratonas NV-P4 presentaron significativamente mayor carga clamidial que todas las ratonas de los grupos VC. Asimismo los animales del grupo VC-P4, también mostraron significativamente mayor carga clamidial que todos los animales de los grupos VE. La mayor carga clamidial detectada en todos los grupos tratados con progesterona, así como el ser ésta significativamente más alta respecto a la de los animales con diferente tipo de vacuna, parece estar en línea con los resultados observados en las anteriores experiencias, lo que sugiere que esta hormona también afecta a la inducción de una respuesta inmunitaria protectora vacunal, en este caso, debilitándola.

## 5. EXPERIENCIA 5: EFECTO DE LA PROGESTERONA SOBRE LA INFECCIÓN POR *C.*

### *ABORTUS* Y SOBRE LA EFICACIA DE LA VACUNA EXPERIMENTAL EN UN MODELO OVINO EL ABORTO ENZÓOTICO OVINO

En esta experiencia se evaluó el efecto de la progesterona sobre la cinética de la infección y la respuesta inmunitaria contra *C. abortus*, así como sobre la protección conferida por la vacuna experimental inactivada empleada en las experiencias anteriores, previamente validada en el hospedador natural (García de la Fuente *et al.*, 2004; Álvarez *et al.*, 2015). No se analizó el efecto del 17 $\beta$ -estradiol, dados los impedimentos legales del uso de esta hormona en animales de abasto (Real Decreto 2178/2004, de 12 de noviembre) y a la vez, por tratar de acercar la experiencia a situaciones reales en el entorno ganadero como puede ser la sincronización de celo mediante la aplicación de esponjas vaginales con progestágenos.

Los resultados en cuanto a las lesiones y la eficacia de la vacunación son similares a los obtenidos por Álvarez *et al.* (2015), quienes validaron la vía de inoculación intratraqueal para validar la eficacia de vacunas contra el AEO en ovejas. Además, la vacuna experimental adyuvada con QS-21 confería protección contra el patógeno, proporcionando una respuesta inmunitaria adecuada.

En nuestro estudio, las ovejas vacunadas mostraron un título de anticuerpos frente *C. abortus* significativamente más alto, que el de las ovejas no vacunadas. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre las ovejas de los grupos V-P4 y V-NT. Como se ha evidenciado anteriormente, los efectos de la progesterona en la producción de anticuerpos aún no están claros. Algunos autores describen que la administración de esta hormona reduce (Lü *et al.*, 2002) o aumenta (Vermeulen *et al.*, 2001) la producción de anticuerpos, mientras que otros autores encontraron que la progesterona no ejercía ningún efecto sobre la respuesta inmunitaria humoral (Nikolaevich *et al.*, 1991). Así, de manera análoga a lo observado en las experiencias con ratones, nuestros resultados están en consonancia con el último estudio mencionado, sugiriendo que en este modelo, la progesterona no tiene ningún efecto significativo sobre la producción de anticuerpos específicos para *C. abortus*.

Otros componentes importantes de la respuesta inmunitaria de memoria generada por las vacunas son los linfocitos T. Así, las ovejas de los grupos vacunados (V-P4 y V-NT) mostraron mayor presencia de linfocitos T (CD3<sup>+</sup>) en pulmón que el resto de grupos. Como se ha dicho anteriormente, los linfocitos T tienen un papel fundamental en el establecimiento de una

respuesta inmunitaria de memoria protectora contra la infección por *C. abortus* (Del Rio *et al.*, 2000; Martinez *et al.*, 2006). Esta inmunidad celular parece estar mediada por IFN- $\gamma$  en todas las especies de clamidias. Así, las subpoblaciones correspondientes de linfocitos T ejercen sus efectos protectores a través de la secreción de esta citoquina (Del Rio *et al.*, 2001; Rottenberg *et al.*, 2002). Sin embargo, no se observaron diferencias en los niveles de IFN- $\gamma$  entre distintos grupos en ningún momento de nuestro estudio. Es posible que las ovejas vacunadas de este ensayo mostraran un aumento temprano de IFN- $\gamma$  después de la infección, que ya había disminuido en el día del sacrificio, tal y como se ha visto en otros modelos murinos con este tipo de vacunas (Caro *et al.*, 2003).

Algunos autores apuntan que bajas concentraciones de IFN- $\gamma$  pueden provocar infecciones clamidiales persistentes (Hogan *et al.*, 2004), mientras que otros sugieren que estas infecciones crónicas podrían ser generadas por un aumento de la IL-10 (Del Rio *et al.*, 2018). Se ha demostrado que la IL-10, gracias a su papel inmunoregulador como citoquina antiinflamatoria, es capaz de moderar los efectos inmunopatológicos asociados a una sobreproducción de IFN- $\gamma$  (Jakobshagen *et al.*, 2015; Kulcsar y Griffin, 2016). Sin embargo, las únicas diferencias encontradas en los niveles de IL-10 en nuestro estudio fueron las observadas entre los animales los grupos NV-NT y NV-P4 el día del desafío, siendo los segundos los que mostraron niveles más elevados de esta citoquina. Las ovejas no vacunadas mostraron una respuesta inmunitaria innata más evidente que las del resto de grupos, siendo la gravedad de las lesiones menor en el caso de las ovejas del grupo NV-P4. Estos resultados podrían estar asociados con el hecho de que la progesterona puede prevenir el daño tisular grave al promover la producción de IL-10 en estos animales como se describe en Trautman *et al.* (1997), quienes encontraron que la progesterona indujo un aumento moderado de IL-10 implicado en la respuesta antiinflamatoria.

Por otro lado, se encontró ADN y antígeno clamidial en los pulmones de todos los animales no vacunados, en las ovejas del grupo V-NT y en un sólo animal del grupo V-P4. Asimismo, se obtuvieron resultados dispares en las tonsilas y los nódulos linfáticos retrofaríngeos, probablemente debido a que algunas ovejas tosieron después del desafío, propagando bacterias sobre el tejido mucoso cercano a los nódulos linfáticos regionales. El ADN de *C. abortus* y el antígeno clamidial detectados en el pulmón de un sólo animal del grupo V-P4 podrían estar relacionados con el hecho de que *C. abortus* permanece en los tejidos linfoides durante la fase de latencia de la infección (Longbottom *et al.*, 2013; Alvarez *et al.*, 2015).

## Discusión

Un resultado interesante, fue la significativamente mayor presencia de linfocitos Treg (Foxp3+) en los nódulos linfáticos regionales de los animales del grupo V-P4 en comparación con los animales de los grupos V-NT y NV-NT. Varios estudios han mostrado que los linfocitos Treg son capaces de atenuar los procesos inflamatorios, así como de tener efectos supresores de la inmunidad innata. Esto puede controlar el desarrollo de una respuesta inmunitaria exacerbada, que provocaría graves daños tisulares (Antunes y Kassiotis, 2010; Hou *et al.*, 2015). Así, Weinberg *et al.* (2011) evidenciaron que el aumento de los niveles de progesterona durante el ciclo menstrual en las mujeres se asocia con una mayor presencia de linfocitos Treg, así como con un debilitamiento de la respuesta inmunitaria celular. Nuestros resultados muestran que los animales del grupo V-P4 desarrollaron una morbilidad y lesiones de menor gravedad que el resto de grupos, además de mostrar una escasa presencia de PMN y macrófagos. Igualmente, sólo se detectó ADN y antígeno clamidial en un animal de los cuatro que formaron este grupo. Esto sugiere que, en nuestro modelo, la progesterona aumenta la presencia de linfocitos Treg, que previenen de una posible respuesta inmunitaria innata excesiva en el pulmón que podría conducir a la formación de lesiones. Al mismo tiempo, el tratamiento con esta hormona no parece bloquear el desarrollo de una respuesta inmunitaria de memoria efectiva inducida por la vacunación. Los resultados mostrados por los animales del grupo V-NT parecen apoyar esta hipótesis. La presencia de linfocitos de Treg en los ganglios linfáticos regionales encontrados en las ovejas de este grupo, fue significativamente menor que la observada en los animales del grupo V-P4. Sin embargo, a pesar de la gran protección conferida por la vacuna, los animales del grupo V-NT presentaban lesiones con mayor presencia de macrófagos que las ovejas del grupo V-P4. También se detectó la presencia de ADN y antígeno clamidial en los pulmones de las ovejas del grupo V-NT, lo que sugiere que una menor presencia de linfocitos Treg podría estar relacionada con una eliminación clamidial menos eficaz.

Otro resultado interesante en esta experiencia fue la baja presencia de PMN encontrados en las lesiones de los animales vacunados (V-P4 y V-NT). Varios estudios demostraron que los PMN son capaces de prevenir la multiplicación incontrolada de *C. abortus* en las primeras etapas de la infección primaria (Buendia *et al.*, 1999a), así como que son necesarios para el reclutamiento de linfocitos T en los focos inflamatorios, un evento clave para la eliminación de la infección por *C. abortus* (Del Rio *et al.*, 2000; Montes de Oca *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2006). Otros autores apoyan la idea de que las vacunas inactivadas, como la utilizada en nuestro estudio, son capaces de controlar la infección mediante la producción de anticuerpos (Buendia *et al.*, 2009), por lo que la presencia de PMN no sería tan importante para una respuesta inmunitaria eficaz de la vacuna contra *C. abortus* (Ortega *et al.*, 2007). Es posible

que la falta de PMN en los animales vacunados se deba al desarrollo temprano de una respuesta inmunitaria específica de memoria generada por la vacuna utilizada. Así, los altos niveles de anticuerpos frente a clamidia y la elevada presencia de linfocitos Treg permiten la eliminación de la clamidia con una mínima implicación de los componentes de la respuesta inmunitaria innata.

Así pues en esta experiencia, se encontró que el tratamiento con progesterona en ovejas junto con la vacunación previene o reduce la gravedad de las lesiones por *C. abortus*. Los resultados obtenidos apoyan la eficacia de la vacuna experimental utilizada y sugieren que la progesterona no altera de forma negativa la respuesta inmunitaria que ésta provoca. Por el contrario, los resultados sugieren que la progesterona puede aumentar su efecto protector. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para profundizar el conocimiento de los mecanismos involucrados en el efecto de la progesterona sobre la respuesta inmunitaria a *C. abortus*.

Como se puede comprobar, existen notables diferencias en los resultados obtenidos entre modelo ovino y murinos, utilizados en nuestros estudios. Para poder explicar dichas diferencias, hay que tener en cuenta las diferencias metodológicas existentes entre ellos. Así, cabe recordar que en el modelo murino se abordó el análisis del efecto del estradiol y la progesterona de forma sistémica. Por este motivo, en el modelo murino se eligió la vía de infección intraperitoneal. Esta vía de infección, ha sido empleada con éxito en multitud de estudios relacionados con *C. abortus* (revisado en Caro *et al.*, 2009). Además, dado el pequeño tamaño de los animales, es posible realizar el análisis de órganos completos que son diana de la infección clamidial, como el hígado y el bazo, con los que profundizar en el estudio de respuestas inmunitarias a este nivel. Sin embargo, la caracterización de los efectos de las hormonas mencionadas a nivel sistémico en ovejas, resultaría una tarea hartamente compleja dado el gran tamaño de los animales y sus órganos. Por ello, se decidió emplear una ruta de infección intratraqueal, previamente validada para probar vacunas frente al AEO y que permite el estudio de la respuesta inmunitaria generada en las lesiones provocadas por la misma (Alvarez *et al.*, 2015).

Por otro lado, en la Experiencia 5, se intentó emular en la medida de lo posible las condiciones más habituales en entornos ganaderos. Así, dadas las restricciones legales, que prohíben la administración de  $17\beta$ -estradiol y sus derivados (Real Decreto 2178/2004, de 12 de noviembre), se decidió prescindir de esta hormona en esta experiencia. Por otra parte la administración de progesterona o moléculas análogas, es ampliamente empleada en programas

## Discusión

de sincronización el celo en el ganado ovino, por lo que la vía de inoculación empleada en el tratamiento hormonal de nuestro estudio, fue a través de esponjas intravaginales comerciales impregnadas con acetato de medroxiprogesterona a dosis estándar. Estos hechos en relación a las diferencias metodológicas respecto al modelo murino podría justificar las diferencias en los resultados obtenidos entre ambos modelos.

Por último, cabe concluir que existen notables diferencias entre el sistema hormonal ovino y murino, así como en los efectos de estas hormonas en cada especie (Miller *et al.*, 1979) y su interacción con el sistema inmunitario, ya de por sí compleja y a veces contradictoria (Nikolaevich *et al.*, 1991; Gilmore *et al.*, 1997; Correale *et al.*, 1998; Vermeulen *et al.*, 2001; Lü *et al.*, 2002).

## CONCLUSIONES

- 1.** Bajo las condiciones experimentales establecidas en este estudio en el modelo murino utilizado, el estradiol favorece la resolución de una primoinfección por *C. abortus*, estando asociada a una mayor presencia de linfocitos T, mientras que la progesterona no interfiere de manera significativa en la resolución y en la respuesta inmunitaria generada.
- 2.** El estradiol y la progesterona administrados en días próximos a la infección no afectan a la protección conferida por una vacuna inactivada experimental frente a *C. abortus* en el modelo murino utilizado.
- 3.** En el modelo experimental murino utilizado en nuestro estudio, el estradiol, administrado en días próximos a la vacunación, potencia el efecto protector de una vacuna inactivada experimental frente a *C. abortus*, mientras que la progesterona debilita la respuesta inmunitaria protectora cuando es administrada en dichas condiciones.
- 4.** En el modelo experimental ovino utilizado, el tratamiento con progesterona durante la inmunización vacunal, reduce la gravedad de las lesiones de una infección por *C. abortus*.
- 5.** La progesterona aumenta el efecto protector de una vacuna inactivada experimental frente a *C. abortus* en el modelo ovino utilizado, pero este hecho no está relacionado con la producción de anticuerpos específicos frente a *C. abortus*.
- 6.** En el modelo ovino, la progesterona aumenta la presencia de linfocitos Treg, que previenen de una posible respuesta inmunitaria innata excesiva, evitando así la formación de lesiones, pero no bloquea el desarrollo de una respuesta inmunitaria de memoria efectiva inducida por la vacunación.
- 7.** Los resultados contradictorios obtenidos entre los dos modelos experimentales utilizados en el presente estudio en relación a la respuesta inmunitaria frente a *C. abortus* y sobre la generada durante la vacunación, indican que el modelo más idóneo para el estudio del efecto de las hormonas sobre ambos procesos es el modelo ovino, ya que se acerca más a la realidad biológica.

