



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Influencia de la Penicilina y de las Hormonas Sexuales 17 Beta-estradiol y Progesterona sobre la Infección por *Chlamydia abortus* en Líneas Celulares de Endometrio y Trofoblasto de Origen Ovino

D. Daniel Álvarez Sánchez
2018

El presente trabajo ha sido desarrollado para optar al grado de Doctor en el Programa Oficial de Doctorado “Ciencias Veterinarias”. Asimismo se propone para Mención de Doctorado Internacional en virtud de las estancias predoctorales realizadas en el Instituto de Patogénesis Molecular, Friedrich-Loeffler-Institut (Jena, Alemania) bajo la supervisión de la Dra. Christiane Schnee, con una duración total de cuatro meses.

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación, como parte del proyecto “Papel del estradiol y la progesterona en la infección por *Chlamydia abortus* en modelos murinos y ovinos: influencia sobre la eficacia de la vacunación” (AGL2013-45868-R). El doctorando ha disfrutado de una beca-contrato predoctoral de la Universidad de Murcia (R.- 269/2014) y de dos ayudas para estancias en el extranjero para beneficiarios del programa de contratos predoctorales FPU de la Universidad de Murcia.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que directa o indirectamente han contribuido a que esta tesis salga adelante y vea la luz al final del proceso de aprendizaje y crecimiento que han supuesto para mí los últimos cinco años. Y en especial:

A mis directores, los doctores Jesús Salinas y María Rosa Caro, por su inestimable dedicación, criterio y motivación. Ha sido un privilegio poder contar con su guía y ayuda, tanto en lo profesional como en lo personal.

A la Dra. Nieves Ortega, quien me enseñó a dar mis primeros pasos en el laboratorio. Por compartir conmigo su buen hacer, por enseñarme lo que es capacidad de trabajo y esfuerzo. Por hacer siempre gala de ese optimismo que le caracteriza, incluso en el peor de los momentos. Me llevo tus lecciones y te dejo mi admiración.

A los profesores de los departamentos de Sanidad Animal y de Histología y Anatomía Patológica, concretamente al Dr. Francisco Cuello, Dra. María del Carmen Gallego, Dr. Antonio J. Buendía, Dra. Laura del Río y Dr. José A. Navarro por sus enseñanzas y por compartir su amplia experiencia y valiosos puntos de vista que de una forma u otra han enriquecido este trabajo y a mí mismo.

Al personal no docente, en el que incluyo a Guillermo, el técnico más rockanrolero, y a todos los alumnos internos, de grado y máster que han pasado por el departamento aportándonos siempre algo positivo.

A los magníficos profesionales de las Secciones de Cultivo de Tejidos, Microscopía y Biología Molecular del Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Murcia, por su excelente trabajo técnico, su amabilidad y sus consejos para afrontar cualquier problema metodológico surgido a lo largo de esta tesis.

A los doctores Christiane Schnee, Konrad Sachse y al resto del grupo de trabajo “Clamidas y Micoplasmas” del Friedrich-Loeffler-Institut, por permitirme ser partícipe de su trabajo y testigo de la calidad científica que les hace ser punteros en este campo, pero sobre todo por su afecto y su hospitalidad. Herzlichen Dank.

A los doctores Joe Arosh y David Longbottom por la cesión de dos de las líneas celulares utilizadas en este estudio.

Finalmente, en lo personal, debo dar las gracias a mi familia y amigos, especialmente a mis padres Martín y María Dolores, por su confianza y apoyo incondicional en todos los sentidos y por permitirme ser parte de su orgullo.

A Antonio Murcia, mi compañero de cueva y de fatigas. Por ser el apoyo diario imprescindible sin el cual esto hubiera sido mucho más difícil. Por su autenticidad, su fantástico sentido del humor y por todos los momentos que han hecho que una relación de trabajo haya evolucionado hasta convertirse en una gran amistad.

A mis amigos, habitantes de Infernalía, por ser capaces de generar, cada vez que nos reunimos, un espacio de distensión y risas con poderes realmente terapéuticos sobre mí. Un espacio al que retirarse para tomar perspectiva y donde ser feliz resulta fácil. Gracias por haber sido un pilar de vital importancia en estos cinco años.

A María José, mi *mujer de verde*, perdón y gracias. Perdón por hacerte única testigo y víctima colateral de los costes invisibles de esta tesis, y gracias por tu paciencia infinita, por cuidarme cada día y por estar siempre ahí para rescatarme en las malas rachas. Gracias por ser la mejor persona que conozco.

*“Nada está perdido si se tiene el valor de proclamar
que todo está perdido y hay que empezar de nuevo”*

- Julio Cortázar -

ÍNDICE

I. REVISION BIBLIOGRÁFICA.....	1
1. Taxonomía del orden <i>Chlamydiales</i>	3
1.1. Antecedentes históricos	3
1.2. Clasificación actual	5
1.3. <i>Chlamydia abortus</i>	6
2. Ciclo de desarrollo	7
2.1. Generalidades	7
2.2. Cuerpo elemental.....	10
2.2.1. Estructura	10
2.2.2. Adhesión y penetración en la célula hospedadora.....	11
2.3. Diferenciación primaria. Expresión temprana de genes.....	12
2.4. Cuerpo reticular	14
2.4.1. Estructura	14
2.4.2. Multiplicación bacteriana. Expresión de genes en la fase intermedia del ciclo.....	14
2.5. Diferenciación secundaria. Expresión tardía de genes	16
2.6. Infección crónica. Persistencia	18
2.7. Liberación de la célula hospedadora	22
3. El aborto enzoótico ovino.....	22
3.1. Características generales	22
3.2. Patogenia y manifestaciones clínicas	23
3.3. Diagnóstico.....	25
3.4. Prevención y control.....	25
3.4.1. Manejo	26
3.4.2. Antibioterapia	26
3.4.3. Vacunación	26
4. Esteroides sexuales femeninos	29
4.1. Generalidades y mecanismos de acción	29
4.2. Estrógenos	31
4.3. Progestágenos	33

4.4. Papel de las hormonas sexuales en la interacción patógeno-célula hospedadora.....	35
4.4.1. Modulación de las respuestas inmunes.....	35
4.4.2. Efecto de las hormonas sexuales sobre infecciones bacterianas	37
4.4.3. Modelos celulares utilizados para el estudio de la influencia de hormonas en el desarrollo de infecciones clamidiales <i>in vitro</i>	39
4.4. Ciclo estral y gestación en la oveja	40

II. PLANTEAMIENTO DE HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 45

III. MATERIAL Y MÉTODOS 51

1. Microorganismo.....53

1.1. Cultivo y producción de <i>C. abortus</i> en saco vitelino de embrión de pollo	53
1.2. Titulación de suspensiones de <i>C. abortus</i> en células McCoy	54
1.2.1. Células McCoy	54
1.2.2. Infección del tapiz celular	55
1.2.3. Valoración del título de <i>C. abortus</i> por inmunofluorescencia indirecta...55	

2. Metodología común empleada en cultivos celulares56

2.1. Descongelación y puesta en cultivo	56
2.2. Recuento y estimación de viabilidad	56
2.3. Subcultivo de líneas continuas creciendo en monocapa	57
2.4. Control de la susceptibilidad a la infección	58
2.4.1. Infección del tapiz celular	58
2.4.2. Inmunofluorescencia indirecta.....	58
2.5. Congelación	58

3. Influencia de la penicilina y las hormonas en el establecimiento de un estado de infección persistente sobre diferentes líneas celulares59

3.1. Líneas celulares	59
3.1.1. LE	59
3.1.2. AH-1	60
3.2. Diseño experimental	60

3.2.1. Preparación de los cultivos celulares	60
3.2.2. Preparación y tratamientos de hormonas y penicilina	61
3.2.3. Infección de los cultivos tratados	62
3.2.4. Recogida de muestras	63
3.2.4.1. Sobrenadantes y ADN	63
3.2.4.2. ARN.....	63
3.2.4.3. Células	64
3.3. Estudio del efecto de la penicilina y las hormonas en la multiplicación clamidial.....	64
3.3.1. Aislamiento de <i>C. abortus</i>	65
3.3.2. Real-time q-PCR	65
3.4. Estudio ultraestructural	66
3.4.1. Fijación de las muestras	66
3.4.2. Deshidratación e inclusión en resina EPON	66
3.4.3. Cortes semifinos y ultrafinos y valoración de los resultados	67
3.5. Estudio de la expresión relativa de genes	67
3.5.1. Selección de genes y diseño y optimización de primers	67
3.5.2. Retrotranscripción	69
3.5.3. Real-time q-PCR	70
3.5.4. Cuantificación relativa de la expresión génica	71

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 73

1. Susceptibilidad de las líneas celulares a la infección por *C. abortus*75

2. Influencia de la penicilina, el estradiol y la progesterona en la multiplicación clamidial77

2.1. Efectos sobre el desarrollo de las inclusiones: IFI	78
2.2. Efectos sobre la multiplicación: aislamiento de CE a partir de sobrenadantes ..	81
2.3. Efectos sobre la multiplicación: cuantificación del ADN clamidial mediante Real-time q-PCR	83

3. Influencia de la penicilina y las hormonas en el establecimiento de un estado de infección persistente sobre las líneas celulares LE y AH-1	84
3.1. Identificación por MET de formas relacionadas con el estado de persistencia clamidial en cultivos tratados con hormonas y penicilina.....	84
3.2. Estudio de la expresión relativa de genes relacionados con el ciclo de desarrollo de <i>C. abortus</i>	93
4. Discusión general: resumen	100
V. CONCLUSIONES	105
VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS	109
VII. BIBLIOGRAFÍA	123
IV.ANEXOS	143
ANEXO I: Composición de los medios de cultivo y soluciones tamponadoras	145
ANEXO II: Abreviaturas.....	147
ANEXO III: Producción científica derivada de esta Tesis.....	149

**REVISIÓN
BIBLIOGRÁFICA**

1. Taxonomía del orden *Chlamydiales*

1.1. Antecedentes históricos

En los últimos cien años, la detección y el estudio de patógenos intracelulares, incluyendo las clamidias, ha visto una gran evolución. Sin embargo, las enfermedades causadas por este tipo de patógenos ya eran conocidas durante siglos. Tanto es así, que se encuentran referencias a una enfermedad compatible con el tracoma en un antiguo manuscrito egipcio, el papiro Ebers, redactado cerca del año 1500 a. C. Posteriormente, tratados médicos griegos e indios demuestran que el tracoma ha “cegado” a la humanidad desde la antigüedad (Dawson, 2009).

La primera descripción moderna de los organismos que hoy conocemos como clamidias fue publicada en 1907 por Halberstädter y von Prowazek, quienes observaron inclusiones intracitoplasmáticas durante el ciclo de replicación del agente del tracoma a partir de raspados conjuntivales (Budai, 2007). En 1930, a raíz de un brote epidémico de psitacosis, se aisló por primera vez el agente causal de esta enfermedad y se estableció su papel etiológico (Bedson *et al.*, 1930). En la siguiente década se describió el ciclo de desarrollo del agente de la psitacosis y se detectaron organismos de naturaleza similar en distintos órganos de varias especies animales (revisado en Rodolakis y Mohamad, 2010).

En 1945, el término “Chlamydia” (del griego, *chlamys*, capa) aparece por primera vez en la bibliografía, aunque aún se seguirían utilizando otros nombres como Bedsonia o Miyagawanella entre otros (Budai, 2007). Sin embargo, la naturaleza de estos agentes patógenos no estuvo clara hasta finales de los años 60. En un principio fueron considerados como virus por su incapacidad de crecer fuera de una célula hospedadora, y luego como organismos intermedios entre virus y bacterias. El cultivo de estos agentes en saco vitelino de embriones de pollo (Yanamura y Meyer, 1941) permitió llevar a cabo estudios que demostrarían que dichos agentes eran organismos procariontes que parasitaban células eucariotas (Moulder, 1966).

La clasificación de las clamidias ha sido objeto de controversia y sufrió continuas modificaciones a lo largo de la historia hasta que en 1971, Storz y Page propusieron el nuevo orden *Chlamydiales*, con un solo género, *Chlamydia*, caracterizado por su ciclo de desarrollo intracelular único. Este género contenía solo dos

especies, *Chlamydia psittaci* y *Chlamydia trachomatis*, aunque a lo largo de los años 80 y 90, nuevas familias, géneros y especies fueron reconocidos (Budai, 2007).

En 1999 se realizó una nueva clasificación del orden *Chlamydiales* basada en el análisis genético de las subunidades 16S y 23S del ARNr (Everett *et al.*, 1999). Esta clasificación dividía al orden *Chlamydiales* en cuatro familias, y la familia *Chlamydiaceae*, a su vez, en dos géneros: *Chlamydia* y *Chlamydophila*. La familia *Chlamydia* contenía a las especies *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia suis* y *Chlamydia muridarum*. La familia *Chlamydophila* contenía a las especies *Chlamydophila pecorum*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci* y tres nuevas especies anteriormente consideradas serotipos de *C. psittaci*: *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila caviae* y *Chlamydophila felis*. Los mismos autores que propusieron esta nueva clasificación publicaron dos años más tarde árboles filogenéticos construidos a partir del análisis de otros cinco genes: *ompA*, *ompB*, *omcA*, *groEL* y *kdtA*, los cuales codifican importantes proteínas de membrana y citoplasma presentes en todas las especies clamidiales (Bush y Everett, 2001). Con estos análisis los autores reafirmaban la separación de la familia *Chlamydiaceae* en dos géneros, así como el ascenso a categoría de especie de los tres antiguos serotipos de *Chlamydia psittaci*.

La clasificación propuesta por Everett despertó desde un principio una gran controversia entre otros investigadores de este campo (Schachter *et al.*, 2001); éstos no creían que los datos obtenidos por los citados autores fueran suficientes para crear el nuevo género *Chlamydophila*. La controversia duró más de una década, en la que algunos autores usaban la nomenclatura *Chlamydophila*, mientras que otros continuaron utilizando la de *Chlamydia* para referirse a las mismas especies. La oposición de estos últimos a la división de la familia en dos géneros se basaba en tres líneas argumentales (Sachse *et al.*, 2015):

- Los umbrales de identidad de secuencias del gen *16S rRNA* propuestos anteriormente o usados para otros taxones bacterianos no separan consistentemente las géneros *Chlamydia* y *Chlamydophila*.
- Los genomas de los miembros de la familia *Chlamydiaceae* son muy similares, y los valores POCP (porcentaje de proteínas conservadas) entre miembros de ambos géneros son considerablemente más altos que aquellos entre miembros de otros géneros bacterianos.

- No hay características fenotípicas claras que distingan las especies de *Chlamydia* y las de *Chlamydophila*.

Poco a poco, la mayoría de grupos de investigación abogaron por la reunificación del género *Chlamydia* (Schachter *et al.*, 2001; Stephens *et al.*, 2009; Bavoil *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta lo anterior, el Manual Bergey de Bacteriología Sistemática, que es una referencia en taxonomía bacteriana, propone en su última edición eliminar *Chlamydophila* como género y transferir todas las especies del género *Chlamydophila* al género *Chlamydia* (Kuo *et al.*, 2011). Por tanto, la especie objeto de este estudio será nombrada en adelante como *Chlamydia abortus*.

1.2. Clasificación actual

En la actualidad, el orden *Chlamydiales* (filo *Chlamydiae* y clase *Chlamydiia*) se compone de ocho familias (Wheelhouse y Longbottom, 2012): *Chlamydiaceae*, *Clavichlamydiaceae*, *Criblamydiaceae*, *Parachlamydiaceae*, *Piscichlamydiaceae*, *Rhabdochlamydiaceae*, *Simkaniaceae* y *Waddliaceae*.

Todas las bacterias incluidas en este orden tienen en común su pequeño tamaño, una pared celular Gram negativa carente de peptidoglicano, ausencia de flagelos, un desarrollo intracelular obligado y un ciclo bifásico, característico y único entre los procariontes, con dos formas bien diferenciadas: una infectiva y otra reproductiva (Kuo *et al.*, 2011).

De las ocho familias que integran el orden, la familia *Chlamydiaceae* es la que tiene mayor interés desde el punto de vista de la Salud Pública, ya que contiene bacterias patógenas para el ser humano y los animales, mientras que los microorganismos de las otras familias tienen como hospedadores principalmente a invertebrados, peces y plantas. Como se ha mencionado anteriormente, la familia *Chlamydiaceae* está compuesta por un solo género: *Chlamydia*, que engloba a 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* (Figura 1).

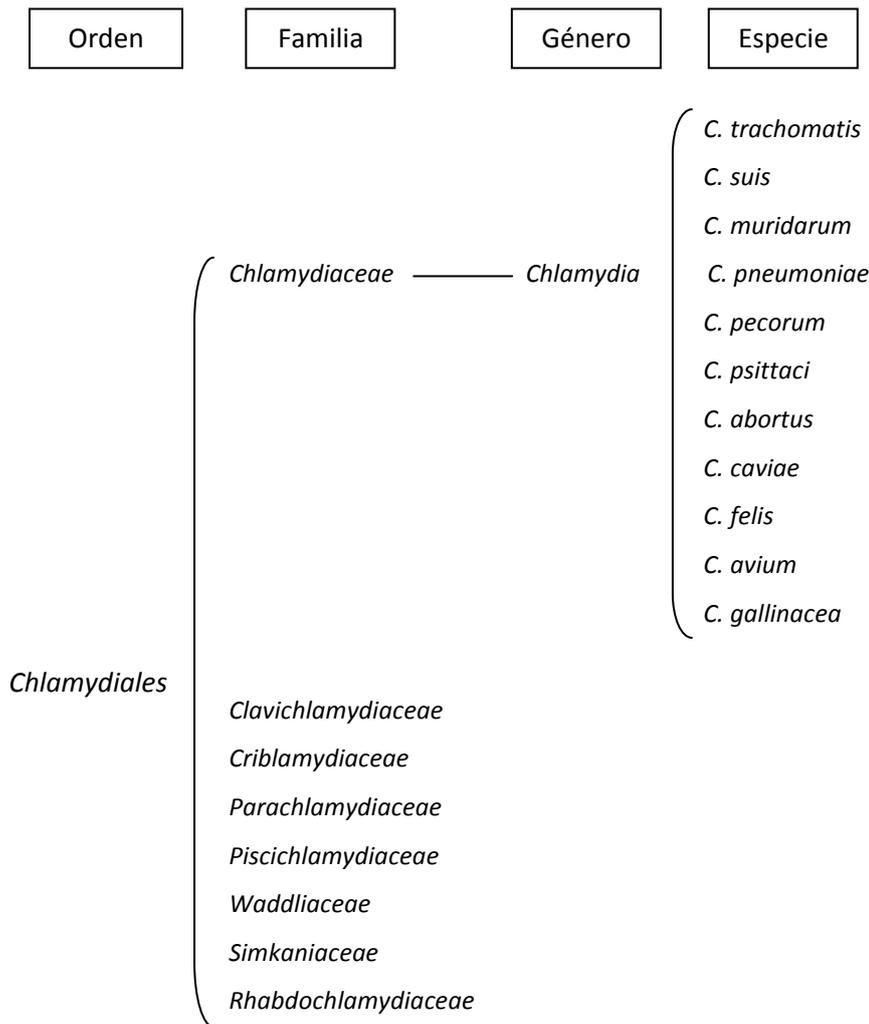


Figura 1. Taxonomía del orden *Chlamydiales*

1.3. *Chlamydia abortus*

Esta especie, anteriormente conocida como serotipo 1 de *Chlamydia psittaci* (Schachter *et al.*, 1974) y como *Chlamydophila abortus* (Everett *et al.*, 1999), incluye cepas causantes de abortos, principalmente en ganado ovino y caprino, aunque también en bovino (Blumer *et al.*, 2011) y porcino (Salinas *et al.*, 2012). Aunque el aborto es el signo clínico más evidente de la infección por *C. abortus*, esta bacteria también se ha asociado con casos de epididimitis, artritis, conjuntivitis y neumonía (Rodolakis y Laroucau, 2015). Además, también hay que tener en cuenta el riesgo zoonótico que representa, sobre todo para mujeres embarazadas en áreas rurales (Rodolakis y

Mohamad, 2010), en las que puede causar abortos y septicemia grave (Pospischil *et al.*, 2002; Walder *et al.*, 2005) tras la inhalación de aerosoles infecciosos.

La proporción de rebaños infectados por *C. abortus* de forma enzoótica y subclínica es alta. Un estudio de prevalencia en 95 rebaños llevado a cabo en Alemania entre 2004 y 2005 reveló seropositividad en el 54.7% de los rebaños estudiados (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). En España, la infección por *C. abortus* también presenta una prevalencia alta en las regiones donde se ha estudiado (Mainar-Jaime *et al.*, 1998; Navarro *et al.*, 2009).

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*.

Un avance importante en el campo de la investigación de *C. abortus* se produjo en 2005, cuando se publicó la secuencia genómica completa de este microorganismo (Thomson *et al.*, 2005), lo que supuso una valiosa herramienta para estudios posteriores.

2. Ciclo de desarrollo

2.1. Generalidades

Las bacterias del orden *Chlamydiales* son organismos intracelulares obligados, es decir, no pueden multiplicarse fuera de las células hospedadoras ya que necesitan obtener de ellas los compuestos energéticos y los intermediarios metabólicos para la

síntesis de sus propios ácidos nucleicos y proteínas. Lo que distingue a las clamidias de otras bacterias intracelulares obligadas es que su crecimiento está asociado a un ciclo de desarrollo bifásico único entre los procariotas (figura 2), en el que se puede apreciar cómo dos formas morfológicamente distintas de clamidia se alternan: 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, y por eso se estudian en su contexto.

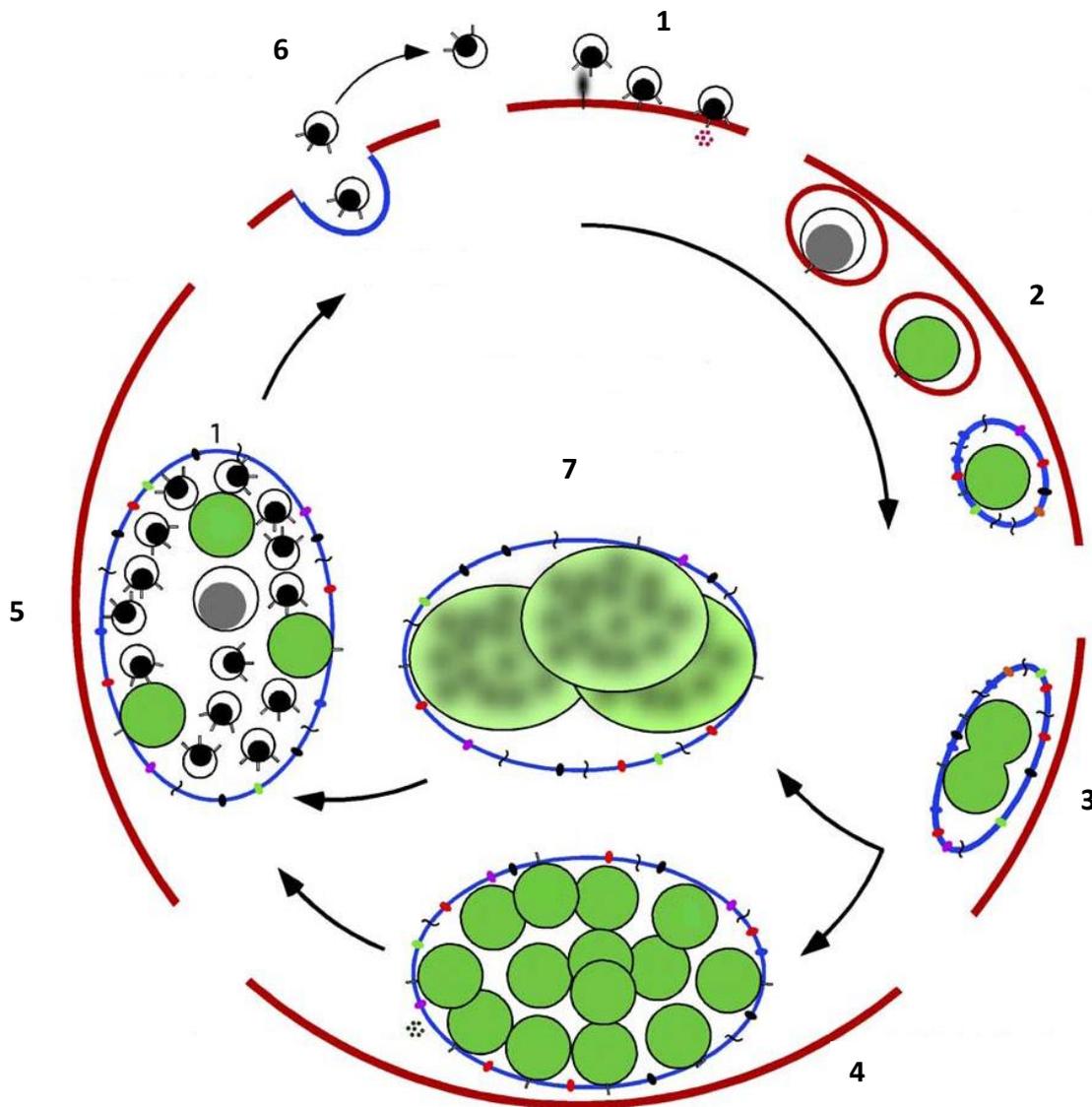


Figura 2. Ciclo de desarrollo clamidial. 1. Adhesión y penetración en la célula hospedadora; 2. Diferenciación primaria (CE → CR); 3. División de los CR; 4. Multiplicación de CR y expansión de la inclusión clamidial; 5. Diferenciación secundaria (CR → CE); 6. Liberación de los CE; 7. Desarrollo de cuerpos aberrantes (CA) (persistencia). Adaptado de Abdelrahman y Belland, 2005.

Los CE son la forma extracelular, metabólicamente inactiva e infecciosa, cuya capacidad de adhesión y penetración en células eucariotas permite la diseminación de la infección entre células susceptibles. Tras la infección, los CE son internalizados en vacuolas llamadas inclusiones intracitoplasmáticas. En ellas, los CE se diferencian en CR, que son la forma metabólicamente activa, y se multiplican repetidas veces mediante fisión binaria hasta que, entre 48 y 72 horas post-infección, se produce la rediferenciación a CE. A continuación, la inclusión y la célula hospedadora se lisan, liberándose gran cantidad de CE que infectarán a las células adyacentes, iniciándose de nuevo el ciclo (Abdelrahman y Belland, 2005).

Bajo la acción de factores como el IFN- γ , ciertos antibióticos como la penicilina o la privación de factores nutricionales esenciales como el triptófano, el ciclo normal de desarrollo se ve interrumpido y aparecen unos cuerpos reticulares anormales también denominados cuerpos aberrantes (CA), incapaces de reorganizarse en CE (Hogan *et al.*, 2004). El efecto de estos factores inductores de los CA es reversible, ya que cuando se eliminan, los CA se diferencian a CE normales. Los CA permanecen en el interior de la célula como agentes infecciosos latentes y se han asociado con la presencia de recidivas en las clamidiosis crónicas y a la dificultad de la eliminación total del microorganismo.

Dada la gran variedad de hospedadores y de enfermedades asociadas que producen las distintas especies del orden *Chlamydiales*, este ciclo de desarrollo es la característica principal que las une como grupo taxonómico. La disponibilidad de secuencias completas de genomas así como los últimos avances en biología celular y molecular han permitido mejorar nuestro conocimiento del ciclo clamidial. Sin embargo, aunque esta información se suele generalizar para todos los miembros del orden *Chlamydiales*, hay que asumir la limitación de que gran parte de los estudios que se citan a continuación se han realizado únicamente sobre el miembro mejor estudiado del orden: *Chlamydia trachomatis*, y no se han demostrado en todas las especies de clamidia.

2.2. Cuerpo elemental

2.2.1. Estructura

Al microscopio electrónico de transmisión se puede observar que los CE son partículas esféricas de pequeño tamaño (0.2-0.3 μm de diámetro), en cuyo interior se aprecia un nucleoide electrodenso, además de material amorfo moderadamente electrodenso (figura 3) (Matsumoto, 1988). Se han descrito dos proteínas responsables de la compactación del nucleoide en los CE, con una actividad similar a la de las histonas en células eucariotas, son la Hc1 y la Hc2, codificadas por los genes *hctA* y *hctB* respectivamente (Brickman *et al.*, 1993). La membrana externa que rodea a los CE se conoce como COMC (de las siglas en inglés *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, y las proteínas ricas en cisteína OmcA y OmcB (Caldwell *et al.*, 1981). También forman

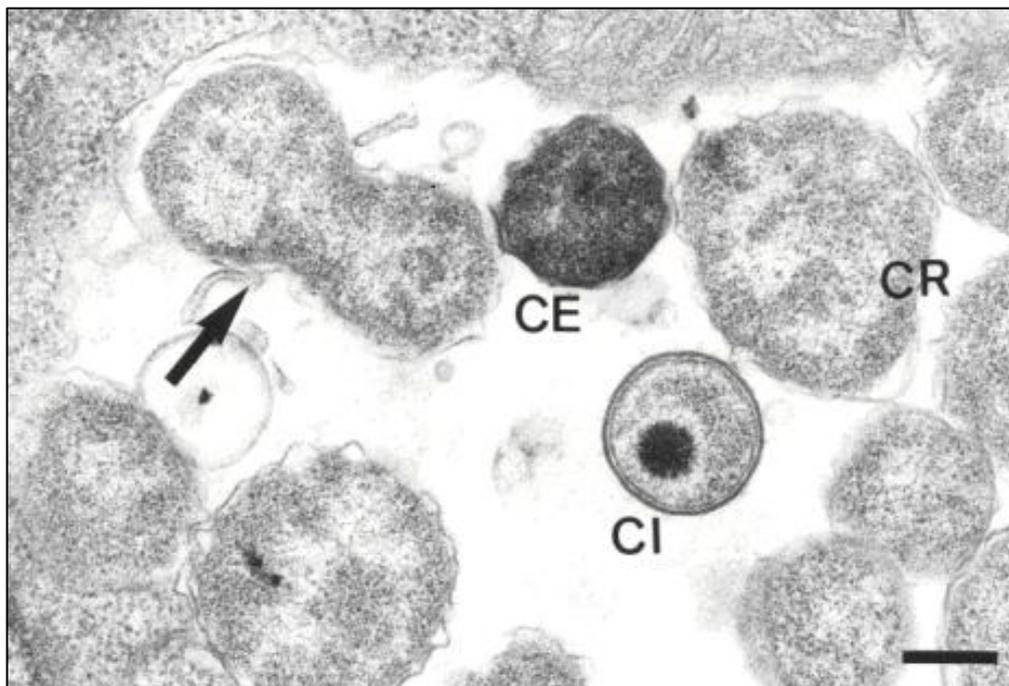


Figura 3. Electronografía de las diferentes formas clamidiales. Cuerpo elemental (CE), cuerpo intermedio (CI) y cuerpo reticular (CR), uno de ellos en fisión binaria (flecha). Barra: 0,25 μm .

parte del COMC las proteínas polimórficas de membrana (Pmp), 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. 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). Recientemente se ha descrito morfológicamente en la superficie de CE de *C. abortus* la presencia de proyecciones compatibles con un sistema de secreción tipo III (T3SS) mediante técnicas de tomografía crioelectrónica (Wilkat *et al.*, 2014).

2.2.2. Adhesión y penetración en la célula hospedadora

Como organismos parásitos intracelulares obligados, las clamidias han desarrollado sistemas de adhesión y entrada a la célula hospedadora elaborados y posiblemente redundantes. Tradicionalmente se ha considerado al CE como un elemento prácticamente inerte que jugaba un papel pasivo en el ciclo de desarrollo clamidial, con un rango de actividad limitado a la adhesión a la célula hospedadora, seguida de la internalización. Sin embargo, estudios de genómica y proteómica realizados en la última década han puesto en duda este concepto y sugieren que los CE clamidiales pueden ser también metabólicamente activos (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).