## BIBLIOGRAFÍA



## Bibliografia

- Abdelrahman, Y.M., Belland, R.J., 2005. The chlamydial developmental cycle. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 949–959. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.03.002>
- Agrawal, T., Vats, V., Wallace, P.K., Salhan, S., Mittal, A., 2007. Cervical cytokine responses in women with primary or recurrent chlamydial infection. *J. Interferon Cytokine Res.* 27, 221–226. <https://doi.org/10.1089/jir.2006.0132>
- Agrawal, T, Gupta, R., Dutta, R., Srivastava, P., Bhengraj, A.R., Salhan, S., Mittal, A., 2009a. Protective or pathogenic immune response to genital chlamydial infection in women--a possible role of cytokine secretion profile of cervical mucosal cells. *Clin. Immunol.* 130, 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2008.10.004>
- Agrawal, Tanvi, Vats, V., Salhan, S., Mittal, A., 2009b. Determination of chlamydial load and immune parameters in asymptomatic, symptomatic and infertile women. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 55, 250–257. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00530.x>
- Ahmed, S.A., Gogal, R.M., Walsh, J.E., Saunders, G., 1996. Estrogen induces defects in T cell functions of mice, in: *FASEB J.* 20814-3998, p. 961.
- Aitken, I.D. 2000. Chlamydial abortion, En: *Diseases of Sheep.* Martin, W.D., Aitken, I.D. (Eds.). Blackwell Science, Oxford, 81-86.
- Aitken ID, Longbottom D. 2007. Chlamydial abortion. In: Aitken ID, editor. *Diseases of sheep.* Fourt edition Oxford, UK: Blackwell Publishing. p. 105-12.
- Al-Alwan, L.A., Chang, Y., Mogas, A., Halayko, A.J., Baglolle, C.J., Martin, J.G., Rousseau, S., Eidelman, D.H., Hamid, Q., 2013. Differential roles of CXCL2 and CXCL3 and their receptors in regulating normal and asthmatic airway smooth muscle cell migration. *J. Immunol.* 191, 2731–2741. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203421>
- Al-Gubory, K.H., Solari, A., Mirman, B., 1999. Effects of luteectomy on the maintenance of pregnancy, circulating progesterone concentrations and lambing performance in sheep. *Reprod. Fertil. Dev.* 11, 317–322.
- Alam, R., Forsythe, P.A., Lett-Brown, M.A., Grant, J.A., 1992. Interleukin-8 and RANTES inhibit basophil histamine release induced with monocyte chemotactic and activating factor/monocyte chemoattractant peptide-1 and histamine releasing factor. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 7, 427–433. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb/7.4.427>
- Alam, R., Stafford, S., Forsythe, P., Harrison, R., Faubion, D., Lett-Brown, M.A., Grant, J.A., 1993. RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils. *J. Immunol.*

- 150, 3442–3448.
- Albrecht, M., Sharma, C.M., Dittrich, M.T., Muller, T., Reinhardt, R., Vogel, J., Rudel, T., 2011. The transcriptional landscape of *Chlamydia pneumoniae*. *Genome Biol.* 12, R98. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-10-r98>
- Álvarez, D., Salinas, J., Buendia, A.J., Ortega, N., del Rio, L., Sanchez, J., Navarro, J.A., Gallego, M.C., Murcia-Belmonte, A., Cuello, F., Caro, M.R., 2015. Intratracheal infection as an efficient route for testing vaccines against *Chlamydia abortus* in sheep. *Vet. J.* 205, 393–398. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.04.036>
- Amadori, A., Zamarchi, R., De Silvestro, G., Forza, G., Cavatton, G., Danieli, G.A., Clementi, M., Chieco-Bianchi, L., 1995. Genetic control of the CD4/CD8 T-cell ratio in humans. *Nat. Med.* 1, 1279–1283.
- Amirshahi, A., Wan, C., Beagley, K., Latter, J., Symonds, I., Timms, P., 2011. Modulation of the *Chlamydia trachomatis* in vitro transcriptome response by the sex hormones estradiol and progesterone. *BMC Microbiol.* 11, 150. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-150>
- Ansar Ahmed, S., Penhale, W.J., Talal, N., 1985. Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action. *Am. J. Pathol.* 121, 531–551.
- Antunes, I., Kassiotis, G., 2010. Suppression of innate immune pathology by regulatory T cells during Influenza A virus infection of immunodeficient mice. *J. Virol.* 84, 12564–12575. <https://doi.org/10.1128/JVI.01559-10>
- Azenabor, A.A., York, J., 2010. *Chlamydia trachomatis* evokes a relative anti-inflammatory response in a free Ca<sup>2+</sup> dependent manner in human macrophages. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 33, 513–528. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2009.09.002>
- Azenabor, A.A., Cintron-Cuevas, J., Schmitt, H., Bumah, V., 2011. *Chlamydia trachomatis* induces anti-inflammatory effect in human macrophages by attenuation of immune mediators in Jurkat T-cells. *Immunobiology* 216, 1248–1255. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2011.07.002>
- Babiuk, L.A., Pontarollo, R., Babiuk, S., Loehr, B., van Drunen Littel-van den Hurk, S., 2003. Induction of immune responses by DNA vaccines in large animals. *Vaccine* 21, 649–658.
- Baehr, W., Zhang, Y.X., Joseph, T., Su, H., Nano, F.E., Everett, K.D., Caldwell, H.D., 1988. Mapping antigenic domains expressed by *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 4000–4004.

## Bibliografia

- Barteneva, N., Theodor, I., Peterson, E.M., de la Maza, L.M., 1996. Role of neutrophils in controlling early stages of a *Chlamydia trachomatis* infection. *Infect. Immun.* 64, 4830–4833.
- Bartlewski, P.M., Beard, A.P., Cook, S.J., Chandolia, R.K., Honaramooz, A., Rawlings, N.C., 1999a. Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. *J. Reprod. Fertil.* 115, 111–124.
- Bartlewski, P.M., Beard, A.P., Rawlings, N.C., 1999b. An ultrasonographic study of luteal function in breeds of sheep with different ovulation rates. *Theriogenology* 52, 115–130.
- Bartlewski, P.M., Baby, T.E., Giffin, J.L., 2011. Reproductive cycles in sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 124, 259–268. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.02.024>
- Bas, S., Muzzin, P., Vischer, T.L., 2001. *Chlamydia trachomatis* serology: diagnostic value of outer membrane protein 2 compared with that of other antigens. *J. Clin. Microbiol.* 39, 4082–4085. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.11.4082-4085.2001>
- Bassett, J.M., Oxborrow, T.J., Smith, I.D., Thorburn, G.D., 1969. The concentration of progesterone in the peripheral plasma of the pregnant ewe. *J. Endocrinol.* 45, 449–457.
- Bavoil, P., Ohlin, A., Schachter, J., 1984. Role of disulfide bonding in outer membrane structure and permeability in *Chlamydia trachomatis*. *Infect. Immun.* 44, 479–485.
- Bavoil, P.M., 2014. What’s in a word: the use, misuse, and abuse of the word “persistence” in *Chlamydia* biology. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4, 27. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00027>
- Bazer, F.W., Spencer, T.E., Ott, T.L., 1997. Interferon tau: a novel pregnancy recognition signal. *Am. J. Reprod. Immunol.* 37, 412–420.
- Bazer, F.W., 2013. Pregnancy recognition signaling mechanisms in ruminants and pigs. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1186/2049-1891-4-23>
- Beagley, K.W., Gockel, C.M., 2003. Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(03\)00202-5](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(03)00202-5)
- Beatty, W.L., Byrne, G.I., Morrison, R.P., 1993. Morphologic and antigenic characterization of interferon gamma-mediated persistent *Chlamydia trachomatis* infection in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 3998–4002.

- Beatty, W.L., Morrison, R.P., Byrne, G.I., 1994. Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microbiol. Rev.* 58, 686–699.
- Becker, E., Hegemann, J.H., 2014. All subtypes of the Pmp adhesin family are implicated in chlamydial virulence and show species-specific function. *Microbiologyopen* 3, 544–556. <https://doi.org/10.1002/mbo3.186>
- Bentley, P.J. 2001. Sex Hormones in Vertebrates. En: *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley and Sons (Eds.). Londres.
- Bermudez-Fajardo, A., Stark, A.-K., El-Kadri, R., Penichet, M.L., Holzle, K., Wittenbrink, M.M., Holzle, L., Oviedo-Orta, E., 2011. The effect of *Chlamydia pneumoniae* Major Outer Membrane Protein (MOMP) on macrophage and T cell-mediated immune responses. *Immunobiology* 216, 152–163. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.06.004>
- Bhavanam, S., Snider, D.P., Kaushic, C., 2008. Intranasal and subcutaneous immunization under the effect of estradiol leads to better protection against genital HSV-2 challenge compared to progesterone. *Vaccine* 26, 6165–6172. doi:10.1016/j.vaccine.2008.08.045
- Biron, C.A., Nguyen, K.B., Pien, G.C., Cousens, L.P., Salazar-Mather, T.P., 1999. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 189–220. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.189>
- Blumer, S., Greub, G., Waldvogel, A., Hassig, M., Thoma, R., Tschuor, A., Pospischil, A., Borel, N., 2011. *Waddlia*, *Parachlamydia* and *Chlamydiaceae* in bovine abortion. *Vet. Microbiol.* 152, 385–393. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.05.024>
- Borel, N., Sachse, K., Rassbach, A., Bruckner, L., Vretou, E., Psarrou, E., Pospischil, A., 2005. Ovine enzootic abortion (OEA): antibody response in vaccinated sheep compared to naturally infected sheep. *Vet. Res. Commun.* 29 Suppl 1, 151–156.
- Borel, N., Kempf, E., Hotzel, H., Schubert, E., Torgerson, P., Slickers, P., Ehrlich, R., Tasara, T., Pospischil, A., Sachse, K., 2008a. Direct identification of chlamydiae from clinical samples using a DNA microarray assay: a validation study. *Mol. Cell. Probes* 22, 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2007.06.003>
- Borel, N., Summersgill, J.T., Mukhopadhyay, S., Miller, R.D., Ramirez, J.A., Pospischil, A., 2008b. Evidence for persistent *Chlamydia pneumoniae* infection of human coronary atheromas. *Atherosclerosis* 199, 154–161. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.09.026>

## Bibliografía

- Borel, N., Frey, C.F., Gottstein, B., Hilbe, M., Pospischil, A., Franzoso, F.D., Waldvogel, A., 2014a. Laboratory diagnosis of ruminant abortion in Europe. *Vet. J.* 200, 218–229. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.03.015>
- Borel, N., Pospischil, A., Hudson, A.P., Rupp, J., Schoborg, R. V, 2014b. The role of viable but non-infectious developmental forms in chlamydial biology. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00097>
- Borel, N., Leonard, C., Slade, J., Schoborg, R. V, 2016. Chlamydial Antibiotic Resistance and Treatment Failure in Veterinary and Human Medicine. *Curr. Clin. Microbiol. reports* 3, 10–18. <https://doi.org/10.1007/s40588-016-0028-4>
- Bouakane, A., Benchaieb, I., Rodolakis, A., 2003. Abortive potency of *Chlamydomydia abortus* in pregnant mice is not directly correlated with placental and fetal colonization levels. *Infect. Immun.* 71, 7219–7222.
- Bregenholt, S., Berche, P., Brombacher, F., Di Santo, J.P., 2001. Conventional alpha beta T cells are sufficient for innate and adaptive immunity against enteric *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* 166, 1871–1876.
- Brown, J., Entrican, G., 1996. Interferon-gamma mediates long-term persistent *Chlamydia psittaci* infection in vitro. *J. Comp. Pathol.* 115, 373–383.
- Brown, J., Howie, S.E., Entrican, G., 2001. A role for tryptophan in immune control of chlamydial abortion in sheep. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 82, 107–119.
- Bruce, H.M., 1959. An exteroceptive block to pregnancy in the mouse. *Nature* 184, 105.
- Buckner, L.R., Lewis, M.E., Greene, S.J., Foster, T.P., Quayle, A.J., 2013. Chlamydia trachomatis infection results in a modest pro-inflammatory cytokine response and a decrease in T cell chemokine secretion in human polarized endocervical epithelial cells. *Cytokine* 63, 151–165. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2013.04.022>
- Buendia, A.J., Salinas, J., Sanchez, J., Gallego, M.C., Rodolakis, A., Cuello, F., 1997. Localization by immunoelectron microscopy of antigens of *Chlamydia psittaci* suitable for diagnosis or vaccine development. *FEMS Microbiol. Lett.* 150, 113–119.
- Buendia, A.J., Sanchez, J., Martinez, M.C., Camara, P., Navarro, J.A., Rodolakis, A., Salinas, J., 1998. Kinetics of infection and effects on placental cell populations in a murine model of *Chlamydia psittaci*-induced abortion. *Infect. Immun.* 66, 2128–2134.
- Buendia, A.J., De Oca, R.M., Navarro, J.A., Sanchez, J., Cuello, F., Salinas, J., 1999a. Role of

- polymorphonuclear neutrophils in a murine model of *Chlamydia psittaci*-induced abortion. *Infect. Immun.* 67, 2110–2116.
- Buendia, A.J., Sanchez, J., Del Rio, L., Garces, B., Gallego, M.C., Caro, M.R., Bernabe, A., Salinas, J., 1999b. Differences in the immune response against ruminant chlamydial strains in a murine model. *Vet. Res.* 30, 495–507.
- Buendia, A.J., Cuello, F., Del Rio, L., Gallego, M.C., Caro, M.R., Salinas, J., 2001. Field evaluation of a new commercially available ELISA based on a recombinant antigen for diagnosing *Chlamydia abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1) infection. *Vet. Microbiol.* 78, 229–239.
- Buendia, A.J., Del Rio, L., Ortega, N., Sanchez, J., Gallego, M.C., Caro, M.R., Navarro, J.A., Cuello, F., Salinas, J., 2002. B-cell-deficient mice show an exacerbated inflammatory response in a model of *Chlamydia abortus* infection. *Infect. Immun.* 70, 6911–6918.
- Buendia, A.J., Martinez, C.M., Ortega, N., Del Rio, L., Caro, M.R., Gallego, M.C., Sanchez, J., Navarro, J.A., Cuello, F., Salinas, J., 2004. Natural killer (NK) cells play a critical role in the early innate immune response to *Chlamydia abortus* infection in mice. *J. Comp. Pathol.* 130, 48–57.
- Buendia, A.J., Nicolas, L., Ortega, N., Gallego, M.C., Martinez, C.M., Sanchez, J., Caro, M.R., Navarro, J.A., Salinas, J., 2007. Characterization of a murine model of intranasal infection suitable for testing vaccines against *C. abortus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 115, 76–86. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.10.008>
- Buendia, A.J., Ortega, N., Caro, M.R., Del Rio, L., Gallego, M.C., Sanchez, J., Navarro, J.A., Cuello, F., Salinas, J., 2009. B cells are essential for moderating the inflammatory response and controlling bacterial multiplication in a mouse model of vaccination against *Chlamydia abortus* infection. *Infect. Immun.* 77, 4868–4876. <https://doi.org/10.1128/IAI.00503-09>
- Buxton, D., 1986. Potential danger to pregnant women of *Chlamydia psittaci* from sheep. *Vet. Rec.* 118, 510–511.
- Buxton, D., Anderson, I.E., Longbottom, D., Livingstone, M., Wattedegera, S., Entrican, G., 2002. Ovine chlamydial abortion: characterization of the inflammatory immune response in placental tissues. *J. Comp. Pathol.* 127, 133–141.
- Buxton, D., Barlow, R.M., Finlayson, J., Anderson, I.E., Mackellar, A., 1990. Observations on the pathogenesis of *Chlamydia psittaci* infection of pregnant sheep. *J. Comp. Pathol.* 102,

## Bibliografía

221–237.