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). Algunas de las moléculas por parte de la bacteria que participan en el proceso de adhesión son el lipooligosacárido (LOS), MOMP, OmpA, OmcB, Hsp70 y la familia de proteínas Pmp (Becker y Hegemann, 2014; Hegemann y Moelleken, 2012; Osaka y Hefty, 2014). 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 glicosaminoglicanos tipo heparán sulfato de la célula (Su *et al.*, 1996; Moelleken y Hegemann, 2008). Esto explica que la adición de policationes 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 EB 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), secretada por el T3SS, que interactúa con el citoesqueleto de actina a varios niveles. Esta proteína ha sido detectada en la cara citoplasmática de la membrana celular estando los CE en la cara externa, lo que confirma la presencia de un T3SS funcional en los CE. Además, la proteína TarP 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 internalizadas, las clamidias modifican las propiedades de la incipiente inclusión intracitoplasmática retrasando su maduración y manteniéndola en las etapas tempranas de la vía endocítica (Hackstadt, 1999), para evitar así su fusión con lisosomas. Este fenómeno no ocurre cuando la célula infectada es un neutrófilo (PMN). Los PMN sí son capaces de formar fagolisosomas, lo que los convierte en una pieza fundamental de la primera línea de defensa contra la infección clamidial (Buendia *et al.*, 1999).

2.3. Diferenciación primaria. Expresión temprana de genes

Tras penetrar en la célula, la inclusión clamidial es transportada inmediatamente utilizando el sistema de microtúbulos de la célula hospedadora a la región perinuclear de la misma, manteniéndose cerca del aparato de Golgi, donde se fusiona con vesículas que contienen esfingomielina (Hackstadt *et al.*, 1996), colesterol (Carabeo *et al.*, 2003) y otros lípidos de origen eucariota que serán necesarios para la

replicación, el crecimiento y estabilidad de la membrana de la inclusión, la reactivación del estado de persistencia y para la rediferenciación de CR a CE (Elwell y Engel, 2012).

Dos horas después de que la bacteria entre en la célula ya son apreciables cambios morfológicos en la misma (Shaw *et al.*, 2000). La transcripción de genes comienza menos de una hora post-infección (hpi), aunque la descondensación del cromosoma no es completa hasta las 6-8 hpi (Belland *et al.*, 2003a). Este proceso comienza con la síntesis de un metabolito que trunca la unión entre la proteína similar a histonas Hc1 y el ADN (Grieshaber *et al.*, 2004). Shaw *et al.* (2000) propusieron clasificar los genes de *C. trachomatis* según el momento en que se expresaban a lo largo del ciclo de desarrollo en: genes de expresión temprana (1-2 hpi), intermedia (3-18 hpi) y tardía (20-48 hpi). Este tipo de expresión en “oleadas” está regulado por el producto del gen de expresión temprana *euo*, un regulador que se encarga de reprimir la transcripción de genes de expresión tardía previniendo su expresión prematura. De esta forma prevendría la diferenciación de CR a CE antes de que se hayan producido suficientes ciclos de replicación (Rosario y Tan, 2012; Rosario *et al.*, 2014). El gen *euo* está conservado en todo el género *Chlamydia*. Otros genes importantes de expresión temprana son los que codifican proteínas asociadas a la inclusión (*inc*), cuyos transcritos se encuentran en la célula 2 hpi (Scidmore-Carlson *et al.*, 1999). Las proteínas Inc son translocadas por el T3SS y se localizan en la cara citosólica de la membrana de la inclusión y se cree que su función es interactuar con proteínas de la célula hospedadora. La primera en ser descrita, IncA, fue aislada gracias a su inmunogenicidad, ya que los anticuerpos frente a esta proteína se encontraban de forma abundante en sueros de cobayas enfermas (Rockey *et al.*, 1995). Desde entonces se han encontrado homólogos de IncA en todas las especies de la familia *Chlamydiaceae* y se ha demostrado que juega un papel controlando la fusión de inclusiones y la interacción entre la inclusión y otros compartimentos celulares (Hackstadt *et al.*, 1999; Delevoye *et al.*, 2008). Utilizando herramientas bioinformáticas se han identificado otras muchas proteínas Inc potenciales (72 en el caso de *C. abortus*) (Dehoux *et al.*, 2011), sin embargo, pocas han sido estudiadas funcionalmente.

Belland *et al.* (2003a) identificaron en total 29 genes de expresión temprana en *C. trachomatis* serotipo D, incluyendo los ya mencionados *euo* e *inc*. En general, sugieren que los genes expresados durante la diferenciación primaria sirven a dos

propósitos principalmente: la adquisición de nutrientes y la modificación de la inclusión para prevenir su fusión con lisosomas.

2.4. Cuerpo reticular

2.4.1. Estructura

El CR (figura 3) es la forma intracelular, sin capacidad infecciosa y metabólicamente activa, producto de la diferenciación del CE. Posee forma esférica y tiene mayor diámetro (0,5-1 μm) que el CE (Matsumoto, 1988). En su interior se aprecia un material nuclear fibrilar muy poco denso en el centro de la partícula, y una gran cantidad de ribosomas hacia la periferia, lo que le da un aspecto granular y denota una intensa actividad biosintética. Los CR están envueltos por 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). Su superficie también está provista de proyecciones compatibles con la estructura de aguja del T3SS, al igual que las encontradas en los CE, pero en el caso de los CR se encuentran en mayor cantidad (Matsumoto, 1982).

Al observar una inclusión al ME es frecuente encontrar CR alargados con dos zonas de baja densidad a los electrones separadas (segregación nuclear) y una constricción central (figura 3), signo de división por fisión binaria. A veces pueden aparecer dos células hijas con membrana plasmática propia, pero una pared celular común, sin septación aparente (Eb *et al.*, 1976).

2.4.2. Multiplicación bacteriana. Expresión de genes en la fase intermedia del ciclo

A partir de las 10 – 16 hpi la mayor parte de los CR se encuentran en alguna fase de división (tiempo de duplicación de 2-3 horas); el número de bacterias se encuentra en crecimiento exponencial. 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, normalmente a las 48 – 72 hpi, 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 hpi las inclusiones ya son lo suficientemente grandes como para ser vistas en un microscopio de contraste de fases (Kuo *et al.*, 2011).

Los miembros del orden *Chlamydiales* tienen un mecanismo de división atípico por dos motivos. En primer lugar carecen de un homólogo de la proteína *ftsZ*, el organizador de la maquinaria citocinética en la gran mayoría de bacterias (Margolin, 2005) y en segundo lugar, en su pared celular no se ha detectado la estructura típica de peptidoglicano mediante técnicas convencionales, lo cual resulta paradójico ya que las clamidias codifican en su genoma un set completo de enzimas para sintetizarlo y además son sensibles a antibióticos que actúan sobre la síntesis de peptidoglicano, como la penicilina (Moulder, 1993). En la mayoría de bacterias son estas dos moléculas, la proteína *ftsZ* y el peptidoglicano, las responsables de orientar la envoltura celular hacia una estructura anular en el plano de división que conducirá finalmente a la fusión de membranas y la separación de la célula en división en dos células hijas (Jacquier *et al.*, 2015). Por lo tanto, las clamidias tienen que usar estrategias alternativas para coordinar este proceso. Algunos estudios recientes han contribuido a esclarecer esta “anomalía clamidial”. Utilizando una nueva tecnología basada en el marcaje metabólico de peptidoglicano mediante sondas que incorporan aminoácidos modificados se ha detectado la presencia de esta macromolécula en el septo de CR en división (Liechti *et al.*, 2014), lo que indica que el peptidoglicano sí juega un papel en la división bacteriana, aunque luego no forme parte de la pared celular. Las funciones que desempeña el peptidoglicano en la pared de la mayoría de bacterias son asumidas por la red de proteínas ricas en aminoácidos azufrados en el caso de clamidia. También se ha encontrado en el plano de división un homólogo de la actina, la proteína MreB y su regulador RodZ (también conocido como CT009) de forma dependiente a precursores del peptidoglicano (Kemege *et al.*, 2015), lo que compensaría funcionalmente la ausencia de *ftsZ*. Estos estudios proporcionan evidencia de que las clamidias sí sintetizan peptidoglicano, el cual además es necesario para la multiplicación.

La información sobre análisis de expresión de genes en esta fase del ciclo es escasa, pero los estudios existentes coinciden en que los CR poseen una actividad transcripcional muy intensa entre las 8 y las 24 hpi, coincidiendo con la multiplicación bacteriana (Belland *et al.*, 2003a; Nicholson *et al.*, 2003). Belland *et al.* (2003a) clasificaron la expresión temporal de genes en temprana, media y tardía. Aunque su estudio se centra en genes de expresión temprana y tardía, afirmaron que, virtualmente, todos los genes del cromosoma de *C. trachomatis* se expresaban en algún momento del ciclo, por lo que el microorganismo tendría escasa o nula capacidad facultativa, lo cual es de esperar en un patógeno intracelular obligado con un genoma pequeño. Nicholson *et al.* (2003) hicieron una clasificación más pormenorizada de los genes según el momento de expresión en el ciclo de desarrollo de *C. trachomatis*. Hicieron una división en tres etapas generales (I, II y III) en base a cambios importantes en la transcripción de genes a lo largo del ciclo, que coincidían con cambios fenotípicos, y en estas etapas se incluían a su vez 7 subgrupos, dependiendo de si los genes se expresaban de forma puntual o duradera a lo largo del ciclo. Las etapas I y II engloban la fase de CR. Los genes incluidos en la etapa I se expresaban entre las 6 y las 12 hpi y estaban implicados en funciones celulares básicas como la traducción de proteínas, ensamblaje de ribosomas, replicación del ADN, adquisición de compuestos energéticos y transporte de nutrientes. En este grupo se encuentra el gen *groEL*, cuyo transcrito empezó a detectarse en abundancia a las 12 hpi, por lo que no es esencial para iniciar la diferenciación primaria, pero sí es necesario para el crecimiento y división celular. La etapa II incluía genes transcritos a las 18 hpi, en una fase media-tardía del ciclo, y son genes involucrados en otros procesos celulares como el metabolismo energético (como por ejemplo *cydA* y *cydB*), síntesis de envolturas celulares (*ompA*, *ompB* y algunos genes de la familia *pmp*), plegamiento de proteínas, T3SS y replicación y reparación del ADN. El perfil transcripcional y las funciones anotadas de estos genes sugieren que tienen un papel crucial en las primeras fases de rediferenciación de CR a CE (Nicholson *et al.*, 2003).

2.5. Diferenciación secundaria. Expresión tardía de genes

Entre las 20 - 25 hpi pueden volver a verse por microscopía electrónica CE en el interior de las inclusiones intracitoplasmáticas junto a los CR y una forma intermedia

entre ambas estructuras, que se conoce como cuerpo intermedio (CI) (figura 3), que representa una etapa de transición en la condensación del material nuclear del CR para originar el CE. Esta diferenciación es asincrónica, debido probablemente a variaciones estocásticas en la expresión de una señal dada. Todavía no se conoce la señal que desencadena el proceso de conversión de CR a CE, si bien se sabe que este proceso comienza con la regulación al alza (*up-regulation*) de los genes que codifican las proteínas similares a histonas, responsables de condensar el material nuclear en una masa electrodensa localizada en el centro del citoplasma (Hackstadt *et al.*, 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 hpi, dependiendo de la cepa clamidial. En este momento, las tres fases de desarrollo (CR, CI y CE) coexisten en la inclusión (figura 3) (Kuo *et al.*, 2011).

Los estudios de expresión génica con microarrays de todo el genoma de *C. trachomatis* han identificado varios genes que se expresan al final del ciclo de desarrollo. Belland *et al.* (2003a) describen 26 genes de expresión tardía, algunos con funciones ya conocidas, como *HctA* y *HctB*, implicados en la condensación del cromosoma, y *omcA* y *omcB*, que codifican componentes del complejo de la membrana externa, y otros que codifican proteínas de función desconocida o cuya función se puede predecir. Entre estos últimos identificaron varios genes que codificaban proteínas que tendrían un papel importante en la formación del COMC como dos tiorredoxina disulfuro isomerasas (CT780 y CT783) y dos cisteín-proteasas de membrana (*mtpA* y *mtpB*). Además, los mismos autores señalan que la expresión de algunos genes en esta fase parece ir encaminada a “armar” a los CE con proteínas necesarias en las fases iniciales de un próximo ciclo de infección, como ocurre por ejemplo con proteínas de ensamblaje del T3SS. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Nicholson *et al.* (2003), los cuales identificaron 70 genes de expresión tardía, clasificados en la etapa III porque su expresión no aumentaba hasta las 24 hpi. Al igual que en el estudio de Belland *et al.* (2003a), algunos de esos genes eran de función conocida, como por ejemplo *HctAB*, *omcAB*, pero describieron además una gran cantidad de genes de función desconocida y que se encontraban solo en *Chlamydia* (Nicholson *et al.*, 2003). El peptidoglicano sintetizado durante la fase de replicación es degradado al final del

ciclo, como demuestran los elevados niveles de muramidasa encontrados en los CE (Skipp *et al.*, 2016).

2.6. Infección crónica. Persistencia

El término persistencia puede definirse de forma general en microbiología como el resultado alternativo de una infección bacteriana según el cual una subpoblación de bacterias se hace “invisible” sin causar síntomas en el hospedador infectado, escapando de la respuesta inmunitaria, de tratamientos antibióticos, y del radar diagnóstico del especialista (Bavoil, 2014). 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, existen evidencias claras, sobre todo *in vitro*, que sugieren que las clamidias son capaces de entrar en este estado de latencia o persistencia asociado con procesos crónicos en el hospedador (Hogan *et al.*, 2004).

Diferentes estudios de persistencia clamidial *in vitro* coinciden en que, tras inducir el estado de persistencia, se observan 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. Además, a nivel ultraestructural éstas adquieren una estructura distinta a los CE o CR presentes en un ciclo de desarrollo normal, apareciendo lo que se conoce como “formas o cuerpos aberrantes” (CA) (figura 4), semejantes a los CR, pero de mayores dimensiones y pleomórficos (Hogan *et al.*, 2004; Schoborg, 2011; Wyrick, 2010). 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* (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).

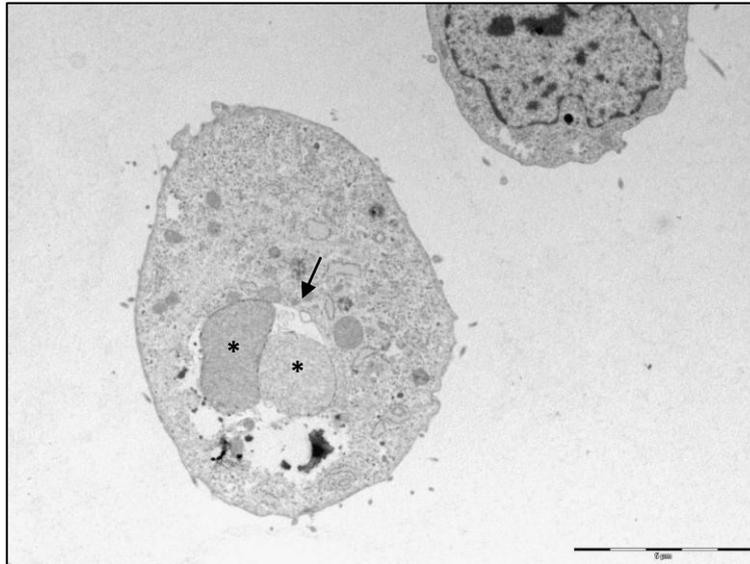


Figura 4. Electronografía de cultivo clamidial tratado con penicilina. La inclusión intracitoplasmática (flecha) contiene dos cuerpos reticulares anormalmente grandes, compatibles con cuerpos aberrantes (asteriscos).

Se han estudiado varios sistemas de inducción de persistencia *in vitro*:

- **Adición de antibióticos:** La adición de antibióticos como la eritromicina, ampicilina o penicilina al medio a partir de las 12 hpi impide la reconversión de CR a CE y promueve la aparición de pequeñas inclusiones en las células infectadas con CA en su interior. Estos CA desaparecen al suprimir la presencia de antibióticos en el medio, lo cual hace pensar que una inadecuada terapia antimicrobiana puede permitir *in vivo* el mantenimiento de la infección clamidial de forma persistente (Hogan *et al.*, 2004).
- **Depleción de nutrientes:** La falta de nutrientes esenciales en el medio como aminoácidos (Coles *et al.*, 1993), 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. Se maneja la hipótesis de que las fluctuaciones de hierro en el organismo debidas por ejemplo a la influencia del estradiol en el endometrio (Kolver *et al.*, 1996) podrían influir en la persistencia clamidial *in vivo*. De hecho, parece ser que las hormonas esteroideas, incluido el β -

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 de IL-10 durante las infecciones clamidiales (Kaushic *et al.*, 2000).

- **Adición de citoquinas:** Varios estudios han demostrado que la exposición de cultivos clamidiales a citoquinas, sobre todo a IFN- γ , induce infecciones persistentes (Shemer y Sarov, 1985; Beatty *et al.*, 1993; Summersgill *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 2001). El mecanismo principal por el que esto ocurre es la activación por IFN- γ de la enzima indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO), la cual degrada el triptófano (Byrne *et al.*, 1986). Así, es una forma indirecta de depleción de un aminoácido esencial para el desarrollo del ciclo de multiplicación clamidial. La adición de triptófano al medio revierte el estado de persistencia. Otras citoquinas como el TNF- α (Summersgill *et al.*, 1995) y la IL-1 (Carlin y Weller, 1995) ejercen un efecto sinérgico al del IFN- γ sobre el crecimiento clamidial.
- **Otros:** Se han observado formas de persistencia *in vitro* utilizando 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).

En los últimos años los avances en proteómica y en técnicas de biología molecular como la PCR cuantitativa (RT-qPCR) y los microarrays, así como la secuenciación del genoma de varias especies de clamidia han contribuido a sentar unas bases de conocimiento del estado de persistencia a nivel molecular. Sin embargo, se considera que este campo está aún en desarrollo ya que resulta difícil comparar los resultados y conclusiones de distintos estudios debido a la gran cantidad de variables que influyen en los mismos: especie y cepa de clamidia, origen de las células

hospedadoras, sistema de inducción de persistencia y tiempos post-infección elegidos para el análisis (Hogan *et al.*, 2004; Goellner *et al.*, 2006; Wyrick, 2010). No obstante, se puede extraer de estas publicaciones un patrón general de regulación de la expresión de genes relacionado con el estado de persistencia *in vitro*. Así, se ha visto que la infrarregulación (*down-regulation*) de genes de expresión tardía como los que codifican para proteínas de membrana, reguladores de la transcripción, factores de la división celular y factores de diferenciación de CR a CE, está asociada a la aparición de formas de persistencia en varias especies de clamidia (Hogan *et al.*, 2004; Carey *et al.*, 2013)

Existe poca información sobre modelos *in vitro* de persistencia en especies de clamidia que no afecten a la salud humana directamente. En el caso de *C. abortus*, Pérez-Martínez y Storz (1985) describieron una infección persistente de células L con una cepa abortiva ovina de *C. psittaci* (actualmente *C. abortus*) mediante cultivo continuo, pero no llegaron a caracterizar morfológicamente el estado de persistencia en la bacteria. Más recientemente, se ha estudiado el efecto inductor de persistencia del IFN- γ en cultivos de *C. abortus* y se ha comprobado la importancia de la concentración de esta citoquina en el control del crecimiento clamidial (Brown y Entrican, 1996; Brown *et al.*, 2001). Así, estos mismos autores demostraron que la disminución de IFN- γ en los cultivos reactivaba la multiplicación bacteriana y señalaron este mecanismo como un posible desencadenante de la enfermedad *in vivo* a través de las fluctuaciones en los niveles de citoquinas y hormonas propias de la gestación. Otro modelo de persistencia *in vitro* de *C. abortus* es el descrito por Stuedli *et al.* (2005), en el cual, tras la coinfección de *C. abortus* con el virus de la diarrea epidémica porcina, los autores observaron inclusiones anormales con formas de desarrollo anormalmente grandes. Posteriormente, usando el mismo modelo, otros autores caracterizaron de forma más detallada el estado de persistencia mediante microscopía electrónica en *C. abortus* y *C. pecorum*, hallándose diferencias entre ambas especies (Borel *et al.*, 2010).

Aunque los estudios mencionados han demostrado que también *C. abortus* es capaz de entrar en fase de persistencia tras la exposición a condiciones desfavorables, hasta la fecha no existe información sobre los cambios transcripcionales que se producen durante esta fase en esta especie.

2.7. Liberación de la célula hospedadora

Hacia el final del ciclo de desarrollo una vacuola contiene cientos de clamidias y ocupa prácticamente todo el citoplasma de la célula hospedadora. El mecanismo exacto de liberación no se conoce con exactitud. Se han postulado dos vías independientes y exclusivas entre sí que ocurren con la misma frecuencia *in vitro* (Hybiske y Stephens, 2007). La primera es la exocitosis lenta de la inclusión, mecanismo conservado en todo el género *Chlamydia* (Zuck *et al.*, 2016), que deja la célula hospedadora intacta; y la segunda vía es la lisis de la inclusión intracelular seguida de la lisis de la célula hospedadora mediada por proteasas. Este último mecanismo parece estar regulado por un plásmido, en concreto por el gen *Pgp4* (Yang *et al.*, 2015).

3. El aborto enzoótico ovino

3.1. Características generales

Como ya se ha mencionado en el apartado de taxonomía, el agente etiológico del aborto enzoótico de los pequeños rumiantes o aborto enzoótico ovino (AEO) es *Chlamydia abortus*. La enfermedad fue descrita por primera vez en Escocia en 1936 (Greig, 1936), si bien en aquella época se pensaba que podía ser el resultado de factores ambientales como deficiencias nutricionales. No fue hasta 1950, que Stamp *et al.* describieron la naturaleza infecciosa del AEO (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). Además del impacto económico que esto implica, el AEO merece especial atención por tratarse de una zoonosis profesional causante de abortos y septicemia en mujeres embarazadas que tienen contacto, directa o indirectamente, con rebaños infectados (Longbottom y Coulter, 2003).

Cuando se introducen animales infectados en un rebaño que era libre de AEO, el primer año se producirán unos pocos abortos (los de estos animales), y es en el segundo año cuando se produce un brote en el que el 30 % de las ovejas y hasta 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 mantiene en un 5-10% si no se toman medidas de control, aumentando este porcentaje cuando se introducen animales de reposición (Rodolakis y Laroucau, 2015).

Las clamidias se eliminan principalmente en las secreciones vaginales de animales infectados en los momentos previos y posteriores al aborto, y en las placentas y fluidos de los fetos abortados. 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 varios días (Nietfeld, 2001). El contagio suele producirse por vía oral mediante la ingestión de CE presentes en el agua o comida contaminadas o mediante el lamido e ingesta de restos placentarios. Otra vía de infección es la aerógena, a través de la inhalación de aerosoles presentes en ambientes contaminados (Buxton *et al.*, 1990). Existen otras vías de transmisión posibles pero menos significativas como son la venérea, la orofecal y a través de la secreción láctea en cabras (Nietfeld, 2001).

3.2. Patogenia y manifestaciones clínicas

Tras la infección por vía oro-nasal, se cree que el microorganismo se establece en los órganos linfoides faríngeos y, tras un breve periodo de replicación en ellos, se produce la diseminación vía hemolinfática a otros órganos hasta alcanzar la placenta (Jones y Anderson, 1988; Nietfeld, 2001). En los países donde el estro de las ovejas es estacional, las hembras sólo son susceptibles de contagiarse al final de la gestación, no produciéndose el aborto en ese momento, sino que permanecen como portadoras latentes de la infección, hasta que el microorganismo se reactiva en la siguiente gestación y entonces se produce el aborto dos o tres semanas antes de la fecha estimada de parto, o parto a término de corderos muertos o muy débiles que suelen morir pocos días después de nacer (Aitken, 2000). Las ovejas raramente presentan sintomatología clínica 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 masiva de las clamidias, se hacen evidentes a partir de los 90 días de gestación y no antes, hecho que parece 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 la inmunocitoquímica se ha visto que *C. abortus* coloniza rápidamente células del trofoblasto en los placentomas, induciendo una respuesta inflamatoria liderada principalmente por neutrófilos. La placentitis puede dar lugar al aborto por distintas causas, siendo éste probablemente el resultado de una combinación de varias. 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 parte, la rápida colonización de un gran número de placentomas podría originar la destrucción de las células del trofoblasto, y por lo tanto la disrupción de la función endocrina de la placenta, produciéndose los abortos a pesar de la escasa colonización de los fetos por parte de *C. abortus* (Navarro *et al.*, 2004; Sammin *et al.*, 2009). Dicha colonización, aunque escasa, existe, como pone de manifiesto la respuesta inmune fetal temprana, incluso previa a los 90 días de gestación (Buxton *et al.*, 1990).

La infección induce una respuesta inmune 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.*, 1994; Livingstone *et al.*, 2009).

En lo que respecta a ovejas no gestantes, *C. abortus* es capaz de producir una infección latente, que no estimula una inmunidad protectora, con la consiguiente reactivación y multiplicación del microorganismo durante la siguiente gestación (Longbottom *et al.*, 2013).

3.3. Diagnóstico

Los signos clínicos que evidencia un rebaño afectado por *C. abortus* no son suficientes para llegar a un diagnóstico certero de la enfermedad. Algunos datos epidemiológicos, como la persistencia de la infección en el rebaño y la afectación mayoritaria de primíparas con abortos tardíos, así como la observación macroscópica de placentas con lesiones necrótico-hemorrágicas, pueden hacer que el veterinario incluya el 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 del laboratorio (Borel *et al.*, 2014).

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 de tejido o escobillones (bacterioscopía mediante tinción, técnicas inmunológicas directas, aislamiento o PCR), mientras que las segundas detectan, en muestras de suero, los anticuerpos anti-clamidia generados por los hospedadores tras la infección (IFI, ELISA o RFC) (Sachse *et al.*, 2009).

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; y por otro, 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 (ArrayTubeTM) cuya sensibilidad ha sido previamente validada en muestras clínicas (Sachse *et al.*, 2005; Borel *et al.*, 2008a; Pantchev *et al.*, 2009; Sachse *et al.*, 2009).

3.4. Prevención y control

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

3.4.1. Manejo

El objetivo de estas medidas sería evitar la introducción de animales infectados en rebaños libres de la enfermedad manteniendo a estos últimos en 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 las ovejas 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 a la imposibilidad de distinguir animales vacunados de infectados mediante diagnóstico serológico convencional (Entrican *et al.*, 2012).

3.4.2. Antibioterapia

Las tetraciclinas se usan en rebaños de ovejas gestantes infectadas para reducir la incidencia de abortos y muertes perinatales. Sin embargo, el uso de antibióticos no garantiza evitar el aborto ni la eliminación de patógenos al ambiente durante el parto (Longbottom y Coulter, 2003). Además, 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). Esto, unido a las complicaciones derivadas del uso de antibióticos como la aparición de resistencias y la posible presencia de residuos en alimentos de origen animal, hace que la antibioterapia no se considere el procedimiento más adecuado para el control de la infección, sino que debe ser indicada solamente en casos excepcionales (Longbottom y Coulter, 2003).

3.4.3. Vacunación

Como ya se ha mencionado en el apartado de patogenia y manifestaciones clínicas, tras una primoinfección con *C. abortus*, los animales generan una respuesta inmune 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 efectiva para el control y prevención de esta 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 confiere protección total contra el desafío natural ni elimina completamente la diseminación del agente infeccioso. Sin embargo, los animales vacunados expuestos a la

infección, experimentan un número significativamente menor de abortos y una reducción de la excreción de clamidias durante un período que abarca entre dos y tres gestaciones con posterioridad a la vacunación (OIE, 2012).

Las vacunas inactivadas fueron las primeras en utilizarse poco después del descubrimiento 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 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 hecho de que las vacunas inactivadas no impidan la excreción de clamidias en el momento del parto supone un gran inconveniente, puesto que esto favorece la persistencia de la infección de forma enzoótica en el rebaño vacunado y puede provocar una selección a favor de aquellas cepas más virulentas (Rodolakis y Souriau, 1979; Wilsmore *et al.*, 1990; García de la Fuente *et al.*, 2004;).

La vacuna atenuada 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 severidad 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, 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 casos de AEO (Laroucau *et al.*, 2010; Wheelhouse *et al.*, 2010; Sargison *et al.*, 2015), 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 solventarlo sería el desarrollo de una vacuna subcelular que contenga aquellas moléculas clamidiales que intervengan específicamente en la inducción de una respuesta inmune efectiva. Gracias al desarrollo de la biotecnología, una vacuna de este tipo podría ser, en teoría, asequible, segura y de fácil conservación, lo cual es muy prometedor. Sin embargo, los ensayos con antígenos recombinantes y péptidos no habían 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). 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 inmune inducida por una vacuna de ADN basada en el gen *ompA* y vehiculada en el bacteriófago λ 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).

Finalmente, otro aspecto a considerar son los adyuvantes, sustancias químicas o componentes microbianos capaces de potenciar la respuesta inmune 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 inmune hacia un tipo específico de inmunidad y hacer que al final la vacuna sea eficaz o no. De hecho, empleando modelos murinos de infección con *C. abortus*, se han ensayado numerosos adyuvantes y seleccionado los que mejor resultado de protección han ofrecido (Caro *et al.*, 2003). En 2004, García de la Fuente *et al.* (2004) describieron cómo vacunas 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.

4. Esteroides sexuales femeninos

4.1. Generalidades y mecanismos de acción

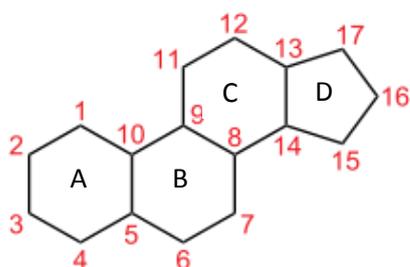


Figura 5. Estructura química del ciclopentanoperhidrofenantreno

Los esteroides sexuales son las hormonas que controlan la reproducción en los vertebrados. Su estructura molecular deriva del núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno, formado por cuatro anillos hidrocarbonados fusionados (A, B, C y D) que presentan 17 átomos de carbono (C1-C17) (figura 5) (Bentley, 2001). Este esqueleto químico es la base estructural del colesterol,

molécula a partir de la cual se sintetizan todas las hormonas esteroideas a través de una serie de reacciones enzimáticas que van produciendo moléculas estructuralmente muy parecidas, pero con actividades biológicas significativamente distintas (Walters, 2007). Las células esteroideogénicas no acumulan la hormona presintetizada, esperando a ser liberada, sino que almacenan el colesterol esterificado, y luego sintetizan las hormonas a demanda. Cuando esto ocurre, el colesterol es transportado a la mitocondria, donde, tras la escisión de la cadena lateral mediante una enzima del citocromo P450, es convertido en pregnenolona, la cual vuelve al citoplasma de la célula y actúa como precursor necesario de todas las hormonas esteroideas.

A lo largo de la vida reproductiva de la hembra, los ovarios ejercen principalmente dos funciones: el crecimiento y maduración de los ovocitos en los folículos y la secreción de varias hormonas: estradiol, progesterona, inhibina, testosterona, oxitocina y relaxina. 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 (*feedback*).

Las hormonas esteroideas ováricas actúan de forma autocrina, paracrina y endocrina. Aunque su función más evidente es coordinar todos los procesos que tienen que ver con el sistema reproductor, sus actividades se extienden a numerosos órganos y sistemas como cerebro, hígado, riñón, pulmón, sistema inmune, sistema cardiovascular y aparato locomotor (Bentley, 2001). Debido a su naturaleza lipofílica, los esteroides

son transportados en sangre unidos a albúmina o a proteínas transportadoras específicas. Una vez que alcanzan el tejido diana, atraviesan la membrana celular por difusión pasiva para unirse a sus receptores. Los receptores clásicos de esteroides son sintetizados en el citoplasma de las células y forman complejos macromoleculares con otras proteínas, entre las que destacan miembros de la familia de proteínas de choque térmico (Hsp). Estos complejos receptores pueden localizarse en el citoplasma o en el núcleo de las células. La unión del esteroide a su receptor específico induce un cambio conformacional en este y la disociación de proteínas chaperonas como la Hsp90, quedando expuesto un dominio de unión a ADN, lo que resulta en la formación de un 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 modifica la estructura de la cromatina e interactúa con el complejo de iniciación de la transcripción, compuesto por varios factores de transcripción y por la ARN polimerasa II, para así regular la expresión génica mediante la activación o represión de la síntesis de ARNm, lo que finalmente se traducirá en una mayor o menor síntesis de proteínas (figura 6) (Hart, 2002).