- Buzoni-Gatel, D., Guilloteau, L., Bernard, F., Bernard, S., Chardes, T., Rocca, A., 1992. Protection against *Chlamydia psittaci* in mice conferred by Lyt-2+ T cells. *Immunology* 77, 284–288.
- Byrne, G.I., Krueger, D.A., 1983. Lymphokine-mediated inhibition of *Chlamydia* replication in mouse fibroblasts is neutralized by anti-gamma interferon immunoglobulin. *Infect. Immun.* 42, 1152–1158.
- Caldwell, H.D., Kromhout, J., Schachter, J., 1981. Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Infect. Immun.* 31, 1161–1176.
- Caldwell, H.D., Perry, L.J., 1982. Neutralization of *Chlamydia trachomatis* infectivity with antibodies to the major outer membrane protein. *Infect. Immun.* 38, 745–754.
- Carabeo, R.A., Grieshaber, S.S., Fischer, E., Hackstadt, T., 2002. *Chlamydia trachomatis* induces remodeling of the actin cytoskeleton during attachment and entry into HeLa cells. *Infect. Immun.* 70, 3793–3803.
- Carey, A.J., Huston, W.M., Cunningham, K.A., Hafner, L.M., Timms, P., Beagley, K.W., 2013. Characterization of in vitro *Chlamydia muridarum* persistence and utilization in an in vivo mouse model of *Chlamydia* vaccine. *Am. J. Reprod. Immunol.* 69, 475–485.  
<https://doi.org/10.1111/aji.12093>
- Carlin, J.M., Weller, J.B., 1995. Potentiation of interferon-mediated inhibition of *Chlamydia* infection by interleukin-1 in human macrophage cultures. *Infect. Immun.* 63, 1870–1875.
- Caro, M.R., Ortega, N., Buendia, A.J., Gallego, M.C., Del Rio, L., Cuello, F., Salinas, J., 2001. Protection conferred by commercially available vaccines against *Chlamydia abortus* in a mouse model. *Vet. Rec.* 149, 492–493.
- Caro, M.R., Ortega, N., Buendia, A.J., Gallego, M.C., Del Rio, L., Cuello, F., Salinas, J., 2003. Relationship between the immune response and protection conferred by new designed inactivated vaccines against ovine enzootic abortion in a mouse model. *Vaccine* 21, 3126–3136.
- Caro, M.R., Buendia, A.J., Ortega, N., Gallego, M.C., Martinez, C.M., Cuello, F., Ruiz-Ybanez, M.R., Erb, K.J., Salinas, J., 2005. Influence of the Th2 immune response established by *Nippostrongylus brasiliensis* infection on the protection offered by different vaccines

- against *Chlamydomphila abortus* infection. *Vet. Res. Commun.* 29 Suppl 1, 51–59.
- Caro, M.R., Buendia, A.J., Del Rio, L., Ortega, N., Gallego, M.C., Cuello, F., Navarro, J.A., Sanchez, J., Salinas, J., 2009. *Chlamydomphila abortus* infection in the mouse: a useful model of the ovine disease. *Vet. Microbiol.* 135, 103–111.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.029>
- Chalmers, W.S., Simpson, J., Lee, S.J., Baxendale, W., 1997. Use of a live chlamydial vaccine to prevent ovine enzootic abortion. *Vet. Rec.* 141, 63–67.
- Choi, Y., Johnson, G.A., Spencer, T.E., Bazer, F.W., 2003. Pregnancy and interferon tau regulate major histocompatibility complex class I and beta2-microglobulin expression in the ovine uterus. *Biol. Reprod.* 68, 1703–1710.  
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.012708>
- Chon, T.W., Bixler, S., 2010. Interferon-tau: current applications and potential in antiviral therapy. *J. Interferon Cytokine Res.* 30, 477–485. <https://doi.org/10.1089/jir.2009.0089>
- Clifton, D.R., Fields, K.A., Grieshaber, S.S., Dooley, C.A., Fischer, E.R., Mead, D.J., Carabeo, R.A., Hackstadt, T., 2004. A chlamydial type III translocated protein is tyrosine-phosphorylated at the site of entry and associated with recruitment of actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 10166–10171. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402829101>
- Coffman, R.L., Lebman, D.A., Rothman, P., 1993. Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching. *Adv. Immunol.* 54, 229–270.
- Corr, T.E., Sullivan, J., Frazer, L.C., Andrews, C.W.J., O’Connell, C.M., Darville, T., 2014. Steroids alone or as adjunctive therapy with doxycycline fail to improve oviduct damage in mice infected with *Chlamydia muridarum*. *Clin. Vaccine Immunol.* 21, 824–830.  
[doi:10.1128/CVI.00006-14](https://doi.org/10.1128/CVI.00006-14)
- Correale, J., Arias, M., Gilmore, W., 1998. Steroid hormone regulation of cytokine secretion by proteolipid protein-specific CD4+ T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. *J. Immunol.* 161, 3365–74.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300778>
- Couper, K.N., Blount, D.G., Riley, E.M., 2008a. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J. Immunol.* 180, 5771–5777.
- Couper, K.N., Blount, D.G., Wilson, M.S., Hafalla, J.C., Belkaid, Y., Kamanaka, M., Flavell, R.A., de Souza, J.B., Riley, E.M., 2008b. IL-10 from CD4CD25Foxp3CD127 adaptive

## Bibliografía

- regulatory T cells modulates parasite clearance and pathology during malaria infection. *PLoS Pathog.* 4, e1000004. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000004>
- Coutinho-Silva, R., Stahl, L., Raymond, M.-N., Jungas, T., Verbeke, P., Burnstock, G., Darville, T., Ojcius, D.M., 2003. Inhibition of chlamydial infectious activity due to P2X7R-dependent phospholipase D activation. *Immunity* 19, 403–412.
- Crocker, B.A., Krebs, D.L., Zhang, J.-G., Wormald, S., Willson, T.A., Stanley, E.G., Robb, L., Greenhalgh, C.J., Forster, I., Clausen, B.E., Nicola, N.A., Metcalf, D., Hilton, D.J., Roberts, A.W., Alexander, W.S., 2003. SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo. *Nat. Immunol.* 4, 540–545. <https://doi.org/10.1038/ni931>
- Cutolo, M., Capellino, S., Montagna, P., Villaggio, B., Sulli, A., Seriolo, B., Straub, R.H., 2003. New roles for estrogens in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.*
- Davis, C.H., Raulston, J.E., Wyrick, P.B., 2002. Protein disulfide isomerase, a component of the estrogen receptor complex, is associated with *Chlamydia trachomatis* serovar E attached to human endometrial epithelial cells. *Infect. Immun.* 70, 3413–3418.
- De la Maza, L.M., Peterson, E.M., Fennie, C.W., Czarniecki, C.W., 1985. The anti-chlamydial and anti-proliferative activities of recombinant murine interferon-gamma are not dependent on tryptophan concentrations. *J. Immunol.* 135, 4198–4200.
- de Sa, C., Souriau, A., Bernard, F., Salinas, J., Rodolakis, A., 1995. An oligomer of the major outer membrane protein of *Chlamydia psittaci* is recognized by monoclonal antibodies which protect mice from abortion. *Infect. Immun.* 63, 4912–4916.
- Decken, K., Kohler, G., Palmer-Lehmann, K., Wunderlin, A., Mattner, F., Magram, J., Gately, M.K., Alber, G., 1998. Interleukin-12 is essential for a protective Th1 response in mice infected with *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 66, 4994–5000.
- Del Rio, L., Buendia, A.J., Sanchez, J., Garces, B., Caro, M.R., Gallego, M.C., Bernabe, A., Cuello, F., Salinas, J., 2000. *Chlamydia abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1) clearance is associated with the early recruitment of neutrophils and CD8(+)T cells in a mouse model. *J. Comp. Pathol.* 123, 171–181. <https://doi.org/10.1053/jcpa.2000.0411>
- Del Rio, L., Buendia, A.J., Sanchez, J., Gallego, M.C., Caro, M.R., Ortega, N., Seva, J., Pallares, F.J., Cuello, F., Salinas, J., 2001. Endogenous interleukin-12 is not required for resolution of *Chlamydia abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1) infection in mice. *Infect. Immun.* 69, 4808–4815. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.8.4808-4815.2001>

- Del Rio, L., Barbera-Cremades, M., Navarro, J.A., Buendia, A.J., Cuello, F., Ortega, N., Gallego, M.C., Salinas, J., Caro, M.R., 2013. IFN-gamma expression in placenta is associated to resistance to *Chlamydia abortus* after intragastric infection. *Microb. Pathog.* 56, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2012.12.003>
- Del Rio, L., Murcia, A., Buendia, A.J., Alvarez, D., Ortega, N., Navarro, J.A., Salinas, J., Caro, M.R., 2018. Development of an in vivo model of *Chlamydia abortus* chronic infection in mice overexpressing IL-10. *Vet. Microbiol.* 213, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.11.009>
- Dosiou, C., Lathi, R.B., Tulac, S., Huang, S.-T.J., Giudice, L.C., 2004. Interferon-related and other immune genes are downregulated in peripheral blood leukocytes in the luteal phase of the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 2501–4. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-031647>
- Dugan, J., Rockey, D.D., Jones, L., Andersen, A.A., 2004. Tetracycline resistance in *Chlamydia suis* mediated by genomic islands inserted into the chlamydial *inv*-like gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 3989–3995. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.10.3989-3995.2004>
- Edvinsson, M., Tallkvist, J., Nystrom-Rosander, C., Ilback, N.-G., 2017a. Iron Homeostasis in Tissues Is Affected during Persistent *Chlamydia pneumoniae* Infection in Mice. *Biomed Res. Int.* 2017, 3642301. <https://doi.org/10.1155/2017/3642301>
- Edvinsson, M., Tallkvist, J., Nystrom-Rosander, C., Ilback, N.-G., 2017b. Cholesterol uptake in the mouse aorta increases during *Chlamydia pneumoniae* infection. *Pathog. Dis.* 75. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftx004>
- Elahi, S., Pang, G., Clancy, R., Ashman, R.B., 2000. Cellular and cytokine correlates of mucosal protection in murine model of oral candidiasis. *Infect. Immun.* 68, 5771–5777. <https://doi.org/10.1128/iai.68.10.5771-5777.2000>
- Elwell, C.A., Ceesay, A., Kim, J.H., Kalman, D., Engel, J.N., 2008. RNA interference screen identifies Abl kinase and PDGFR signaling in *Chlamydia trachomatis* entry. *PLoS Pathog.* 4, e1000021. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000021>
- Entrican, G., Brown, J., Graham, S., 1998. Cytokines and the protective host immune response to *Chlamydia psittaci*. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 21, 15–26.
- Entrican, G., Buxton, D., Longbottom, D., 2001. Chlamydial infection in sheep: immune control versus fetal pathology. *J. R. Soc. Med.* 94, 273–277.

## Bibliografia

- Entrican, G., 2002. Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. *J. Comp. Pathol.* 126, 79–94. <https://doi.org/10.1053/jcpa.2001.0539>
- Entrican, G., Wattegedera, S., Rocchi, M., Fleming, D.C., Kelly, R.W., Wathne, G., Magdalenic, V., Howie, S.E.M., 2004. Induction of inflammatory host immune responses by organisms belonging to the genera *Chlamydia*/*Chlamydophila*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 100, 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.04.006>
- Entrican, G., Wheelhouse, N., Wattegedera, S.R., Longbottom, D., 2012. New challenges for vaccination to prevent chlamydial abortion in sheep. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 35, 271–276. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2011.12.001>
- Essig, A., Longbottom, D., 2015. *Chlamydia abortus*: New Aspects of Infectious Abortion in Sheep and Potential Risk for Pregnant Women. *Curr. Clin. Microbiol. Reports* 2, 22–34. [doi:10.1007/s40588-015-0014-2](https://doi.org/10.1007/s40588-015-0014-2)
- Everett, K.D., Bush, R.M., Andersen, A.A., 1999. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 Pt 2, 415–440.
- Faas, M., Bouman, A., Moesa, H., Heineman, M.J., de Leij, L., Schuiling, G., 2000. The immune response during the luteal phase of the ovarian cycle: a Th2-type response? *Fertil. Steril.* 74, 1008–1013.
- Faye, P., Charton, A., Mage, C., Bernard, C., Le Layec, C. 1972. Propriétés hémagglutinantes du “virus” de l’avortement enzootique des petits ruminants (souches de Rakeïa d’origine ovine et caprine). *Bull. Acad. Vet. Fr.* 45: 169-173.
- Feng, C.G., Kullberg, M.C., Jankovic, D., Cheever, A.W., Caspar, P., Coffman, R.L., Sher, A., 2002. Transgenic mice expressing human interleukin-10 in the antigen-presenting cell compartment show increased susceptibility to infection with *Mycobacterium avium* associated with decreased macrophage effector function and apoptosis. *Infect. Immun.* 70, 6672–6679.
- Fitch, P.M., Wheelhouse, N.M., Bowles, P., Paterson, M., Longbottom, D., Entrican, G., Howie, S.E.M., 2010. Ectopic lymphoid tissue formation in the lungs of mice infected with *Chlamydia pneumoniae* is associated with epithelial macrophage inflammatory protein-2/CXCL2 expression. *Clin. Exp. Immunol.* 162, 372–378. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04231.x>

- Foo, Y.Z., Nakagawa, S., Rhodes, G., Simmons, L.W., 2017. The effects of sex hormones on immune function: a meta-analysis. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 92, 551–571.  
<https://doi.org/10.1111/brv.12243>
- Forbes, T.R., Klein, I., 1958. Plasma levels of progestin during absorption of progesterone pellets in mice. *Yale J. Biol. Med.* 30, 442–445.
- Fox, H.S., Bond, B.L., Parslow, T.G., 1991. Estrogen regulates the IFN-gamma promoter. *J. Immunol.* 146, 4362 LP – 4367.
- Freestone, P.P.E., Sandrini, S.M., Haigh, R.D., Lyte, M., 2008. Microbial endocrinology: how stress influences susceptibility to infection. *Trends Microbiol.* 16, 55–64.  
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.11.005>
- Fteita, D., Kononen, E., Gursoy, M., Soderling, E., Gursoy, U.K., 2015. Does estradiol have an impact on the dipeptidyl peptidase IV enzyme activity of the *Prevotella intermedia* group bacteria? *Anaerobe* 36, 14–18. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.09.002>
- Garcia-Gomez, E., Gonzalez-Pedrajo, B., Camacho-Arroyo, I., 2013. Role of sex steroid hormones in bacterial-host interactions. *Biomed Res. Int.* 2013, 928290.  
<https://doi.org/10.1155/2013/928290>
- Garcia-Seco, T., Perez-Sancho, M., Salinas, J., Navarro, A., Diez-Guerrier, A., Garcia, N., Pozo, P., Goyache, J., Dominguez, L., Alvarez, J., 2016. Effect of Preventive Chlamydia abortus Vaccination in Offspring Development in Sheep Challenged Experimentally. *Front. Vet. Sci.* 3, 67. <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00067>
- Garcia de la Fuente, J.N., Gutierrez-Martin, C.B., Ortega, N., Rodriguez-Ferri, E.F., del Rio, M.L., Gonzalez, O.R., Salinas, J., 2004. Efficacy of different commercial and new inactivated vaccines against ovine enzootic abortion. *Vet. Microbiol.* 100, 65–76.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.01.015>
- Gardner, R.L., 1991. Rugh's *Mus* redux. *The Mouse; Its Reproduction and Development.* (1990). By Roberts Rugh. Oxford University Press, Oxford. 434pp. £55. *BioEssays* 13, 150. <https://doi.org/10.1002/bies.950130311>
- Gazzinelli, R.T., Wysocka, M., Hayashi, S., Denkers, E.Y., Hieny, S., Caspar, P., Trinchieri, G., Sher, A., 1994. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 153, 2533–2543.
- Geng, Y., Berencsi, K., Gyulai, Z., Valyi-Nagy, T., Gonczol, E., Trinchieri, G., 2000. Roles of

## Bibliografia

- interleukin-12 and gamma interferon in murine *Chlamydia pneumoniae* infection. *Infect. Immun.* 68, 2245–2253.
- Georgopoulos, C., Welch, W.J., 1993. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9, 601–634.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.cb.09.110193.003125>
- Gerber, A., Thoma, R., Vretou, E., Psarrou, E., Kaiser, C., Doherr, M.G., Zimmermann, D.R., Polkinghorne, A., Pospischil, A., Borel, N., 2007. Ovine Enzootic Abortion (OEA): a comparison of antibody responses in vaccinated and naturally-infected swiss sheep over a two year period. *BMC Vet. Res.* 3, 24. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-3-24>
- Ghosh, S., Klein, R.S., 2017. Sex Drives Dimorphic Immune Responses to Viral Infections. *J. Immunol.* 198, 1782–1790. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601166>
- Gilmore, W., Weiner, L.P., Correale, J., 1997. Effect of Estradiol on Cytokine Secretion by Proteolipid Protein-Specific T Cell Clones Isolated from Multiple Sclerosis Patients and Normal Control Subjects. *J. Immunol.* 158, 446–451.
- Giron-Gonzalez, J.A., Moral, F.J., Elvira, J., Garcia-Gil, D., Guerrero, F., Gavilan, I., Escobar, L., 2000. Consistent production of a higher TH1:TH2 cytokine ratio by stimulated T cells in men compared with women. *Eur. J. Endocrinol.* 143, 31–36.
- Goddard, L.M., Ton, A.N., Org, T., Mikkola, H.K.A., Iruela-Arispe, M.L., 2013. Selective suppression of endothelial cytokine production by progesterone receptor. *Vascul. Pharmacol.* 59, 36–43. doi:10.1016/j.vph.2013.06.001
- Golde, W.T., Gollobin, P., Rodriguez, L.L., 2005. A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. *Lab Anim. (NY)*. 34, 39–43.  
doi:10.1038/labani005-39
- Graham, J.D., Clarke, C.L., 1997. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr. Rev.* 18, 502–519. <https://doi.org/10.1210/edrv.18.4.0308>
- Graham, S.P., Jones, G.E., MacLean, M., Livingstone, M., Entrican, G., 1995. Recombinant ovine interferon gamma inhibits the multiplication of *Chlamydia psittaci* in ovine cells. *J. Comp. Pathol.* 112, 185–195.
- Greig, J.R., 1936. Enzootic abortion in ewes; a preliminary note. *Vet. Rec.* 42, 1225-1227.
- Groux, H., Cottrez, F., Rouleau, M., Mauze, S., Antonenko, S., Hurst, S., McNeil, T., Bigler, M., Roncarolo, M.G., Coffman, R.L., 1999. A transgenic model to analyze the