El mecanismo de acción clásico de modulación de la expresión génica implica un retraso temporal de la respuesta a los esteroides de horas o incluso días. Sin embargo, se sabe que existen respuestas mucho más rápidas que tienen lugar en minutos o segundos, 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). Estos efectos obedecen a mecanismos de acción menos convencionales de los esteroides, conocidos como “no genómicos” o “no transcripcionales”, ya que no precisan de la síntesis de ARN, sino que involucran a segundos mensajeros intracelulares y varias cascadas de transducción de señales como modulación de AMP cíclico, flujo de iones (generalmente calcio) y vías proteinquinasas (Losel y Wehling, 2003). Estos mecanismos pueden ser iniciados por la unión de los esteroides a dos tipos de receptores. Por un lado, se sabe que hay receptores clásicos de esteroides a nivel de membrana, y que son capaces de iniciar la producción de segundos mensajeros e interactuar con sistemas de señalización celular. Sin embargo, la principal función de estos receptores sigue siendo modificar la actividad transcripcional. Por otro lado, existen otros receptores de esteroides (no clásicos) en la membrana celular a los que

también se atribuye la acción no genómica de los esteroides, aunque estos no están todavía bien caracterizados (Losel y Wehling, 2003).

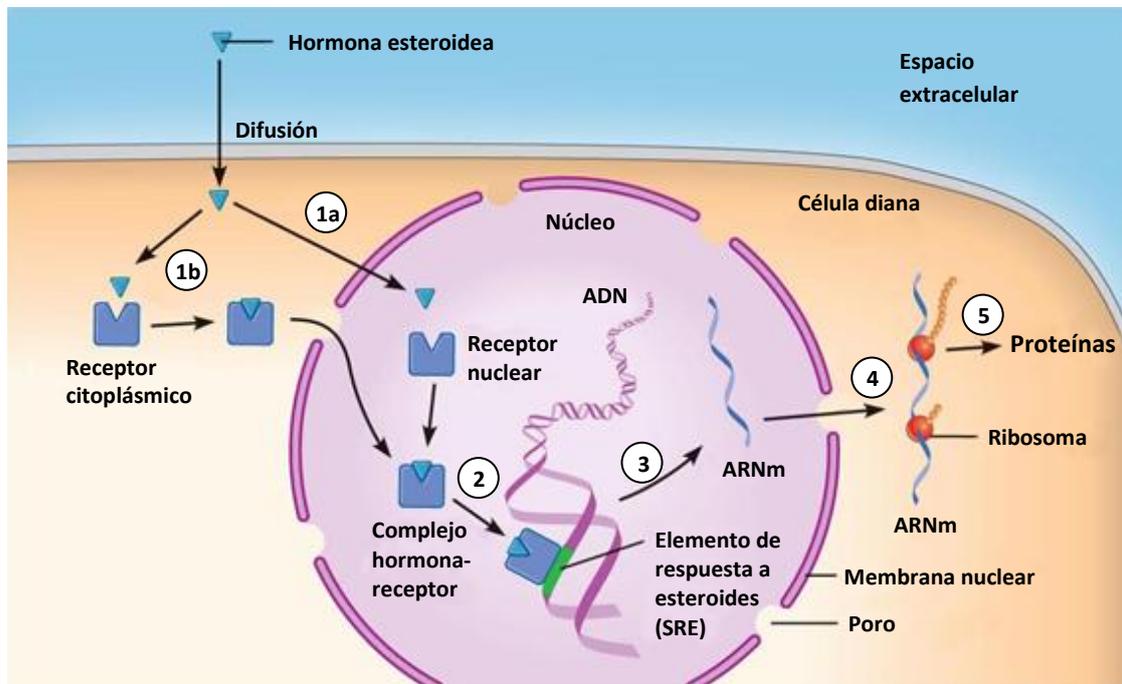


Figura 6. Mecanismo de acción clásico de los esteroides. Gracias a su naturaleza lipofílica, las hormonas esteroideas son capaces de atravesar membranas para unirse a sus receptores, que pueden localizarse en el núcleo (1a) o en el citoplasma (1b), para formar un complejo hormona-receptor, el cual se 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), resultando finalmente en una mayor o menor síntesis de proteínas (5). Fuente: <http://droualb.faculty.mjc.edu/>

4.2. Estrógenos

Los estrógenos son un grupo de hormonas esteroideas responsables de una gran cantidad de efectos fisiológicos encaminados principalmente a controlar la reproducción en la hembra a varios niveles. Así, juegan un papel fundamental en el desarrollo del tracto reproductor, de los caracteres sexuales secundarios, del comportamiento de receptividad sexual durante el estro y además tienen efectos neuroendocrinos involucrados en el control de la ovulación. El estrógeno natural más abundante y bioquímicamente activo es el **17 β -estradiol (E2)**, seguido por la estrona (E1) y el estriol

(E3). Estructuralmente, la molécula de E2 se caracteriza por tener 18 átomos de carbono, anillo A aromatizado y dos grupos hidroxilo en posición 3 y 17 (figura 7).

El E2 es sintetizado principalmente en los ovarios por las células de la granulosa. En estas células se encuentra el complejo enzimático conocido como aromatasas, el cual se encarga de transformar andrógenos (androstenediona, testosterona) en estrógenos mediante la aromatización del anillo A. Este efecto es regulado por la gonadotropina FSH. La androstenediona necesaria es sintetizada en las células de la teca tras el estímulo de otra gonadotropina, la LH, y luego es transportada por difusión a través de la membrana basal de las células de la granulosa adyacentes, donde una fracción es convertida a

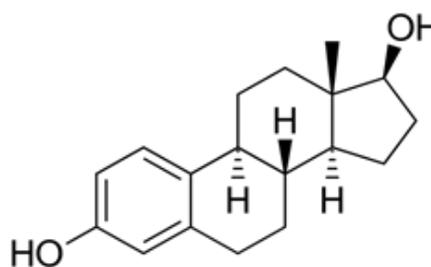


Figura 7. Estructura química del 17β-estradiol (E2)

testosterona, y finalmente ambos andrógenos son aromatizados a estrona y estradiol. Así, la producción de estrógenos ováricos depende de la participación de dos tipos celulares, teca y granulosa, y de dos gonadotropinas, LH y FSH, de ahí el concepto de que la síntesis de estrógenos foliculares sigue el modelo o teoría de “dos células - dos gonadotropinas” (figura 8) (Hillier *et al.*, 1994; Walters, 2007).

Al igual que otros esteroides, la mayor parte de los estrógenos circulan en sangre unidos a proteínas. En concreto, el E2 se une a la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG) con alta afinidad y especificidad, y a la albúmina con baja afinidad. Estas proteínas plasmáticas son importantes porque regulan la concentración de fracción libre de E2 en sangre, que es la biológicamente activa, y controlan la difusión de la hormona desde los vasos sanguíneos a las células (Hammond, 2016). Una vez dentro de la célula diana, el E2 se unirá al receptor de estrógenos (ER).

Existen dos tipos diferentes de ER: ER α y ER β , codificados por genes independientes y con patrones de expresión distintos en función del tejido donde se encuentran. Así, el receptor ER α es más abundante en estroma ovárico y endometrio, mientras que el ER β es más frecuente en células de la granulosa ováricas, cerebro, sistema cardiovascular o hueso (Shughure *et al.*, 1998).

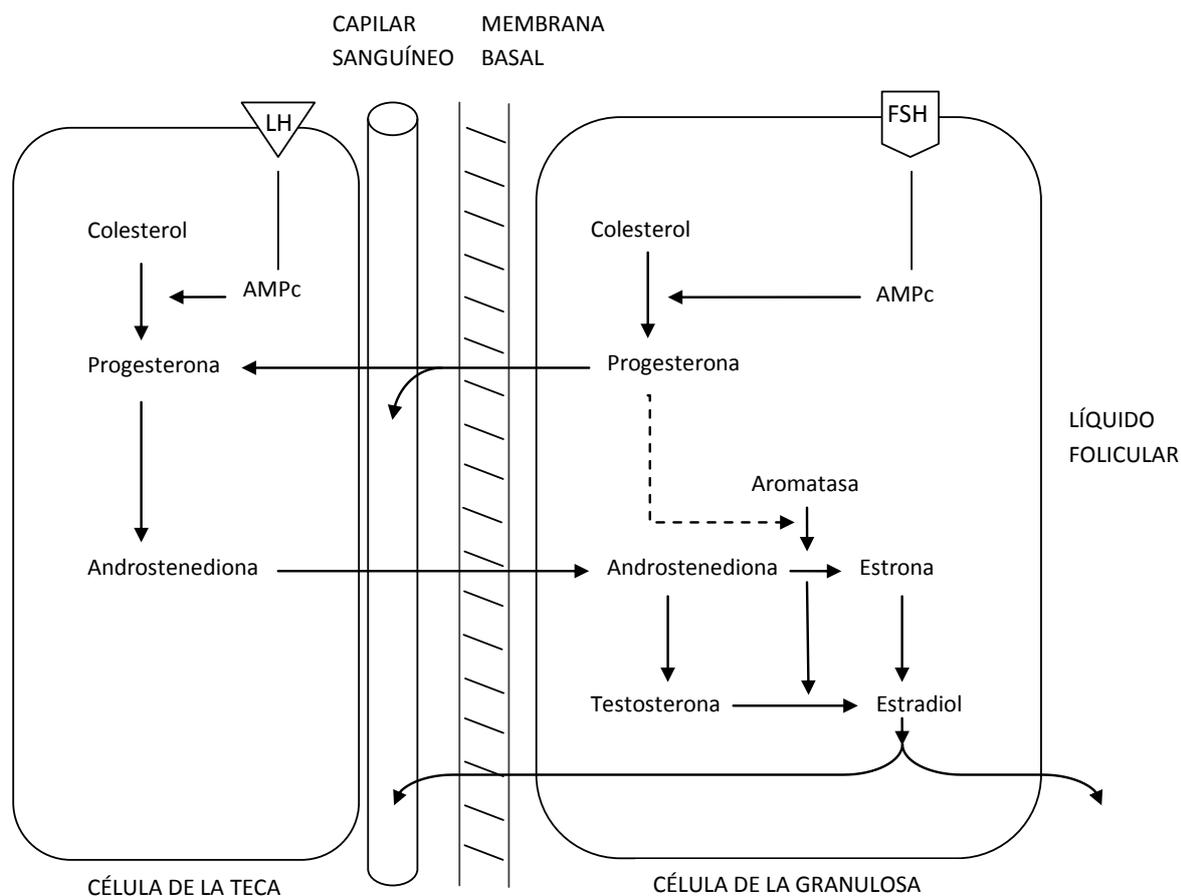


Figura 8. Diagrama del concepto “dos células – dos gonadotropinas” para la síntesis de hormonas esteroideas ováricas. Bajo la influencia de la LH, en las células de la teca se produce androstenediona a partir de progesterona. La androstenediona difunde a las células de la granulosa para ser convertida en testosterona. En estas células, los andrógenos son aromatizados por el complejo enzimático aromatasa, transformándose en estrógenos (Guerriero, 2009).

4.3. Progestágenos

Los progestágenos son otro grupo importante de hormonas esteroideas cuyo nombre es indicativo de su función principal: favorecer o mantener la gestación. El progestágeno natural más abundante es la **progesterona (P4)**. Esta hormona juega un papel clave en la compleja regulación de la función reproductiva en la hembra actuando a varios niveles: 1) en el útero, induce la transición o diferenciación del endometrio a fase secretora y reduce la contractilidad del miometrio permitiendo la implantación del embrión; 2) en la glándula mamaria, favorece junto a la prolactina la maduración lóbulo-alveolar necesaria para la producción láctea durante la gestación y la lactación

tras el parto; y 3) 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 9). Es sintetizada directamente a partir de la pregnenolona y es un precursor de otras hormonas esteroideas durante la esteroidogénesis (figura 8). La

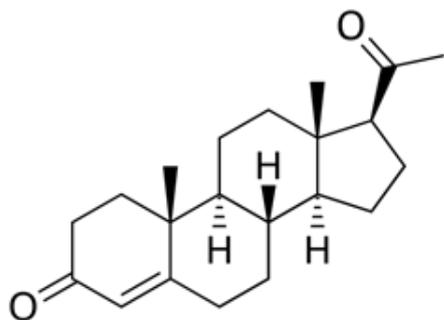


Figura 9. Estructura química de la progesterona (P4)

biosíntesis de P4 es estimulada tras el pico de LH y la ovulación, cuando las células de la granulosa maduran y se hipertrofian, transformándose en células luteínicas (cuerpo lúteo) (Taraborrelli, 2015). Si se produce la gestación, la placenta también juega un papel manteniendo la concentración plasmática de progesterona a lo largo de la misma, aunque la importancia de este órgano como productor de P4 varía según la especie. Así, en humanos, caballos, ovejas y gatos la P4 producida por la placenta es suficiente para mantener la gestación, mientras que en roedores, vacas, cerdos, cabras y perros la P4 procedente de los cuerpos lúteos es esencial durante toda la gestación porque la producción de la placenta es insuficiente.

Tras su liberación, al igual que el E2 y otros esteroides, la P4 es transportada en sangre unida a proteínas, concretamente se une a la globulina transportadora de corticosteroides (CBG) o transcortina con alta afinidad, y a la albúmina con baja afinidad (Hammond, 2016). Al ser una molécula lipofílica, una vez que alcanza el tejido diana, atraviesa las membranas celulares para interactuar a nivel nuclear con los receptores de progesterona (PR). Los efectos de la progesterona en los distintos tejidos uterinos son mediados por dos isoformas del PR, llamadas PR-A y PR-B. Estas dos proteínas son funcionalmente diferentes a pesar de ser codificadas por un único gen, que está bajo el control de distintos promotores. La expresión relativa de una isoforma u otra varía entre especies; y para cada especie puede influir en las respuestas celulares a la P4 (Graham y Clarke, 1997).

4.4. Papel de las hormonas sexuales en la interacción patógeno – célula hospedadora

4.4.1. Modulación de las respuestas inmunes

El efecto modulador que tienen las hormonas sexuales sobre las funciones del sistema inmune es un hecho conocido y que ha suscitado interés en la comunidad científica desde hace tiempo (Ahmed *et al.*, 1985; Ghosh y Klein, 2017). Este efecto se hace evidente al comparar las respuestas inmunes que producen individuos de distinto sexo ante el mismo estímulo. Por ejemplo, en respuesta a una inmunización, las ratonas generan una respuesta más intensa de células T y más anticuerpos que los machos (Weinstein *et al.*, 1984). En las mujeres, además, se ha comprobado que poseen mayor cantidad de linfocitos T CD4+ circulantes de forma fisiológica (Amadori *et al.*, 1995) y que tienen respuestas Th2 más intensas que los hombres (Giron-Gonzalez *et al.*, 2000). Además, existen datos epidemiológicos suficientes que muestran que la incidencia de enfermedades autoinmunes es mayor en mujeres que en hombres y que la severidad de algunas de estas enfermedades disminuye durante la gestación (Whitacre, 2001). Estos mismos hallazgos también se encuentran trasladados en los modelos animales utilizados para el estudio de enfermedades autoinmunes como el de la encefalitis autoinmune experimental y el de la artritis inducida por colágeno (Jansson y Holmdahl, 1998) en las que al quedar gestantes los ratones, la severidad de las enfermedades disminuye. Aun así, los estudios que evalúan el dimorfismo sexual en las respuestas inmunes no se centran únicamente en las hormonas sexuales sino que tienen en cuenta las complejas interacciones de éstas con otros factores como la expresión de genes de cromosomas sexuales, genes de la respuesta inmune o modificaciones epigenéticas (Ghosh y Klein, 2017).

Centrándonos en las hormonas sexuales femeninas, varios estudios han demostrado que tanto el estradiol como la progesterona influyen en la mayoría de los componentes de la inmunidad innata y adaptativa (Beagley y Gockel, 2003). Sin embargo, los resultados de estos estudios a menudo son contradictorios y parece que el efecto de las hormonas sobre los distintos componentes del sistema inmune dependen de variables como la dosis de hormona empleada, el componente concreto del sistema inmune que se analiza e incluso se sugiere que podría depender de condiciones individuales en el caso de estudios *in vivo* (Tan *et al.*, 2015; Foo *et al.*, 2017). Todo

esto hace que no resulte sencillo extraer conclusiones generales de estos estudios y añade un nivel de complejidad adicional al trabajo de experimentación con hormonas.

La influencia que ejercen el estradiol y la progesterona sobre los distintos componentes del sistema inmune no solo es importante para el estudio de patologías propias del sistema inmune, sino que también resulta interesante el papel que juegan estas hormonas en la respuesta frente a enfermedades infecciosas, especialmente aquellas cuya patogenia está relacionada de algún modo con el ciclo estral y/o el tracto reproductor femenino. Un buen ejemplo sería la infección por *C. abortus*. En la patogenia de esta enfermedad, un aspecto importante y poco estudiado es que los animales que han abortado excretan la bacteria en el periodo periovulatorio de los siguientes ciclos estrales haciendo que la infección persista en el rebaño (Papp *et al.*, 1994). Así, se dan fases de latencia durante la infección clamidial, primero desde la infección del animal hasta la colonización placentaria, y luego desde el aborto hasta la nueva excreción en los siguientes estros. Este proceso de latencia/multiplicación activa en función de la fase del ciclo estral podría estar relacionada con las fluctuaciones de las hormonas responsables de controlar el ciclo reproductor. A pesar de que esta relación no ha sido investigada hasta la fecha, son muchos los indicios que apuntan a que puede existir una importante relación entre *C. abortus* y las citadas hormonas. En primer lugar, los esteroides sexuales son capaces de modular la actividad de las diferentes subpoblaciones celulares leucocíticas implicadas en la respuesta inmune frente a *C. abortus*; así, se ha demostrado que los estrógenos incrementan la actividad fagocítica de los macrófagos y son capaces de elevar la secreción de citoquinas proinflamatorias (Miller y Hunt, 1996). La progesterona, por su parte, reduce la actividad de macrófagos y de células NK, disminuye la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B, y promueve el paso de una respuesta inmune celular Th1 a Th2 (Szekeres-Bartho *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2002; Su *et al.*, 2009;). Esta influencia de las hormonas sexuales sobre la respuesta inmune queda reflejada en una serie de trabajos utilizando modelos de infección con ratones ovariectomizados, en los que se observa que el tratamiento con β -estradiol mejora la respuesta inmune frente a patógenos intracelulares como es el caso de *Mycobacterium avium* (Tsuyuguchi *et al.*, 2001). Especialmente interesantes son los estudios con una bacteria intracelular abortiva de patogenia similar a *C. abortus*, como es *Coxiella burnetii* (Leone *et al.*, 2004). En este caso ratonas ovariectomizadas infectadas con *C. burnetii* y tratadas con 17β -estradiol presentaban menor carga

bacteriana en hígado y bazo, mostrando también menor cantidad de focos inflamatorios en estos órganos tras el análisis histopatológico.

Por otro lado, la influencia de las hormonas sexuales en el curso de las infecciones de patógenos intracelulares se ha asociado con la eficacia de las vacunas frente a dichos patógenos. Existen varios estudios que muestran cómo el ambiente hormonal es capaz de modular las respuestas inmunes obtenidas tras una vacunación. Por ejemplo, en un estudio realizado sobre modelos animales se demostró que la fase del ciclo estral en la que las ratonas eran vacunadas frente al tétanos o al cólera afectaba a la magnitud de las respuestas humoral y celular en el tracto reproductor, si bien el efecto de las hormonas sobre las respuestas inmunes era variable en función de la vía de administración de la vacuna (Gockel *et al.*, 2003). Más recientemente, Bhavanam *et al.* (2008) comprobaron que las ratonas ovariectomizadas y tratadas con estradiol en el momento de la vacunación presentaban mayores tasas de supervivencia y menor excreción vírica tras la infección con un herpes genital comparándolas con ratonas vacunadas bajo la influencia de progesterona o placebo. De esta forma, un mayor conocimiento del efecto que tienen las hormonas sobre los distintos componentes del sistema inmune podría resultar útil a la hora de elaborar nuevas vacunas o de diseñar nuevos protocolos de vacunación.

4.4.2. Efecto de las hormonas sexuales sobre infecciones bacterianas

Además de su papel como moduladores del sistema inmune, las hormonas también pueden tener un efecto directo sobre el crecimiento y el metabolismo de las bacterias, así como sobre la expresión de factores de virulencia (García-Gómez *et al.*, 2013). Esto es lo que sugiere la endocrinología microbiana, un nuevo campo interdisciplinario basado en el principio de 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 (Freestone *et al.*, 2008; Lyte, 2004). Así, se han descrito proteínas que actúan como receptores de estrógenos en varias especies de bacterias como por ejemplo *Pseudomonas aeruginosa* (Rowland *et al.*, 1992), *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* entre otras (Sugarman y Mummaw, 1990). También es conocido que bacterias del grupo *Prevotella intermedia*, 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). Por otra parte, en este mismo grupo de especies se ha comprobado que el estradiol aumenta la actividad de la enzima DPPIV (un factor de virulencia) de forma dosis y cepa dependiente, hechos que podrían explicar en parte el aumento de gingivitis asociada al embarazo (Fteita *et al.*, 2015).

En el caso del género *Chlamydia*, existen estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, que sugieren que los esteroides sexuales femeninos afectan a la susceptibilidad a la infección por parte de las células hospedadoras. Así, se ha demostrado que el pretratamiento de un cultivo de células endometriales humanas con estradiol favorece la adhesión de CE de *C. trachomatis* a las células y el desarrollo de inclusiones clamidiales, 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). Esto concuerda con los resultados obtenidos por Guseva *et al.* (2003), los cuales observaron que células obtenidas del tracto reproductor de cerdas en la fase del ciclo estral dominada por estrógenos eran más susceptibles a la infección por *C. suis* que las células obtenidas en una fase dominada por progesterona. En los modelos *in vivo* de infección por *C. muridarum* es habitual un pretratamiento de los ratones con progesterona para favorecer la infección vaginal. En cambio, las cobayas son más susceptibles a la infección por *C. caviae* al ser tratadas con estradiol (Pasley *et al.*, 1985a).

Recientemente se ha demostrado que el tratamiento *in vitro* con progesterona y/o β -estradiol de una línea de células endometriales (ECC-1) infectadas con *C. trachomatis* provoca importantes cambios en la expresión génica de esta bacteria. En concreto, el tratamiento con estradiol produjo una regulación al alza (*up-regulation*) de una serie de genes, entre ellos *omcB*, *trpB*, *cydA*, *cydB*, *pyk* y *yggV*, que sugiere una respuesta de estrés similar a la encontrada en otros modelos de persistencia clamidial. En cambio, el tratamiento de los cultivos infectados con progesterona indujo un aumento de la expresión de genes que codifican elementos de respuestas metabólicas de aminoácidos y carbohidratos, es decir, del metabolismo energético (Amirshahi *et al.*, 2011).

En el caso de *C. abortus*, en algunas ocasiones se ha hipotetizado sobre la posible implicación de factores endocrinos en la patogenia del aborto enzoótico ovino (Leaver *et al.*, 1989; Buxton *et al.*, 1990; Kerr *et al.*, 2005), sin embargo, hasta la fecha no se han publicado trabajos sobre *C. abortus* como los descritos en párrafos anteriores para otras especies de clamidia, por lo que todavía se desconoce el papel que juegan los esteroides sexuales femeninos en la susceptibilidad a la infección por esta especie.

4.4.3. Modelos celulares utilizados para el estudio de la influencia de hormonas en el desarrollo de infecciones clamidiales *in vitro*

Los efectos que tienen las hormonas sexuales femeninas sobre *Chlamydia* spp. podrían ser resultado de la influencia directa de éstas sobre las bacterias. Sin embargo, al tratarse de organismos intracelulares, es posible que dichos efectos se produzcan de forma indirecta, vía célula hospedadora, es decir, que sean una respuesta de la bacteria a cambios producidos en las células por las hormonas. Así, se ha demostrado que el tratamiento con progesterona puede alterar la expresión génica de células endometriales humanas (ECC-1) infectadas con *C. trachomatis*, en relación con las células no tratadas, incrementando los niveles de ARNm para diversas citoquinas proinflamatorias y factores quimiotácticos, así como la regulación al alza de genes implicados en vías de interferón (Wan *et al.*, 2014). Otro estudio que muestra el efecto indirecto que ejercen los esteroides sexuales sobre la multiplicación clamidial, esta vez el estradiol, fue el publicado por Hall *et al.* (2011), quienes demostraron que el cocultivo de células endometriales epiteliales (HEC-1-B e Ishikawa) con células del estroma (SHT-290) pretratadas con estradiol mejoraba significativamente la infectividad de las células epiteliales con *C. trachomatis* y producía un aumento de la expresión de IL-8 e IL-6 en células epiteliales infectadas y no infectadas. Estos ejemplos demuestran la importancia que tiene la selección de líneas celulares a la hora de realizar estudios *in vitro* con organismos intracelulares obligados, ya que las células no son un mero soporte pasivo para los microorganismos, sino que entre ellos pueden establecerse interacciones a nivel molecular que deben ser tenidas en cuenta a la hora de diseñar experimentos o interpretar resultados.

Una característica esencial que deben tener las líneas celulares utilizadas para el estudio de respuestas a hormonas es la presencia de receptores para dichas hormonas, una particularidad que poseen especialmente las poblaciones celulares del tracto

reproductor. En los estudios de respuestas celulares a la infección por serotipos urogenitales de *C. trachomatis* normalmente se han utilizado líneas celulares continuas procedentes de carcinomas endometriales humanos como las HeLa, HEC-1B, Ishikawa o las ECC-1 entre otras. Curiosamente, en 2012 se publicó un artículo en el que los autores trataban de verificar mediante estudio genético la autenticidad de varias líneas celulares tumorales humanas de origen ovárico y endometrial, y concluían que muchas de estas líneas presentaban contaminación cruzada entre sí o se encontraban mal identificadas (Korch *et al.*, 2012).

Al margen de las líneas endometriales de origen humano, se han establecido otras líneas a partir de cultivos primarios de epitelio oviductal de ratón, como la Bm1.11, Bm12.4 y la C57epi.1 (Johnson y Kerr, 2015), para estudiar la respuesta inmune de células epiteliales a la infección por *C. muridarum*, cuya patogenia es similar a la de *C. trachomatis*. Al ser infectadas, el espectro de citoquinas producidas por estas células resultó ser más amplio y algo diferente al producido por las células HeLa y HEC-1B (Johnson, 2004), lo cual puede deberse al uso de distintas cepas clamidiales, a diferencias biológicas entre epitelio endometrial y oviductal, a diferencias intrínsecas entre la biología de distintas especies de hospedador (ratón y ser humano) o a que el proceso de transformación de las células tumorales haya alterado su funcionalidad. Así, vemos que son muchos y complejos los factores que influyen para que un modelo *in vitro* se ajuste bien a la realidad.

4.5. Ciclo estral y gestación en la oveja

Las ovejas tienen un ciclo reproductivo de tipo poliéstrico estacional, con ciclos ovulatorios durante la época de fotoperiodo decreciente (en general la estación reproductiva comienza a finales de verano u otoño y termina en invierno) y un cese de la actividad cíclica ovárica (anestro) durante el resto del año. Esta estacionalidad depende en gran medida de la raza y del origen geográfico de los animales, siendo más marcada en ovejas criadas en países de latitud alta, y siendo casi inexistente en países de latitud media y clima tropical o subtropical (Rosa y Bryant, 2003). En España, la mayoría de razas autóctonas muestran una estacionalidad muy reducida, con periodos de anestro de 3-4 meses, en primavera, en los que un 15-30% de ovejas se mantienen cíclicas o tienen ovulaciones esporádicas (Ortiz, 1983; Santiago-Moreno *et al.*, 2000).

Las distintas fases del ciclo reproductor ovino y su duración están representadas en la figura 10.

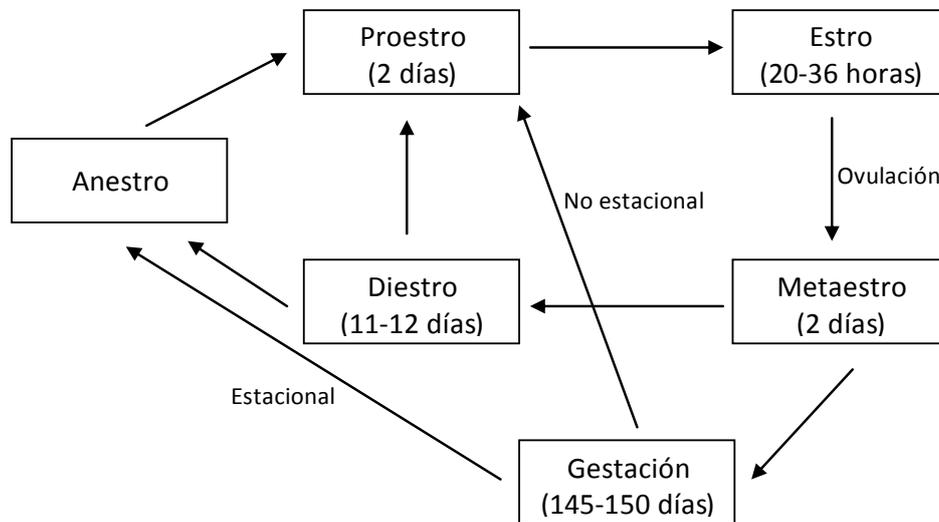


Figura 10. Fases del ciclo reproductivo de la oveja y duración aproximada de cada una de ellas. Adaptado de Nasar, 2006.

El ciclo estral de la oveja dura 16-17 días, considerándose como día 0 el día que se produce el pico de LH (figura 11). Este momento coincide con el estro, fase del ciclo en que la hembra muestra signos de celo y es receptiva a la cubrición. Este cambio en el comportamiento se debe al incremento en la concentración plasmática de estrógenos producidos por los folículos en desarrollo. Cuando la concentración de estrógenos alcanza su pico máximo, se produce el pico de LH, que resulta en la ovulación y en el fin del estro. Tras la ovulación, el folículo ovulatorio se convierte en un cuerpo lúteo funcional, que es la principal fuente de progesterona en la oveja cíclica (Nasar, 2006). Así, los niveles de P4 son muy bajos durante el estro (menos de 1 ng/ml) y aumentan durante el diestro hasta alcanzar su nivel máximo (3 ng/ml aproximadamente) en torno al día 8 del ciclo, y permanecerán elevados hasta el día 11-12 (Bartlewski *et al.*, 1999b; Bartlewski *et al.*, 2011). Si no sucede la gestación, se produce una regresión del cuerpo lúteo (luteolisis mediada por PGF2 α), lo que resulta en una disminución rápida de la concentración plasmática de P4. Una vez que cesa la actividad inhibitoria de la P4 sobre el eje hipotálamo-hipófisis, vuelve a liberarse GnRH y FSH, que estimula el crecimiento de los folículos, que a su vez van a producir concentraciones crecientes de estrógenos, hasta que se produce de nuevo el pico de LH y comienza un nuevo ciclo. Durante el intervalo interovulatorio, en las ovejas se producen 3 o 4 ondas foliculares,

que se corresponden con aumentos en la concentración plasmática de estradiol, la cual alcanza su pico máximo (en torno a 21 pg/ml) durante el estro, justo antes del pico de LH (Bartlewski *et al.*, 1999a).

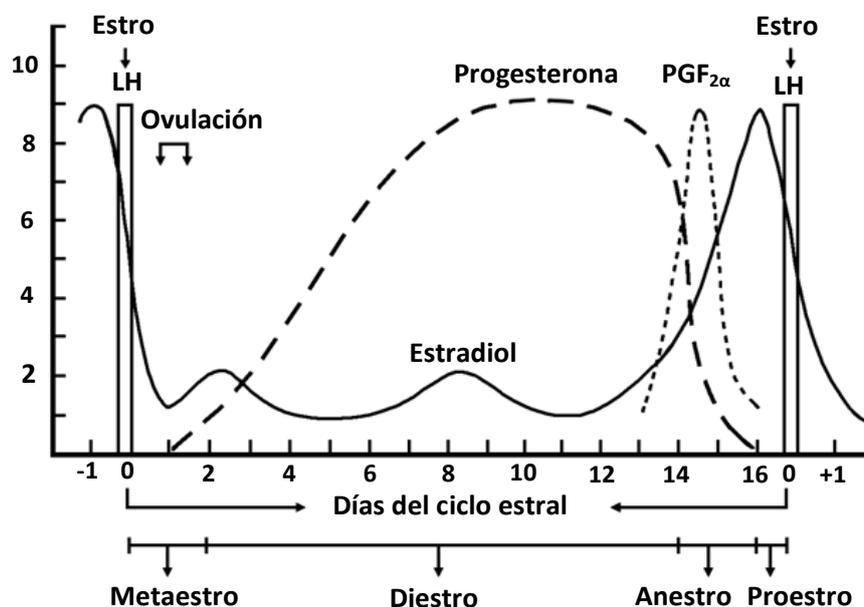


Figura 11. Cambios en las concentraciones de estradiol y progesterona durante el ciclo estral en la oveja. Los pulsos de $PGF_{2\alpha}$ previos al estro causan la lisis del cuerpo lúteo, dando lugar a la caída brusca de la concentración plasmática de progesterona y permitiendo el aumento de los niveles de estradiol que anticipan el pico de LH y la ovulación. Adaptado de Nasar, 2006.