- immunoregulatory role of IL-10 secreted by antigen-presenting cells. *J. Immunol.* 162, 1723–1729.
- Guerriero, G., 2009. Vertebrate sex steroid receptors: evolution, ligands, and neurodistribution. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1163, 154–168. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04460.x>
- Guseva, N. V., Knight, S.T., Whittimore, J.D., Wyrick, P.B., 2003. Primary cultures of female swine genital epithelial cells in vitro: A new approach for the study of hormonal modulation of chlamydia infection. *Infect. Immun.* 71, 4700–4710. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.8.4700-4710.2003>
- Gutierrez-Martin, C.B., Ojcius, D.M., Hsia, R., Hellio, R., Bavoil, P.M., Dautry-Varsat, A., 1997. Heparin-mediated inhibition of *Chlamydia psittaci* adherence to HeLa cells. *Microb. Pathog.* 22, 47–57.
- Gutierrez, J., Williams, E.J., O'Donovan, J., Brady, C., Proctor, A.F., Marques, P.X., Worrall, S., Nally, J.E., McElroy, M., Bassett, H.F., Sammin, D.J., Markey, B.K., 2011. Monitoring clinical outcomes, pathological changes and shedding of *Chlamydia abortus* following experimental challenge of periparturient ewes utilizing the natural route of infection. *Vet. Microbiol.* 147, 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.06.015>
- Hackstadt, T., Scidmore-Carlson, M.A., Shaw, E.I., Fischer, E.R., 1999. The *Chlamydia trachomatis* InCA protein is required for homotypic vesicle fusion. *Cell. Microbiol.* 1, 119–130.
- Hall, J.V., Schell, M., Dessus-Babus, S., Moore, C.G., Whittimore, J.D., Sal, M., Dill, B.D., Wyrick, P.B., 2011. The multifaceted role of oestrogen in enhancing *Chlamydia trachomatis* infection in polarized human endometrial epithelial cells. *Cell. Microbiol.* 13, 1183–1199. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01608.x>
- Hammond, G.L., 2016. Plasma steroid-binding proteins: primary gatekeepers of steroid hormone action. *J. Endocrinol.* 230, R13-25. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0070>
- Han, X., Wang, S., Fan, Y., Yang, J., Jiao, L., Qiu, H., Yang, X., 2006. Chlamydia infection induces ICOS ligand-expressing and IL-10-producing dendritic cells that can inhibit airway inflammation and mucus overproduction elicited by allergen challenge in BALB/c mice. *J. Immunol.* 176, 5232–5239.
- Harper, A., Pogson, C.I., Jones, M.L., Pearce, J.H., 2000. Chlamydial development is adversely affected by minor changes in amino acid supply, blood plasma amino acid levels, and glucose deprivation. *Infect. Immun.* 68, 1457–1464.

## Bibliografia

- Hart, S.M., 2002. Modulation of nuclear receptor dependent transcription. *Biol. Res.* 35, 295–303.
- Hatch, T.P., Miceli, M., Silverman, J.A., 1985. Synthesis of protein in host-free reticulate bodies of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis*. *J. Bacteriol.* 162, 938–942.
- Hatch, T.P., 1996. Disulfide cross-linked envelope proteins: the functional equivalent of peptidoglycan in chlamydiae? *J. Bacteriol.* 178, 1–5.
- Hechard, C., Grepinet, O., Rodolakis, A., 2003a. Proteic boost enhances humoral response induced by DNA vaccination with the *dnaK* gene of *Chlamydomyphila abortus* but fails to protect pregnant mice against a virulence challenge. *Vet. Res.* 34, 119–125. <https://doi.org/10.1051/vetres:2002052>
- Hechard, C., Grepinet, O., Rodolakis, A., 2003b. Evaluation of protection against *Chlamydomyphila abortus* challenge after DNA immunization with the major outer-membrane protein-encoding gene in pregnant and non-pregnant mice. *J. Med. Microbiol.* 52, 35–40. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.04983-0>
- Hechard, C., Grepinet, O., 2004. DNA vaccination against Chlamydiaceae: current status and perspectives. *Vet. Res.* 35, 149–161. <https://doi.org/10.1051/vetres:2004007>
- Hechard, C., Grepinet, O., Rodolakis, A., 2004. Molecular cloning of the *Chlamydomyphila abortus* *groEL* gene and evaluation of its protective efficacy in a murine model by genetic vaccination. *J. Med. Microbiol.* 53, 861–868. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05442-0>
- Herring, A.J., Anderson, I.E., McClenaghan, M., Inglis, N.F., Williams, H., Matheson, B.A., West, C.P., Rodger, M., Brettle, P.P., 1987. Restriction endonuclease analysis of DNA from two isolates of *Chlamydia psittaci* obtained from human abortions. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed)*. 295, 1239.
- Herrmann, B., Rahman, R., Bergstrom, S., Bonnedahl, J., Olsen, B., 2000. *Chlamydomyphila abortus* in a Brown skua (*Catharacta antarctica lonnbergi*) from a subantarctic island. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3654–3656.
- Hicks, D.J., Johnson, L., Mitchell, S.M., Gough, J., Cooley, W.A., La Ragione, R.M., Spencer, Y.I., Wangoo, A. 2006. Evaluation of zinc salt based fixatives for preserving antigenic determinants for immunohistochemical demonstration of murine immune system cell markers. *Biotech Histochem* 81: 23-30.
- Hill, B.F., 1967. Biology of the Laboratory Mouse. Earl L. Green . *Q. Rev. Biol.* 42, 559–560.

<https://doi.org/10.1086/405578>

- Hillier, S.G., Whitelaw, P.F., Smyth, C.D., 1994. Follicular oestrogen synthesis: the “two-cell, two-gonadotrophin” model revisited. *Mol. Cell. Endocrinol.* 100, 51–54.
- Hogan, R.J., Mathews, S.A., Mukhopadhyay, S., Summersgill, J.T., Timms, P., 2004. Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm. *Infect. Immun.* 72, 1843–1855.
- Hou, X., Song, J., Su, J., Huang, D., Gao, W., Yan, J., Shen, J., 2015. CD4(+)Foxp3(+) Tregs protect against innate immune cell-mediated fulminant hepatitis in mice. *Mol. Immunol.* 63, 420–427. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.09.015>
- Howie, A., Leaver, H., D Aitken, I., Hay, L.A., E Anderson, I., E Williams, G., Jones, G., 1989. The effect of chlamydial infection on the initiation of premature labour: Serial measurements of intrauterine Prostaglandin E2 in amniotic fluid, allantoic fluid and utero-ovarian vein, using catheterised sheep experimentally infected with an ovine abortin strain of *Chlamydia psittaci*. *PLEFA*. Vol, 37 (3). Ed. Elsevier, pp 203-211. [https://doi.org/10.1016/0952-3278\(89\)90087-2](https://doi.org/10.1016/0952-3278(89)90087-2)
- Hsia, R., Ohayon, H., Gounon, P., Dautry-Varsat, A., Bavoil, P.M., 2000. Phage infection of the obligate intracellular bacterium, *Chlamydia psittaci* strain guinea pig inclusion conjunctivitis. *Microbes Infect.* 2, 761–772.
- Hsu, S.M., Raine, L., Fanger, H. 1981. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29: 577–580.
- Huang, J., Wang, M.D., Lenz, S., Gao, D., Kaltenboeck, B., 1999. IL-12 administered during *Chlamydia psittaci* lung infection in mice confers immediate and long-term protection and reduces macrophage inflammatory protein-2 level and neutrophil infiltration in lung tissue. *J. Immunol.* 162, 2217–2226.
- Huang, J., DeGraves, F.J., Lenz, S.D., Gao, D., Feng, P., Li, D., Schlapp, T., Kaltenboeck, B., 2002. The quantity of nitric oxide released by macrophages regulates *Chlamydia*-induced disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 3914–3919. <https://doi.org/10.1073/pnas.062578399>
- Hybiske, K., Stephens, R.S., 2007. Mechanisms of *Chlamydia trachomatis* entry into nonphagocytic cells. *Infect. Immun.* 75, 3925–3934. <https://doi.org/10.1128/IAI.00106-07>
- Ibana, J.A., Belland, R.J., Zea, A.H., Schust, D.J., Nagamatsu, T., AbdelRahman, Y.M., Tate,

## Bibliografia

- D.J., Beatty, W.L., Aiyar, A.A., Quayle, A.J., 2011. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase activity by levo-1-methyl tryptophan blocks gamma interferon-induced Chlamydia trachomatis persistence in human epithelial cells. *Infect. Immun.* 79, 4425–4437. <https://doi.org/10.1128/IAI.05659-11>
- Igietseme, J.U., Ramsey, K.H., Magee, D.M., Williams, D.M., Kincy, T.J., Rank, R.G., 1993. Resolution of murine chlamydial genital infection by the adoptive transfer of a biovar-specific, Th1 lymphocyte clone. *Reg. Immunol.* 5, 317–324.
- Igietseme, J.U., 1996. Molecular mechanism of T-cell control of Chlamydia in mice: role of nitric oxide in vivo. *Immunology* 88, 1–5.
- Igietseme, J.U., Ananaba, G.A., Bolier, J., Bowers, S., Moore, T., Belay, T., Eko, F.O., Lyn, D., Black, C.M., 2000. Suppression of endogenous IL-10 gene expression in dendritic cells enhances antigen presentation for specific Th1 induction: potential for cellular vaccine development. *J. Immunol.* 164, 4212–4219.
- Igietseme, J.U., Eko, F.O., Black, C.M., 2003. Contemporary approaches to designing and evaluating vaccines against Chlamydia. *Expert Rev. Vaccines* 2, 129–146. <https://doi.org/10.1586/14760584.2.1.129>
- Iida, N., Grotendorst, G.R., 1990. Cloning and sequencing of a new gro transcript from activated human monocytes: expression in leukocytes and wound tissue. *Mol. Cell. Biol.* 10, 5596–5599.
- Jablonska, E., Jablonski, J., Holownia, A., 1999. Role of neutrophils in release of some cytokines and their soluble receptors. *Immunol. Lett.* 70, 191–197.
- Jakobshagen, K., Ward, B., Baschuk, N., Huss, S., Brunn, A., Malecki, M., Fiolka, M., Rappl, G., Corogeanu, D., Karow, U., Schiller, P., Abken, H., Heukamp, L.C., Deckert, M., Kronke, M., Utermohlen, O., 2015. Endogenous Il10 alleviates the systemic antiviral cellular immune response and T cell-mediated immunopathology in select organs of acutely LCMV-infected mice. *Am. J. Pathol.* 185, 3025–3038. [doi:10.1016/j.ajpath.2015.07.019](https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.07.019)
- Jones, L.A., Anthony, J.-P., Henriquez, F.L., Lyons, R.E., Nickdel, M.B., Carter, K.C., Alexander, J., Roberts, C.W., 2008. Toll-like receptor-4-mediated macrophage activation is differentially regulated by progesterone via the glucocorticoid and progesterone receptors. *Immunology* 125, 59–69. [doi:10.1111/j.1365-2567.2008.02820.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02820.x)
- Kamanaka, M., Kim, S.T., Wan, Y.Y., Sutterwala, F.S., Lara-Tejero, M., Galan, J.E., Harhaj,

- E., Flavell, R.A., 2006. Expression of interleukin-10 in intestinal lymphocytes detected by an interleukin-10 reporter knockin tiger mouse. *Immunity* 25, 941–952.  
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.09.013>
- Karpuzoglu, E., Fenaux, J.B., Phillips, R.A., Lengi, A.J., Elvinger, F., Ansar Ahmed, S., 2006. Estrogen up-regulates inducible nitric oxide synthase, nitric oxide, and cyclooxygenase-2 in splenocytes activated with T cell stimulants: role of interferon-gamma. *Endocrinology* 147, 662–671. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0829>
- Karunakaran, K.P., Yu, H., Foster, L.J., Brunham, R.C., 2010. Development of a *Chlamydia trachomatis* T cell Vaccine. *Hum. Vaccin.* 6, 676–680.
- Kaushic, C., Zhou, F., Murdin, A.D., Wira, C.R., 2000. Effects of estradiol and progesterone on susceptibility and early immune responses to *Chlamydia trachomatis* infection in the female reproductive tract. *Infect. Immun.* 68, 4207–4216.
- Kavandi, L., Collier, M.A., Nguyen, H., Syed, V., 2012. Progesterone and calcitriol attenuate inflammatory cytokines CXCL1 and CXCL2 in ovarian and endometrial cancer cells. *J. Cell. Biochem.* 113, 3143–3152. doi:10.1002/jcb.24191
- Kelver, M.E., Kaul, A., Nowicki, B., Findley, W.E., Hutchens, T.W., Nagamani, M., 1996. Estrogen regulation of lactoferrin expression in human endometrium. *Am. J. Reprod. Immunol.* 36, 243–247.
- Kensil, C.R., Wu, J.Y., Anderson, C.A., Wheeler, D.A., Amsden, J., 1998. QS-21 and QS-7: purified saponin adjuvants. *Dev. Biol. Stand.* 92, 41–47.
- Kerr, K., Entrican, G., McKeever, D., Longbottom, D., 2005. Immunopathology of *Chlamydia abortus* infection in sheep and mice. *Res. Vet. Sci.* 78, 1–7.  
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2004.08.004>
- Kerr, K., Wheelhouse, N., Livingstone, M., Anderson, I.E., Entrican, G., McKeever, D., Longbottom, D., 2010. Inflammatory cytokine responses in a pregnant mouse model of *Chlamydia abortus* infection. *Vet. Microbiol.* 144, 392–398.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.01.025>
- Kincy-Cain, T., Clements, J.D., Bost, K.L., 1996. Endogenous and exogenous interleukin-12 augment the protective immune response in mice orally challenged with *Salmonella dublin*. *Infect. Immun.* 64, 1437–1440.
- Kintner, J., Schoborg, R. V., Wyrick, P.B., Hall, J. V., 2015. Progesterone antagonizes the

## Bibliografia

- positive influence of estrogen on *Chlamydia trachomatis* serovar E in an Ishikawa/SHT-290 co-culture model. *Pathog. Dis.* 73. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv015>
- Klein, P.W., Easterbrook, J.D., Lalime, E.N., Klein, S.L., 2008. Estrogen and progesterone affect responses to malaria infection in female C57BL/6 mice. *Gend. Med.* 5, 423–433. doi:10.1016/j.genm.2008.10.001
- Knittler, M.R., Sachse, K., 2015. *Chlamydia psittaci*: update on an underestimated zoonotic agent. *Pathog. Dis.* 73, 1–15. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftu007>
- Koehler, L., Nettelbreker, E., Hudson, A.P., Ott, N., Gerard, H.C., Branigan, P.J., Schumacher, H.R., Drommer, W., Zeidler, H., 1997. Ultrastructural and molecular analyses of the persistence of *Chlamydia trachomatis* (serovar K) in human monocytes. *Microb. Pathog.* 22, 133–142. <https://doi.org/10.1006/mpat.1996.0103>
- Kol, A., Bourcier, T., Lichtman, A.H., Libby, P., 1999. Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *J. Clin. Invest.* 103, 571–577. <https://doi.org/10.1172/JCI5310>
- Kopf, M., Le Gros, G., Bachmann, M., Lamers, M.C., Bluethmann, H., Kohler, G., 1993. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 362, 245–248. <https://doi.org/10.1038/362245a0>
- Kopf, M., Baumann, H., Freer, G., Freudenberg, M., Lamers, M., Kishimoto, T., Zinkernagel, R., Bluethmann, H., Kohler, G., 1994. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 368, 339–342. <https://doi.org/10.1038/368339a0>
- Kornman, K.S., Loesche, W.J., 1982. Effects of estradiol and progesterone on *Bacteroides melaninogenicus* and *Bacteroides gingivalis*. *Infect. Immun.* 35, 256–263.
- Kulcsar, K.A., Griffin, D.E., 2016. T cell-derived interleukin-10 is an important regulator of the Th17 response during lethal alphavirus encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 295–296, 60–67. doi:10.1016/j.jneuroim.2016.04.010
- Kuna, P., Reddigari, S.R., Schall, T.J., Rucinski, D., Viksman, M.Y., Kaplan, A.P., 1992. RANTES, a monocyte and T lymphocyte chemotactic cytokine releases histamine from human basophils. *J. Immunol.* 149, 636–642.
- Kuo, C., Wang, S., Grayston, J.T., 1972. Differentiation of TRIC and LGV organisms based on enhancement of infectivity by DEAE-dextran in cell culture. *J. Infect. Dis.* 125, 313–317.
- Kuo, C.C., Stephens, R.S., Bavoil, P.M., Kaltenboeck, B. 2011. Genus I. *Chlamydia*, In:

- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Krieg, N.R., Staley, J.T., Brown, D.R., Hedlund, B.P., Paster, B.J., Ward, N.L., Ludwig, W., Whitman, W.B. (Eds.). Springer, New York, 846-865.
- Kutlin, A., Flegg, C., Stenzel, D., Reznik, T., Roblin, P.M., Mathews, S., Timms, P., Hammerschlag, M.R., 2001. Ultrastructural study of *Chlamydia pneumoniae* in a continuous-infection model. *J. Clin. Microbiol.* 39, 3721–3723.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.39.10.3721-3723.2001>
- Lahita, R.G., Bradlow, H.L., Ginzler, E., Pang, S., New, M., 1987. Low plasma androgens in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 30, 241–248.
- Lambden, P.R., Everson, J.S., Ward, M.E., Clarke, I.N., 1990. Sulfur-rich proteins of *Chlamydia trachomatis*: developmentally regulated transcription of polycistronic mRNA from tandem promoters. *Gene* 87, 105–112.
- Lammert, J.K., 1982. Cytotoxic cells induced after *Chlamydia psittaci* infection in mice. *Infect. Immun.* 35, 1011–1017.
- Laroucau, K., Souriau, A., Rodolakis, A. 2000. Isolation of new pmp sequence in serotype-1 *Chlamydia psittaci* strains, In: *Chlamydia Research*, vol. 4. Saikku, P. (Ed.) Universitas Helsingienis, Finland, 38.
- Laroucau, K., Vorimore, F., Bertin, C., Mohamad, K.Y., Thierry, S., Hermann, W., Maingourd, C., Pourcel, C., Longbottom, D., Magnino, S., Sachse, K., Vretou, E., Rodolakis, A., 2009. Genotyping of *Chlamydia abortus* strains by multilocus VNTR analysis. *Vet. Microbiol.* 137, 335–344. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.01.029>
- Laroucau, K., Vorimore, F., Sachse, K., Vretou, E., Siarkou, V.I., Willems, H., Magnino, S., Rodolakis, A., Bavoil, P.M., 2010. Differential identification of *Chlamydia abortus* live vaccine strain 1B and *C. abortus* field isolates by PCR-RFLP. *Vaccine* 28, 5653–5656.  
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.06.064>
- Laroucau, K., Aaziz, R., Vorimore, F., Menard, M.F., Longbottom, D., Denis, G., 2018. Abortion storm induced by the live *C. abortus* vaccine 1B strain in a vaccinated sheep flock, mimicking a natural wild-type infection. *Vet. Microbiol.* 225, 31–33.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.09.012>
- Lasarte, S., Elsner, D., Guia-Gonzalez, M., Ramos-Medina, R., Sanchez-Ramon, S., Esponda, P., Munoz-Fernandez, M.A., Rellosó, M., 2013. Female sex hormones regulate the Th17 immune response to sperm and *Candida albicans*. *Hum. Reprod.* 28, 3283–3291.

## Bibliografia

doi:10.1093/humrep/det348

- Leaver, H.A., Howie, A., Appleyard, W., Aitken, I.A.N.D., Hay, L.A., 1987. Altered steroid hormone and prostaglandin metabolism during chlamydial infection in sheep. *Biochem. Soc. Trans.* 15, 479 LP – 479. <https://doi.org/10.1042/bst0150479>
- Lenart, J., Andersen, A.A., Rockey, D.D., 2001. Growth and development of tetracycline-resistant *Chlamydia suis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 2198–2203. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.8.2198-2203.2001>
- Leone, M., Honstetter, A., Lepidi, H., Capo, C., Bayard, F., Raoult, D., Mege, J.-L., 2004. Effect of sex on *Coxiella burnetii* infection: protective role of 17beta-estradiol. *J. Infect. Dis.* 189, 339–345. <https://doi.org/10.1086/380798>
- Liu, G., Anderson, C., Scaltreto, H., Barbon, J., Kensil, C.R., 2002. QS-21 structure/function studies: effect of acylation on adjuvant activity. *Vaccine* 20, 2808–2815.
- Longbottom, D., Psarrou, E., Livingstone, M., Vretou, E., 2001. Diagnosis of ovine enzootic abortion using an indirect ELISA (rOMP91B iELISA) based on a recombinant protein fragment of the polymorphic outer membrane protein POMP91B of *Chlamydia abortus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 195, 157–161.
- Longbottom, D., 2003. Chlamydial vaccine development. *J. Med. Microbiol.* <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05093-0>
- Longbottom, D., Coulter, L.J., 2003. Animal chlamydioses and zoonotic implications. *J. Comp. Pathol.* 128, 217–244. <https://doi.org/10.1053/jcpa.2002.0629>
- Longbottom, D., Livingstone, M., 2006. Vaccination against chlamydial infections of man and animals. *Vet. J.* 171, 263–275. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2004.09.006>
- Longbottom, D., Livingstone, M., Maley, S., van der Zon, A., Rocchi, M., Wilson, K., Wheelhouse, N., Dagleish, M., Aitchison, K., Wattedgera, S., Nath, M., Entrican, G., Buxton, D., 2013. Intranasal infection with *Chlamydia abortus* induces dose-dependent latency and abortion in sheep. *PLoS One* 8, e57950. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057950>
- Longbottom, D., Sait, M., Livingstone, M., Laroucau, K., Sachse, K., Harris, S.R., Thomson, N.R., Seth-Smith, H.M.B., 2018. Genomic evidence that the live *Chlamydia abortus* vaccine strain 1B is not attenuated and has the potential to cause disease. *Vaccine* 36, 3593–3598. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.05.042>

- Losel, R., Wehling, M., 2003. Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 46–56. <https://doi.org/10.1038/nrm1009>
- Lü, F.X., Abel, K., Ma, Z., Rourke, T., Lu, D., Torten, J., Mcchesney, M., Miller, C.J., 2002. The strength of B cell immunity in female rhesus macaques is controlled by CD8+ T cells under the influence of ovarian steroid hormones. *Clin. Exp. Immunol.* 128, 10–20. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2002.01780.x>
- Lu, H., Zhong, G., 1999. Interleukin-12 production is required for chlamydial antigen-pulsed dendritic cells to induce protection against live *Chlamydia trachomatis* infection. *Infect. Immun.* 67, 1763–1769.
- Lucero, M.E., Kuo, C.C., 1985. Neutralization of *Chlamydia trachomatis* cell culture infection by serovar-specific monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 50, 595–597.
- Lutter, E.I., Bonner, C., Holland, M.J., Suchland, R.J., Stamm, W.E., Jewett, T.J., McClarty, G., Hackstadt, T., 2010. Phylogenetic analysis of *Chlamydia trachomatis* Tarp and correlation with clinical phenotype. *Infect. Immun.* 78, 3678–3688. <https://doi.org/10.1128/IAI.00515-10>
- Lyte, M., 2004. Microbial endocrinology and infectious disease in the 21st century. *Trends Microbiol.* 12, 14–20.
- Macatonia, S.E., Hosken, N.A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C.S., Culpepper, J.A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K.M., O’Garra, A., 1995. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J. Immunol.* 154, 5071–5079.
- MacMicking, J., Xie, Q.W., Nathan, C., 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 323–350. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.323>
- Maghazachi, A.A., Al-Aoukaty, A., Schall, T.J., 1996. CC chemokines induce the generation of killer cells from CD56+ cells. *Eur. J. Immunol.* 26, 315–319. <https://doi.org/10.1002/eji.1830260207>
- Mainar-Jaime, R.C., de la Cruz, C., Vazquez-Boland, J.A., 1998. Epidemiologic study of chlamydial infection in sheep farms in Madrid, Spain. *Small Rumin. Res.* 28, 131-138.
- Manual terrestre de la OIE. 2012. Aborto Enzoótico de las ovejas (clamidiosis ovina). Capítulo 2.7.7. pp. 1106-1107.
- Maret, A., Coudert, J.D., Garidou, L., Foucras, G., Gourdy, P., Krust, A., Dupont, S., Chambon,

## Bibliografía

- P., Druet, P., Bayard, F., Guery, J.-C., 2003. Estradiol enhances primary antigen-specific CD4 T cell responses and Th1 development in vivo. Essential role of estrogen receptor alpha expression in hematopoietic cells. *Eur. J. Immunol.* 33, 512–521.  
<https://doi.org/10.1002/immu.200310027>
- Martinez, C.M., Buendia, A.J., Sanchez, J., Ortega, N., Caro, M.R., Gallego, M.C., Navarro, J.A., Cuello, F., Salinas, J., 2006. Relative importance of CD4+ and CD8+ T cells in the resolution of *Chlamydia abortus* primary infection in mice. *J. Comp. Pathol.* 134, 297–307. doi:10.1016/j.jcpa.2005.12.002
- Maslow, A.S., Davis, C.H., Choong, J., Wyrick, P.B., 1988. Estrogen enhances attachment of *Chlamydia trachomatis* to human endometrial epithelial cells in vitro. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 159, 1006–1014.
- Matsumoto, A., Manire, G.P., 1970. Electron microscopic observations on the effects of penicillin on the morphology of *Chlamydia psittaci*. *J. Bacteriol.* 101, 278–285.
- Matsumoto, A., 1988. Structural characteristics of chlamydial bodies, En: *Microbiology of Chlamydia*. Barron, A. (Ed.). CRC Press, Boca Raton, 21-45.
- McEwen, A.D., Stamp, J.T., Littlejohn, A.I., 1951. Enzootic abortion in ewes. II. Immunization and infection experiments. *Vet. Rec.* 63, 197–201.
- McKuen, M.J., Dahl, G., Fields, K.A., 2013. Assessing a potential role of host Pannexin 1 during *Chlamydia trachomatis* infection. *PLoS One* 8, e63732.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063732>
- Meghari, S., Bechah, Y., Capo, C., Lepidi, H., Raoult, D., Murray, P.J., Mege, J.-L., 2008. Persistent *Coxiella burnetii* infection in mice overexpressing IL-10: an efficient model for chronic Q fever pathogenesis. *PLoS Pathog.* 4, e23.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0040023>
- Meng, L., Tompkins, M., Miller, M., Fogle, J., 2014. Lentivirus-activated T regulatory cells suppress T helper cell interleukin-2 production by inhibiting nuclear factor of activated T cells 2 binding to the interleukin-2 promoter. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 30, 58–66.  
<https://doi.org/10.1089/AID.2013.0062>
- Menzies, F.M., Henriquez, F.L., Alexander, J., Roberts, C.W., 2011. Selective inhibition and augmentation of alternative macrophage activation by progesterone. *Immunology* 134, 281–291. doi:10.1111/j.1365-2567.2011.03488.x

- Mikloska, Z., Ruckholdt, M., Ghadiminejad, I., Dunckley, H., Denis, M., Cunningham, A.L., 2000. Monophosphoryl lipid A and QS21 increase CD8 T lymphocyte cytotoxicity to herpes simplex virus-2 infected cell proteins 4 and 27 through IFN-gamma and IL-12 production. *J. Immunol.* 164, 5167–5176. doi:10.4049/jimmunol.164.10.5167
- Miller, B.G., Wild, J., Stone, G.M., 1979. Effects of progesterone on the oestrogen-stimulated uterus: a comparative study of the mouse, guinea pig, rabbit and sheep. *Aust. J. Biol. Sci.* 32, 549–560.
- Miller, M.A., Turk, J.R., Nelson, S.L., Van der Lek, A.P., Solorzano, R., Fales, W.H., Morehouse, L.G., Gosser, H.S., 1990. Chlamydial infection in aborted and stillborn lambs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2, 55–58.
- Miller, L., Hunt, J.S., 1996. Sex steroid hormones and macrophage function. *Life Sci.* 59, 1–14.
- Miyaura, H., Iwata, M., 2002. Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesterone and glucocorticoids. *J. Immunol.* 168, 1087–1094.
- Mjihdi, A., Truyens, C., Detournay, O., Carlier, Y., 2004. Systemic and placental productions of tumor necrosis factor contribute to induce fetal mortality in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* 107, 58–64.  
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2004.03.016>
- Moelleken, K., Hegemann, J.H., 2008. The Chlamydia outer membrane protein OmcB is required for adhesion and exhibits biovar-specific differences in glycosaminoglycan binding. *Mol. Microbiol.* 67, 403–419. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06050.x>
- Montes de Oca, R.M., Buendia, A.J., Del Rio, L., Sanchez, J., Salinas, J., Navarro, J.A., 2000a. Polymorphonuclear neutrophils are necessary for the recruitment of CD8(+) T cells in the liver in a pregnant mouse model of *Chlamydia abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1) infection. *Infect. Immun.* 68, 1746–1751.
- Montes de Oca, R., Buendia, A.J., Sanchez, J., Del Rio, L., Seva, J., Navarro, J.A., Salinas, J., 2000b. Limited role of polymorphonuclear neutrophils in a pregnant mouse model of secondary infection by *Chlamydia abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1). *Microb. Pathog.* 29, 319–327. <https://doi.org/10.1006/mpat.2000.0396>
- Moore, T., Ananaba, G.A., Bolier, J., Bowers, S., Belay, T., Eko, F.O., Igietseme, J.U., 2002. Fc receptor regulation of protective immunity against *Chlamydia trachomatis*. *Immunology* 105, 213–221.

## Bibliografia

- Moore, T., Ekworomadu, C.O., Eko, F.O., MacMillan, L., Ramey, K., Ananaba, G.A., Patrickson, J.W., Nagappan, P.R., Lyn, D., Black, C.M., Igietseme, J.U., 2003. Fc receptor-mediated antibody regulation of T cell immunity against intracellular pathogens. *J. Infect. Dis.* 188, 617–624. <https://doi.org/10.1086/377134>
- Morrison, S.G., Su, H., Caldwell, H.D., Morrison, R.P., 2000. Immunity to murine *Chlamydia trachomatis* genital tract reinfection involves B cells and CD4(+) T cells but not CD8(+) T cells. *Infect. Immun.* 68, 6979–6987. <https://doi.org/10.1128/iai.68.12.6979-6987.2000>
- Morrison, S.G., Morrison, R.P., 2001. Resolution of secondary *Chlamydia trachomatis* genital tract infection in immune mice with depletion of both CD4+ and CD8+ T cells. *Infect. Immun.* 69, 2643–2649. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.4.2643-2649.2001>
- Morrison, S.G., Farris, C.M., Sturdevant, G.L., Whitmire, W.M., Morrison, R.P., 2011. Murine *Chlamydia trachomatis* genital infection is unaltered by depletion of CD4 + T cells and diminished adaptive immunity. *J. Infect. Dis.* 203, 1120–1128. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiq176>
- Moulder, J.W., 1991. Interaction of chlamydiae and host cells in vitro. *Microbiol. Rev.* 55, 143–190.
- Moulder, J.W., Hatch, T.P., Kuo, C.C., Schachter, J., Storz, J. 1984. Genus I. *Chlamydia*, Jones, Rake and Stearns 1945. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Krieg, N.J., Ed.), Vol. 1, pp. 729-739. Williams and Wilkins, Baltimore, MD
- Nasar, A., 2006. Hormonal changes in the uterus during pregnancy - lessons from the ewe: a review. *J. Agricul. Rural Develop.* 4, 1-7.
- Navarro, J.A., Garcia de la Fuente, J.N., Sanchez, J., Martinez, C.M., Buendia, A.J., Gutierrez-Martin, C.B., Rodriguez-Ferri, E.F., Ortega, N., Salinas, J., 2004. Kinetics of infection and effects on the placenta of *Chlamydia abortus* in experimentally infected pregnant ewes. *Vet. Pathol.* 41, 498–505. <https://doi.org/10.1354/vp.41-5-498>
- Navarro, J.A., Ortega, N., Buendia, A.J., Gallego, M.C., Martinez, C.M., Caro, M.R., Sanchez, J., Salinas, J., 2009. Diagnosis of placental pathogens in small ruminants by immunohistochemistry and PCR on paraffin-embedded samples. *Vet. Rec.* 165, 175–178.
- Nietfeld, J.C., 2001. Chlamydial infections in small ruminants. *Vet Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 17, 301-314.
- Nikolaevich, K.N., Ivanovich, S.J., Victorovich, S.S., 1991. Major reproduction hormones as