Los cambios cíclicos de las concentraciones de hormonas ováricas (E2 y P4) asociados a los periodos de desarrollo de los folículos ováricos o del cuerpo lúteo tienen efectos directos sobre el crecimiento y metabolismo de las células de los tejidos del tracto reproductor, preparándolos para una posible gestación. Estos efectos dependen de la localización y concentración de ER y PR, cuya expresión, a su vez, varía a lo largo de las distintas fases del ciclo estral y la gestación. Esto fue demostrado por Spencer y Bazer (1995), los cuales realizaron histerectomías a ovejas en distintos días del ciclo estral y estudiaron la expresión de ARNm de ER y PR en cada uno de esos días, así como la localización espacial de los mismos en los distintos tejidos uterinos mediante hibridación *in situ* y análisis inmunocitoquímicos. En general, sus resultados mostraron que la expresión de genes de ER y PR en el útero ovino está regulada de forma tipo

celular y tejido dependiente en las distintas etapas el ciclo estral y de la gestación temprana.

Tras la fecundación debe producirse un reconocimiento materno de la gestación, un proceso fisiológico en el cual el embrión, en el periodo preimplantacional, debe anunciar su presencia en el tracto reproductivo materno con el fin de evitar que se desencadene el mecanismo luteolítico ejercido por la prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) sobre el cuerpo lúteo, prolongando la vida de éste y garantizando la producción de progesterona, que es esencial para el establecimiento y mantenimiento de la gestación. En los rumiantes este mecanismo está mediado por la secreción de interferón *tau* (IFN- τ) por parte de las células del trofoectodermo (Bazer *et al.*, 1997) entre los días 11 y 21 de gestación. El IFN- τ es una proteína perteneciente a la familia de los interferones tipo 1 que actúa silenciando la expresión de receptores de oxitocina en las células epiteliales y glandulares endometriales, bloqueando así la producción pulsátil de PGF_{2α} mediada por oxitocina (Bazer, 2013). Además de su efecto endocrino, el IFN- τ parece jugar un papel en la compleja modulación del sistema inmune local que debe producirse para que el feto semialogénico no sea rechazado por el sistema inmune materno. Así, se ha comprobado que el IFN- τ regula 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), lo que podría constituir uno de los mecanismos de tolerancia materna al embrión. Por otro lado, el IFN- τ ha demostrado *in vitro* tener buena eficacia antivírica, tanto frente a patógenos específicos de animales como de humanos, lo cual, unido a su escasa citotoxicidad, lo convierte en una buena alternativa al IFN- α en la terapia antivírica (Chon y Bixler, 2010).

Como se ha mencionado anteriormente, la progesterona es la hormona clave de la gestación. Impide la reanudación de la ciclicidad y prepara el útero para la implantación y para mantener al feto a lo largo de toda la gestación. En la oveja, las concentraciones plasmáticas de P4 aumentan gradualmente durante la primera mitad de la gestación, y en torno al día 90 empiezan a aumentar de forma mucho más marcada hasta alcanzar su pico máximo (aproximadamente 13 ng/ml) en torno al día 125 post-cubrición, y a partir de ahí descienden bruscamente hasta el momento del parto (figura 12) (Bassett *et al.*, 1969). Resulta interesante que el aumento marcado de la concentración de progesterona el día 90 de gestación coincida exactamente con la

aparición de las primeras inclusiones clamidiales en el epitelio coriónico de la placenta en ovejas infectadas (Buxton *et al.*, 1990).

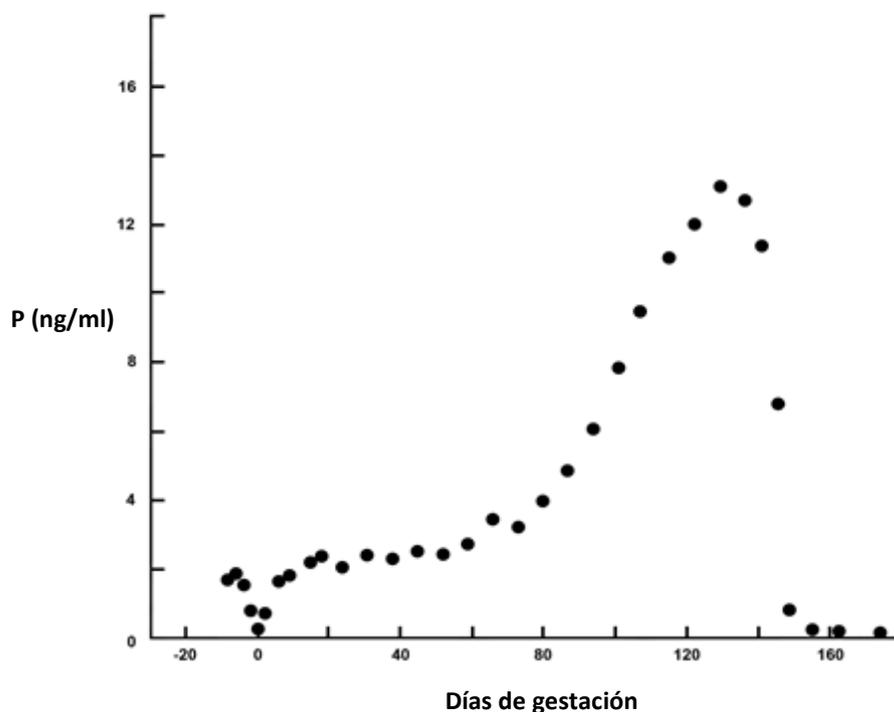


Figura 12. Concentración plasmática de progesterona en sangre periférica de oveja durante el periodo de gestación. Adaptado de Basset *et al.* (1969).

Durante el primer tercio de gestación, en la oveja, la producción y el mantenimiento de unos niveles adecuados de progesterona depende del cuerpo lúteo, y a partir del día 60 aproximadamente, esta producción es asumida por la placenta, de forma que una ovariectomía no comprometería el desarrollo fetal (Al-Gubory *et al.*, 1999). Cuando se produce la colonización placentaria por *C. abortus*, ésta se multiplica en el epitelio trofoblástico de las vellosidades coriales de los placentomas ovinos (Navarro *et al.*, 2004). Estas células son la fuente principal de progesterona desde el día 60 de gestación, lo que significa que una lesión en esta zona podría alterar el equilibrio hormonal necesario para el correcto mantenimiento de la misma. Así quedó demostrado en un trabajo en el que se comprobó cómo la concentración plasmática de progesterona en ovejas infectadas con *C. abortus* era significativamente menor en comparación con ovejas no infectadas (Leaver *et al.*, 1989).

PLANTEAMIENTO DE HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La bacteria intracelular obligada *Chlamydia abortus* es uno de los principales agentes causales de aborto infeccioso en el sector de los pequeños rumiantes. La enfermedad que produce, el aborto enzoótico ovino, es diagnosticada en la mayoría de las regiones ganaderas a nivel mundial, generando importantes pérdidas económicas. En la fisiopatología del aborto enzoótico ovino se alternan fases de latencia (desde la infección del animal hasta que queda gestante) con fases de multiplicación activa (final de la gestación y sucesivos estros) que dificultan la identificación de animales infectados y por tanto la erradicación de la enfermedad de la explotación.

A pesar del papel central que desempeña este proceso cíclico en la patogenia del aborto enzoótico ovino, todavía no se conocen los mecanismos subyacentes que lo controlan. Existen evidencias que sugieren que la fluctuación de las hormonas sexuales que regulan el ciclo reproductor, especialmente estradiol y progesterona, puede contribuir como desencadenante para la reactivación de *C. abortus*. Entre ellas cabe citar el reconocido papel inmunomodulador que tienen el estradiol y la progesterona. Además, dado el papel crítico que juegan las hormonas sexuales femeninas regulando el ciclo estral, es posible que un patógeno como *C. abortus*, cuya patogenia está asociada a determinados momentos del ciclo reproductor, haya desarrollado evolutivamente mecanismos para interactuar directamente con este ambiente hormonal, como así lo demuestran para otras especies de clamidia varios estudios sobre la influencia de las hormonas en el crecimiento, metabolismo y susceptibilidad a la infección de la célula hospedadora. Finalmente, otro hecho que apunta en este sentido es la coincidencia temporal entre la reactivación de *C. abortus* y la clara inversión del ratio progesterona/estradiol en la circulación materna, que tienen lugar al final de la gestación en la oveja.

Aun existiendo todos estos indicios, hasta la fecha no existe ningún trabajo que investigue la relación entre la patogenia de *C. abortus* y las citadas hormonas.

Paralelamente, estudios previos sugieren que el estado de latencia *in vivo* puede estar relacionado con el estado de persistencia *in vitro*, que puede definirse como un fenotipo viable y duradero en el tiempo pero no infeccioso del patógeno, inducido tras su exposición a condiciones de estrés como privación de nutrientes, respuesta inmune o presencia de determinados antibióticos. Aunque estos estudios han demostrado desde el

punto de vista morfológico que *C. abortus* es capaz de entrar en fase de persistencia tras la exposición a condiciones desfavorables, hasta la fecha no existe información sobre los cambios transcripcionales que se producen durante esta fase en esta especie.

La caracterización del estado de persistencia *in vitro* de *C. abortus* tanto desde el punto de vista morfológico como a través de las alteraciones transcripcionales de determinados genes que codifican proteínas clave en el ciclo de desarrollo de la bacteria puede ser muy útil para descifrar los fenómenos que controlan la entrada y salida del estado de persistencia y, en última instancia, averiguar cuál es la señal que produce la reactivación de *C. abortus*. Aunque existen varias formas de inducir el estado de persistencia clamidial, en esta tesis utilizaremos un modelo de inducción por adición de penicilina por haber demostrado buenos resultados en otras especies de clamidia y porque imita un tratamiento antibiótico inadecuado, lo cual resulta interesante desde el punto de vista del manejo de la enfermedad en el rebaño.

Finalmente, en la mayoría de estudios *in vitro* sobre *C. abortus* se ha utilizado como soporte para su cultivo la línea celular McCoy. Sin embargo, las células McCoy no son de origen ovino y no proceden de tejidos del tracto reproductor, por lo que no son una diana natural para la infección con *C. abortus*. Una línea celular para el estudio *in vitro* de la influencia de las hormonas sexuales femeninas en la infección por *C. abortus* debería reunir las siguientes características básicas para ser un buen modelo:

- Que la especie de origen sea el hospedador natural: ovino.
- Que la población celular de origen sea aquella por la que *C. abortus* tiene tropismo y se multiplica causando enfermedad: epitelio trofoblástico o del endometrio uterino.
- Presencia de receptores de estrógenos y progesterona.

Estas características las reúnen las dos líneas celulares utilizadas en esta tesis. Por un lado, Haldorson *et al.* (2006) aislaron células de trofoblasto ovino a partir del placentomo de una oveja al final de la gestación y las transformaron mediante transfección con el gen de una oncoproteína (SV-40 large T antigen), estableciendo la línea AH-1. Los autores verificaron la naturaleza trofoblástica de las células mediante el análisis de la expresión de interferón tau (citoquina producida casi exclusivamente por el trofoblasto de rumiantes). Aunque esta línea se estableció inicialmente con el objetivo de realizar estudios sobre *Neospora caninum*, ya ha sido utilizada como modelo para

investigar el papel del trofoblasto en el inicio y propagación de la inflamación placentaria que se produce durante la infección con *C. abortus* (Wheelhouse *et al.*, 2009).

Por otra parte, aunque la patología placentaria inducida por *C. abortus* comienza en la porción fetal de la placenta, se ha observado que rápidamente progresa hacia la porción materna, produciéndose endometritis en el borde de las carúnculas, con diferentes tipos de infiltrados inflamatorios en ambas porciones de la placenta (Sammin *et al.*, 2006; Sammin *et al.*, 2009). Por ello decidimos estudiar la influencia de las hormonas durante la infección por *C. abortus* también en el componente materno de la placenta, es decir, en el epitelio endometrial ovino. Con este fin utilizamos la línea celular LE, establecida por Johnson *et al.* (1999) a partir del útero de una oveja en el día 5 del ciclo estral. Estos autores verificaron el origen epitelial de las células por inmunomarcaje de citoqueratina y comprobaron la presencia de receptores de estrógenos y progesterona mediante inmunofluorescencia. Las células LE han sido utilizadas como modelo *in vitro* para estudiar varios procesos relacionados con el endometrio ovino a nivel celular, pero hasta la fecha no se han usado como modelo de infección con *C. abortus*.

Tanto la línea AH1 como la LE no se encuentran disponibles comercialmente, por lo que han tenido que ser proporcionadas por los laboratorios que las han producido y caracterizado.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, nuestra **hipótesis** es que el proceso cíclico de latencia/multiplicación activa de *C. abortus* en función de la fase del ciclo estral está relacionado con las fluctuaciones de las hormonas responsables de controlar el ciclo reproductivo.

El **objetivo global** de esta tesis es doble; por un lado, investigar la influencia de dos de las principales hormonas sexuales femeninas, estradiol y progesterona, sobre la infección *in vitro* de *C. abortus* y determinar así su papel en el establecimiento de infecciones persistentes en modelos *in vitro*; y por otro, caracterizar el estado de persistencia *in vitro* de *C. abortus* utilizando un modelo de adición de penicilina.

Planteamiento de hipótesis y objetivos

Para la consecución de dicho objetivo general, se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

1. Analizar la influencia de la penicilina, el estradiol y la progesterona en el desarrollo y multiplicación *in vitro* de *C. abortus*.
2. Analizar la ultraestructura de inclusiones clamidiales en distintas líneas celulares expuestas a tratamientos de penicilina, estradiol o progesterona.
3. Estudiar cambios en la respuesta transcripcional de *C. abortus* cultivada en distintas líneas celulares y expuesta a penicilina, estradiol o progesterona.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Microorganismo

Para la realización de todos los experimentos de esta Tesis se ha utilizado la cepa AB7 de *C. abortus*, aislada a partir de un aborto ovino por el Dr. Faye (Escuela de Veterinaria de Maison-Alfort, Francia). La razón por la que se usa esta cepa radica en su comportamiento abortivo, que ha sido extensamente probado tanto en modelos murinos (Caro *et al.*, 2009) como en el hospedador natural (Rodolakis y Laroucau, 2015).

1.1. Cultivo y producción de *Chlamydia abortus* en saco vitelino de embrión de pollo

El cultivo de *C. abortus* se realiza en huevos de gallina fecundados, libres de patógenos específicos, de 7 días de incubación en una incubadora a 37,5 °C y en movimiento. Estos huevos se inocularon vía intravitelina con una suspensión de 2×10^6 unidades formadoras de inclusiones (UFI) de *C. abortus* en 0,2 ml de PBS estéril.

Para ello, primero se visualizó la cámara de aire del huevo mediante un ovoscopio. La inoculación de la suspensión bacteriana se realizó con una aguja de 0,9 x 40 mm a través de la cámara de aire, depositando el inóculo en el lado opuesto al que ocupa el embrión. El punto de inoculación se selló con cera y los huevos inoculados se mantuvieron en incubadora a temperatura de 37,5 °C y humedad constante, observándose diariamente con un ovoscopio para detectar las posibles muertes embrionarias.

Se considera que si un embrión muere en los primeros 3 días no se debe a la infección, sino a posibles problemas traumáticos o tóxicos. Por lo tanto, se eliminan los huevos en los que el embrión muere antes de 4 días tras la inoculación. La infección por *C. abortus* provoca la muerte embrionaria tras 6 u 8 días post-infección por lo que los huevos se abren en este momento, una vez que, mediante visualización al ovoscopio, se comprueba que el embrión ha muerto.

Previamente a su apertura, los huevos se mantuvieron a 4 °C durante 2 horas, para asegurarnos de la muerte embrionaria y facilitar la manipulación del saco vitelino. Una vez extraído, el saco vitelino se diluyó al 1/3 (peso/volumen) en PBS, macerándose en un mortero de loza con arena de mar lavada estéril (Panreac). El macerado se centrifugó 10 minutos a 175 x g para eliminar, por un lado, la fracción lipídica, que se

queda en la parte superior del sobrenadante y, por otro, los restos celulares más groseros, que sedimentan. De esta forma, se recogió únicamente la porción intermedia de este centrifugado, que es la más rica en bacterias. Antes de distribuirla en alícuotas se realizó un control de esterilidad, sembrando una muestra en agar Columbia enriquecido con 5% de sangre de cordero (bioMérieux) e incubando durante 24 horas a 37 °C.

Para valorar la infección por *C. abortus* de las membranas vitelinas obtenidas, se realizaron extensiones de cada macerado sobre portaobjetos y, una vez fijadas por calor, se tiñeron mediante la técnica de Stamp. 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 1.2.

Todos los experimentos realizados en esta tesis fueron llevados a cabo utilizando el mismo lote de la cepa AB7 de *C. abortus*.

1.2. Titulación de suspensiones de *C. abortus* en células McCoy

1.2.1. Células McCoy

La línea celular McCoy se originó a partir de células del fluido sinovial humano, aunque el estudio de las sub-líneas sucesivas ha demostrado que actualmente está compuesta por fibroblastos de ratón. Una característica de estas células es que resultan especialmente sensibles a la infección clamidial, por lo que se utilizan específicamente para la propagación de clamidias. Las células fueron puestas en cultivo y mantenidas en crecimiento continuo como se expone en el apartado 2. Las especificidades relativas a su cultivo se detallan en la tabla 1.

Origen biológico	Ratón. No específico.
Morfología	fibroblasto
Medio de crecimiento	EMEM suplementado (anexo I)
Método de disociación	Tripsina/EDTA (anexo I)
Densidad de siembra	60 000 células/cm ²
Ratio de subcultivo	1:5 cuando el cultivo alcanza 70-80% de confluencia
Condiciones de cultivo	5% CO ₂ ; 37°C

Tabla 1. Características específicas de cultivo de las células McCoy

1.2.2. Infección del tapiz celular

Se depositaron células McCoy para su cultivo en una placa de 96 pocillos a una concentración de 20 000 células viables por pocillo, en 100 μ l. Las placas se incubaron a 37 °C y 5% CO₂ durante 24 horas, hasta que el tapiz apareció confluyente y el cultivo preparado para la infección. Pasado ese tiempo, se retiró el medio de la placa y se añadió la muestra a titular, diluida en una solución de dietil aminoetil-dextrano en PBS al 1/10 000 (PBS-DEAE-D), en diluciones decimales, desde 10⁻² hasta 10⁻⁷ (25 μ l por pocillo). Se incubó durante 90 minutos a 37 °C y 5% de CO₂, tras lo cual, se centrifugó a 1400 x g durante 30 minutos, se eliminó el sobrenadante de cada pocillo y se lavó añadiendo 100 μ l de PBS estéril. Después de retirar el PBS se añadieron 100 μ l por pocillo de MEM suplementado y las placas se incubaron en estufa de CO₂ a 37 °C durante 48 horas. Pasado ese tiempo, se retiró el medio de cultivo, se lavó una vez añadiendo 100 μ l de PBS y tras retirar el PBS las células se fijaron añadiendo a cada pocillo 100 μ l de acetona al 80% en PBS (v/v) enfriada a -20 °C. Las placas se conservaron a esta temperatura hasta su procesamiento.

1.2.3. Valoración del título de *C. abortus* por inmunofluorescencia indirecta

Para visualizar y contar las inclusiones que las clamidias forman en los cultivos de células McCoy, se realizó una técnica de inmunofluorescencia indirecta, utilizando varios anticuerpos monoclonales (AcMo) anti-MOMP oligomérica específicos de *C. abortus* (Salinas *et al.*, 1995). El protocolo a seguir es el siguiente: tras retirar la acetona de las placas conservadas a -20 °C, se realiza un lavado añadiendo 150 μ l de PBS por pocillo. Se elimina el PBS, se añade 50 μ l/pocillo de cada AcMo diluido al 1/1000 en PBS, y se incuba 45 minutos a 37 °C. Transcurrido ese tiempo, se lava dos veces con PBS durante 10 minutos en agitación. 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 como colorante de contraste (Sigma) a una dilución 1/5000. Se colocan 50 μ l por pocillo de esta mezcla y se incuba 45 minutos a 37 °C. La técnica finaliza con tres lavados en PBS y uno final con agua destilada, tras lo cual se elimina el agua sobrante, con precaución de no dañar el tapiz celular y se añaden 50 μ l de PBS-Glicerol (1:9 v/v) pH 8,6, con el objeto de favorecer la visualización de la fluorescencia.

Las inclusiones se observaron en un microscopio invertido dotado de equipamiento para epifluorescencia (Nikon TE2000-U). Se contó el número de cuerpos de inclusión por pocillo en la dilución que contenía menos de 100 inclusiones por pocillo y por último se calculó el título de la cepa expresado como número de UFI/ml.

2. Metodología común empleada en cultivos celulares

2.1. Descongelación y puesta en cultivo

Todas las líneas celulares utilizadas en esta tesis se encuentran conservadas en depósitos de nitrógeno líquido en la Sección de Cultivo de Tejidos, integrada en el Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia. Para descongelarlas y ponerlas en cultivo se empieza sumergiendo el criotubo en un baño maría a 37°C y agitándolo suavemente durante unos minutos. Una vez descongeladas, las células se resuspenden inmediatamente en 9 ml de medio de cultivo y se centrifugan a $200 \times g$ durante 10 minutos. Se desecha el sobrenadante, en el que se concentra el crioprotector dimetilsulfóxido (DMSO), tóxico a temperatura ambiente, y se resuspenden las células en 2 ml de medio de cultivo suplementado. A continuación se realiza el recuento y estimación de viabilidad como se detalla en el siguiente apartado y se ajusta la concentración deseada usando medio de cultivo suplementado. Finalmente se distribuyen en un volumen final de 4 ml en frascos de 25 cm² y se incuban en un incubador de CO₂ (5%) durante 24 horas. Pasado ese tiempo, en el cual las células se adhieren al frasco de cultivo, se renueva el medio de cultivo, retirando el medio con células muertas y restos celulares que quedan en suspensión y añadiendo 4 ml de medio de cultivo suplementado fresco.

2.2. Recuento y estimación de viabilidad

El recuento de células viables se realiza mediante una tinción vital con azul tripán. El método consiste en depositar 50 µl de la suspensión celular en un tubo Eppendorf, al que se añade el mismo volumen de una disolución de azul tripán al 1% en PBS. La mezcla se agita suavemente con una micropipeta y se llena con ella la cámara de aire que se forma al poner un cubreobjetos sobre el hemocitómetro de Neubauer.

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

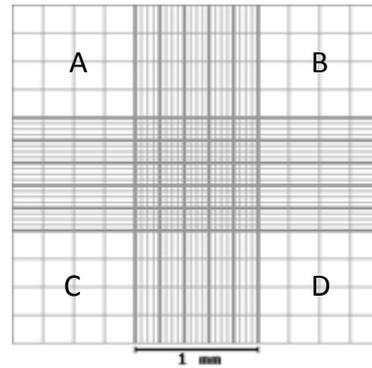


Figura 13. Hemocitómetro de Neubauer

$$\text{N}^\circ \text{ células viables/ml} = \frac{A+B+C+D}{4} \times 2 \times 10\,000$$

2.3. Subcultivo de líneas continuas creciendo en monocapa

Las células se mantienen en crecimiento continuo en frascos de cultivo durante la realización de los experimentos. Para ello, los cultivos que alcanzan un 70-80% de confluencia se someten a varios subcultivos o pases.

Para la realización de un subcultivo, se procede en primer lugar a disgregar mediante tratamiento enzimático el tapiz celular del fondo del frasco de cultivo. Para ello, se retira el medio del frasco que contiene la línea celular, se añade 1,5 ml (5 ml en el caso de los frascos de 75 cm²) de una solución de tripsina y EDTA en PBS precalentada a 37 °C y se deja actuar durante 4 minutos a 37 °C. Pasado ese tiempo comprobamos al microscopio invertido que las células se han desprendido de la superficie de cultivo. A continuación se añaden 3,5 ml de medio de cultivo suplementado para neutralizar la actividad de la tripsina (5 ml en el caso de frascos de 75 cm²). En un nuevo frasco de cultivo de 25 cm² se añaden 4 ml de medio de cultivo suplementado (12 ml en el caso de los frascos de 75 cm²) y, una vez calculado el número de células viables, tal y como se ha descrito previamente, se siembra el número de células adecuado en función de cada línea celular y se incuban a 37 °C y 5% de CO₂. El tapiz se controla diariamente y transcurridos 2 o 3 días, cuando el tapiz vuelve a alcanzar el 70-80% de confluencia, se hace un nuevo pase.

2.4. Control de la susceptibilidad a la infección

Las células LE y AH-1 (apartado 3.1) no habían sido utilizadas hasta el momento en estudios de infección clamidial, por lo que en primer lugar se realizaron ensayos para comprobar su susceptibilidad a la infección por la cepa AB7 de *C. abortus*.

2.4.1. Infección del tapiz celular

Primero se depositan células para su cultivo en una placa de 96 pocillos a una concentración determinada según la línea celular, en 100 µl de medio suplementado. Las placas se incuban a 37 °C y 5% de CO₂ durante 24 horas, hasta que el tapiz aparece semiconfluyente y el cultivo preparado para la infección. Pasado ese tiempo, se retira el medio de la placa y se añaden diluciones decimales, desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁸, de una suspensión de *C. abortus*, diluida en una solución de PBS-DEAE-D al 1/10 000. El resto del proceso de infección del tapiz se llevó a cabo siguiendo los pasos descritos en el apartado 1.2.2.

2.4.2. Inmunofluorescencia indirecta

Para visualizar y contar las inclusiones que las clamidias forman en los cultivos de cada línea celular, se realizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta como se detalla en el apartado 1.2.3.

2.5. Congelación

Con el fin de crear y mantener un stock de células disponible para utilizar en todos los experimentos, en el momento de hacer un subcultivo se conserva un lote de células en nitrógeno líquido. Para la congelación, se siguen los pasos de un subcultivo hasta que tenemos las células en suspensión (apartado 2.3). A continuación se hace recuento y estimación de viabilidad (apartado 2.2). La viabilidad celular debe ser mayor de un 85% para evitar problemas a la hora de reiniciar un cultivo congelado debido al escaso número de células y presencia de restos celulares. Ajustamos la concentración de células a 2 x 10⁶ células/ml. A continuación preparamos 5 ml de medio de congelación, compuesto por FBS (80%) y DMSO (20%) y lo mezclamos con 5 ml de la suspensión celular, en una proporción 1:1 (de modo que las células quedan a una concentración de 1 x 10⁶ células/ml, el DMSO al 10% y el suero al 40%). Finalmente, se distribuye la

mezcla en 10 criotubos (1 ml/criotubo), que se identifican y se introducen a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un recipiente que garantiza una velocidad de congelación entre 1 y $3\text{ }^{\circ}\text{C}$ por minuto. Al día siguiente, los tubos se trasladan a un depósito de almacenamiento con nitrógeno líquido.

3. Influencia de la penicilina y las hormonas en el establecimiento de un estado de infección persistente sobre diferentes líneas celulares

3.1. Líneas celulares

Para nuestro estudio se utilizaron dos líneas celulares ovinas procedentes de órganos implicados en la reproducción y relacionados con la patogenia de *C. abortus* como son el útero, origen de la línea celular LE, y la placenta, origen de la línea AH-1. Para realizar ensayos con hormonas en cultivos celulares es necesario utilizar medios de cultivo sin rojo fenol, ya que éste puede tener cierta actividad estrogénica sobre las células (Berthois *et al.*, 1986) y un suero fetal bovino (FBS) tratado para eliminar la presencia de hormonas esteroideas (charcoal stripped FBS).

3.1.1. LE

La línea celular LE fue cedida por el Dr. Joe Arosh (*Texas A&M College of Veterinary Medicine & Biomedical Sciences*, EE.UU). Se trata de una línea de células inmortalizadas aisladas del epitelio luminal del endometrio de una oveja de raza Rambouillet adultas histerectomizada en el día 5 del ciclo estral (Johnson *et al.*, 1999). Los autores verificaron el origen epitelial de las células por inmunomarcaje de citoqueratina y las caracterizaron funcionalmente comprobando la presencia de receptores de estradiol y progesterona y la presencia de receptores de interferón *tau*. Las especificidades relativas a su cultivo se detallan en la tabla 2.

Origen biológico	Epitelio luminal de endometrio ovino
Morfología	Célula epitelial
Medio de crecimiento	DMEM suplementado (anexo I)
Método de disociación	Tripsina/EDTA (anexo I)
Densidad de siembra	50 000 células/cm ²
Ratio de subcultivo	1:10 cuando el cultivo alcanza 70-80% de confluencia
Condiciones de cultivo	5% CO ₂ ; 37°C

Tabla 2. Características específicas de cultivo de las células LE

3.1.2. AH-1

La línea celular AH-1 fue cedida por el Dr. David Longbottom (*Moredun Research Institute*, Reino Unido). Estas células fueron transformadas a partir de cultivos primarios de un cotiledón de la placenta de una oveja de raza Suffolk al final de la gestación (Haldorson *et al.*, 2005). En el mismo trabajo, la línea fue caracterizada morfológica y funcionalmente (verificando la expresión de ARNm de interferón- τ) como trofoblasto fetal ovino. Las características relativas a su cultivo se exponen en la tabla 3.

Origen biológico	Placenta ovina
Morfología	Trofoblasto
Medio de crecimiento	IMDM suplementado (anexo I)
Método de disociación	Tripsina/EDTA (anexo I)
Densidad de siembra	50 000 células/cm ²
Ratio de subcultivo	1:10 o 1:12 cuando el cultivo alcanza 70-80% de confluencia
Condiciones de cultivo	5% CO ₂ ; 37°C

Tabla 3. Características específicas de cultivo de las células AH-1

3.2. Diseño experimental

El siguiente diseño experimental se realizó con cada una de las líneas celulares descritas en el apartado 3.1.

3.2.1. Preparación de los cultivos celulares

Para iniciar los experimentos, nuestro primer objetivo fue sembrar 4 frascos de 75 cm² con aproximadamente 3,5x10⁶ células/frasco y 2 placas de 24 pocillos con 1x10⁵ células/pocillo. Para ello realizamos un subcultivo de un frasco de 75 cm² al 80% de confluencia como se describe en el apartado 2.3 hasta tener las células en suspensión. Añadimos 1 ml de suspensión celular a cada uno de los frascos de 75 cm², en los que previamente habíamos añadido 11 ml de medio de cultivo. Con la suspensión restante realizamos un recuento y estimación de viabilidad (apartado 2.2) y ajustamos la concentración de células con medio de cultivo suplementado hasta tener 5 x 10⁶ células en 50 ml de medio (1x10⁵ células/ml). Finalmente distribuimos 1 ml de suspensión en

cada uno de los pocillos e incubamos tanto los frascos como las placas durante 24 horas a 37 °C y 5% CO₂.

3.2.2. Preparación y tratamientos de hormonas y penicilina

La progesterona y el 17 β -estradiol (Sigma-Aldrich) fueron disueltos en etanol absoluto hasta obtener una solución stock de cada uno de ellos de 1 mg/ml siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se hicieron sucesivas diluciones a partir de esta solución stock en medio de cultivo sin rojo fenol suplementado. Debido a que en el hospedador natural las hormonas fluctúan durante el ciclo estral y la gestación, para esta tesis se utilizaron concentraciones suprafisiológicas para cubrir todo el espectro de condiciones posibles (Pant *et al.*, 1977). Además, estudios previos han demostrado que los niveles de progesterona a nivel local en tejidos de órganos del tracto reproductor como ovarios y placenta pueden llegar a ser entre 2 y 5 veces más altos que los niveles séricos (Weiss y Rifkin, 1975; Feinshtein *et al.*, 2010). Así, las concentraciones utilizadas fueron:

- Estradiol: 500 pg/ml
- Progesterona: 100 ng/ml

En el caso de la penicilina (Sigma-Aldrich), también se hizo una dilución con medio de cultivo sin rojo fenol suplementado hasta alcanzar la concentración deseada:

- Penicilina G: 200 U/ml

Transcurridas 24 horas de incubación, los cultivos celulares descritos en el apartado anterior fueron tratados con estradiol, progesterona y penicilina, sustituyendo el medio de cultivo del día anterior por los nuevos medios que contienen las citadas hormonas o el antibiótico. Así, tras aspirar el medio, a cada frasco se le añadió 12 ml de medio con un tratamiento y al cuarto se le añadió medio no tratado, como control negativo. Paralelamente, en el caso de las placas (figura 14), se aspiró el medio de los pocillos y se aplicaron los tratamientos añadiendo 1 ml de los medios tratados a cada pocillo, constituyendo cada muestra un grupo de tres pocillos, y dejando pocillos con medio no tratado como controles negativos.

Los cultivos celulares tratados fueron incubados durante 24 horas a 37 °C y 5% de CO₂ antes de continuar con los experimentos.

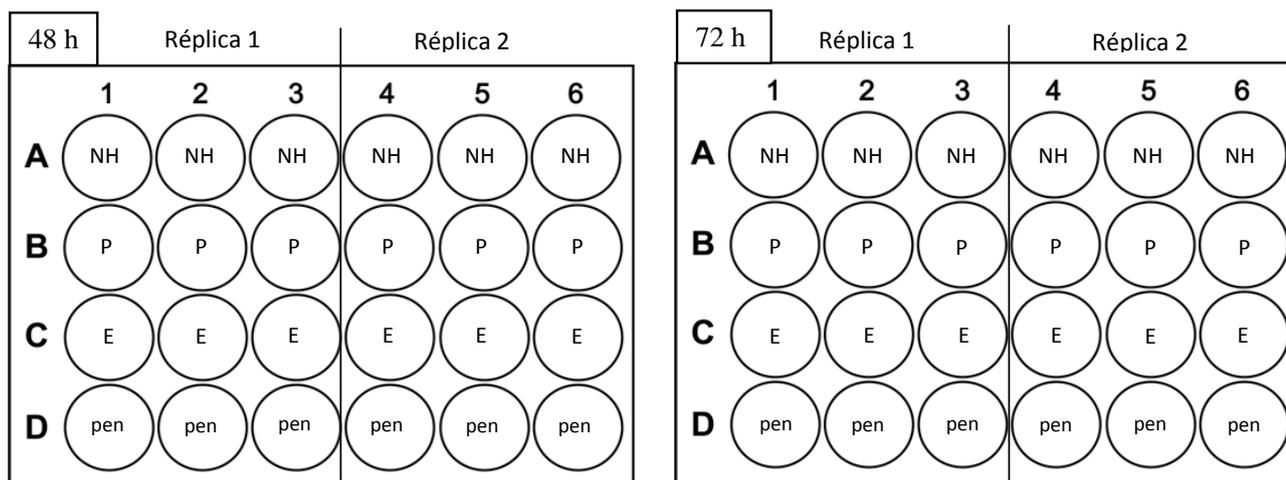


Figura 14: Distribución de los distintos tratamientos en las placas. El experimento se realizó por duplicado (réplica 1 y 2) para cada momento de recogida de muestras (48 y 72 h). Cada muestra se compondrá del material recogido en tres pocillos. NH: No hormonas (controles no tratados); P: Progesterona; E: estradiol; pen: penicilina.

Con el fin de verificar la presencia y estabilidad del estradiol y la progesterona durante el experimento, en el momento de recogida de las muestras (48 y 72 horas post-infección) se cuantificó mediante dos kits ELISA comerciales la concentración de 17 β -estradiol (DetectX 17 β -estradiol, Arbor Assays) y de progesterona (DetectX Progesterone, Arbor Assays) en el sobrenadante de los cultivos celulares tratados, siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.2.3. Infección de los cultivos tratados

Tras 24 horas de incubación de las células en presencia de sus respectivos tratamientos, se procedió a infectar los cultivos con la cepa AB7 de *C. abortus* a una multiplicidad de infección (MOI) de 2 UFI por célula. Para ello, se diluyó una alícuota del stock clamidial obtenido según el apartado 1.1 en una solución de PBS-DEAE-D al 1/10 000. A continuación aspiramos el medio de los frascos y las placas y añadimos 5 ml de la dilución clamidial a cada frasco y 100 μ l a cada pocillo. Se incubaron durante 90 minutos a 37 $^{\circ}$ C y 5% de CO₂, tras lo cual, se centrifugaron a 1400 x g durante 30 minutos. Seguidamente se retiró el medio de infección y se lavaron los frascos y pocillos con PBS estéril. Después de retirar el PBS se volvió a añadir medio de cultivo (12 ml/frasco y 1 ml/pocillo en el caso de las placas) suplementado con estradiol,

progesterona o penicilina, y sin tratamiento en el caso de los controles negativos, y se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂.

3.2.4. Recogida de muestras

3.2.4.1. Sobrenadantes y ADN

Las muestras de sobrenadantes y de ADN se recogieron en dos momentos: a las 48 (placa 1) y a las 72 horas post-infección (placa 2). Se recogieron 500 µl de sobrenadante de cada pocillo que se pasaron a criotubos y se congelaron a -80 °C. Seguidamente se aspiró el resto de medio de cultivo de los pocillos y se recogieron las células proyectando 200 µl de PBS frío (a punto de congelación) por pocillo. De esta forma se recogen 600 µl de suspensión celular, por muestra, en un tubo Eppendorf. A continuación se centrifugaron los tubos durante 5 minutos a 400 x g. Tras retirar el sobrenadante, se resuspendió el pellet celular en el primer buffer de extracción de un kit comercial de extracción de ADN (FavorPrep Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit, Favorgen) y se continuó con 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 utilización.

3.2.4.2. ARN

Las muestras de ARN se recogieron en dos momentos: a las 48 (placa 1) y a las 72 horas post-infección (placa 2) para obtener información de un ciclo clamidial completo. Las ribonucleasas (RNasa) son extremadamente comunes, lo que resulta en periodos de vida muy cortos para cualquier ARN en un ambiente no protegido. Por ello, al trabajar con ARN se tomaron ciertas precauciones para prevenir su rápida degradación como limpiar las superficies de trabajo con un agente que elimina las RNasas (RNaseZAP, Sigma-Aldrich), usar puntas de micropipeta con filtro y libres de RNasas y mantener los tubos y las muestras en hielo.

Se aspiró el medio de cultivo de los pocillos y se recogieron las células en el primer buffer de extracción de ARN de un kit comercial (RNeasy Mini Kit, Qiagen) proyectando el mismo mediante pipeteo sobre el tapiz celular. La función de este buffer es lisar las membranas plasmáticas de células y orgánulos, liberando su contenido. El

material recogido de cada una de las muestras fue homogeneizado para reducir su viscosidad haciéndolo pasar por un sistema de biopolímeros en columnas de microcentrífuga (Qiasredder, Qiagen), antes de continuar con la extracción y purificación de ARN.

Se procedió a la extracción de ARN total a partir de las muestras homogeneizadas usando el kit comercial RNeasy Mini Kit (Qiagen), siguiendo el protocolo del fabricante. El ARN fue eluído en 50 μ l de agua libre de RNasas y a continuación sometido a un tratamiento de DNasa (DNase I, Thermo Fisher Scientific) para eliminar los posibles restos de ADN, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de ARN fueron cuantificadas mediante espectrofotometría (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific). Finalmente, las muestras de ARN fueron alicuotadas y conservadas a -80 °C.

Para comprobar la ausencia de ADN en las muestras se realizó una real-time qRT-PCR (Kapa Sybr Fast Universal One-step qRT-PCR kit, Sigma-Aldrich) con cada una de las muestras, poniendo controles sin enzima retrotranscriptasa.

3.2.4.3. Células

A las 72 horas tras la infección se recogieron las células de los frascos de 75 cm² con las que se realizará el estudio ultraestructural (apartado 3.5). Para ello, se aspiró el medio de cada uno de los frascos y se añadieron 5 ml de una solución de tripsina/EDTA precalentada a 37 °C. Tras 4 minutos de incubación a 37 °C, neutralizamos la acción de la tripsina añadiendo medio suplementado con FBS. A continuación pasamos las células en suspensión a un tubo de 15 ml y las centrifugamos a 200 x g durante 10 minutos. Finalmente aspiramos el sobrenadante de los tubos, quedando un pellet de células en el fondo, el cual fue inmediatamente procesado para su visualización al microscopio electrónico de transmisión como se detalla en los apartados 3.5.1 y siguientes.

3.3. Estudio del efecto de la penicilina y las hormonas en la multiplicación clamidial

Para determinar la influencia del estradiol y la progesterona en la multiplicación clamidial *in vitro*, ésta fue evaluada mediante aislamiento de CE a partir

de las muestras de sobrenadantes y mediante PCR cuantitativa (q-PCR) a partir del ADN extraído de las células infectadas.

3.3.1. Aislamiento de *C. abortus*

Se realizaron diluciones decimales de los sobrenadantes en PBS-DEAE-D desde 10^{-1} a 10^{-4} . Las mismas diluciones se realizaron con un control positivo, la cepa AB7 cultivada en saco vitelino. Las diluciones de las muestras y del control positivo se utilizaron para infectar cultivos semiconfluentes de células McCoy en placas de 96 pocillos como se describe en el apartado 1.2.2. Finalmente, para observar las inclusiones clamidiales se realizó una técnica de IFI como se ha descrito en el apartado 1.2.3.

3.3.2. Real-Time q-PCR

La mezcla de cada reacción de q-PCR se realizó en un volumen final de 25 μ l. Cada reacción contenía 12,5 μ l de una mezcla comercial de Taq polimerasa, buffer de reacción, dNTPs y MgCl₂ (Kapa Probe Fast qPCR Master Mix, Sigma-Aldrich), 2,5 μ l de cada uno de los primers específicos de *C. abortus* CpaOMP1-F y CpaOMP1-R (0,9 μ M) (tabla 4), 2,5 μ l de la sonda TaqMan CpaOMP-S (0,2 μ M) (tabla 4) y 0,4 μ l de fluorocromo de normalización ROX low. Se añadió 2,6 μ l 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 q-PCRs 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 q-PCRs se hicieron por duplicado, tomándose la media de los dos valores como resultado definitivo para cada muestra analizada. A la vista de los valores obtenidos con el control positivo a diferentes diluciones, se establecieron puntos de corte para los valores obtenidos con las muestras en estudio, de manera que aquellas

muestras en las que se detectó señal de amplificación a ciclo (C_q) 37,5 o superior fueron consideradas como muestras negativas; mientras que aquellas en las que se detectó señal de amplificación con un C_q inferior a 36 fueron consideradas positivas. Las muestras con valores de C_q entre 36 y 37,5 se determinaron como dudosas.

Primers y sonda	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	Gen diana	Tamaño amplicón	Referencia
CpaOMP1-F	GCAACTGACACTAAGTCGGCTACA	<i>ompA</i>	82 pb	Pantchev <i>et al.</i> , 2009
CpaOMP1-R	ACAAGCATGTTCAATCGATAAGAGA			
CpaOMP1-S	FAM-TAAATACCACGAATGGCAAGTTGGTTTAGCG-TAMRA			

Tabla 4. Información sobre la secuencia, gen diana y tamaño del amplicón de los primers y sonda utilizados en la q-PCR para la detección de *C. abortus*.

3.4. Estudio ultraestructural

3.4.1. Fijación de las muestras

Los pellets de células fueron fijados en glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato 0,1 M (pH 7,2) durante 1 hora a 4 °C. A continuación se pasaron a una mezcla de tampón cacodilato y sacarosa (líquido lavador) para eliminar los restos de fijador durante toda la noche. Al día siguiente las muestras fueron postfijadas en tetraóxido de osmio al 1% en tampón cacodilato durante 2 horas a 4°C. Finalmente se volvieron a pasar por líquido lavador durante una noche.

3.4.2. Deshidratación e inclusión en resina Epon

El proceso de deshidratación de las muestras fijadas se realizó mediante la sumersión de las mismas en concentraciones crecientes de etanol (30%, 50%, 70%, 90% y etanol absoluto), permaneciendo en cada una de las soluciones durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se procedió a la inmersión de las muestras en óxido de propileno, en dos pasos de 15 minutos cada uno.

Para la inclusión en resina se sumergieron las muestras en tres disoluciones de óxido de propileno y Epon:

Epon + óxido de propileno en proporción 1:2.....45 min

Epon + óxido de propileno en proporción 1:1.....2 h

Epon + óxido de propileno en proporción 2:1.....2 h

Finalmente se sumergieron en Epon puro durante toda la noche y al día siguiente se realizaron las cápsulas con Epon puro y se dejaron en estufa durante 48 horas a 70 °C para completar la polimerización de la resina.

3.4.3. Cortes semifinos y ultrafinos y valoración de los resultados

Una vez polimerizados los bloques de resina, se realizaron cortes semifinos (2.5 µm) con un ultramicrotomo Leica EM UC6. Estos cortes se tiñeron con azul de toluidina para localizar las zonas de la muestra más ricas en células infectadas. Una vez seleccionada la zona adecuada, se realizaron, utilizando el mismo ultramicrotomo, secciones ultrafinas de 40 nm de espesor, que fueron recogidas sobre rejillas de cobre de 200 mallas previamente cubiertas con una película de formvar. Luego fueron contrastadas con acetato de uranilo al 2% en tampón veronal y citrato de plomo.

Los cortes de las muestras se observaron en el Microscopio electrónico Philips Tecnai 12 con una aceleración de 80 Kv. La captación de imágenes fue realizada con una cámara digital Megaview III. En las muestras que mostraban heterogeneidad en la morfología de las inclusiones, éstas fueron clasificadas en tres tipos: características normales, intermedias o de persistencia, y se calculó el porcentaje de cada tipo presente en la muestra contando las células de 10 campos diferentes.

3.5. Estudio de la expresión relativa de genes

3.5.1. Selección de genes y diseño y optimización de primers

Realizamos una selección inicial de 27 genes de interés basándonos en la bibliografía relacionada con el efecto del estado de persistencia sobre la expresión génica durante el ciclo de desarrollo clamidial. La mayoría de estos trabajos publicados son sobre *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* y *C. psittaci*, por lo que fue necesario utilizar software para alineamiento de secuencias (Geneious, MultAlin y BLAST) para encontrar las secuencias equivalentes en el genoma de *C. abortus* publicado en el GenBank (NCBI Reference Sequence: NZ_LN554882.1).

Para diseñar los primers para los genes seleccionados, primero introducimos la secuencia de cada gen en la herramienta informática OligoPerfect Designer (Thermo

Fisher Scientific), la cual nos proporciona varios pares de primers posibles según las características que elegimos de longitud y temperatura de fusión (T_m). Luego hicimos una evaluación teórica de cada par de primers con el programa OligoAnalyzer 3.1 (IDT), y seleccionamos aquellos con menores posibilidades de formar estructuras secundarias como dímeros y horquillas. Todos los primers fueron sintetizados por Eurofins Genomics.

Con el fin de poner a prueba los primers y optimizar las condiciones de la PCR se realizaron varias pruebas con los primers seleccionados sobre ADN genómico de una cepa tipo de *C. abortus* mediante real-time q-PCR. Se ensayaron 3 concentraciones de cada par de primers (1; 0,5 y 0,25 μM) y luego se probaron 5 concentraciones de ADN molde en diluciones decimales (100 $\text{ng}/\mu\text{l}$ – 0,01 $\text{ng}/\mu\text{l}$). En general, los mejores resultados (amplificación sin formación de dímeros de primers) se obtuvieron con la concentración más baja de primers y las diluciones 10, 1 y 0,1 $\text{ng}/\mu\text{l}$ de ADN. Para comprobar la especificidad de la amplificación realizamos electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR y comparamos el tamaño de las bandas con la longitud teórica de cada gen. Como resultado de estas pruebas, finalmente se seleccionaron 16 genes objetivo que codifican proteínas implicadas en la respuesta a estrés, estructura de membrana, división celular, regulación de la conversión de CR a CE y metabolismo energético (tabla 5).

Finalmente, la cuantificación relativa de ARN requiere que los genes objetivo y el gen de referencia, que en nuestro caso fue el *16S rRNA*, sean amplificados con eficiencias comparables. Para comprobar esto, realizamos una curva de eficiencia mediante real-time q-PCR para cada gen seleccionado con 5 diluciones decimales de una muestra de ARN (10 $\text{ng}/\mu\text{l}$ – 0,001 $\text{ng}/\mu\text{l}$). Se obtuvieron eficiencias cercanas al 100% en casi todos los casos entre las diluciones 10 y 0,01 $\text{ng}/\mu\text{l}$ y se realizó electroforesis de los amplicones para comprobar la especificidad.

Genes	Secuencia de primers (5'-3')	Proteína codificada	Clasificación funcional
<i>16S rRNA</i>	Fw: CTTGTACACACCGCCCGTC	ARN ribosómico	Gen de referencia
	Rv: GCCCAACCTAGTCAAACCGTC		
<i>GroEL</i>	Fw: CAACAGGTAGCAGAATCCGGA	Proteína de choque térmico 60	Respuesta a estrés
	Rv: CTCTTCGCTGATCAATTGGCCA		
<i>dnaK</i>	Fw: ACCAACC GTTCATCACTATGGA	Proteína de choque térmico 70	
	Rv: TGGCATGGAGCTTTTGTACG		
<i>htrA</i>	Fw: CAAGATGACGGTGTCTCTGCTTT	Proteasa	
	Rv: TGCTTCGACAGAAACAATCAGCA		
<i>grpE</i>	Fw: CAACAGTTCCTACCCCGATAA	Cofactor Hsp70	
	Rv: CCTCATCTGACATCTGTGAGGC		
<i>ompA</i>	Fw: GCATTATTGTTTGCCGCTAC	MOMP	Proteínas de membrana
	Rv: ATCACCTGAAGCACCTTCCCA		
<i>omcA</i>	Fw: TGCCGTATTGTAGATTGCTGCT	Proteína del complejo mb externa A	
	Rv: TGA ACTCTGAATTGCACTCAG		
<i>omcB</i>	Fw: GTCGATTTCGATGCTCTGCCTA	Proteína del complejo mb externa B	
	Rv: AGCAACGGGTACCGTTAAAGT		
<i>pmp17G</i>	Fw: GGGTGATTGGGGTAACGATTGT	Proteína polimórfica de mb	
	Rv: AGGTTGGTGAGATTGCTGCT		
<i>ftsW</i>	Fw: TTGTTCCCTGCGTCGCTATC	Proteína de mb en división celular	División celular
	Rv: AAAAGCTATTACGGCTGCGGA		
<i>hctA</i>	Fw: ACGTGA CTTAGACAAGGCCGA	Proteína similar a histonas	Regulación de la conversión CR a CE
	Rv: TGCTTTACGCTTAGATGCTGATT		
<i>euo</i>	Fw: AAGGCTTCTAAAACAACCCGG	Proteína similar a histonas	
	Rv: GGCTAATAACCCAAGCAGCG		
<i>Cpaf</i>	Fw: CGCACCTGAGCATCGTTA	Factor clamidial con actividad proteasa	Degradación de proteínas
	Rv: AAGACAAAACCCCAAGCTCCT		
<i>sctN</i>	Fw: TTCGATACCCTCATGTCGCAA	ATPasa citoplasmática del sistema de secreción tipo III	Sistema de secreción tipo III
	Rv: TACCTCCCAACGCGTACATT		
<i>cydA</i>	Fw: GGCGTTTGCATCCAAGAGTTA	Citocromo d ubiquinol oxidasa sub I	Sistema de transporte de electrones
	Rv: GG TAGTGAAGGCGTTTTTGTCTTT		
<i>cydB</i>	Fw: TCCACACAACAACGTGTAGG	Citocromo d ubiquinol oxidasa sub II	
	Rv: TAGTAAGACCGAGTCAGCAAATGG		
<i>miaA</i>	Fw: CGCCCACAAGAATAGGGACTT	Isopentenil pirofosfato transferasa	Control a nivel de traducción
	Rv: GACAGCGCATTCCTCATTATCTGA		

Tabla 5. Genes seleccionados y secuencias de primers utilizados para la Real-Time q-PCR junto a las proteínas que codifican clasificadas funcionalmente.

3.5.2. Retrotranscripción

El análisis de expresión de genes se realizó mediante PCR a tiempo real en dos pasos, es decir, la reacción de retrotranscripción y la de amplificación de ADN complementario (ADNc) producto de la reacción anterior se hicieron por separado. De

esta forma podemos conservar un stock de ADNc, que es más estable que el ARN inicial, para futuros experimentos.

Se convirtieron 400 ng de ARN total de cada muestra (apartado 3.2.4.2) a ADNc usando un kit comercial (Reverse Transcriptase Core kit, Eurogentec) que utiliza oligonucleótidos de secuencias aleatorias como primers. Cada reacción de retrotranscripción incluía 2 μ l de buffer RT 10x, 4 μ l de $MgCl_2$ 25mM, 4 μ l de dNTPs 2,5 mM, 1 μ l de oligonucleótidos, 0,4 μ l de inhibidor de RNAsa, 0,5 μ l de EuroScript RT, 2 μ l de ARN molde (200 ng/ μ l) y 6,1 μ l de agua libre de RNAsas para completar un volumen final de reacción de 20 μ l. Las reacciones de retrotranscripción se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler (Eppendorf) con un programa de tres pasos: un paso inicial de 10 minutos a 25 °C, un paso de retrotranscripción de 30 minutos a 48 °C y un paso final de inactivación de la enzima retrotranscriptasa de 5 minutos a 95 °C.

Asumimos que todo el ARN fue convertido a ADNc, de forma que al final obtuvimos 20 μ l de ADNc de cada muestra a una concentración de 20 ng/ μ l, que fueron distribuidos en alícuotas y conservados a -20 °C.

3.5.3. Real-Time q-PCR

La Real-Time q-PCR (PCR cuantitativa a tiempo real) se realizó en un termociclador Applied Biosystems 7500 Fast (Thermo Scientific). Cada muestra fue analizada por duplicado, dos veces independientes.

La mezcla de cada reacción se realizó en un volumen final de 20 μ l. Cada reacción contenía 1 μ l de ADNc diluido en agua ultrapura (10 ng), 10 μ l de SYBR Green Master Mix (Kapa SYBR Fast qPCR Master Mix, Sigma-Aldrich), 0,4 μ l de fluorocromo de normalización ROX y 2 μ l de cada uno de los primers (0,25 μ M). Para completar el volumen final de la reacción se añadió 4,6 μ l de agua ultrapura. Las condiciones de amplificación consistieron en 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 30 segundos. Finalmente se realiza un proceso de disociación en 4 etapas (15 segundos a 95 °C; 1 minuto a 60 °C; 15 segundos a 95 °C y 15 segundos a 60 °C) ya que el análisis de la curva de disociación nos permite identificar la presencia de dímeros de primers y analizar así la especificidad de la reacción.

3.5.4. Cuantificación relativa de la expresión génica

La expresión relativa de los genes seleccionados fue normalizada con respecto al nivel de amplificación del gen de referencia *16S rRNA* en cada muestra y calculada usando el método comparativo $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Para la interpretación y análisis de los resultados, definimos la regulación al alza o a la baja significativa como un aumento o disminución de dos veces o más del nivel de expresión del gen normalizado de interés de la muestra con respecto a la muestra no tratada. Estos valores fueron elegidos por ser umbrales comúnmente establecidos en estudios anteriores de expresión génica realizados con otras especies de *Chlamydia* (Hogan *et al.*, 2003; Goellner *et al.*, 2006; Amirshahi *et al.*, 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Susceptibilidad de las líneas celulares a la infección por *C. abortus*

En la mayoría de estudios *in vitro* sobre *C. abortus* se ha utilizado como soporte para su cultivo diversas líneas celulares como las McCoy, L, Vero, BeWo, HeLa o LLC-MK2. Sin embargo, éstas células no son de origen ovino o no proceden de tejidos del tracto reproductor, por lo que no son una diana natural para la infección con *C. abortus*. En otras ocasiones se han utilizado células de origen ovino para realizar estudios sobre el efecto del IFN- γ en el desarrollo de *C. abortus* (Brown y Entrican, 1996; Brown *et al.*, 2001), aunque éstas células eran de naturaleza fibroblástica, y por lo tanto tampoco serían un modelo ideal para estudiar las interacciones patógeno-célula hospedadora en el aparato reproductor. Como alternativa, en esta tesis doctoral decidimos utilizar las líneas celulares LE y AH-1 con el objetivo de establecer un diseño experimental que representara lo más fielmente posible, teniendo en cuenta las limitaciones que supone cualquier modelo *in vitro*, la barrera fetoplacentaria ovina, lugar donde se produce la multiplicación de *C. abortus*.

Uno de los objetivos iniciales de este trabajo fue determinar si las líneas LE y AH-1 eran susceptibles a la infección por la cepa AB7 de *C. abortus*. Para ello infectamos los tapices celulares semiconfluentes y realizamos una IFI a las 48 hpi. A continuación se describe el nivel de infección y la morfología de las inclusiones observadas al microscopio de epifluorescencia y se compara con los resultados de una infección en la línea celular McCoy, que es la utilizada rutinariamente para el cultivo de *C. abortus*.

Como se observa en la figura 15, las dos líneas, LE y AH-1, son susceptibles a la infección por la cepa AB7 de *C. abortus*. Además, ambas líneas celulares mostraron un nivel de infección similar al de las células McCoy, que a las 72 hpi fue cercano al 100%, cuando utilizábamos una MOI estimada de 2. Sin embargo, al considerar el tamaño y morfología de las inclusiones sí que se observaron algunas diferencias entre líneas celulares. En las células McCoy, las inclusiones tienen un tamaño aproximado de entre 20 y 25 μm , adquieren una forma ovalada o arriñonada y se localizan siempre adyacentes al núcleo de la célula (figura 16A). Si tomamos como referencia la apariencia de las inclusiones observadas en esta línea celular, las inclusiones desarrolladas en las células LE eran de mayor tamaño (en torno a 50 μm), llegando a ocupar prácticamente todo el citoplasma, y pleomórficas, encontrándose desde

inclusiones redondeadas hasta otras alargadas pasando por formas multilobulares (figura 16B). Por otra parte, la infección de células AH-1 produjo, a las 48 hpi unas inclusiones de tamaño pequeño/medio (25 μm), aunque a las 72 hpi era patente su aumento de tamaño (alcanzando los 46 μm). Morfológicamente predominaban las formas redondeadas y ligeramente ovaladas, tanto a las 48 como a las 72 hpi (figura 16C).

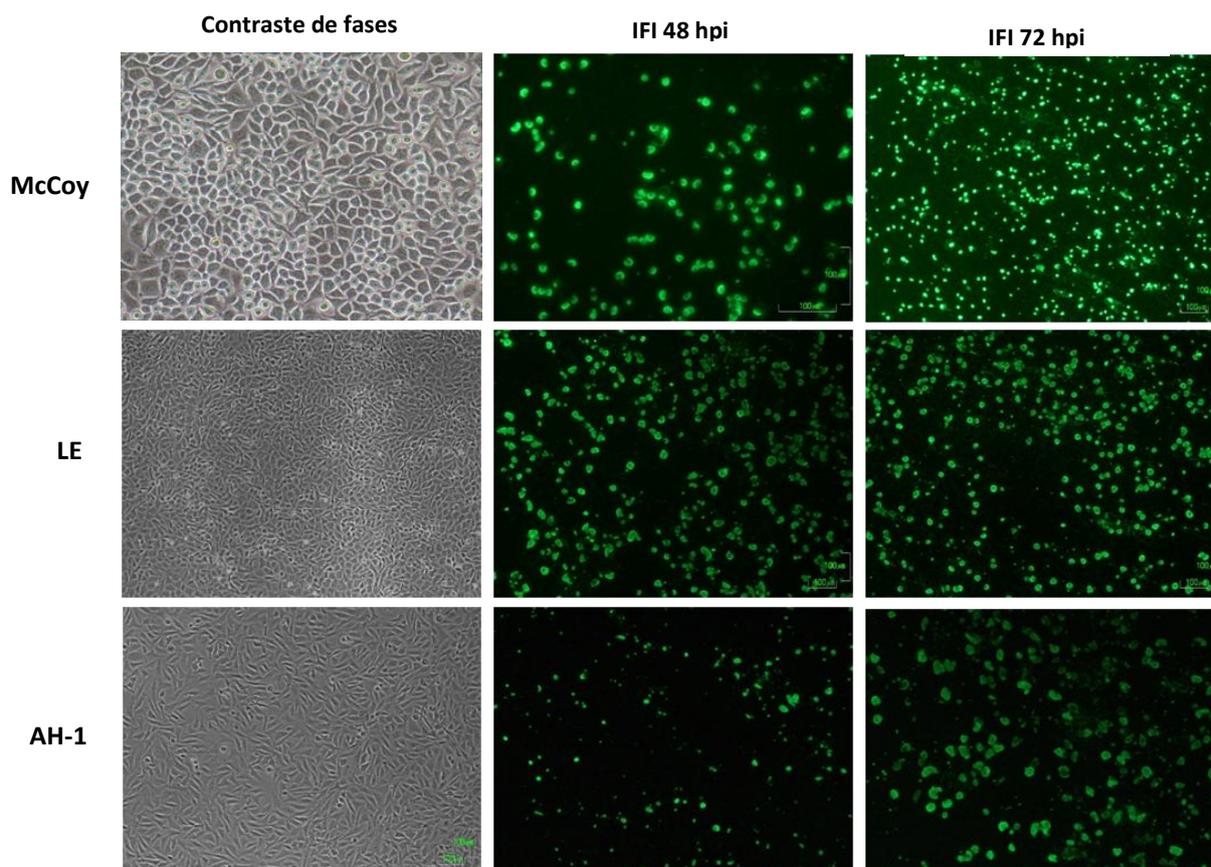


Figura 15. Imágenes representativas de las líneas celulares McCoy, LE y AH-1 no infectadas observadas al microscopio de contraste de fases, e infectadas (MOI estimada = 2) y teñidas por IFI a las 48 y a las 72 hpi y vistas al microscopio de epifluorescencia.

Estos resultados nos indican que las líneas celulares LE y AH-1 no solo son susceptibles a la infección clamidial, sino que el nivel de infectividad de las mismas es comparable al de las células McCoy y las inclusiones que se desarrollan en su interior, especialmente en el caso de la línea LE, son de mayor tamaño. Esto podría traducirse en una mayor producción clamidial, por lo que el uso de esta línea supondría una ventaja

en aquellos procedimientos en los que se busca un máximo rendimiento del cultivo, como por ejemplo en la producción de antígeno para la elaboración de vacunas contra el AEO. Este hecho podría ser interesante para ser evaluado desde un punto de vista industrial, pues las actuales vacunas inactivadas comerciales emplean la línea celular McCoy (revisado en Caro *et al.*, 2001; García de la Fuente *et al.*, 2004) que, al ser de origen humano y/o murino, cuando estas vacunas son administradas en la oveja, inducen respuestas inmunes no deseadas contra los restos celulares que no son eliminados de la suspensión antigénica tras la purificación de la misma.

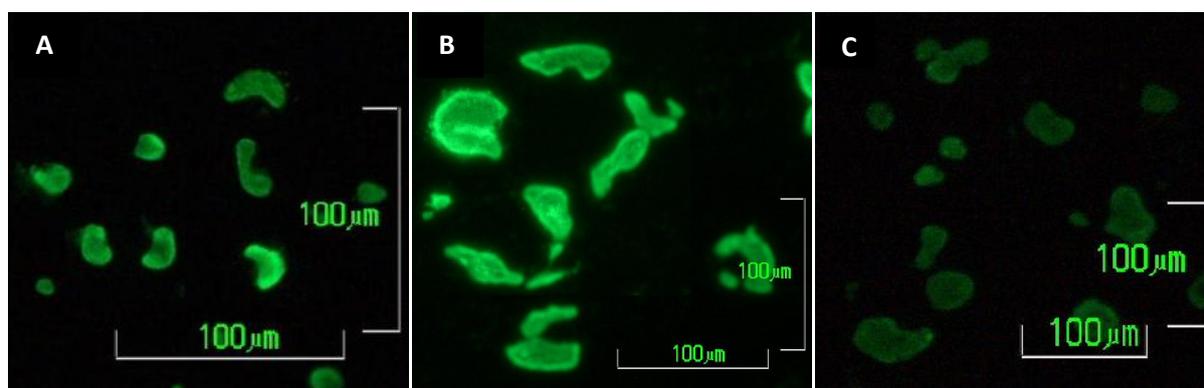


Figura 16. Imágenes de inclusiones clamidiales teñidas mediante IFI a las 72 hpi en distintas líneas celulares. (A): Células McCoy; inclusiones de morfología ovalada o arriñonada rodeando al núcleo de la célula, tamaño aproximado de 23 x 12 µm. **(B):** Células LE; inclusiones de morfología variable, que van desde redondeadas hasta alargadas, y de gran tamaño (52 x 21 µm). **(C):** Células AH-1; predominan las inclusiones de morfología redondeada y tamaño aproximado de 46 x 28 µm.