- regulators of cell-to-cell interactions in humoral immune responses. *Brain. Behav. Immun.* 5, 149–161.
- Nweze, I.C., Smith, J.W., Zhang, B., Klinge, C.M., Lakshmanan, J., Harbrecht, B.G., 2012. 17beta-Estradiol attenuates cytokine-induced nitric oxide production in rat hepatocyte. *J. Trauma Acute Care Surg.* 73, 408–412. doi:10.1097/TA.0b013e31825a789b
- Ohtani, M., Garcia, A., Rogers, A.B., Ge, Z., Taylor, N.S., Xu, S., Watanabe, K., Marini, R.P., Whary, M.T., Wang, T.C., Fox, J.G., 2007. Protective role of 17 beta -estradiol against the development of *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer in INS-GAS mice. *Carcinogenesis* 28, 2597–2604. doi:10.1093/carcin/bgm150
- Ohtsuka, Y., Lee, J., Stamm, D.S., Sanderson, I.R., 2001. MIP-2 secreted by epithelial cells increases neutrophil and lymphocyte recruitment in the mouse intestine. *Gut* 49, 526–533.
- Ojcius, D.M., Souque, P., Perfettini, J.L., Dautry-Varsat, A., 1998. Apoptosis of epithelial cells and macrophages due to infection with the obligate intracellular pathogen *Chlamydia psittaci*. *J. Immunol.* 161, 4220–4226.
- Omsland, A., Sager, J., Nair, V., Sturdevant, D.E., Hackstadt, T., 2012. Developmental stage-specific metabolic and transcriptional activity of *Chlamydia trachomatis* in an axenic medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 19781–19785. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212831109>
- Ortega, N., Caro, M.R., Buendia, A.J., Gallego, M.C., Del Rio, L., Martinez, C.M., Nicolas, L., Cuello, F., Salinas, J., 2007. Role of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and NK cells in the protection conferred by different vaccines against *Chlamydia abortus* infection. *Res. Vet. Sci.* 82, 314–322. doi:10.1016/j.rvsc.2006.07.016
- Ortiz, L., Demick, K.P., Petersen, J.W., Polka, M., Rudersdorf, R.A., Van der Pol, B., Jones, R., Angevine, M., DeMars, R., 1996. *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein (MOMP) epitopes that activate HLA class II-restricted T cells from infected humans. *J. Immunol.* 157, 4554–4567.
- Osaka, I., Hefty, P.S., 2014. Lipopolysaccharide-binding alkylpolyamine DS-96 inhibits *Chlamydia trachomatis* infection by blocking attachment and entry. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 3245–3254. <https://doi.org/10.1128/AAC.02391-14>
- Osman, R.A., Andria, M.L., Jones, A.D., Meizel, S., 1989. Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160, 828–833.

## Bibliografia

- Ou, C., Tian, D., Ling, Y., Pan, Q., He, Q., Eko, F.O., He, C., 2013. Evaluation of an ompA-based phage-mediated DNA vaccine against *Chlamydia abortus* in piglets. *Int. Immunopharmacol.* 16, 505–510. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2013.04.027>
- Oxenius, A., Karrer, U., Zinkernagel, R.M., Hengartner, H., 1999. IL-12 is not required for induction of type 1 cytokine responses in viral infections. *J. Immunol.* 162, 965–973.
- Pal, S., Peterson, E.M., de la Maza, L.M., 2005. Vaccination with the *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein can elicit an immune response as protective as that resulting from inoculation with live bacteria. *Infect. Immun.* 73, 8153–8160. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.12.8153-8160.2005>
- Pantchev, A., Sting, R., Bauerfeind, R., Tyczka, J., Sachse, K., 2010. Detection of all *Chlamydomphila* and *Chlamydia* spp. of veterinary interest using species-specific real-time PCR assays. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 33, 473–484. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2009.08.002>
- Papp, J.R., Shewen, P.E., Gartley, C.J., 1993. *Chlamydia psittaci* infection and associated infertility in sheep. *Can. J. Vet. Res.* 57, 185–189.
- Papp, J.R., Shewen, P.E., Gartley, C.J., 1994. Abortion and subsequent excretion of chlamydiae from the reproductive tract of sheep during estrus. *Infect. Immun.* 62, 3786–3792.
- Papp, John R., Shewen, P.E., 1996a. Pregnancy failure following vaginal infection of sheep with *Chlamydia psittaci* prior to breeding. *Infect. Immun.* 64, 1116–1125.
- Papp, J R, Shewen, P.E., 1996b. Localization of chronic *Chlamydia psittaci* infection in the reproductive tract of sheep. *J. Infect. Dis.* 174, 1296–1302. <https://doi.org/10.1093/infdis/174.6.1296>
- Pasley, J.N., Rank, R.G., Hough, A.J.J., Cohen, C., Barron, A.L., 1985. Absence of progesterone effects on chlamydial genital infection in female guinea pigs. *Sex. Transm. Dis.* 12, 155–158.
- Peltier, M.R., Liu, W.J., Hansen, P.J., 2000. Regulation of lymphocyte proliferation by uterine serpin: interleukin-2 mRNA production, CD25 expression and responsiveness to interleukin-2. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 223, 75–81.
- Pelus, L.M., Fukuda, S., 2006. Peripheral blood stem cell mobilization: the CXCR2 ligand GRObeta rapidly mobilizes hematopoietic stem cells with enhanced engraftment properties. *Exp. Hematol.* 34, 1010–1020. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2006.04.004>

- Pennock, J.W., Stegall, R., Bell, B., Vargas, G., Motamedi, M., Milligan, G., Bourne, N., 2009. Estradiol improves genital herpes vaccine efficacy in mice. *Vaccine* 27, 5830–5836. doi:10.1016/j.vaccine.2009.07.052
- Penttila, T., Haveri, A., Tammiruusu, A., Vuola, J.M., Lahesmaa, R., Puolakkainen, M., 2008. Chlamydia pneumoniae infection in IL-10 knock out mice: accelerated clearance but severe pulmonary inflammatory response. *Microb. Pathog.* 45, 25–29. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2008.02.004>
- Perez-Martinez, J.A., Storz, J., 1985. Antigenic diversity of Chlamydia psittaci of mammalian origin determined by microimmunofluorescence. *Infect. Immun.* 50, 905–910.
- Perry, L.L., Feilzer, K., Caldwell, H.D., 1997. Immunity to Chlamydia trachomatis is mediated by T helper 1 cells through IFN-gamma-dependent and -independent pathways. *J. Immunol.* 158, 3344–3352.
- Peterson, E.M., Cheng, X., Pal, S., de la Maza, L.M., 1993. Effects of antibody isotype and host cell type on in vitro neutralization of Chlamydia trachomatis. *Infect. Immun.* 61, 498–503.
- Peterson, R.A., 2012. Regulatory T-Cells: Diverse Phenotypes Integral to Immune Homeostasis and Suppression. *Toxicol. Pathol.* 40, 186–204. <https://doi.org/10.1177/0192623311430693>
- Phillips Campbell, R., Kintner, J., Whittimore, J., Schoborg, R. V, 2012. Chlamydia muridarum enters a viable but non-infectious state in amoxicillin-treated BALB/c mice. *Microbes Infect.* 14, 1177–1185. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.07.017>
- Phillips, D.M., Burillo, C.A., 1998. Ultrastructure of the murine cervix following infection with Chlamydia trachomatis. *Tissue Cell* 30, 446–452.
- Phillips, S., Quigley, B.L., Timms, P., 2019. Seventy Years of Chlamydia Vaccine Research - Limitations of the Past and Directions for the Future. *Front. Microbiol.* 10, 70. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00070>
- Piccinni, M.P., Maggi, E., Romagnani, S., 2000a. Role of hormone-controlled T-cell cytokines in the maintenance of pregnancy. *Biochem. Soc. Trans.* 28, 212–215.
- Piccinni, M.P., Scaletti, C., Maggi, E., Romagnani, S., 2000b. Role of hormone-controlled Th1- and Th2-type cytokines in successful pregnancy. *J. Neuroimmunol.* 109, 30–33.
- Piccinni, M.P., 2002. T-cell cytokines in pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 47, 289–294.

## Bibliografia

- Poiley, S.M., 1960. A systematic method of breeder rotation for non-inbred laboratory colonies. *Proc Anim. Care Panel* 10, 159–166.
- Pospischil, A., Thoma, R., Hilbe, M., Grest, P., Gebbers, J.O., 2002. Abortion in woman caused by caprine *Chlamydia abortus* (*Chlamydia psittaci* serovar 1). *Swiss Med. Wkly.* 132, 64–66. <https://doi.org/2002/05/smw-09911>
- Pospischil, A., Borel, N., Chowdhury, E.H., Guscetti, F., 2009. Aberrant chlamydial developmental forms in the gastrointestinal tract of pigs spontaneously and experimentally infected with *Chlamydia suis*. *Vet. Microbiol.* 135, 147–156. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.035>
- Powrie, F., Menon, S., Coffman, R.L., 1993. Interleukin-4 and interleukin-10 synergize to inhibit cell-mediated immunity in vivo. *Eur. J. Immunol.* 23, 3043–3049. <https://doi.org/10.1002/eji.1830231147>
- Puolakkainen, M., 2013. Laboratory diagnosis of persistent human chlamydial infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3, 99. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00099>
- Ragusa, A., de Carolis, C., dal Lago, A., Miriello, D., Ruggiero, G., Brucato, A., Pisoni, M.P., Muscara, M., Merati, R., Maccario, L., Nobili, M., 2004. Progesterone supplement in pregnancy: an immunologic therapy? *Lupus* 13, 639–642. <https://doi.org/10.1191/0961203304lu2007oa>
- Rahman, A., 2008. Hormonal Changes in the Uterus During Pregnancy - Lessons from the Ewe: A Review. *J. Agric. Rural Develop.* <https://doi.org/10.3329/jard.v4i1.761>
- Rank, R.G., Barron, A.L., 1987. Specific effect of estradiol on the genital mucosal antibody response in chlamydial ocular and genital infections. *Infect. Immun.* 55, 2317–2319.
- Rank, R.G., Ramsey, K.H., Pack, E.A., Williams, D.M., 1992. Effect of gamma interferon on resolution of murine chlamydial genital infection. *Infect. Immun.* 60, 4427–4429.
- Raulston, J.E., 1997. Response of *Chlamydia trachomatis* serovar E to iron restriction in vitro and evidence for iron-regulated chlamydial proteins. *Infect. Immun.* 65, 4539–4547.
- Register, K.B., Morgan, P.A., Wyrick, P.B., 1986. Interaction between *Chlamydia* spp. and human polymorphonuclear leukocytes in vitro. *Infect. Immun.* 52, 664–670.
- Rizzo, A., Paolillo, R., Lanza, A.G., Guida, L., Annunziata, M., Carratelli, C.R., 2008. *Chlamydia pneumoniae* induces interleukin-6 and interleukin-10 in human gingival fibroblasts. *Microbiol. Immunol.* 52, 447–454.

- Rodolakis, A., 1976. [Abortive infection of mice inoculated intraperitoneally with *Chlamydia ovis*]. *Ann. Rech. Vet.* 7, 195–205.
- Rodolakis, A., Souriau, A., 1979. Clinical evaluation of a commercial vaccine against chlamydial abortion of ewes. *Ann. Rech. Vet.* 10, 41–48.
- Rodolakis, A., Souriau, A., 1980. Clinical evaluation of immunity following experimental or natural infection of ewes with *Chlamydia psittaci* (var. *ovis*). *Ann. Rech. Vet.* 11, 215–223.
- Rodolakis, A., Souriau, A., 1983. Response of ewes to temperature-sensitive mutants of *Chlamydia psittaci* (var *ovis*) obtained by NTG mutagenesis. *Ann. Rech. Vet.* 14, 155–161.
- Rodolakis, A., Salinas, J., Papp, J., 1998. Recent advances on ovine chlamydial abortion. *Vet. Res.* 29, 275–288.
- Rodolakis, A., Laroucau, K., 2015. Chlamydiaceae and chlamydial infections in sheep or goats. *Vet. Microbiol.* 181, 107–118. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.010>
- Rodrigues, O.R., Marques, C., Soares-Clemente, M., Ferronha, M.H., Santos-Gomes, G.M., 2009. Identification of regulatory T cells during experimental *Leishmania infantum* infection. *Immunobiology* 214, 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2008.07.001>
- Rosa, H.J.D., Bryant, M.J., 2003. Seasonality of reproduction in sheep. *Small Rumin. Res.* 48, 155–171. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(03\)00038-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0921-4488(03)00038-5)
- Rottenberg, M.E., Gigliotti-Rothfuchs, A., Wigzell, H., 2002. The role of IFN-gamma in the outcome of chlamydial infection. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 444–451.
- Rottenberg, M.E., Gigliotti Rothfuchs, A., Gigliotti, D., Ceausu, M., Une, C., Levitsky, V., Wigzell, H., 2000. Regulation and role of IFN-gamma in the innate resistance to infection with *Chlamydia pneumoniae*. *J. Immunol.* 164, 4812–4818.
- Rowland, S.S., Falkler, W.A.J., Bashirelahi, N., 1992. Identification of an estrogen-binding protein in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 42, 721–727.
- Runge, M., Binder, A., Schotte, U., Ganter, M., 2012. Investigations concerning the prevalence of *Coxiella burnetii* and *Chlamydia abortus* in sheep in correlation with management systems and abortion rate in Lower Saxony in 2004. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 125, 138–143.

## Bibliografia

- Sabat, R., Grutz, G., Warszawska, K., Kirsch, S., Witte, E., Wolk, K., Geginat, J., 2010. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21, 331–344. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2010.09.002>
- Sachse, K., Hotzel, H., Slickers, P., Ellinger, T., Ehricht, R., 2005. DNA microarray-based detection and identification of *Chlamydia* and *Chlamydophila* spp. *Mol. Cell. Probes* 19, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2004.09.005>
- Sachse, K., Vretou, E., Livingstone, M., Borel, N., Pospischil, A., Longbottom, D., 2009. Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. *Vet. Microbiol.* 135, 2–21. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.040>
- Sachse, K., Bavoil, P.M., Kaltenboeck, B., Stephens, R.S., Kuo, C.-C., Rossello-Mora, R., Horn, M., 2015. Emendation of the family Chlamydiaceae: proposal of a single genus, *Chlamydia*, to include all currently recognized species. *Syst. Appl. Microbiol.* 38, 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.12.004>
- Saka, H.A., Thompson, J.W., Chen, Y.-S., Kumar, Y., Dubois, L.G., Moseley, M.A., Valdivia, R.H., 2011. Quantitative proteomics reveals metabolic and pathogenic properties of *Chlamydia trachomatis* developmental forms. *Mol. Microbiol.* 82, 1185–1203. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07877.x>
- Salas, E., Lopez, M.G., Villarroya, M., Sanchez-Garcia, P., De Pascual, R., Dixon, W.R., Garcia, A.G., 1994. Endothelium-independent relaxation by 17- $\alpha$ -estradiol of pig coronary arteries. *Eur. J. Pharmacol.* 258, 47–55.
- Salem, M.L., Hossain, M.S., Nomoto, K., 2000a. Mediation of the immunomodulatory effect of beta-estradiol on inflammatory responses by inhibition of recruitment and activation of inflammatory cells and their gene expression of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ . *Int. Arch. Allergy Immunol.* 121, 235–245. <https://doi.org/10.1159/000024323>
- Salem, M.L., Matsuzaki, G., Kishihara, K., Madkour, G.A., Nomoto, K., 2000b. beta-estradiol suppresses T cell-mediated delayed-type hypersensitivity through suppression of antigen-presenting cell function and Th1 induction. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 121, 161–169. <https://doi.org/10.1159/000024312>
- Salinas, J., Sanchez, J., Buendia, A.J., Souriau, A., Rodolakis, A., Bernabe, A., Cuello, F., 1994. The LPS localization might explain the lack of protection of LPS-specific antibodies in abortion-causing *Chlamydia psittaci* infections. *Res. Microbiol.* 145, 611–620.
- Salinas, J., Souriau, A., Cuello, F., Rodolakis, A., 1995. Antigenic diversity of ruminant