2. Influencia de la penicilina, el estradiol y la progesterona en la multiplicación clamidial

Para determinar si las hormonas sexuales femeninas y/o la penicilina afectan a la multiplicación clamidial en cada una de las líneas celulares, se suplementaron los cultivos celulares con estradiol, progesterona o penicilina y se analizó la evolución de la inclusión así como la producción de clamidias mediante aislamiento de CE de los sobrenadantes y cuantificación de ADN clamidial mediante Real-time q-PCR de los cultivos.

2.1. Efectos sobre el desarrollo de las inclusiones: IFI

En primer lugar, observamos el efecto que tenían el estradiol, la progesterona o la penicilina en el desarrollo de inclusiones clamidiales directamente en los cultivos tratados con hormonas o con el antibiótico. Ambas líneas celulares mostraron resultados similares en cuanto a la tasa de infectividad y desarrollo de las inclusiones. Los resultados de las IFI realizadas sobre las células AH-1 se observa en la figura 17. Así, el nivel de infectividad fue más alto en los cultivos tratados con hormonas, tanto con estradiol (B) como con progesterona (C) que en los cultivos control crecidos en ausencia de hormonas (A). En los cultivos tratados con penicilina (D) se observó un número muy reducido de inclusiones, las cuales además eran de pequeño tamaño y poco brillantes.

El mecanismo por el que las hormonas favorecen la infección clamidial no está claro. Uno de los mecanismos que podría explicar estas diferencias de susceptibilidad a la infección en función de las distintas condiciones hormonales y en distintas especies podría ser la expresión diferencial de receptores en las células epiteliales, que median la entrada de chlamydia. Otro mecanismo que se ha postulado, en el caso de experimentos *in vivo*, es el cambio que se produce en la estructura tisular del tracto reproductor en las distintas etapas del ciclo estral. Así, se sabe que el epitelio del tracto reproductor femenino pasa de ser estratificado a queratinizado, aumentando varias capas de grosor, en el transcurso de la fase secretora (dominada por progesterona) a la fase proliferativa (dominada por estrógenos), lo cual tiene importantes repercusiones a nivel de inmunidad de mucosas (Gallichan y Rosenthal, 1996). No obstante, nuestros resultados, derivados de experimentos *in vitro* y por lo tanto no influidos por elementos como la arquitectura tisular y el sistema inmune, demuestran que debe haber otros factores implicados en la susceptibilidad a la infección mediada por hormonas.

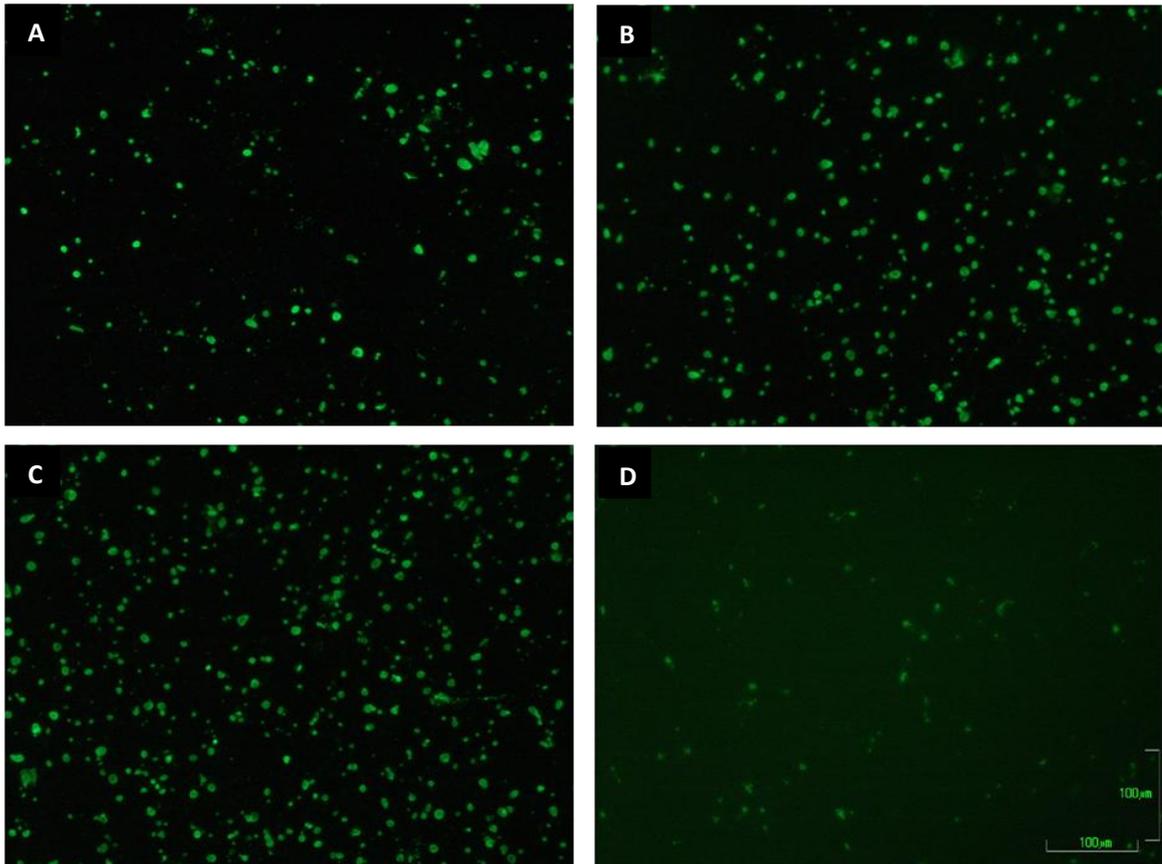


Figura 17. Micrografías de cultivos de células AH-1 sometidas a distintos tratamientos hormonales o penicilina, infectadas con *C. abortus* (MOI aproximada = 2) e inmunoteñidas a las 48 hpi. (A) Control, cultivo sin hormonas; (B): Cultivo tratado con estradiol; (C): progesterona; (D): penicilina

La infección clamidial se inicia con el contacto, adhesión e internalización del CE en la célula hospedadora. A pesar de que no se conoce con exactitud este mecanismo de interacción, sí que se ha demostrado mediante técnicas de separación de células marcadas por fluorescencia que el pretratamiento de un cultivo celular con estradiol favorece la adhesión de CE de *C. trachomatis* a la superficie de células epiteliales endometriales humanas, aumentando el porcentaje de células con CE marcados y adheridos a ellas del 50 al 80% (Maslow *et al.*, 1988). Más tarde, Davis *et al.* (2002) identificaron una proteína de superficie de membrana de células epiteliales endometriales humanas (proteína disulfuro-isomerasa) como un receptor de la misma cepa de *C. trachomatis* y que resultó pertenecer al complejo receptor de estrógenos. Probablemente la adición de estradiol induce una regulación positiva de componentes

del complejo receptor de estrógenos en la superficie de las células, y por tanto aumenta también la adhesión de CE y la susceptibilidad a la infección.

Como se discutirá más adelante, es posible que los efectos que tienen las hormonas sobre la infección clamidial no se produzcan directamente sobre la bacteria sino que sean el resultado de alteraciones inducidas por dichas hormonas en las células hospedadoras. Así, habría que considerar posibles mecanismos por los que las hormonas alteran el ambiente celular de forma que se modifique la susceptibilidad de la célula hospedadora a la infección por patógenos intracelulares como *Chlamydia*. El efecto fisiológico de las hormonas sobre las células epiteliales puede afectar tanto a proteínas de superficie como a modificaciones/alteraciones intracelulares. Una posibilidad es que las hormonas regulen la expresión de receptor/es en las células eucariotas que formen parte del complejo adhesina-receptor de *C. abortus* como ocurría en el caso de *C. trachomatis* (Davis *et al.*, 2002). Guseva *et al.* (2003) estudiaron la influencia del estradiol y la progesterona en la infección por *C. suis* en distintas poblaciones celulares del útero de cerdas en distintas fases del ciclo estral, y uno de sus hallazgos fue que las células del epitelio luminal eran más sensibles a estradiol y más susceptibles a la infección que las células del epitelio glandular (Guseva *et al.*, 2003). Este hallazgo es debido probablemente al hecho de que el epitelio luminal está formado por células más maduras y diferenciadas y por tanto es un excelente modelo para analizar los receptores de membrana apicales implicados en la adhesión de CE de chlamydia, y apoya la hipótesis de Davis *et al.* de que los CE reconocen un receptor perteneciente al complejo receptor de estrógenos. Serían necesarios más estudios para corroborar esta posibilidad y entender el mecanismo por el que las hormonas sexuales regulan la susceptibilidad a la infección por *C. abortus*.

Finalmente, en esta parte del trabajo se observó un primer indicio de un estado de estrés en los cultivos tratados con penicilina, aunque para poder hablar de persistencia es necesario completar y confirmar los resultados mediante microscopía electrónica y análisis de la expresión génica, como se verá más adelante. Las infecciones persistentes se caracterizan por la capacidad de *Chlamydia* de pasar a un estado metabólicamente inactivo y no infeccioso ante la presencia de un agente estresante, y posteriormente reanudar su actividad metabólica e infectividad al retirar el estímulo estresante (Hogan *et al.*, 2004). En nuestro estudio hallamos evidencias que confirman por primera vez en *C. abortus* que, al menos la penicilina, es uno de estos

factores estresantes para esta especie. Esta evidencia se basa en análisis morfológicos mediante MET (caracterización de CA) y análisis de expresión de genes mediante q-PCR, que veremos en los siguientes epígrafes.

2.2. Efectos sobre la multiplicación: aislamiento de CE a partir de sobrenadantes

El recuento de inclusiones clamidiales al microscopio de epifluorescencia en las pruebas de aislamiento sobre células McCoy indicó que había más presencia de *C. abortus* en el sobrenadante de cultivos de células ovinas tratados con hormonas que en el de aquellos crecidos únicamente con FBS “charcoal-stripped” (figura 18) a las 48 hpi. El nivel de infectividad tan bajo observado en las muestras control a las 48 hpi indica una diferencia importante con respecto a los tratados con hormonas. Estos resultados corroboran un efecto positivo de las hormonas en el desarrollo del ciclo biológico clamidial. Previamente se ha demostrado que el tratamiento con estradiol de una línea de células endometriales humanas favorecía el desarrollo de inclusiones de *C. trachomatis* (Hall *et al.*, 2011) y que las células obtenidas del tracto reproductor de cerdas en la fase del ciclo estral dominada por estrógenos eran más susceptibles a la infección por *C. suis* que las obtenidas en otras fases del ciclo (Guseva *et al.*, 2003).

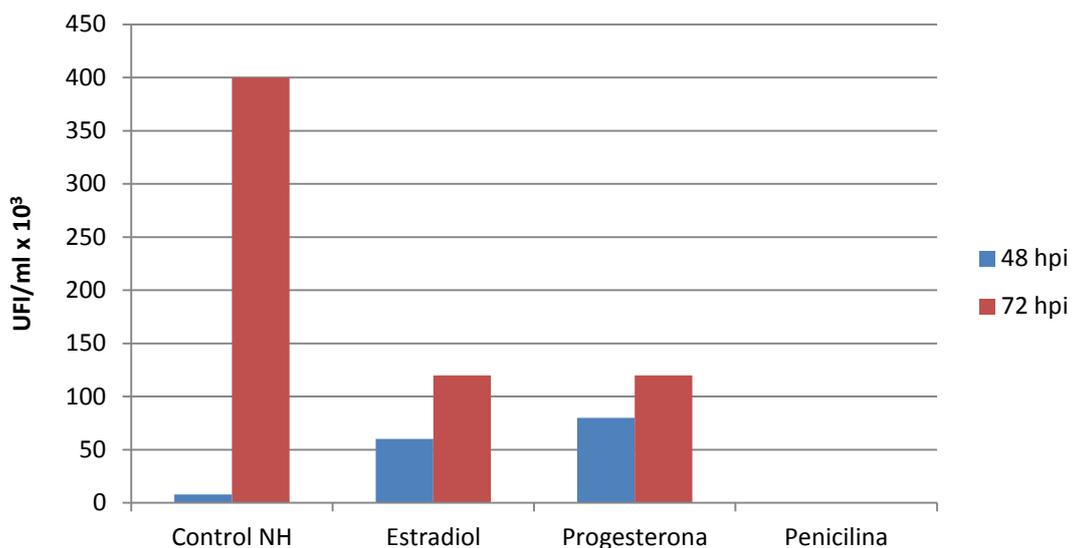


Figura 18. Resultados de aislamiento de *C. abortus* en sobrenadantes de células LE a las 48 y 72 hpi tratadas con estradiol, progesterona, penicilina o no tratadas (control NH).

Nuestros datos señalan una mayor presencia de CE viables de *C. abortus* en el sobrenadante de cultivos tratados con progesterona a las 48 hpi. Aunque no hemos encontrado estudios sobre el efecto de la progesterona sobre el crecimiento de chlamydia *in vitro*, estos resultados concuerdan con los obtenidos por Kaushic *et al.* (2000) en sus experimentos *in vivo*, quienes, utilizando un modelo de rata, describieron que los animales eran más susceptibles a la infección intravaginal con *C. muridarum* tras ser tratados con progesterona. Curiosamente, estos resultados se contraponen a los obtenidos por Pasley *et al.* (1985a,b), los cuales apuntan al estradiol como la hormona que favorece la infección endometrial y a una ausencia de efecto de la progesterona en sus estudios llevados a cabo en modelo de cobaya utilizando la especie *C. caviae*. En la especie humana también existen estudios que revelan una asociación entre las infecciones por *C. trachomatis* y las distintas etapas del ciclo menstrual, viéndose incrementada la susceptibilidad a la infección en las etapas dominadas por estradiol (Sweet *et al.*, 1986), o el hecho de tomar anticonceptivos hormonales (Washington *et al.*, 1985).

Todos estos estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, aportan evidencias de que el ambiente hormonal en el momento de exposición al patógeno puede tener distintos efectos en el resultado de la infección de células del tracto reproductor.

A las 72 hpi puede observarse un gran aumento en el número de UFI/ml de CE aislados en los cultivos no tratados con hormonas. Este incremento puede explicarse porque se ha completado el ciclo de desarrollo intracelular y se ha producido una liberación simultánea de CE de las células hospedadoras. En los sobrenadantes de cultivos tratados con estradiol y progesterona observamos un aumento más proporcionado del número de UFI/ml de CE aislados, lo que nos puede indicar que también se está completando el ciclo clamidial, pero, o bien a un ritmo más lento, o bien de forma escalonada.

Los resultados de aislamiento a partir de sobrenadantes de cultivos tratados con penicilina quedaron por debajo del límite de detección tanto a las 48 como a las 72 hpi, lo que unido a la visualización de dichos cultivos (figura 17D) nos hace pensar que a pesar de producirse la infección en el interior de las células, ésta no es activa, es decir, no hay liberación de CE infectivos al medio de cultivo.

2.3. Efectos sobre la multiplicación: cuantificación del ADN clamidial mediante Real-time q-PCR

Para confirmar los hallazgos visualizados mediante aislamiento de CE de *C. abortus* en sobrenadantes, se realizó una real-time q-PCR para detección de ADN de *C. abortus* en los cultivos, tanto de células AH-1 como LE, tratados con hormonas o penicilina y en dos momentos, a las 48 y a las 72 hpi. Como se observa en la figura 19, la cantidad de ADN de *C. abortus* detectada fue algo mayor en la línea LE que en la AH1, donde los valores C_q fueron más altos, sobre todo a las 48 hpi, lo que coincide con el número y tamaño de inclusiones que habíamos visto en la figura 15. Sin embargo, en cuanto a las muestras tratadas con hormonas o penicilina, únicamente el tratamiento con penicilina dio lugar a C_q claramente superiores a los de los cultivos control, lo que indica una menor cantidad de ADN en estas muestras, no encontrándose diferencias entre cultivos tratados con hormonas y cultivos control en ninguna de las líneas celulares. Esta diferencia con respecto a los resultados de aislamiento puede deberse a que en las pruebas de aislamiento solo detectamos CE viables en el medio mientras que cuantificando el ADN total del cultivo detectamos CE, CR y CA, viables y no viables, por lo que los resultados pueden variar entre una prueba y otra.

En el caso de muestras tratadas con penicilina observamos que la media de los niveles de detección de ADN aumenta ligeramente a las 72 hpi con respecto a las 48 hpi en ambas líneas celulares, lo cual resulta llamativo ya que, como habíamos mencionado, la penicilina induce una infección no activa, sin producción de CE, y por lo tanto cabría esperar un mantenimiento en los niveles inferiores de ADN detectados a las 48 hpi. Este hecho puede explicarse ya que algunos autores indican que en los CA continúa existiendo síntesis de ADN sin multiplicación clamidial, lo que podría estar ocurriendo bajo la acción de la penicilina en nuestro modelo (Byrne *et al.*, 2001; Lambden *et al.*, 2006).

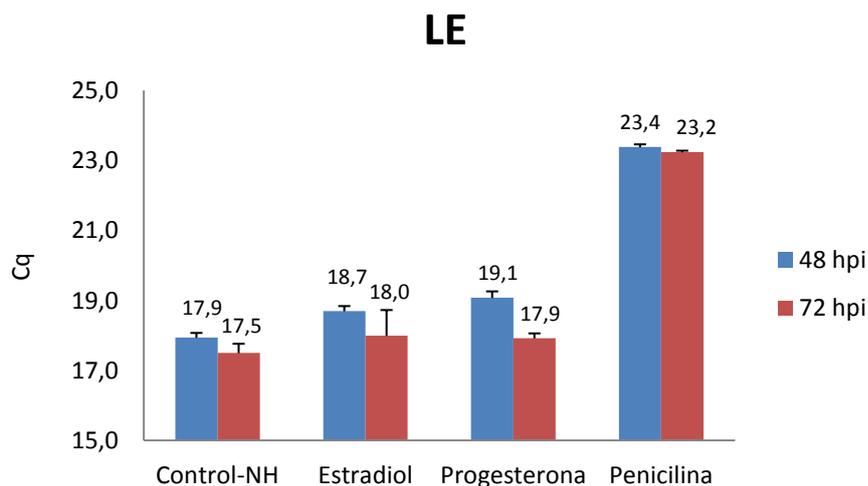
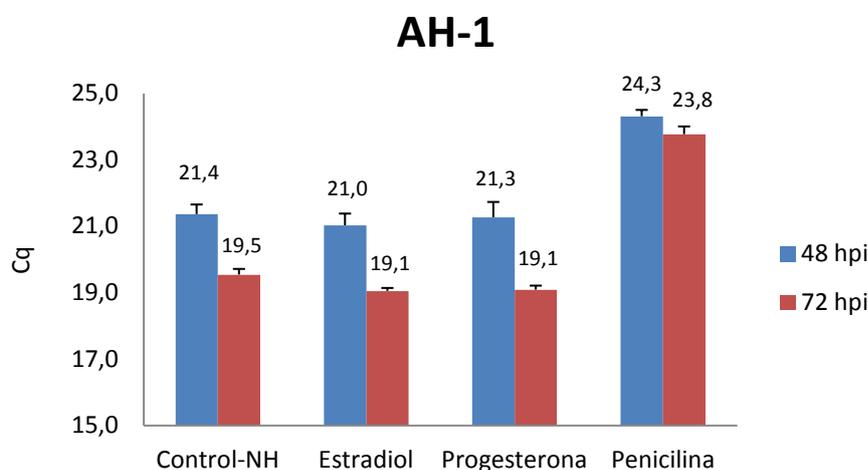


Figura 19. Resultados de q-PCR para detección de *C. abortus* expresados en C_q (media + SD)



3. Influencia de la penicilina y las hormonas en el establecimiento de un estado de infección persistente sobre las líneas celulares LE y AH-1

3.1. Identificación por MET de formas relacionadas con el estado de persistencia clamidial en cultivos tratados con hormonas y penicilina

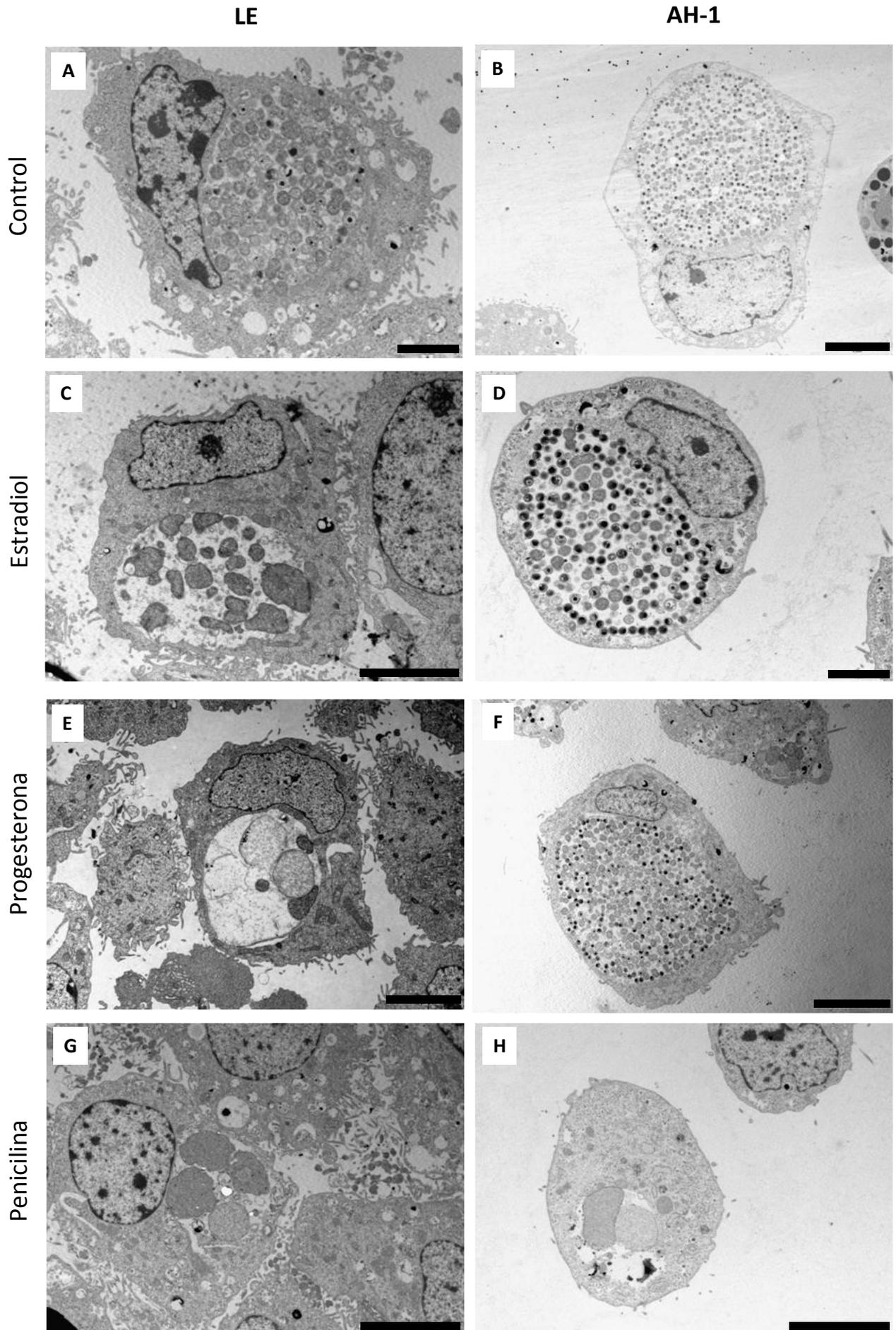
Varios autores han descrito mediante microscopía electrónica cómo distintas especies de clamidia adquieren una apariencia característica al ser cultivadas en condiciones de estrés (Hogan *et al.*, 2004; Goellner *et al.*, 2006; Borel *et al.*, 2010). En nuestro estudio comparamos la morfología de las inclusiones de *C. abortus* en cultivos de células LE y AH-1 expuestas a estradiol, progesterona o penicilina, en relación a los

cultivos de células infectadas no tratadas, utilizando microscopía electrónica (figura 20). Las inclusiones clamidiales que se desarrollaron en los cultivos control (medio suplementado con charcoal stripped FBS, sin hormonas) contenían CR de morfología normal en ambas líneas celulares, LE y AH-1 (Figura 20A y 20B). Sin embargo, las imágenes de los cultivos tratados con penicilina muestran inclusiones de pequeño tamaño que contienen entre 1 y 4 partículas pleomórficas de hasta 3 μm de diámetro, similares a las formas aberrantes descritas en varios modelos de persistencia *in vitro* (Hogan *et al.*, 2004). También se observó depósito multifocal de material electrodensito en la membrana externa de estos cuerpos aberrantes, que a veces compartían el espacio de la inclusión con membranas vesiculares vacías de CR más pequeños (Figura 21). Estos hallazgos fueron esencialmente idénticos en células AH-1 y LE y constituyeron el 100% de las inclusiones visualizadas (figura 20G y 20H).

Por otra parte, la suplementación del medio de cultivo celular con hormonas dio lugar a diferencias en la morfología clamidial en función de la línea celular utilizada. Así, la exposición de células LE a estradiol indujo la presencia de inclusiones de tamaño medio en cuyo interior se encontraba un número limitado de CR anormales, aunque en menor medida que en el caso de los cultivos tratados con penicilina. En cada inclusión observada, estos CR eran muy variables en número, tamaño y forma, de manera que, en la misma muestra encontramos distintos tipos de inclusiones, que iban desde las que presentaban características normales (en torno a un 43% de todas las inclusiones observadas) a aquellas con características típicas de persistencia (32%), pasando por otras que presentaban características intermedias (25%) (Figura 20C). En cambio, el análisis morfológico de las células AH-1 expuestas a estradiol no reveló evidencia alguna de formas persistentes o CA, sino que mostraron inclusiones clamidiales típicas con mezcla de CE y CR de morfología y tamaño normales (Figura 20D). De forma parecida, en relación con las morfologías aberrantes, los cultivos de *C. abortus* en células LE tratadas con progesterona presentaban inclusiones con CR agrandados y pleomórficos (Figura 20E), muy similares a los CA encontrados en los cultivos tratados con penicilina. Esta morfología aberrante fue la predominante entre las inclusiones observadas (67%), aunque también se observaron otras con características normales (20%) e intermedias (13%).

En cambio, el tratamiento con progesterona de las células AH-1 dio lugar a inclusiones normales de gran tamaño en las que se podía observar una gran cantidad de CR, CI y CE de morfología normal (Figura 20F).

Figura 20. Micrografías tomadas a las 72 horas post-infección de las líneas celulares LE y AH-1 infectadas por *C. abortus* y sometidas a tratamientos de estradiol, progesterona o penicilina y controles no tratados. (A): Célula LE no tratada en la que se aprecia una inclusión clamidial normal de tamaño medio en cuyo interior predominan los CR sobre otras formas clamidiales; barra: 2 μm . **(B):** Célula AH-1 no tratada que presenta una inclusión madura típica, de gran tamaño, que contiene un gran número de CI y CR; barra: 5 μm . **(C):** Célula LE tratada con estradiol en la que se observa una inclusión de tamaño medio que contiene unos 20 CR pleomórficos y de tamaños variables que oscilan entre 0,7 y 3 μm ; barra: 5 μm . **(D):** Célula AH-1 tratada con estradiol en la que aparece una inclusión clamidial madura típica, de tamaño grande en la que predominan los CE, situados en la periferia de la inclusión, sobre los CR; barra: 2 μm . **(E):** Célula LE tratada con progesterona en la que se aprecia una inclusión de tamaño medio conteniendo 3 CR anormalmente grandes y de electrodensidad variable que ocupan media inclusión, mientras que en la otra media se aprecia un material poco electrodenso compatible con restos de membranas; barra: 5 μm . **(F):** Célula AH-1 tratada con progesterona en la que se observa una infección típica, con una inclusión citoplasmática de gran tamaño que ocupa casi todo el citoplasma y contiene gran número de CR, CI y CE situados en la periferia de la inclusión; barra: 5 μm . **(G):** Célula LE tratada con penicilina donde se aprecia una inclusión pequeña con 4 CA de gran tamaño (en torno a 2,5 μm de diámetro) y electrodensidad variable que ocupan la práctica totalidad de la inclusión junto a algunas membranas vesiculares vacías de CR más pequeños; barra: 5 μm . **(H):** Célula AH-1 tratada con penicilina en la que se distingue una inclusión de pequeño tamaño que contiene dos CA de 2-3 μm de diámetro, en cuya membrana externa se aprecian depósitos de material electrodenso distribuidos irregularmente; barra: 5 μm .



Los antibióticos betalactámicos, como la penicilina, actúan sobre las bacterias inhibiendo el paso final (la transpeptidación) de la síntesis de peptidoglicano, molécula que juega un papel fundamental en la división celular de *Chlamydia* (Liechti *et al.*, 2014). Los hallazgos morfológicos obtenidos en este trabajo en los cultivos infectados con *C. abortus* y tratados con penicilina coinciden con los descritos por otros autores al aplicar el mismo tratamiento antibiótico sobre otras especies clamidiales. Por ejemplo, en un estudio sobre *C. trachomatis* en el que se evaluó *in vitro* el efecto de distintos antibióticos de uso común a concentraciones habituales, los autores observaron que ninguno de los tratamientos con penicilinas impedía el desarrollo de inclusiones clamidiales, pero que éstas eran de pequeño tamaño y contenían estructuras esféricas grandes compatibles con CA (Kintner *et al.*, 2014). En otro trabajo sobre *C. psittaci* con un modelo de persistencia *in vitro* mediante adición de penicilina al medio, también se describe la aparición de CA de gran tamaño, muy variables en forma, con un citoplasma electrolúcido y algunos focos electrodensos (Hu *et al.*, 2015). Estos focos o depósitos de material electrodense son también descritos por Goellner *et al.* (2006) en cultivos de *C. psittaci* tratados con penicilina, y son similares a los identificados en nuestro trabajo en *C. abortus* (figura 21). La evolución a formas aberrantes tras la exposición a penicilina también ha sido descrita morfológicamente para las especies *C. muridarum* (Campbell *et al.*, 2012), *C. pneumoniae* (Di Pietro *et al.*, 2012) y, más recientemente, para *C. pecorum* (Leonard *et al.*, 2016). En todos los casos se identificaron CA con características ultraestructurales comunes.

A pesar de que el efecto de los antibióticos como factor causante de estrés/persistencia en *Chlamydia* había sido descrito en otras especies de interés médico o veterinario, hasta la fecha no se había evaluado el efecto de la penicilina sobre el ciclo de desarrollo de *C. abortus*. Si bien la penicilina no es el antibiótico de elección como tratamiento ante un brote de AEO, los betalactámicos son los antibióticos más frecuentemente prescritos por los veterinarios de animales destinados a la producción de alimentos en Europa (De Briyne *et al.*, 2014). Esto puede hacer que durante el tratamiento de otras infecciones bacterianas concurrentes, las clamidias en desarrollo en animales asintomáticos estén expuestas a betalactámicos, lo que, atendiendo a nuestros resultados, favorecería la supervivencia de *C. abortus* a través de la inducción o el mantenimiento del estado de persistencia.

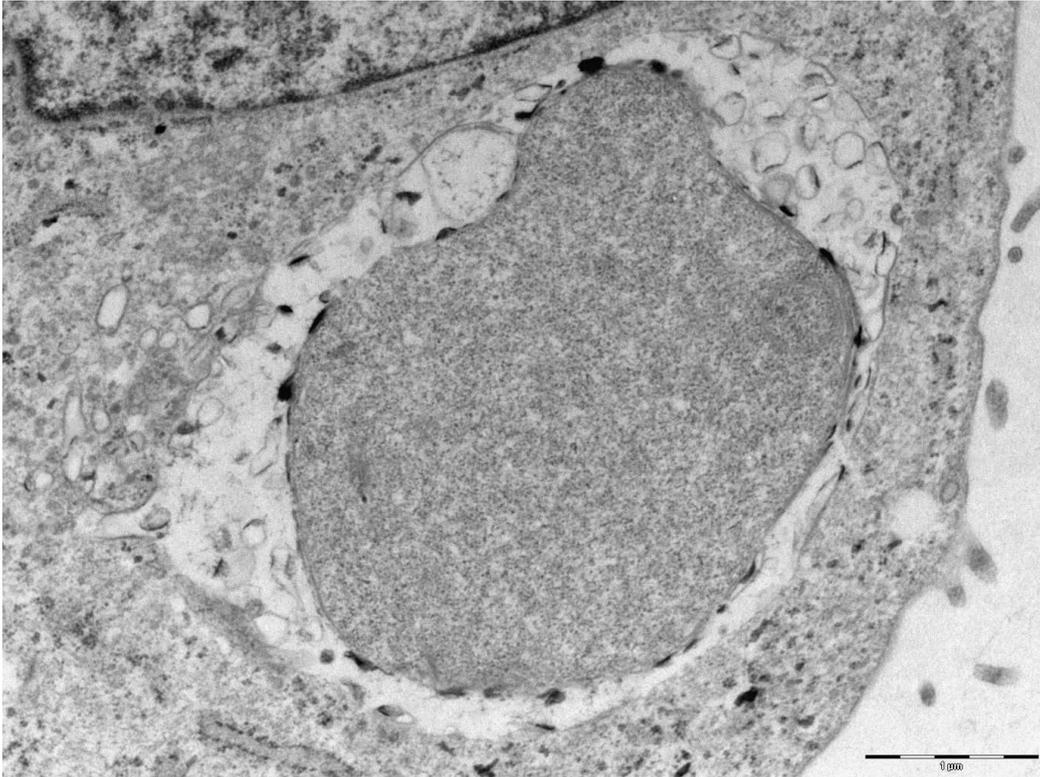


Figura 21. Electronografía de una inclusión de *C. abortus* en una célula AH-1 infectada y tratada con 200 U/ml de penicilina. Se observa una inclusión de pequeño tamaño que contiene un único cuerpo aberrante redondeado y de unos 3 μm de diámetro. Se observa depósito de material electrodensito a intervalos regulares en toda su membrana externa. También se aprecian membranas vesiculares vacías de CR más pequeños en el escaso espacio de la inclusión no ocupado por la forma aberrante; barra: 1 μm .

En cuanto a los cultivos tratados con hormonas, cabe destacar la distinta respuesta observada al mismo tratamiento hormonal en función de la línea celular utilizada para el cultivo de *C. abortus*. Mientras que en las células AH-1 la adición de progesterona o estradiol no alteró el desarrollo del ciclo normal, en las células LE ambas hormonas indujeron la aparición de formas anormales. Esto sugiere que los cambios observados en la morfología de *C. abortus* tras el tratamiento hormonal no son debidos a la acción directa de las hormonas sobre el microorganismo, sino que se producen de forma indirecta a través de la célula hospedadora. Es decir, las hormonas inducirían cambios en el ambiente celular, que a su vez influirían en el desarrollo de *C. abortus* dado su carácter de patógeno intracelular obligado que depende de la maquinaria metabólica de la célula que parasita para completar su propio ciclo. Existen varios estudios que demuestran cómo las hormonas tienen efectos importantes en vías

de la inmunidad innata de las células del epitelio del tracto reproductor. Por ejemplo, la expresión de péptidos antimicrobianos como la lactoferrina (Walmer *et al.*, 1992), el inhibidor de proteasas leucocitarias (SLPI) (Fahey y Wira, 2002) o la defensina humana 5 (HD-5) (Quayle *et al.*, 1998) está influenciada en todos los casos por cambios en las concentraciones de hormonas sexuales femeninas. En un estudio más reciente, Wan *et al.* (2014) analizaron el transcriptoma de células endometriales humanas tratadas con estradiol o progesterona e infectadas con *C. trachomatis* y compararon la cantidad de ADN clamidial entre cultivos tratados y no tratados mediante qPCR. Los autores observaron que los cultivos tratados con progesterona presentaban una cantidad de clamidias significativamente menor que los cultivos tratados con estradiol o que los no tratados. Además, el estudio del transcriptoma de estas células tratadas con progesterona e infectadas con clamidia reveló un aumento significativo en la expresión de genes relacionados con múltiples vías de la inmunidad innata (péptidos antimicrobianos, citoquinas pro-inflamatorias, quimioquinas y activación de vías de interferón). La expresión de todos estos elementos de la respuesta inmune puede ser el mecanismo que limita la multiplicación clamidial en presencia de progesterona. Si estos resultados fueran extrapolables a las células endometriales de origen ovino, en nuestro estudio, podrían explicar la presencia de formas aberrantes en las células LE, aunque ningún trabajo hasta la fecha ha analizado la respuesta de esta línea celular a las hormonas sexuales y/o a la infección clamidial en cuanto a la expresión de mediadores inmunitarios.

En el caso de las células de origen trofoblástico, no hemos hallado estudios sobre posibles efectos del estradiol y la progesterona en el ambiente celular que pudieran afectar a la multiplicación clamidial. Sin embargo, sí que se han analizado algunas respuestas de células de este origen a la propia infección intracelular. Wheelhouse *et al.* (2009) utilizaron las células AH-1 para investigar el papel del trofoblasto en el inicio de la inflamación placentaria tras la infección por *C. abortus*. Los autores determinaron que al ser infectadas, estas células producen TNF- α y CXCL8 de forma dosis y tiempo dependiente, lo que sugiere que, durante la infección por *C. abortus*, las células de trofoblasto son la fuente primaria de citoquinas, que actúan de forma autocrina y paracrina iniciando la placentitis que da lugar al aborto. El TNF- α es una citoquina proinflamatoria que produce trombosis en placentas de ovejas infectadas con *C. abortus* (Buxton *et al.*, 2002) y cuya presencia en altos niveles en la placenta ha

sido asociada con abortos en ovejas (Arranz-Solís *et al.*, 2016). Más recientemente se ha visto que estas mismas células también producen péptidos antimicrobianos de la familia de las defensinas (sBD-1 y sBD-2) como respuesta a la infección por *Waddlia chondrophila* (microorganismo perteneciente al orden *Chlamydiales*) (Coyle *et al.*, 2016).

A parte de expresar genes que codifican elementos de la respuesta inmune innata tras una infección intracelular, las células de trofoblasto de rumiantes se caracterizan además por producir de forma fisiológica IFN- τ . Esta proteína es la responsable del mecanismo de reconocimiento materno de la gestación, actuando de forma paracrina sobre el endometrio anulando la expresión de receptores de estrógenos y de oxitocina (Bazer *et al.*, 1997) y modulando algunos componentes del sistema inmune sobre todo a nivel local en el útero (Asselin *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2007) pero también a nivel periférico (Yankey *et al.*, 2001; Gifford *et al.*, 2007). Por otra parte se ha demostrado la eficacia antivírica de esta molécula, lo que también puede entenderse como una forma de optimizar las condiciones intrauterinas para la implantación y mantenimiento de la gestación.

Atendiendo a la bibliografía consultada, podríamos afirmar que en el proceso de comunicación intercelular que se produce en la interfase materno-fetal durante la gestación, en términos generales, las células del trofoblasto (línea AH-1 en nuestro estudio) están más especializadas en emitir señales, mientras que las células del endometrio (línea LE) actúan principalmente como receptores de la información. Esta hipótesis podría explicar la morfología aberrante de las clamidias cultivadas en las células LE y la no alteración morfológica de las cultivadas en las células AH-1, porque las primeras habrían respondido a los tratamientos con estradiol y progesterona más efectivamente, alterándose su ambiente intracelular de una forma que desconocemos, pero que al parecer, perjudica el desarrollo de *C. abortus*.

Por otra parte, se debe tener en cuenta que en algunas especies, entre ellas la oveja, la placenta es un órgano productor de hormonas. Por ello, al mismo tiempo que realizamos el control de la concentración de hormonas en sobrenadantes de cultivos tratados (ver apartado 3.2.2 de material y métodos), también analizamos si nuestras células AH-1 producían de forma fisiológica estradiol y/o progesterona que pudieran haber interferido en los experimentos. Los resultados de tales análisis se muestran en la

figura 22. En primer lugar resulta llamativa la variabilidad en la concentración de hormonas entre muestras tratadas teóricamente con la misma concentración de estradiol o progesterona. Este hecho puede obedecer a la escasa magnitud de las unidades que estamos intentando controlar (nanogramos y picogramos), que haría que cualquier pequeño error de pipeteo o incluso la evaporación diferente en distintos puntos de la placa resulte finalmente en importantes variaciones de las concentraciones presentes.

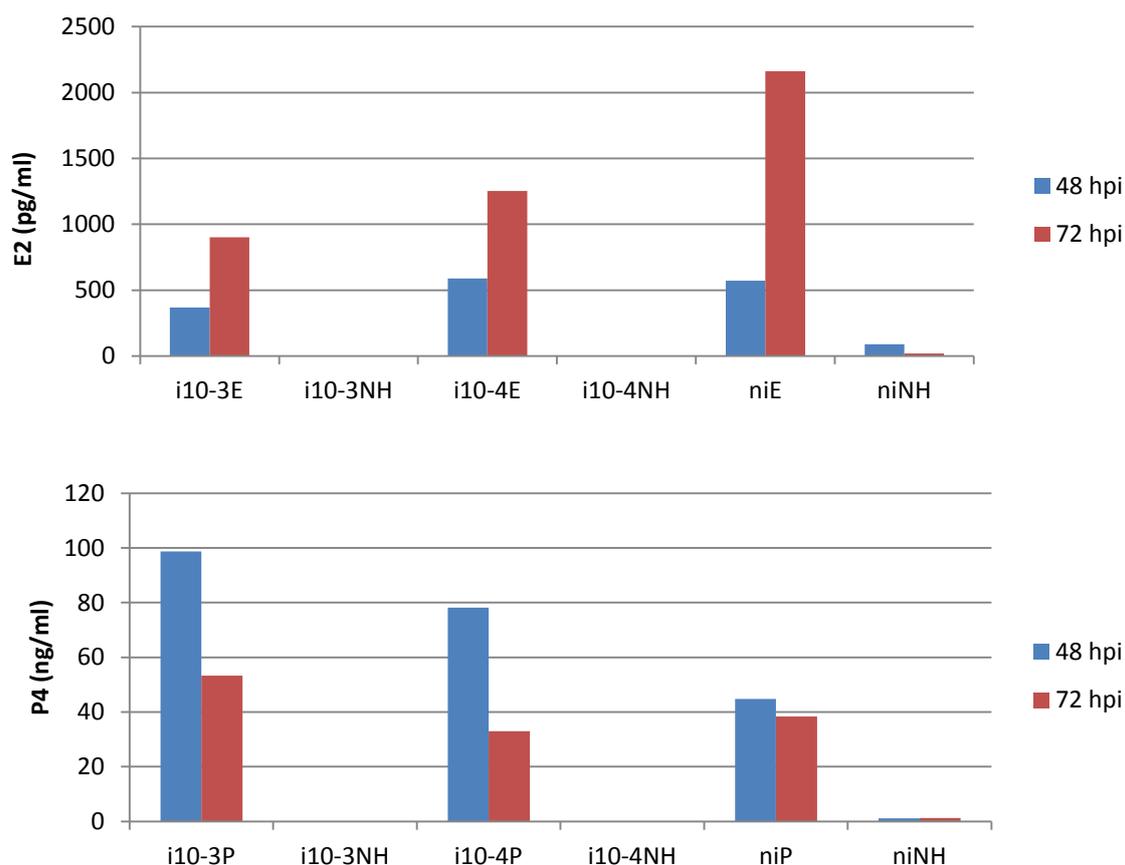


Figura 22. Concentración de 17β-estradiol y progesterona en sobrenadantes de cultivos de células AH-1 infectadas (i) con dos diluciones de una suspensión clamidial (10^{-3} y 10^{-4}) o no infectadas (ni); y tratadas con estradiol (E) o Progesterona (P) o no tratadas (NH); y recogidos a las 48 o 72 horas post-infección.

Curiosamente, en los sobrenadantes de células no tratadas con hormonas, solo se detectó presencia de estradiol y progesterona (aunque a concentraciones muy bajas) en los cultivos no infectados, mientras que en los infectados no se detectaron dichas hormonas. Una explicación posible es que la infección por *C. abortus* esté alterando la

biosíntesis de estradiol y progesterona en las células. Esta hipótesis se ve reforzada en el caso de la producción de estradiol porque los cultivos infectados con una dosis infectiva menor (10^{-4}) presentan concentraciones de estradiol más elevadas que los cultivos infectados con una dosis mayor (10^{-3}), aunque también es cierto que a las 72 hpi el número de clamidias debería ser mayor que a las 48 hpi, y sin embargo observamos mayor concentración de estradiol a las 72 hpi. En el caso de la progesterona ocurre el fenómeno contrario, detectamos mayores concentraciones de progesterona a las 48 hpi que a las 72 hpi, pero no observamos el efecto de la dilución decimal de la dosis de infección. En cualquier caso, la presencia de hormonas por encima del límite de detección en cultivos no tratados y no infectados (niNH) frente a la ausencia de las mismas en cultivos infectados nos hace pensar que la infección clamidial influye negativamente en las funciones endocrinas de las células del trofoblasto, lo que podría añadirse a la lista de mecanismos, posiblemente aditivos, por los que se desencadena el aborto en la patogenia del AEO. Este hallazgo coincide con el realizado por Azenabor *et al.* (2007), los cuales describieron un descenso significativo en la producción de estradiol y progesterona en células de trofoblasto humano tras ser infectadas con *C. trachomatis*, y lo asociaron a una depleción en las reservas de colesterol de la célula. Así, un “secuestro” del colesterol de la célula eucariota por parte de las clamidias tendrá consecuencias sobre la síntesis de productos derivados del colesterol, como las hormonas esteroideas y algunas vitaminas, pero también sobre el mantenimiento de la estructura y fluidez de la membrana celular.

3.2. Estudio de la expresión relativa de genes relacionados con el ciclo de desarrollo de *C. abortus*

Gracias a los avances de la biología molecular que se han dado en las últimas décadas, se ha tratado de caracterizar el estado de persistencia clamidial, además de morfológicamente, a través de las alteraciones en la expresión de genes que regulan proteínas clave en el ciclo de desarrollo de la bacteria. Aunque se han publicado trabajos de este tipo para otras especies de clamidia, hasta la fecha no existe información sobre los cambios transcripcionales que tienen lugar durante el estado de persistencia en *C. abortus*.

En esta tesis tratamos de analizar la respuesta transcripcional de *C. abortus* tras su exposición a estradiol, progesterona y penicilina en dos líneas celulares distintas: LE y AH-1 y en dos momentos: a las 48 y a las 72 hpi.

Los cambios en la expresión relativa de los genes estudiados se encuentran en la tabla 6. El tratamiento con penicilina causó, en general, una regulación al alza de los genes relacionados con la respuesta a estrés y una regulación a la baja de genes relacionados con la síntesis de proteínas de membrana y la división celular. En concreto, a las 48 hpi, las clamidias cultivadas en células LE y tratadas con penicilina mostraron una expresión alterada para 11 genes, de los cuales 4 estaban regulados al alza (*groEL*, *dnaK*, *htrA* y *Cpaf*) y 7 a la baja (*omcB*, *hctA*, *sctN*, *cydA*, *cydB* y *miaA*), mientras que las mismas condiciones de cultivo clamidial, pero en la línea celular AH-1, dieron lugar a la expresión diferencial de 5 genes, 2 regulados al alza (*dnaK* y *grpE*) y 3 a la baja (*omcA*, *omcB* y *hctA*). Curiosamente, a las 72 hpi el número de genes con expresión alterada disminuyó de 11 a 8 en el caso de los cultivos en células LE, 5 regulados al alza (*dnaK*, *htrA*, *ompA*, *fstW* y *Cpaf*) y 3 a la baja (*omcA*, *omcB* y *hctA*), y por el contrario, en los cultivos de células AH-1, a las 72 hpi, el número de genes con expresión diferenciada se incrementó de 5 a 10 (*htrA*, *ompA*, *omcA*, *omcB*, *pmp17G*, *hctA*, *sctN*, *cydA*, *cydB*, *miaA*), estando todos ellos regulados a la baja.

Estos datos están en consonancia con los resultados de microscopía electrónica de cultivos tratados con penicilina y se suman a la evidencia de que este antibiótico es un buen inductor de persistencia en cultivos *in vitro* de *C. abortus*, lo que constituye un modelo útil para futuros estudios que requieran establecer este estado en esta especie.

De forma general, los genes que codifican proteínas de membrana *omcA* y *omcB* y el gen que codifica una proteína similar a histonas *hctA* se encontraron regulados a la baja en ambas líneas celulares y en ambos momentos estudiados, mientras que otros se mantuvieron regulados al alza, como *dnaK* y *htrA*, ambos codificantes de proteínas de respuesta a estrés. En conjunto, estas características sugieren que la penicilina bloquea la fisión binaria y el paso de CR a CE y coinciden parcialmente con los resultados obtenidos en otros estudios en los que se analiza el efecto de la penicilina en la regulación transcripcional en otras especies de *Chlamydia* (tabla 7).

Tabla 6. Expresión relativa de mRNA (*fold change* o cambio en el incremento de veces ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)) de genes de *C. abortus* a las 48 y a las 72 hpi en células LE y AH-1 tratadas con estradiol (E2), progesterona (P4) o penicilina (pen). Los datos están normalizados utilizando el gen 16S rRNA como gen de referencia. Negrita y sombreado en verde: regulación al alza significativa (incremento de veces > 2); cursiva y sombreado en rojo: regulación a la baja significativa (incremento de veces < 0,5).

Clase funcional	Genes	LE						AH-1					
		48 hpi			72 hpi			48 hpi			72 hpi		
		E2	P4	pen	E2	P4	pen	E2	P4	pen	E2	P4	pen
Respuesta a estrés	<i>groEL</i>	0.91	1.48	2.79	0.82	1.51	1.84	0.71	1.00	1.58	0.86	0.69	0.60
	<i>dnaK</i>	0.67	1.61	3.87	0.96	1.54	3.24	0.75	1.02	2.56	0.96	0.69	0.87
	<i>htrA</i>	<i>0.32</i>	<i>0.30</i>	2.63	0.63	0.98	3.71	0.97	0.97	0.85	0.88	0.95	<i>0.33</i>
	<i>grpE</i>	<i>0.36</i>	<i>0.28</i>	1.78	0.94	1.22	1.19	0.83	0.98	2.56	0.62	0.70	0.72
Proteínas de membrana	<i>ompA</i>	0.95	1.26	1.98	1.36	1.63	4.78	0.82	1.08	0.64	0.91	0.69	<i>0.16</i>
	<i>omcA</i>	0.65	0.95	NA	1.24	1.22	<i>0.00</i>	0.63	1.32	<i>0.15</i>	0.81	0.64	<i>0.01</i>
	<i>omcB</i>	0.86	0.73	<i>0.02</i>	1.27	1.22	<i>0.14</i>	0.44	0.71	<i>0.04</i>	0.59	0.62	<i>0.01</i>
	<i>pmp17G</i>	2.75	2.35	<i>0.13</i>	1.73	1.82	0.97	1.14	1.47	0.42	0.88	0.82	<i>0.03</i>
División celular	<i>ftsW</i>	0.70	1.22	1.98	1.15	1.21	2.85	1.26	1.38	0.93	1.61	1.04	0.61
Conversión CR a CE	<i>hctA</i>	0.51	0.99	<i>0.03</i>	1.00	1.18	<i>0.14</i>	0.72	1.19	<i>0.03</i>	0.80	0.70	<i>0.01</i>
	<i>euo</i>	0.85	1.41	1.04	0.89	1.31	1.99	1.35	1.32	1.24	1.63	1.11	0.61
Degradación de proteínas	<i>Cpaf</i>	0.68	1.58	2.11	0.97	1.15	4.31	1.00	1.06	1.49	0.87	0.89	0.52
T3SS	<i>sctN</i>	0.87	1.02	<i>0.41</i>	1.32	1.32	1.80	0.82	1.12	0.43	0.95	0.60	<i>0.06</i>
Sistema transporte electrones	<i>cydA</i>	1.23	1.24	<i>0.30</i>	1.06	1.37	0.58	1.01	1.08	0.62	0.75	0.83	<i>0.25</i>
	<i>cydB</i>	<i>0.28</i>	<i>0.23</i>	<i>0.32</i>	0.73	0.80	0.85	0.77	0.98	0.61	0.57	0.52	<i>0.37</i>
Control traducción	<i>miaA</i>	1.17	6.83	<i>0.06</i>	1.25	1.24	1.44	0.89	1.20	0.51	0.76	0.76	<i>0.24</i>

A la vista de los resultados obtenidos a partir de las muestras tratadas con penicilina, si tuviéramos que caracterizar el modelo de persistencia *in vitro* de *C. abortus*, entre todos los genes propuestos usaríamos los siguientes como marcadores de persistencia: *omcA*, *omcB*, *dnaK* y *hctA*, ya que su expresión se ha alterado de forma sostenida en ambas líneas celulares y momentos post-infección estudiados.

Un aspecto importante del proceso de diferenciación secundaria (paso de CR a CE) es la expresión de genes que codifican proteínas que conforman el complejo de la membrana externa. Los genes de expresión tardía *omcA* y *omcB* (Belland *et al.*, 2003a) codifican dos proteínas ricas en cisteína que forman parte de este complejo. Al tratarse de proteínas estructurales, están implicadas en el mantenimiento de la integridad estructural de los CE de clamidia y en el reconocimiento de la respuesta inmune del hospedador. En modelos de persistencia descritos en otras especies de clamidia, los niveles de ARNm de este gen se encuentran reducidos (Goellner *et al.*, 2006; Lambden *et al.*, 2006; Carey *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2015;), lo que coincide con los resultados obtenidos en nuestro estudio, en los que la penicilina indujo una regulación a la baja sostenida de estos genes. El hecho de que la proteína *omcB* sea el segundo componente más abundante de la membrana externa clamidial, que es reconocida por el sistema inmune del hospedador, hace que la regulación a la baja de la expresión del gen que la codifica detectada en nuestro estudio, pueda corresponderse con un estado de inactividad clamidial, donde la bacteria, por medio de la no producción de ésta y otras proteínas, eludiese la respuesta inmune del hospedador, permitiéndole persistir dentro de las células por un tiempo indeterminado.

Los genes *groEL* y *dnaK* codifican las proteínas de choque térmico Hsp60 y Hsp70. Estas proteínas son sintetizadas en fases tempranas del ciclo clamidial, tienen función de chaperona, interviniendo en el transporte, translocación, ensamblaje y plegamiento de proteínas sintetizadas de novo (Zugel y Kaufmann, 1999) y son una de las principales dianas de la respuesta inmune humoral en infecciones por *C. abortus* (Hechard *et al.*, 2004). En nuestro trabajo no encontramos alteraciones en la regulación del gen *groEL* en cultivos clamidiales tratados con penicilina, con excepción de una regulación al alza en cultivos sobre células LE a las 48 hpi. La ausencia generalizada de cambios significativos en la expresión de este gen coincide con otros estudios de modelos de inducción de persistencia *in vitro* (Belland *et al.*, 2003b; Goellner *et al.*, 2006; Klos *et al.*, 2009; Carey *et al.*, 2013).

Especie	Genes regulados al alza ↑	Expresión no alterada ⇔	Genes regulados a la baja ↓	Referencia
<i>C. psittaci</i>	<i>ompA</i>	<i>groEL, grpE, cpaF, sctN</i>	<i>dnaK, omcA, omcB, euo, hctA, ftsW,</i>	Goellner <i>et al.</i> , 2006
<i>C. psittaci</i>	<i>dnaK, grpE</i>		<i>ftsW, omcB</i>	Hu <i>et al.</i> , 2015
<i>C. pneumoniae</i>	<i>htrA</i>		<i>hctA</i>	Di Pietro <i>et al.</i> , 2012
<i>C. pneumoniae</i>		<i>groEL</i>	<i>ftsW</i>	Klos <i>et al.</i> , 2009
<i>C. muridarum</i>		<i>groEL</i>	<i>euo, omcB, ompA</i>	Carey <i>et al.</i> , 2013
<i>C. trachomatis</i>			<i>htrA</i>	Huston <i>et al.</i> , 2008
<i>C. trachomatis</i>			<i>omcB</i>	Lambden <i>et al.</i> , 2006
<i>C. trachomatis</i>	<i>htrA</i>	<i>groEL, ftsW, ompA</i>	<i>hctB</i>	Nicholson <i>et al.</i> , 2002

Tabla 7. Cuadro resumen del comportamiento de genes coincidentes con los estudiados en esta tesis ante el tratamiento con penicilina en otras especies de *Chlamydia*.

La regulación al alza de un gen como *dnaK*, que codifica una proteína implicada en diversas funciones del metabolismo de la bacteria podría permitir al microorganismo resistir los efectos inhibidores de la penicilina y mantener algunas funciones básicas que le permitan sobrevivir hasta el cese de la acción del agente estresante. En un estudio realizado en la cercana especie *C. psittaci* (Goellner *et al.*, 2006), los autores hicieron un hallazgo que apunta en la misma dirección. Tras inducir el estado de persistencia mediante penicilina o IFN- γ , analizaron la expresión de varios genes relacionados con el ciclo de desarrollo a distintos momentos post-infección, empezando a las 12 hpi. En un momento tan temprano hallaron una regulación al alza llamativa de varios genes de expresión tardía codificantes de proteínas de membrana (*omcA*, *pomp91B*, *omcB*) y proteínas implicadas en la condensación del ADN (*hctA*), diferenciación CR-CE (*ctcB*), sistema de secreción tipo III (*incA*), y regulación de la transcripción (*rpoN*). Para explicar estos resultados, los autores argumentan que ante un agente estresante, la célula clamidial trata de acelerar su ciclo de desarrollo iniciando procesos que normalmente tendrían lugar más tarde e intensificando la expresión de genes que son esenciales para una supervivencia a largo plazo. Para confirmar si ocurre lo mismo en *C. abortus*, sería interesante repetir el perfil de expresión génica en momentos post-infección más tempranos.

La proteína codificada por el gen *hctA*, la Hc1, está implicada en la condensación del cromosoma y por tanto se considera que *hctA* es un gen de expresión tardía en el ciclo clamidial (Belland *et al.*, 2003a), ya que el cromosoma debe ser condensado durante la diferenciación secundaria de CR a CE. La regulación a la baja detectada en nuestro modelo de penicilina coincide con lo descrito por otros autores (Di Pietro *et al.*, 2012) y es otro signo de que el antibiótico produce un bloqueo del paso de CR a CE en el ciclo de desarrollo.

Otro hecho a destacar de los resultados obtenidos es la regulación al alza del gen *Cpaf* encontrada en los cultivos de células LE y no en los de AH-1. Este gen codifica un factor clamidial con actividad proteasa (CPAF) que es secretado al citoplasma de la célula eucariota y está relacionado con la supresión del tránsito intracelular, la inhibición de la apoptosis y la supresión de la presentación de antígenos por parte de los complejos mayores de histocompatibilidad I y II de células infectadas por clamidias (Zhong, 2011). Aunque algunos estudios indican que durante el estado de persistencia este gen se encuentra regulado a la baja (Rodel *et al.*, 2012; Dille *et al.*, 2014;), lo que ayudaría a la clamidia a resistir la apoptosis, otros estudios en función del modelo de inducción de persistencia lo encuentran regulado al alza o no alterado (Heuer *et al.*, 2003; Goellner *et al.*, 2006). Kawana *et al.* (2007) describieron que en células infectadas por *C. trachomatis*, las proteasas CPAF degradaban la proteína de superficie CD1d, que es una molécula de tipo CMH, lo que hace a la célula hospedadora más “invisible” a células de la inmunidad innata como las NK o las NKT. Así, la regulación al alza de este gen podría constituir otra estrategia de evasión de la respuesta inmune.

Por otro lado, los tratamientos con estradiol y progesterona dieron lugar a pocos cambios en el perfil de expresión de los genes estudiados. Nuestros resultados muestran que solo la expresión de 4 genes en las células LE a las 48 hpi estaba significativamente alterada por la adición de hormonas con respecto a los controles crecidos en ausencia de tratamientos. De estos 4 genes, 3 estaban regulados a la baja (*htrA*, *grpE* y *cydB*) y 1 al alza (*pmp17G*). Estos cambios fueron similares tanto para los cultivos tratados con estradiol como para los tratados con progesterona. A las 72 hpi no se observaron cambios en la expresión génica inducidos por la adición de hormonas.

Resulta curiosa la falta de relación entre las imágenes de MET tomadas a las 72 hpi de cultivos clamidiales en células LE tratados con hormonas (figura 20C y E), en las

que observamos presencia de formas aberrantes, y el perfil transcripcional obtenido de cultivos en las mismas condiciones, en el que no se aprecia ninguna alteración en la expresión de los genes estudiados. Así, los resultados en relación con la presencia de formas aberrantes en los cultivos tratados con hormonas no parecen estar relacionados con un determinado patrón de expresión génica ni con un tratamiento hormonal determinado.

Muchos investigadores han tratado de encontrar un patrón común de alteraciones en la expresión génica que se correlacione con el fenotipo de CA en la infección clamidial *in vitro* con el objetivo de trasladar estos conocimientos a la búsqueda y caracterización del microorganismo en estado de persistencia *in vivo* y, si es posible, determinar los mecanismos que regulan la inducción de este estado y la reactivación posterior. En nuestro trabajo, el grupo de genes *omcA*, *omcB*, *dnaK* y *hctA* presentaron una regulación consistente en ambas líneas celulares y momentos estudiados en los cultivos tratados con penicilina, lo que los haría válidos para seguir investigando sobre el estado de persistencia *in vivo* inducido por antibióticos en *C. abortus*. Sin embargo, la ausencia de alteraciones en la expresión en los cultivos de células LE tratados con hormonas, en los que, por el contrario, sí habíamos observado presencia de CA por MET, hace que este panel de genes no se pueda generalizar a cualquier sistema de inducción de persistencia. Además, en un estudio realizado en la especie *C. trachomatis* y sobre células endometriales humanas con el objetivo de determinar el efecto del estradiol y la progesterona sobre la expresión de genes de la bacteria, los autores, analizando todo el genoma del patógeno mediante microarrays, observaron alteraciones significativas en la expresión de varios genes clamidiales, entre ellos algunos analizados en nuestro trabajo como *omcB*, *cydA*, *cydB* y *miaA* (Amirshahi *et al.*, 2011). Las diferencias entre este estudio y el nuestro nos indican que probablemente los perfiles de expresión de genes no solo difieren entre distintos métodos de inducción de persistencia, sino que también varían en función de la especie de *Chlamydia*.

La idea de que no existe un único perfil de genes con alteraciones comunes para cualquier modelo de inducción de persistencia y cualquier especie de clamidia ya ha sido apuntada previamente por otros autores (Hogan *et al.*, 2004; Goellner *et al.*, 2006; Klos *et al.*, 2009; Wyrick, 2010). Aunque el criterio fenotípico es constante, consistente en la aparición de CR anormalmente grandes, que no se dividen, viables pero no cultivables, los perfiles de transcripción de distintos estudios muestran diferencias

significativas en cuanto a la regulación de los mismos genes entre distintos modelos de inducción de persistencia, entre diferentes especies de clamidia y probablemente también en función del tipo de células hospedadoras. Por lo tanto, parece que no existe un único modelo de persistencia *in vitro*, sino que los miembros de la familia *Chlamydiaceae* han desarrollado más de un mecanismo para alcanzar este estado y asegurar su supervivencia en condiciones desfavorables.

4. Discusión general: resumen

Trabajos previos han sugerido que la infección por *C. abortus* puede estar influenciada por hormonas esteroideas (Papp *et al.*, 1994; Nietfeld, 2001). Otros autores ya habían apuntado que la infección causada por las cercanas especies *C. trachomatis* (Maslow *et al.*, 1988; Hall *et al.*, 2011; Hafner *et al.*, 2013), *C. suis* (Guseva *et al.*, 2003) y *C. caviae* (Pasley *et al.*, 1985a), todas ellas relacionadas con el tracto reproductor femenino, también se encuentran moduladas por hormonas sexuales femeninas, entre las que destacan el estradiol y la progesterona como principales reguladores de los ciclos estral, en el caso de los animales, y menstrual, en el caso de la mujer. Sin embargo, hasta la fecha, el papel que dichas hormonas pueden jugar en la patogenia del AEO sigue siendo desconocido.