- Chlamydia psittaci* strains demonstrated by the indirect microimmunofluorescence test with monoclonal antibodies. *Vet. Microbiol.* 43, 219–226.
- Salinas, J., Ortega, N., Borge, C., Rangel, M.J., Carbonero, A., Perea, A., Caro, M.R., 2012. Abortion associated with *Chlamydia abortus* in extensively reared Iberian sows. *Vet. J.* 194, 133–134. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.03.002>
- Sammin, D.J., Markey, B.K., Quinn, P.J., McElroy, M.C., Bassett, H.F., 2006. Comparison of fetal and maternal inflammatory responses in the ovine placenta after experimental infection with *Chlamydia abortus*. *J. Comp. Pathol.* 135, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2006.04.005>
- Sammin, D., Markey, B., Bassett, H., Buxton, D., 2009. The ovine placenta and placentitis-A review. *Vet. Microbiol.* 135, 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.054>
- Sandbulte, J., TerWee, J., Wigington, K., Sabara, M., 1996. Evaluation of *Chlamydia psittaci* subfraction and subunit preparations for their protective capacities. *Vet. Microbiol.* 48, 269–282.
- Sandoz, K.M., Rockey, D.D., 2010. Antibiotic resistance in *Chlamydiae*. *Future Microbiol.* 5, 1427–1442. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.96>
- Santiago-Moreno, J., Lopez-Sebastian, A., Gonzalez-Bulnes, A., Gomez-Brunet, A., Chemineau, P., 2000. Seasonal changes in ovulatory activity, plasma prolactin, and melatonin concentrations, in mouflon (*Ovis gmelini musimon*) and Manchega (*Ovis aries*) ewes. *Reprod. Nutr. Dev.* 40, 421–430.
- Sargison, N.D., Truylers, I.G.R., Howie, F.E., Thomson, J.R., Cox, A.L., Livingstone, M., Longbottom, D., 2015. Identification of the 1B vaccine strain of *Chlamydia abortus* in aborted placentas during the investigation of toxæmic and systemic disease in sheep. *N. Z. Vet. J.* 63, 284–287. <https://doi.org/10.1080/00480169.2015.1018365>
- Satoskar, A.R., Rodig, S., Telford, S.R. 3rd, Satoskar, A.A., Ghosh, S.K., von Lichtenberg, F., David, J.R., 2000. IL-12 gene-deficient C57BL/6 mice are susceptible to *Leishmania donovani* but have diminished hepatic immunopathology. *Eur. J. Immunol.* 30, 834–839. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200003\)30:3<834::AID-IMMU834>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200003)30:3<834::AID-IMMU834>3.0.CO;2-9)
- Scapini, P., Lamagna, C., Hu, Y., Lee, K., Tang, Q., DeFranco, A.L., Lowell, C.A., 2011. B cell-derived IL-10 suppresses inflammatory disease in Lyn-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, E823–32. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107913108>

## Bibliografia

- Schachter, J., Banks, J., Sugg, N., Sung, M., Storz, J., Meyer, K.F., 1974. Serotyping of Chlamydia. I. Isolates of ovine origin. *Infect. Immun.* 9, 92–94.
- Schachter, J., Banks, J., Sugg, N., Sung, M., Storz, J., Meyer, K.F., 1975. Serotyping of Chlamydia: isolates of bovine origin. *Infect. Immun.* 11, 904–907.
- Schall, T.J., Bacon, K., Toy, K.J., Goeddel, D. V, 1990. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* 347, 669–671.  
<https://doi.org/10.1038/347669a0>
- Schoborg, R. V, 2011. Chlamydia persistence -- a tool to dissect chlamydia--host interactions. *Microbes Infect.* 13, 649–662. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.03.004>
- Schramm, N., Bagnell, C.R., Wyrick, P.B., 1996. Vesicles containing Chlamydia trachomatis serovar L2 remain above pH 6 within HEC-1B cells. *Infect. Immun.* 64, 1208–1214.
- Shaw, E.I., Dooley, C.A., Fischer, E.R., Scidmore, M.A., Fields, K.A., Hackstadt, T., 2000. Three temporal classes of gene expression during the Chlamydia trachomatis developmental cycle. *Mol. Microbiol.* 37, 913–925.
- Shemer, Y., Sarov, I., 1985. Inhibition of growth of Chlamydia trachomatis by human gamma interferon. *Infect. Immun.* 48, 592–596.
- Siarkou, V., Lambropoulos, A.F., Chrisafi, S., Kotsis, A., Papadopoulos, O., 2002. Subspecies variation in Greek strains of Chlamydia abortus. *Vet. Microbiol.* 85, 145–157.
- Skipp, P.J.S., Hughes, C., McKenna, T., Edwards, R., Langridge, J., Thomson, N.R., Clarke, I.N., 2016. Quantitative Proteomics of the Infectious and Replicative Forms of Chlamydia trachomatis. *PLoS One* 11, e0149011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149011>
- Souriau, A., Bosseray, N., Rodolakis, A., Lantier, F., Plommet, M., 1988. Anti-chlamydial immunity in ewes conferred by vaccination with a combination of three live chlamydia, brucella and salmonella vaccines. *Vet. Rec.* 123, 12,29-32.
- Srivastava, P.K., Menoret, A., Basu, S., Binder, R.J., McQuade, K.L., 1998. Heat shock proteins come of age: primitive functions acquire new roles in an adaptive world. *Immunity* 8, 657–665.
- Stamp, J.T., McEwen, A.D., Watt, J.A.A., Nisbet, D.I., 1950. Enzootic abortion in ewes; transmission of the disease. *Vet. Rec.* 62, 251–254.
- Stephens, R.S., Sanchez-Pescador, R., Wagar, E.A., Inouye, C., Urdea, M.S., 1987. Diversity of

- Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes. *J. Bacteriol.* 169, 3879–3885.
- Stephens, R.S., Kalman, S., Lammel, C., Fan, J., Marathe, R., Aravind, L., Mitchell, W., Olinger, L., Tatusov, R.L., Zhao, Q., Koonin, E. V, Davis, R.W., 1998. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science* 282, 754–759.
- Stevens, M.P., Twin, J., Fairley, C.K., Donovan, B., Tan, S.E., Yu, J., Garland, S.M., Tabrizi, S.N., 2010. Development and evaluation of an *ompA* quantitative real-time PCR assay for *Chlamydia trachomatis* serovar determination. *J. Clin. Microbiol.* 48, 2060–2065. <https://doi.org/10.1128/JCM.02308-09>
- Strom, J.O., Theodorsson, A., Ingberg, E., Isaksson, I.-M., Theodorsson, E., 2012. Ovariectomy and 17beta-estradiol replacement in rats and mice: a visual demonstration. *J. Vis. Exp.* e4013. doi:10.3791/4013
- Su, H., Caldwell, H.D., 1991. In vitro neutralization of *Chlamydia trachomatis* by monovalent Fab antibody specific to the major outer membrane protein. *Infect. Immun.* 59, 2843–2845.
- Su, H., Raymond, L., Rockey, D.D., Fischer, E., Hackstadt, T., Caldwell, H.D., 1996. A recombinant *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein binds to heparan sulfate receptors on epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 11143–11148.
- Suchland, R.J., Sandoz, K.M., Jeffrey, B.M., Stamm, W.E., Rockey, D.D., 2009. Horizontal transfer of tetracycline resistance among *Chlamydia* spp. in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 4604–4611. <https://doi.org/10.1128/AAC.00477-09>
- Sugarman, B., Mummaw, N., 1990. Oestrogen binding by and effect of oestrogen on trichomonads and bacteria. *J. Med. Microbiol.* 32, 227–232. <https://doi.org/10.1099/00222615-32-4-227>
- Summersgill, J.T., Sahney, N.N., Gaydos, C.A., Quinn, T.C., Ramirez, J.A., 1995. Inhibition of *Chlamydia pneumoniae* growth in HEp-2 cells pretreated with gamma interferon and tumor necrosis factor alpha. *Infect. Immun.* 63, 2801–2803.
- Swanson, A.F., Kuo, C.C., 1994. Binding of the glycan of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* to HeLa cells. *Infect. Immun.* 62, 24–28.
- Takeda, K., Kishimoto, T., Akira, S., 1997. STAT6: its role in interleukin 4-mediated biological

## Bibliografia

- functions. *J. Mol. Med. (Berl)*. 75, 317–326.
- Tan, I.J., Peeva, E., Zandman-Goddard, G., 2015. Hormonal modulation of the immune system - A spotlight on the role of progestogens. *Autoimmun. Rev.* 14, 536–542.  
<https://doi.org/10.1016/j.autrev.2015.02.004>
- Taraborrelli, S., 2015. Physiology, production and action of progesterone. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 94 Suppl 1, 8–16. <https://doi.org/10.1111/aogs.12771>
- Thomson, N.R., Yeats, C., Bell, K., Holden, M.T.G., Bentley, S.D., Livingstone, M., Cerdeno-Tarraga, A.M., Harris, B., Doggett, J., Ormond, D., Mungall, K., Clarke, K., Feltwell, T., Hance, Z., Sanders, M., Quail, M.A., Price, C., Barrell, B.G., Parkhill, J., Longbottom, D., 2005. The *Chlamydomonas abortus* genome sequence reveals an array of variable proteins that contribute to interspecies variation. *Genome Res.* 15, 629–640.  
<https://doi.org/10.1101/gr.3684805>
- Ting, L.M., Hsia, R.C., Haidaris, C.G., Bavoil, P.M., 1995. Interaction of outer envelope proteins of *Chlamydia psittaci* GPIC with the HeLa cell surface. *Infect. Immun.* 63, 3600–3608.
- Togari, C. 1927. On the ovulation of the mouse. *Nagoya J. Med. Sci.* 2: 17-50.
- Trautman, M.S., Collmer, D., Edwin, S.S., White, W., Mitchell, M.D., Dudley, D.J., 1997. Expression of interleukin-10 in human gestational tissues. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 4, 247–253.
- Trinchieri, G., 1995. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13, 251–276. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.13.040195.001343>
- Tsuyuguchi, K., Suzuki, K., Matsumoto, H., Tanaka, E., Amitani, R., Kuze, F., 2001. Effect of oestrogen on *Mycobacterium avium* complex pulmonary infection in mice. *Clin. Exp. Immunol.* 123, 428–434. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2001.01474.x>
- Turhan, A., Lin, M., Lee, G.S., Miele, L.F., Tsuda, A., Konerding, M.A., Mentzer, S.J., 2009. Vascular microarchitecture of murine colitis-associated lymphoid angiogenesis. *Anat. Rec. (Hoboken)*. 292, 621–632. <https://doi.org/10.1002/ar.20902>
- Valls Ortiz, M., 1983. Frequent lambing of sheep flocks in Spain: productivity and management consequences. *Livest. Prod. Sci.* 10, 49–58. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0301-6226\(83\)90006-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0301-6226(83)90006-4)

- van Den Broek, M., Bachmann, M.F., Kohler, G., Barner, M., Escher, R., Zinkernagel, R., Kopf, M., 2000. IL-4 and IL-10 antagonize IL-12-mediated protection against acute vaccinia virus infection with a limited role of IFN-gamma and nitric oxide synthetase 2. *J. Immunol.* 164, 371–378.
- van den Brom, R., Lievaart-Peterson, K., Luttikholt, S., Peperkamp, K., Wouda, W., Vellema, P., 2012. Abortion in small ruminants in the Netherlands between 2006 and 2011. *Tijdschr. Diergeneeskd.* 137, 450–457.
- van der Veen, R.C., 2001. Nitric oxide and T helper cell immunity. *Int. Immunopharmacol.* 1, 1491–1500.
- Van Lent, S., Creasy, H.H., Myers, G.S.A., Vanrompay, D., 2016. The Number, Organization, and Size of Polymorphic Membrane Protein Coding Sequences as well as the Most Conserved Pmp Protein Differ within and across Chlamydia Species. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 26, 333–344. <https://doi.org/10.1159/000447092>
- Van Snick, J., 1990. Interleukin-6: an overview. *Annu. Rev. Immunol.* 8, 253–278. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.08.040190.001345>
- Vasilevsky, S., Stojanov, M., Greub, G., Baud, D., 2016. Chlamydial polymorphic membrane proteins: regulation, function and potential vaccine candidates. *Virulence* 7, 11–22. <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1111509>
- Vats, V., Agrawal, T., Salhan, S., Mittal, A., 2007. Primary and secondary immune responses of mucosal and peripheral lymphocytes during Chlamydia trachomatis infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 49, 280–287. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00196.x>
- Vermeulen, M., Pazos, P., Lanari, C., Molinolo, A., Gamberale, R., Geffner, J.R., Giordano, M., 2001. Medroxyprogesterone acetate enhances in vivo and in vitro antibody production. *Immunology* 104, 80–86.
- Verthelyi, D., Petri, M., Ylamus, M., Klinman, D.M., 2001. Disassociation of sex hormone levels and cytokine production in SLE patients. *Lupus* 10, 352–358. <https://doi.org/10.1191/096120301674365881>
- Vora, G.J., Stuart, E.S., 2003. A Role for the glycolipid exoantigen (GLXA) in chlamydial infectivity. *Curr. Microbiol.* 46, 217–223. <https://doi.org/10.1007/s00284-002-3843-1>
- Vretou, E., Loutrari, H., Mariani, L., Costelidou, K., Eliades, P., Conidou, G., Karamanou, S.,

## Bibliografia

- Mangana, O., Siarkou, V., Papadopoulos, O., 1996. Diversity among abortion strains of *Chlamydia psittaci* demonstrated by inclusion morphology, polypeptide profiles and monoclonal antibodies. *Vet. Microbiol.* 51, 275–289.
- Vretou, E., Psarrou, E., Kaisar, M., Vlisidou, I., Salti-Montesanto, V., Longbottom, D., 2001. Identification of protective epitopes by sequencing of the major outer membrane protein gene of a variant strain of *Chlamydia psittaci* serotype 1 (*Chlamydomphila abortus*). *Infect. Immun.* 69, 607–612. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.1.607-612.2001>
- Walder, G., Hotzel, H., Brezinka, C., Gritsch, W., Tauber, R., Wurzner, R., Ploner, F., 2005. An unusual cause of sepsis during pregnancy: recognizing infection with *chlamydomphila abortus*. *Obstet. Gynecol.* 106, 1215–1217. <https://doi.org/10.1097/01.AOG.0000161060.69470.9c>
- Walters, E. 2007. Comparative reproductive physiology of domestic animals., In: *Comparative reproductive biology*. Schatten, H., Constantinescu, G. (Eds.). Blackwell Publishing, Oxford, 117-131.
- 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. <https://doi.org/10.1111/aji.12168>
- Webley, W.C., Vora, G.J., Stuart, E.S., 2004. Cell surface display of the chlamydial glycolipid exoantigen (GLXA) demonstrated by antibody-dependent complement-mediated cytotoxicity. *Curr. Microbiol.* 49, 13–21. <https://doi.org/10.1007/s00284-003-4181-7>
- Weinberg, A., Enomoto, L., Marcus, R., Canniff, J., 2011. Effect of menstrual cycle variation in female sex hormones on cellular immunity and regulation. *J. Reprod. Immunol.* 89, 70–77. [doi:10.1016/j.jri.2010.11.009](https://doi.org/10.1016/j.jri.2010.11.009)
- Weinstein, Y., Ran, S., Segal, S., 1984. Sex-associated differences in the regulation of immune responses controlled by the MHC of the mouse. *J. Immunol.* 132, 656–661.
- Wheelhouse, N., Aitchison, K., Laroucau, K., Thomson, J., Longbottom, D., 2010. Evidence of *Chlamydomphila abortus* vaccine strain 1B as a possible cause of ovine enzootic abortion. *Vaccine* 28, 5657–5663. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.04.114>
- Wheelhouse, N.M., Sait, M., Aitchison, K., Livingstone, M., Wright, F., McLean, K., Inglis, N.F., Smith, D.G.E., Longbottom, D., 2012. Processing of *Chlamydia abortus* polymorphic membrane protein 18D during the chlamydial developmental cycle. *PLoS*

- One 7, e49190. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049190>
- Whitten, W.K., 1956. Modification of the oestrous cycle of the mouse by external stimuli associated with the male. *J. Endocrinol.* 13, 399–404.
- Whitten, W.K., Bronson, F.H., Greenstein, J.A., 1968. Estrus-inducing pheromone of male mice: transport by movement of air. *Science* 161, 584–585.
- Williams, D.M., Byrne, G.I., Grubbs, B., Marshal, T.J., Schachter, J., 1988. Role in vivo for gamma interferon in control of pneumonia caused by *Chlamydia trachomatis* in mice. *Infect. Immun.* 56, 3004–3006.
- Williams, D.M., Grubbs, B.G., Pack, E., Kelly, K., Rank, R.G., 1997. Humoral and cellular immunity in secondary infection due to murine *Chlamydia trachomatis*. *Infect. Immun.* 65, 2876–2882.
- Wilsmore, A.J., Izzard, K.A., Dagnall, G.J., Wilsmore, B.C., Woodland, R.M., 1990a. Protection of ewes vaccinated with A22 strain *Chlamydia psittaci* (ovis) against challenge in pregnancy with homologous and heterologous strains of the organism. *Br. Vet. J.* 146, 349–353.
- Wilsmore, A.J., Izzard, K.A., Wilsmore, B.C., Dagnall, G.J., 1990b. Breeding performance of sheep infected with *Chlamydia psittaci* (ovis) during their preceding pregnancy. *Vet. Rec.* 126, 40–41.
- Wolpe, S.D., Sherry, B., Juers, D., Davatelis, G., Yurt, R.W., Cerami, A., 1989. Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 612–616.
- Woods, M.L. 2nd, Mayer, J., Evans, T.G., Hibbs, J.B.J., 1994. Antiparasitic effects of nitric oxide in an in vitro murine model of *Chlamydia trachomatis* infection and an in vivo murine model of *Leishmania major* infection. *Immunol. Ser.* 60, 179–195.
- Wyrick, P.B., 2010. *Chlamydia trachomatis* persistence in vitro: an overview. *J. Infect. Dis.* 201 Suppl, S88-95. <https://doi.org/10.1086/652394>
- Xin, L., Li, Y., Soong, L., 2007. Role of interleukin-1beta in activating the CD11c(high) CD45RB- dendritic cell subset and priming *Leishmania amazonensis*-specific CD4+ T cells in vitro and in vivo. *Infect. Immun.* 75, 5018–5026.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.00499-07>
- Yang, X., HayGlass, K.T., Brunham, R.C., 1996. Genetically determined differences in IL-10

## Bibliografia

- and IFN-gamma responses correlate with clearance of *Chlamydia trachomatis* mouse pneumonitis infection. *J. Immunol.* 156, 4338–4344.
- Yilma, A.N., Singh, S.R., Fairley, S.J., Taha, M.A., Dennis, V.A., 2012. The anti-inflammatory cytokine, interleukin-10, inhibits inflammatory mediators in human epithelial cells and mouse macrophages exposed to live and UV-inactivated *Chlamydia trachomatis*. *Mediators Inflamm.* 2012, 520174. <https://doi.org/10.1155/2012/520174>
- Yoshimoto, T., Takahama, Y., Wang, C.R., Yoneto, T., Waki, S., Nariuchi, H., 1998. A pathogenic role of IL-12 in blood-stage murine malaria lethal strain *Plasmodium berghei* NK65 infection. *J. Immunol.* 160, 5500–5505.
- Young, W.C., 1941. Observations and Experiments on Mating Behavior in Female Mammals (Concluded). *Q. Rev. Biol.* 16, 311–335.
- You, H.J., Kim, J.Y., Jeong, H.G., 2003. 17 beta-estradiol increases inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303, 1129–1134. doi:10.1016/s0006-291x(03)00477-7
- Yui, J., Garcia-Lloret, M., Wegmann, T.G., Guilbert, L.J., 1994. Cytotoxicity of tumour necrosis factor-alpha and gamma-interferon against primary human placental trophoblasts. *Placenta* 15, 819–835.
- Zhang, F., Li, S., Yang, J., Yang, L., He, C., 2009. Induction of a protective immune response against swine *Chlamydia abortus* infection in mice following co-vaccination of omp-1 DNA with recombinant MOMP. *Zoonoses Public Health* 56, 71–76. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01160.x>
- Zheng, W., Wang, Q.-H., Feng, H., Liu, J., Meng, H.-R., Cao, Y.-M., 2009. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells prevent the development of Th1 immune response by inhibition of dendritic cell function during the early stage of *Plasmodium yoelii* infection in susceptible BALB/c mice. *Folia Parasitol. (Praha)*. 56, 242–250.
- Zugel, U., Kaufmann, S.H., 1999. Immune response against heat shock proteins in infectious diseases. *Immunobiology* 201, 22–35.

**ANEXOS**

## 1. COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO Y TAMPONES

### Medio de cultivo para células McCoy (pH 7)

Medio esencial mínimo de Eagle (MEM) en agua destilada suplementado con:

- |                                |           |
|--------------------------------|-----------|
| - Suero fetal bovino           | 10%       |
| - Glutamina                    | 292 mg/l  |
| - Piruvato de sodio            | 100 mM    |
| - Gentamicina                  | 500 µg/l  |
| - Anfotericina B               | 2500 µg/l |
| - Extracto de levadura         | 1 g/l     |
| - Glucosa anhidra              | 3,7 g/l   |
| - Bicarbonato sódico           | 4,06 g/l  |
| - Hidrolizado de lactoalbúmina | 5 g/l     |

Esterilizado por filtración (0,22 µm).

### Solución de tripsina (pH 7,2)

- |            |        |
|------------|--------|
| - PBS      | 1 l    |
| - Tripsina | 2,5 g  |
| - EDTA     | 0,25 g |

Esterilizado por filtración (0,22 µm).

## Anexos

### **Solución Azul Tripán (pH 7,2)**

- NaCl	0,81 g
- KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,66 g
- Azul tripán	0,4 g
- Agua destilada	100 ml

Se calentó hasta hervir. Esterilizado por filtración (0,45 µm).

### **PBS (pH 7,2)**

- NaCl	7,65 g
- KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,27 g
- Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	0,724 g
- Agua destilada	1 l

Esterilizado en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

### **PBS-DEAE-Dextrano (pH 7,2) (100x)**

- PBS	100 ml
- DEAE-dextrano	1 g

Esterilizado por filtración (0,22 µm).

### **PBS-Glicerol (pH 8,6)**

Se preparó mezclando 9 partes de glicerol (Sigma) con una de PBS.

El pH se ajustó con NaOH 1N. Conservado a 4°C.

**Tampón Tris (TB) (pH 7,6)**

- Trizma base 0,97 g
- Trizma HCl (Sigma) 6,61 g
- Agua destilada 1 l

**Tampón Tris-Salino (TBS) (pH 7,6)**

A un litro de TB se le añadieron 8,5 g de NaCl.

**Tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) (pH 8,0) (5x)**

- Tris (Trizma® base, Sigma) 0,81 g
- Ácido bórico 27,5 g
- EDTA pH 8,0; 0,5M 20 ml
- Agua destilada 1 l

El tampón TBE se utilizó a una concentración de 1x, preparada en el momento de su utilización con agua destilada.

**Tampón carbonato/bicarbonato (pH 9,6)**

- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1,59 g
- NaCO<sub>3</sub>H 3,93 g
- NaN<sub>3</sub> 200 mg
- Agua destilada 1 l

Preparar en el momento de su uso y guardar a 4°C no más de una semana.

## 2. LISTA DE ABREVIATURAS

**ABC:** Avidina-biotina-peroxidasa

**Ac:** Anticuerpo

**AcMo:** Anticuerpo monoclonal

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**AEO:** Aborto enzoótico ovino

**Ag:** Antígeno

**CA:** Cuerpo aberrante

**CD4<sup>+</sup>:** Antígeno superficial de los linfocitos T colaboradores

**CD8<sup>+</sup>:** Antígeno superficial de los linfocitos T citotóxicos

**CE:** Cuerpo elemental

**CI:** Cuerpo intermedio

**CMH:** Complejo mayor de histocompatibilidad

**COMC:** Complejo de la membrana externa clamidial

**CPA:** Células presentadoras de antígeno

**CR:** Cuerpo reticular

**DBA:** Diaminobencidina

**DEAE-D:** Dietilaminoetil dextrano

**DEPC:** Dietilpilocarbonato

**DO:** Densidad óptica

**E2:** Estradiol

**ELISA:** Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

**FSH:** Hormona foliculoestimulante

**IDO:** Indolamina 2,3-dioxigenasa

**iNOS:** Sintetasa de óxido nítrico inducible

**IFI:** Inmunofluorescencia indirecta

**IFN- $\gamma$ :** Interferón gamma

**Ig:** Inmunoglobulina

**IL:** Interleuquina

**LH:** hormona luteinizante

**LPS:** Lipopolisacárido

**MEM:** Medio esencial mínimo de Eagle

**MiP-2:** *Macrophage inflammatory protein 2-alpha*

**MOMP:** Proteína principal de la membrana externa

**NK:** Células asesinas naturales

**OIE:** Organización Mundial de Sanidad Animal

**P4:** Progesterona

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**Pi:** Posinfección

**PBS:** Solución tampón fosfato

**PMN:** Polimorfonucleares (neutrófilos)

**RANTES:** *Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*

**SAI:** Servicio de Apoyo a la Investigación

**TBE:** Tampón Tris-borato-EDTA

**TBS:** Tampón Tris salino

**Th:** Linfocitos T colaboradores

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa

**UFIs:** Unidades formadoras de inclusiones

## SUMMARY AND CONCLUSIONS



### 1. SUMMARY

The obligate intracellular bacterium *Chlamydia abortus* (*C. abortus*) is a causative agent of enzootic ovine abortion (OEA). The symptomatology of this disease is not observed until the bacteria colonizes the placenta, eventually causing the abortion. Infected animals become carriers that will spread the bacteria in the following estruses. This process of latency active/multiplication suggests that the female sex hormones, estradiol and progesterone hormones might play an important role in the physiopathology of OEA, affecting the success of chlamydial clearance and also jeopardising the effectiveness of vaccination. However, the mechanisms through which sex hormones are involved in chlamydial pathogenicity remain unclear. The aim of the present doctoral thesis, therefore, was to determine the effect of sex hormones, 17 $\beta$ -estradiol and progesterone, on the kinetics of *C. abortus*-induced infection and immune response in murine and ovine experimental models.

For this purpose, ovariectomized animals treated with the proposed hormones were used in order to analyse the effect induced by estradiol and progesterone during infection. We monitorise the morbidity and possible changes in infection kinetics showed by animals. The histopathological alterations induced by *C. abortus* were also analysed, as well as the characteristics of the innate and acquired immune response generated after the infection. Likewise, the effect of hormones at the time of immunization was analysed using a previously contrasted inactivated experimental vaccine in order to investigate possible changes in vaccine-inducing phase of immunity. Besides, we analyse the effect of estradiol and progesterone at the time of infection on previously vaccinated animals in order to study how the female sex hormones aforementioned on the effector phase of vaccine-inducing immunity. On the other hand, in the ovine model, the same parameters were analysed as in the murine models but only under the administration of progesterone. European legal barriers in the use of 17 $\beta$ -estradiol in farm animals, avoid us the employment of this hormone. However, this fact give us the opportunity to bring this trial closer to real situations in the farm environment such as the synchronization of oestrus by the application of progestins-impregnated commercial vaginal sponges.

The results indicate that, under the experimental conditions established in murine models, estradiol favours the resolution of a first infection by *C. abortus*, while progesterone does not significantly interfere with the resolution and the immune response generated after it.

However, in the murine model, estradiol and progesterone do not affect the protection conferred by an experimental inactivated vaccine against *C. abortus* when it is administered in days close to infection. However, estradiol promotes the protection conferred by this vaccine when it is administered in days close to vaccination, while progesterone weakens immune response elicited by the vaccine when it is also administered in days close to vaccination. On the other hand, in the ovine experimental model used, treatment with progesterone during vaccination with an experimental inactivated vaccine against *C. abortus* increases its protective effect and minimizes the severity of the lesions of the infection, increasing the presence of Treg lymphocytes, which does not block the development of an effective memory immune response induced by vaccination.

## 2. CONCLUSIONS

**1.** Under the experimental conditions established in this study in the murine model used, estradiol favours the resolution of a primoinfection by *C. abortus*, being associated with a greater presence of T lymphocytes, while progesterone does not interfere significantly in the resolution and the generated immune response.

**2.** Estradiol and progesterone administered in days close to infection do not affect the protection conferred by an experimental inactivated vaccine against *C. abortus* in the murine model used.

**3.** In the murine experimental model used in our study, estradiol, administered in days close to vaccination, enhances the protective effect of an experimental inactivated vaccine against *C. abortus*, while progesterone weakens the protective immune response when administered under the same conditions.

**4.** In the experimental sheep model used, treatment with progesterone during vaccine immunization reduces the severity of *C. abortus* lesions.

**5.** Progesterone increases the protective effect of an experimental inactivated vaccine against *C. abortus* in the sheep model used, but this is not related to the production of specific antibodies against *C. abortus*.

## Summary and conclusions

**6.** In the ovine model, progesterone increases the presence of Treg lymphocytes, which prevent a possible excessive innate immune response, thus preventing the formation of lesions, but does not block the development of an effective memory immune response induced by vaccination.

**7.** The contradictory results obtained between the two experimental models used in this study in relation to the immune response against *C. abortus* and that generated during vaccination indicate that the most suitable model for the study of the effect of hormones on both processes is the ovine model, as it is closer to biological reality.

# RESUMEN

## 1. RESUMEN

La bacteria intracelular obligada *Chlamydia abortus* (*C. abortus*), es una el agente causal del aborto enzoótico ovino (AEO). La sintomatología de esta enfermedad no se observa hasta que la bacteria coloniza la placenta, causando finalmente el aborto. Los animales infectados se convierten en portadores que diseminarán la bacteria en los siguientes estros. Este proceso de latencia/multiplicación activa, sugiere que las hormonas sexuales de la hembra, estradiol y progesterona podrían desempeñar un papel importante en la fisiopatología del AEO, afectando a la resolución de la infección clamidial y también a la eficacia de la vacunación. Sin embargo, los mecanismos a través los cuales las hormonas sexuales de la hembra afectan a la infección por *C. abortus* no se han estudiado en profundidad. Así pues, el objetivo principal de esta tesis doctoral, ha sido analizar el efecto de las hormonas sexuales,  $17\beta$ -estradiol y progesterona, sobre la cinética de la infección y la respuesta inmunitaria inducida por *C. abortus* en modelos experimentales murinos y ovinos.

Para ello, se utilizaron animales ovariectomizados tratados con las hormonas propuestas y se analizó el efecto inducido por las mismas durante la infección, controlando su morbilidad y los posibles cambios en su curso (cinética de la infección). También se analizaron las alteraciones histopatológicas inducidas por *C. abortus*, así como las características de la respuesta inmunitaria, tanto innata como adquirida generada tras la infección. Igualmente, se analizó el efecto de las hormonas en el momento de la inmunización con una vacuna experimental previamente contrastada (fase inductora de la inmunidad vacunal) y su efecto en el momento de la infección de animales vacunados (fase efectora de la inmunidad vacunal). Por otra parte, en el modelo ovino, se analizaron los mismos parámetros que en los modelos murinos pero sólo bajo la administración de progesterona, dados los impedimentos legales del uso del  $17\beta$ -estradiol en animales de abasto, y con la perspectiva de acercar la experiencia a situaciones reales en el entorno ganadero como pueden ser la sincronización de celo mediante la aplicación de esponjas vaginales con progestágenos.

Los resultados indican que, bajo las condiciones experimentales establecidas en los modelos murinos, el estradiol favorece la resolución de una primoinfección por *C. abortus*, mientras que la progesterona no interfiere de manera significativa en la resolución y en la respuesta inmunitaria generada tras ella. Sin embargo, en este modelo murino, las hormonas sexuales de la hembra no afectan a la protección conferida por una vacuna inactivada

## Resumen

experimental frente a *C. abortus* cuando son administradas en días próximos a la infección, pero sí cuando se administran en días próximos a la vacunación, teniendo el estradiol un efecto potenciador y la progesterona debilitador de la respuesta inmunitaria vacunal. Por otro lado, en el modelo experimental ovino utilizado, el tratamiento con progesterona durante la inmunización vacunal con una vacuna inactivada experimental frente a *C. abortus*, aumenta el efecto protector de la misma y minimiza la gravedad de las lesiones de la infección, incrementando la presencia de linfocitos Treg, que no bloquea el desarrollo de una respuesta inmunitaria de memoria efectiva inducida por la vacunación.