El trabajo presentado en esta tesis trata de investigar *in vitro* cómo afectan las hormonas esteroideas sexuales estradiol y progesterona al desarrollo del ciclo intracelular de *C. abortus* y aporta una contribución en la investigación de los mecanismos que pueden estar implicados en la aparición de un estado de persistencia clamidial mediante estudios de caracterización morfológica y transcripcional utilizando, por primera vez para *C. abortus*, la penicilina como agente inductor de dicho estado. Además, por primera vez, para la realización de los experimentos se utilizaron dos líneas celulares de origen ovino que tratan de emular el órgano donde tiene lugar la multiplicación activa de *C. abortus* en el hospedador natural, la placenta, tanto en su porción fetal o trofoblástica (línea celular AH-1 (Haldorson *et al.*, 2006)), como en su porción materna o endometrial (línea celular LE (Johnson *et al.*, 1999)).

Entre los primeros objetivos de esta tesis estaba conocer la susceptibilidad de las dos líneas celulares propuestas en este estudio, LE y AH-1, a la infección por *C.*

abortus, así como evaluar el efecto del estradiol, progesterona y penicilina en el desarrollo de la infección por *C. abortus* en dichas líneas celulares. Según nuestros resultados, tanto el estradiol como la progesterona tuvieron un efecto positivo en los niveles de infección celular, como demostramos mediante IFI de los cultivos de células LE y AH-1 tratadas, y mediante aislamiento de CE de los sobrenadantes de los cultivos. Este resultado podría ser explicado porque la adición de hormonas induce una regulación positiva de componentes del complejo receptor de estrógenos en la superficie celular, y como ha sido previamente demostrado para *C. trachomatis*, este receptor participe en la adhesión de CE (Davis *et al.*, 2002), mejorando así la susceptibilidad a la infección.

En definitiva, nuestros resultados demuestran que ambas hormonas, estradiol y progesterona, aumentan la susceptibilidad a la infección en las dos líneas celulares estudiadas. Esta diferencia con respecto a los controles no tratados con hormonas hacen de éste un sistema útil para abordar la identificación de los mecanismos de susceptibilidad en futuros estudios sobre la relación patógeno-célula hospedadora.

Otro resultado a destacar es la distinta respuesta de *C. abortus* observada ante el mismo tratamiento hormonal en función de la línea celular utilizada para su cultivo. Esto es un indicio claro de que las alteraciones que vemos en la bacteria se producen vía indirecta a través de la célula hospedadora. Una vez que sabemos esto, resultaría interesante profundizar en el estudio de la respuesta de las células eucariotas (expresión de mediadores de la respuesta inmune innata) a las hormonas y a la infección, tal y como hicieron Wan *et al.* (2014) con células endometriales humanas y *C. trachomatis*. Un paso más en la creación de un modelo *in vitro* que se asemeje a la realidad sería establecer un sistema de co-cultivo de ambas líneas celulares y analizar las interacciones que se producen entre ellas al compartir el mismo ambiente extracelular. Además, los autores que establecieron la línea AH-1 comprobaron que ésta expresaba y producía IFN- τ (Haldorson *et al.*, 2006) y paralelamente se ha demostrado que las células LE responden al IFN- τ modulando la expresión del 8% de los genes analizados (1274 de 15634) mediante microarray (Chen *et al.*, 2007).

Al examinar al MET los cultivos clamidiales desarrollados en células LE tratadas con progesterona, se observaron CA similares a los que presentaban los cultivos tratados con penicilina. Al igual que los tratamientos con β -lactámicos son habituales en

el tratamiento de las enfermedades del ganado, también es frecuente en el manejo reproductivo del rebaño la utilización de progesterona como parte de los tratamientos de sincronización de celo. Si, como parecen indicar los resultados de MET, la progesterona favorece el desarrollo de formas de persistencia, esto podría tener implicaciones en el control del AEO en el rebaño, como por ejemplo a la hora del diseño de protocolos de vacunación.

No hemos hallado referencias bibliográficas que asocien el tratamiento de progesterona con el estado de persistencia *in vitro* de *C. abortus*. Amirshahi *et al.* (2011) evaluaron el efecto del estradiol y la progesterona en cultivos *in vitro* de *C. trachomatis* y describen que el tratamiento con progesterona, al contrario que con estradiol, no provoca la aparición de formas de persistencia, pero que sin embargo sí inducía alteraciones en aproximadamente el 25% del transcriptoma, produciendo en general una regulación al alza de genes de vías del metabolismo energético de carbohidratos y aminoácidos.

Los trabajos de investigación sobre persistencia clamidial son relativamente numerosos en especies de clamidia que afectan a la especie humana (Hogan *et al.*, 2004; Schoborg, 2011), mientras que para *C. abortus*, hasta donde sabemos, solo se han estudiado tres modelos de persistencia *in vitro* hasta la fecha: cultivo continuo (Perez-Martinez y Storz, 1985), adición de IFN- γ (Brown y Entrican, 1996; Brown *et al.*, 2001) y co-infección con el virus de la diarrea epidémica porcina (Stuedli *et al.*, 2005; Borel *et al.*, 2010). En esta tesis utilizamos por primera vez un modelo de inducción de persistencia por adición de penicilina, y lo utilizamos para investigar las posibles relaciones entre las hormonas sexuales femeninas y el estado de persistencia que puedan inducir.

Primeramente caracterizamos el estado de persistencia *in vitro* de *C. abortus* a través de la descripción de alteraciones morfológicas y del análisis de un perfil de expresión génica en cultivos tratados con penicilina. Los resultados obtenidos para *C. abortus* coinciden con los descritos por otros autores que previamente habían caracterizado dicho estado en otras especies de chlamydia (Goellner *et al.*, 2006; Carey *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2015), sobre todo en cuanto a la apariencia de las formas aberrantes, y solo parcialmente en relación al perfil de alteración de la expresión de los genes estudiados.

Por otra parte, los resultados en relación con la presencia de formas aberrantes en los cultivos tratados con hormonas no parecen estar relacionados con un determinado patrón de expresión génica. Así, a diferencia de lo que ocurre en los cultivos tratados con penicilina, el posible efecto de las hormonas sobre el ciclo intracelular de *C. abortus* depende más bien de la línea celular que de la propia hormona. Los resultados del análisis morfológico al MET de clamidias cultivadas en la línea de células epiteliales del endometrio (LE), con la presencia de formas aberrantes independientemente del tratamiento hormonal utilizado, indican que esta línea ha sido más susceptible al tratamiento con hormonas inductor de persistencia con independencia del perfil de expresión de genes resultante. Los resultados obtenidos en nuestro estudio indican que esta línea puede ser un modelo adecuado para futuras investigaciones que profundicen en el efecto de las hormonas sexuales en el ciclo intracelular de *C. abortus* como otros autores indican para *C. suis* (Guseva *et al.*, 2003) o *C. trachomatis* (Amirshahi *et al.*, 2011; Wan *et al.*, 2014), utilizando líneas de células epiteliales endometriales, similares a LE y originarias de la especie de hospedador natural para la especie de clamidia estudiada.

Los resultados indican que existen diferencias en los perfiles de expresión génica de *C. abortus*, dependiendo del tratamiento inductor de persistencia que se utiliza en los diferentes estudios. Este hecho ha sido evidenciado por otros autores en otras especies clamidiales (Goellner *et al.*, 2006; Klos *et al.*, 2009; Timms *et al.*, 2009). Estos autores coinciden en que el perfil de expresión de genes es variable en función del inductor de persistencia utilizado e incluso de la especie de clamidia investigada. Nuestro estudio aporta más evidencias que soportan la idea de que un simple perfil de transcripción no es suficiente para caracterizar el estado persistente de la bacteria en cualquier circunstancia.

Finalmente, se debe tener en cuenta la limitación de que en nuestros estudios utilizamos una única dosis de hormonas y estudiamos los efectos del estradiol y la progesterona por separado sabiendo que, *in vivo*, las concentraciones de estradiol y progesterona están continuamente fluctuando y obviamente están presentes al mismo tiempo en el organismo. No obstante, varios estudios *in vitro* han demostrado que tanto el estradiol como la progesterona regulan la expresión de receptores y antagonizan los efectos de la otra hormona (Katzenellenbogen, 2000; Gillgrass *et al.*, 2005). Así, resulta esencial analizar el efecto de cada una por separado antes de pasar a estudiar los efectos

de la combinación de ambas hormonas, lo que podría ser una línea de trabajo para el futuro. En cuanto a la dosis utilizada, el efecto de las hormonas descrito en este trabajo se ha obtenido utilizando concentraciones de hormonas suprafisiológicas tratando de cubrir aquellas que pueden darse a nivel local en la placenta inflamada o durante la gestación. No obstante, no se conocen las concentraciones exactas de hormonas en estas localizaciones y en los distintos estados fisiológicos o patológicos en el ovino, lo que sería de interés de cara a futuros estudios sobre el efecto de las hormonas sexuales en procesos que tienen lugar a nivel del tracto reproductor o placenta.

En conclusión, en este trabajo hemos realizado una investigación básica que aporta nueva información sobre la biología del estado de persistencia de *C. abortus*. Las aplicaciones de nuestros hallazgos podrían pasar por el diseño de futuras estrategias de vacunación frente al AEO. Utilizar el conocimiento sobre el ambiente hormonal podría directa o indirectamente ayudarnos a inducir respuestas inmunes protectoras, lo que podría contribuir al desarrollo de vacunas más efectivas. Además, hemos establecido un grupo de genes que, aunque deberían ser probados en más modelos de persistencia *in vitro*, podrían ser útiles en el desarrollo de una prueba diagnóstica específica basada en ARN que permita distinguir entre infecciones agudas y persistentes. Por último, un mejor conocimiento de los mecanismos que controlan la inducción del estado de persistencia clamidial y la posterior reactivación será necesario para otras aplicaciones hipotéticas como el desarrollo de vacunas o fármacos que actúen de forma específica sobre clamidias en estado de persistencia.

CONCLUSIONES

PRIMERA: Las líneas celulares AH-1 y LE (originarias de trofoblasto y endometrio ovino respectivamente) son susceptibles a la infección por la cepa AB7 de *Chlamydia abortus* y en ellas se desarrollan inclusiones de mayor tamaño que las observadas en las líneas tradicionalmente empleadas para el cultivo de esta bacteria.

SEGUNDA: Las hormonas sexuales 17β -estradiol y progesterona favorecen la infectividad de las líneas celulares AH-1 y LE, mientras que la penicilina produce el efecto contrario.

TERCERA: Las alteraciones morfológicas observadas en *Chlamydia abortus* tras la adición de hormonas a los cultivos no se asocian con una acción directa de las hormonas sobre el microorganismo, sino que se producen de forma indirecta a través de la célula hospedadora.

CUARTA: La infección por *Chlamydia abortus* influye negativamente en la producción de progesterona y 17β -estradiol por parte de las células del trofoblasto, lo que podría considerarse como uno de los mecanismos implicados en la patogenia del aborto enzoótico ovino.

QUINTA: La adición de penicilina a cultivos de *Chlamydia abortus* induce *in vitro* un estado de persistencia, con características morfológicas y patrones de transcripción génica definidos.

SEXTA: La progesterona y en menor medida el 17β -estradiol inducen la formación de cuerpos reticulares de morfología aberrante en cultivos de células LE, aunque este hecho no se asocia con alteraciones en la expresión de los genes estudiados en *Chlamydia abortus*.

Conclusiones

SÉPTIMA: Los genes *omcA* y *omcB* (proteínas de membrana), *dnaK* (respuesta a estrés) y *hctA* (conversión de cuerpos reticulares a cuerpos elementales) se proponen como indicadores de un estado de persistencia *in vitro* inducido por penicilina en *Chlamydia abortus*.

OCTAVA: No se puede establecer un patrón común de expresión génica para los distintos modelos de inducción de persistencia clamidial *in vitro*.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

Title of the thesis: “Effect of penicillin and sex hormones 17 beta-estradiol and progesterone on the infection with *Chlamydia abortus* of cell lines derived from ovine endometrial and trophoblastic tissues”

Introduction

The obligate intracellular bacterium *Chlamydia abortus* is one of the major causes of reproductive failure in most sheep- and goat-breeding countries worldwide. In particular, the pathogen induces late-term abortion, causing substantial economic losses in the livestock sector. Although abortion due to *C. abortus* has been sporadically diagnosed in other species of mammals, including humans, the infection mainly affects small ruminants, resulting in the disease known as ovine enzootic abortion (OEA). One especially intriguing feature of OEA is the ability of *C. abortus* to establish a latent, undetectable infection in non-pregnant sheep until the last weeks of a subsequent pregnancy (Longbottom and Coulter, 2003). At this time, something occurs that triggers the reactivation of the organism, which colonizes the placenta and multiplies, eventually causing abortion or birth of small, weak lambs. After the reproductive failure, animals acquire protective immunity, allowing successful rebreeding, although they become carriers and can excrete the organism from their reproductive tracts in following estruses (Nietfeld, 2001).

Despite the central role that this latency-to-recrudescence process plays in the pathogenesis of OEA, the underlying mechanisms that control it remain unclear. Several lines of evidence suggest that fluctuations of hormones that control reproductive cycles, such as estradiol (E2) and progesterone (P4) might contribute as triggering events for the reactivation of dormant *C. abortus*. Firstly, it is widely accepted that steroid hormones are able to modulate both innate and adaptive immune responses against bacteria (Beagley and Gockel, 2003). Secondly, in addition to their role as immunomodulators, female sex hormones may have a direct effect on bacterial growth and metabolism, affecting the susceptibility to infection of host cells to chlamydiae (Guseva *et al.*, 2003; Hall *et al.*, 2011; Kintner *et al.*, 2015). Finally, it has been shown in sheep that the recrudescence of *C. abortus* in late term of pregnancy, coincides in

time with the marked physiological change in serum E2/P4 ratio that takes place at the final stage of gestation (Nasar, 2006).

In spite of these pieces of evidence, to our knowledge, the relationship between the pathogenesis of *C. abortus* and the mentioned hormones is still unknown.

In parallel, previous research suggests that the latent state of chlamydiae *in vivo* may be linked to the persistent state *in vitro* (Hogan *et al.*, 2004; Pospischil *et al.*, 2009). Persistence can be defined as the viable but non-infectious phenotype of the pathogen, and is induced under stressful growth conditions imposed by immunological responses, nutrient deprivation or antibiotics. The presence of aberrant forms is generally recognized as a hallmark of *in vitro* persistence, as well as differential mRNA expression patterns of some genes involved in regulation of the developmental cycle, cell membrane structures and energy metabolism (Hogan *et al.*, 2004). Previous studies have shown that *C. abortus* is capable of persistence (Brown *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 2001; Borel *et al.*, 2010). However, although the publication of *C. abortus* complete genome sequence (Thomson *et al.*, 2005) opened up the possibility for a systematic study of the transcriptional response during persistence, to our knowledge, such molecular changes have not yet been investigated for this pathogen.

A morphological and transcriptional characterisation of the persistent state of *C. abortus* would be necessary to unravel the mechanisms that control entry into and exit from the latent state and, ultimately, to figure out the signal that triggers the reactivation of *C. abortus*. Moreover, the set up of a well characterised model of persistence would be very useful to assess the ability of other substances or molecules such as E2 or P4 to induce the persistent state.

Finally, most *in vitro* studies on *C. abortus* are performed using McCoy cells as hosts for the bacterial culture, although they are not a natural target for this species. A suitable cell line to study the influence of sex hormones on the *in vitro* *C. abortus* infection should meet the following characteristics: to be of ovine origin, to come from tissues by which *C. abortus* has naturally tropism and to have demonstrated presence of E2 and P4 receptors. In this thesis work, experiments are carried out in two cell lines derived from the ovine female genital tract (Johnson *et al.*, 1999) and placenta (Haldorson *et al.*, 2006), which fulfil the aforementioned requirements and are

consequently a better *in vitro* model to study the effect of E2, P4 and penicillin on the *C. abortus* infection.

Hypothesis and objectives

Taking this background into account, we hypothesize that hormonal fluctuations which take place during the reproductive cycle may play a role in the mechanisms that regulate entry into and reactivation from the *C. abortus* latent state.

The main goal of the PhD thesis is therefore to investigate the influence of E2 and P4 on the *in vitro* infection of *C. abortus* and to determine their role in the establishment of persistent infections. To reach this goal, the following specific objectives were set:

1. To assess the influence of E2 and P4 on the growth of *C. abortus in vitro*.
2. To analyse the morphology of chlamydial inclusions grown in different cell lines and exposed to E2, P4 or penicillin.
3. To examine changes in the transcriptional response of *C. abortus* cultured in different cell lines and exposed to E2, P4 or penicillin.

Methods

Experiments were carried out in two different immortalized ovine cell lines: the trophoblast cell line AH-1 and the endometrial cell line LE. Cells were cultured to 75% confluence before the addition of 17 β -estradiol (500 pg/ml), progesterone (100 ng/ml) or penicillin (200 U/ml) as demonstrable inducer agent of persistence in other species of chlamydia (Hogan *et al.*, 2004). Non-treated cells were left as control. Twenty-four hours after treatments, cell monolayers were infected with *C. abortus* strain AB7 (2 x 10⁶ IFUs/ml).

Samples of supernatants, DNA, RNA and cell pellets were taken at 48 and 72 hours post infection (hpi) in different experiments.

To study the influence of E2, P4 and penicillin on the growth and development of *C. abortus*, first we performed an indirect immunofluorescence technique to assess the number and shape of inclusions in the different cultures. Then, we used supernatants to carry out the isolation and counting of viable free elementary bodies using McCoy

Summary and conclusions

cells as substrate. Finally we collected cell monolayers to determine the amount of chlamydial DNA by q-PCR.

To assess the effect of hormones and penicillin on the ultrastructure of inclusions, cell pellets were collected at 72 hpi. Cell pellets were fixed in 2.5% glutaraldehyde, postfixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated with increasing concentrations of absolute ethanol and finally embedded in epoxy resin. Areas of high cell density for ultrastructural examination were selected from epoxy resin blocks using semithin sections (1 mm) stained with haematoxylin. Ultrathin sections (80 nm) were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and examined by TEM.

Chlamydial transcriptional changes were studied from infected cells harvested at 48 and 72 hpi. Total RNA was extracted and purified using a commercial kit. For each sample, 400 ng of total RNA was reverse transcribed into cDNA using a commercial kit, following the manufacturer's instructions. A set of 16 target genes encoding proteins related to the chlamydial developmental cycle were selected: *groEL*, *dnaK*, *htrA*, *grpE* (stress response), *ompA*, *omcA*, *omcB*, *pmp17G* (membrane proteins), *ftsW*, *hctA*, *euo* (RB to EB conversion), *Cpaf* (protease activity), *sctN* (T3SS), *cydA*, *cydB* (electron transport system), *miaA* (translation control); and *16S rRNA* was used as reference gene for relative quantification. Primers were designed using the informatics tool OligoPerfect Designer (ThermoFisher Scientific) and tested by qPCR using chromosomal DNA of *C. abortus* as template. Measurement of mRNA expression levels was performed in the 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). All RT-qPCR reactions were performed in triplicate for each target gene. The relative expression ratio of a target gene was calculated using the comparative 'Delta-delta method' ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). A 2-fold change in the normalized gene of interest expression level was used as a cut-off, which is a commonly established threshold in other chlamydial gene expression studies (Hogan *et al.*, 2004; Goellner *et al.*, 2006; Amirshahi *et al.*, 2011). Thus, selected genes showing relative expression ratios higher than 2 or lower than 0.5 were considered to be up- or down-regulated respectively.

Results and discussion

1. Influence of estradiol, progesterone and penicillin on the growth of *C. abortus*

Immunostained inclusions of *C. abortus* grown in hormone and penicillin-treated AH-1 and LE cells showed for both cell lines a greater level of infectivity in hormone-treated cultures, both with E2 or P4, than in control cultures grown without hormones. Penicillin-treated cultures displayed a very low number of inclusions, which were small-sized and faint (figure 17). *C. abortus* exhibited productive infection in both cell lines typified by inclusion formation observed when EB were harvested from supernatants and titrated onto McCoy cells. Results of EB isolation were in line with observations of immunostained cultures: there was higher presence of *C. abortus* in the supernatant of hormone-treated cultures than in those grown without hormones. Viable EB from penicillin-treated cultures could not be isolated. The level of detection of chlamydial DNA was in general higher in LE than in AH-1 cultures. However, regarding treatments, only penicillin-treated samples showed a significant lower quantity of DNA, whereas no differences were found between hormone-treated cultures and controls in any cell line. This discrepancy with results obtained in isolation may be due to the ability of qPCR of detecting not only the DNA from live viable chlamydial EB, but also from RB, EB and IB, viable or not.

The mechanism by which hormones enhance the infectivity of LE and AH-1 cells is unclear. It is possible that effects that hormones have on the chlamydial infection do not take place directly on the bacteria, but they are the result of hormone-induced changes in host cells. Thus, we should consider mechanisms by which hormones can alter the host cell environment in such a way that chlamydial susceptibility is enhanced. One possible explanation is that hormones increase the expression of receptors related to chlamydial infection in the surface of epithelial cells. Chlamydial infection is initiated by contact, attachment and entry of EB into host cells. Previously, it was reported that pre-treatment of human endometrial epithelial cells with E2 enhance the attachment of *C. trachomatis* serovar E infectious EB, increasing the percentage of cells with fluorescent-marked EB attached from 50 to 80% (Maslow *et al.*, 1988). Years later, Davis *et al.* (2002) identified a membrane protein at the surface of endometrial human cells (protein disulfide isomerase) as a receptor for the same

serovar of *C. trachomatis* and it belonged to the estrogen receptor complex. So it is possible that the supplementation with E2 has a positive regulatory effect on components of the estrogen receptor complex, which would enhance the attachment of EB to cells and consequently the susceptibility to infection. Guseva *et al.* (2003) studied the influence of E2 and P4 on the infection of *C. suis* in different cell populations of the uterus of sows in different stages of estral cycle. They found that cells from luminal epithelium were more sensible to E2 and more susceptible to the infection than cells from glandular epithelium. This finding is probably due to the fact that luminal epithelia are made of more mature and differentiated cells, and so they are an excellent model to analyse apical membrane receptors involved in chlamydial EB attachment. In addition, Guseva's results support Davis hypothesis that EB may recognise a receptor from the estrogen receptor complex. Further studies would be necessary to confirm this possibility and to understand the precise mechanism by which sex hormones regulate the susceptibility to infection with *C. abortus*.

2. Characterization of the persistent state induced by addition of hormones or penicillin to cultures of *C. abortus*

a. Microscopic evidence of chlamydial persistence

It has been reported by several authors (Hogan *et al.*, 2004; Goellner *et al.*, 2006; Borel *et al.*, 2010) that chlamydiae show a characteristic electron microscopy appearance under persistence conditions. In our study, we compared the morphology of *C. abortus* inclusions in both LE and AH-1 cell cultures un-exposed or exposed to E2, P4 or penicillin using transmission electron microscopy (TEM). Chlamydial inclusions that developed under regular culture conditions (control cultures) contained morphologically normal RB, in both LE and AH-1 cell lines (figure 20A and 20B). In contrast, images of penicillin treated cultures exhibited small inclusions containing 1-4 amorphous particles of up to 3 μm in length, similar to the enlarged aberrant forms described in several models of *in vitro* persistence (Hogan *et al.*, 2004). Multifocal deposition of electron-dense material was observed on the outer membrane of these aberrant bodies, which sometimes shared the inclusion space with empty vesicle

membranes from smaller RB. These findings were essentially identical in AH-1 and LE cells (figure 20G and 20H)

Morphological findings described in this work for the first time in *C. abortus* are in agreement with those obtained by other authors who used penicillin to induce persistence in other chlamydia species such as *C. trachomatis* (Kintner *et al.*, 2014), *C. psittaci* (Goellner *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2015), *C. muridarum* (Campbell *et al.*, 2012), *C. pneumoniae* (Di Pietro *et al.*, 2012) and more recently, *C. pecorum* (Leonard *et al.*, 2016). In all cases aberrant forms with common ultrastructure features were described.

Despite the fact that antibiotics had been used as stressor agents to induce persistence in other species of chlamydia of medical or veterinary interest, to our knowledge, no one has assessed the effect of penicillin on the *C. abortus* developmental cycle. Even though penicillin is not the antimicrobial of choice against an outbreak of OEA, beta-lactams are the most frequently prescribed antibiotics to treat the main food producing species of animals in Europe (De Briyne *et al.*, 2014). It is therefore likely that during the treatment of concurrent bacterial infections, developing chlamydiae in asymptomatic animals are exposed to beta-lactams, which, according to our results, would favour the survival of *C. abortus* by inducing or maintaining the persistent state.

On the other hand, surprisingly, the supplementation of culture media with hormones led to differences in chlamydial morphology dependent upon the host cell line used. Exposure of LE cells to E2 induced the presence of sparsely populated inclusions containing aberrant forms, though to a lesser extent than in the case of the treatment with penicillin. These abnormal RBs were very variable in number, size and shape, so that, within the same sample, we could find different inclusion types, ranging from normal (43% of all inclusions observed) to persistence appearance (32%), with intermediate morphologies also present (25%) (figure 20C). By contrast, morphological examination of E2 exposed AH-1 cells did not show any evidence of aberrant, persistent forms, but it revealed typical chlamydial inclusion development as depicted by a mixture of characteristic EBs and RBs of normal size and shape (figure 20D). Likewise, when *C. abortus* was grown in P4-treated LE cells, TEM observation revealed enlarged pleomorphic RBs (figure 20E), rather similar to the aberrant forms described in penicillin treated samples. On the other hand, when we applied the P4 treatment to

infected AH-1 cells, we observed large normal inclusions containing many RBs, IBs and EBs of normal morphology (figure 20F).

It is noteworthy the different response to the same hormone treatment depending on the host cell line used for the culture of *C. abortus*. This suggests that changes observed in chlamydial morphology after hormone treatments are not due to direct action of hormones on the microorganism, but rather occur indirectly, via host cell.

Several studies have demonstrated that E2 and P4 modulate the innate immune responses of epithelial cells from the female reproductive tract (Walmer *et al.*, 1992; Quayle *et al.*, 1998; Fahey and Wira, 2002). More recently, Wan *et al.* (2014) analysed the transcriptome of human endometrial cells treated with E2 or P4 and infected with *C. trachomatis* and compared the quantity of chlamydial DNA between treated and untreated cultures by qPCR. The authors associated the lesser infectivity of P4-treated cultures with a significant up-regulation of genes related to multiples ways of the innate immunity in these cultures. In our study, a hypothesis like this could explain the presence of aberrant forms in LE cells. However, further studies are required to investigate the response of this cell line to hormones or chlamydial infections regarding the expression of mediators of the immune response.

In the case of the AH-1 cell line, there are no studies about the effect of E2 and P4 on the chlamydial growth in cells of trophoblastic origin. However, some responses of the cell line to the infection itself have been reported. Thus, Wheelhouse *et al.*, (2009) determined that AH-1 cells produce TNF- and CXCL8 in a dose and time dependent manner upon infection with *C. abortus*. In addition, it has been demonstrated that these cells also produce antimicrobial peptides (sBD-1 and sBD-2) as response to *Waddlia chondrophila* infection (Coyle *et al.*, 2016).

b. Transcriptional changes induced by hormones and penicillin

Relative expression fold changes are summarized in table 6. Treatment with penicillin caused, in general, a consistent up-regulation of genes related to stress response and a down-regulation of genes related to membrane protein synthesis and cell division. In particular, *C. abortus* cultured in penicillin treated LE cells showed at 48 hpi differential regulation for 11 genes, of which 4 were up-regulated (*GroEL*, *dnaK*,

htrA and *Cpaf*) and 7 down-regulated (*omcB*, *hctA*, *sctN*, *cydA*, *cydB* and *miaA*), while the same conditions in AH-1 cells led to differential expression of 5 genes, including 2 up-regulated (*dnaK* and *grpE*) and 3 down-regulated (*omcA*, *omcB* and *hctA*). At 72 hpi, the number of genes that were differentially expressed dropped to 8 in LE cells. In contrast, in AH-1 cells, at 72 hpi, the number of differentially regulated genes increased from 5 to 10 (*htrA*, *ompA*, *omcA*, *omcB*, *pmp17G*, *hctA*, *sctN*, *cydA*, *cydB*, *miaA*), being all of them down-regulated or shut down.

Altogether these results in *C. abortus* suggest that penicillin has blocked binary fission and RB to EB conversion and agree in part with observations from studies with penicillin-stressed *C. trachomatis* (Kintner *et al.*, 2014), *C. pneumoniae* (Di Pietro *et al.*, 2012) and *C. psittaci* (Goellner *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2015).

Many researchers have tried to find a common pattern of alterations in gene expression that correlates to the aberrant form phenotype in *in vitro* chlamydial infection with the aim of transferring this knowledge to the detection and characterization of the persistent forms *in vivo*. In the light of results obtained from penicillin treated cultures, we suggest the following set of genes as markers to characterize the model of penicillin-induced persistence in *C. abortus*: *omcA*, *omcB*, *dnaK* and *hctA*. The expression of these 4 genes was consistently altered in both cell lines and moments post-infection studied.

On the other hand, female sex hormones had little effect on the expression of the studied genes under our experimental conditions. Our data show that only the expression of 4 genes in LE cells at 48 hpi was significantly altered due to addition of female sex hormones to the culture compared to infection in the absence of hormones. Out of these 4 genes, 3 were down-regulated: *htrA*, *grpE* and *cydB*, while only 1 was up-regulated: *pmp17G*. This differential expression was similar for both E2 and P4 treated cultures. At 72 hpi changes in gene expression was not observed in hormone treated cultures.

In our study it is interesting to note the lack of connection between TEM micrographs of P4 treated LE cultures at 72 hpi (figure 20C and 20E), in which we saw aberrant forms, and the transcriptional gene profile obtained in the same conditions, in which no alterations in any of the genes studied was observed. Thus, the altered morphology in hormone-treated cultures does not seem to be linked to a specific gene

expression pattern. This makes our proposed set of marker genes unsuitable for every system of persistence induction.

Recently, it was demonstrated that *Chlamydia trachomatis* persistence phenotype can be induced by sex hormones *in vitro* (Amirshahi *et al.*, 2011). In particular, estradiol supplementation of infected cells was shown to produce significant changes in the gene expression profile and it also induced the development of atypical inclusions containing AB. P4 exposure resulted in a general up-regulation of genes that encode elements of carbohydrate and amino acid metabolism pathways. Differences between this study and ours suggest that changes in expression of genes are different not only among different system of persistence induction, but also among different species of *Chlamydia*.

The idea that transcriptional changes are different depending on the system of persistence induction and among chlamydial species has been previously pointed out by other authors (Hogan *et al.*, 2004; Goellner *et al.*, 2006; Klos *et al.*, 2009; Wyrick, 2010). Although morphological features are constant, consisting of the appearance of abnormally enlarged, non-dividing RB, transcriptional profiles described in different studies show significant differences regarding the regulation of common genes among different system of persistence induction, different species of chlamydiae and probably depends also on the type of host cells. Therefore, it seems that there is no single model of persistence *in vitro*, but members of the *Chlamydiaceae* family have developed more than one mechanism to reach this state and ensure their survival under adverse conditions.

Conclusions

- I. AH-1 and LE cell lines, originated from ovine trophoblast and endometrium respectively, are susceptible to infection by *Chlamydia abortus* strain AB7. Chlamydial inclusions developed within them are larger than those observed in other traditionally used cell lines for the culture of this bacterium.
- II. Sex hormones 17 β -estradiol and progesterone enhance the infectivity of AH-1 and LE cells, while penicillin has the opposite effect.
- III. Morphological changes observed in hormone-treated *Chlamydia abortus* cultures do not result from a direct effect of the hormones on the microorganism, but they occur indirectly via host cell.
- IV. *Chlamydia abortus* infection decreases the production of progesterone and 17 β -estradiol by trophoblast cells. This could be a mechanism implicated in the pathogenesis of ovine enzootic abortion.
- V. Penicillin induces a persistent state in *in vitro* cultured *Chlamydia abortus*, with characteristic morphological features and gene transcriptional patterns.
- VI. Progesterone and, to a lesser degree, 17 β -estradiol induce the morphology of aberrant bodies in *Chlamydia abortus*-infected LE cultures, although it does not associate with alterations in the transcriptional response of studied genes.
- VII. The genes *omcA* and *omcB* (membrane proteins), *dnaK* (stress response) and *hctA* (conversion of reticular bodies to elementary bodies) are proposed as markers of the penicillin-induced persistent state in *in vitro* cultured *Chlamydia abortus*.
- VIII. A common pattern of gene expression that is valid for any system of chlamydial persistence induction cannot be established.

BIBLIOGRAFÍA

- A**bdelrahman, Y.M., Belland, R.J., 2005. The chlamydial developmental cycle. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 949-959.
- Ahmed, S.A., Penhale, W.J., Talal, N., 1985. Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases mechanisms of sex hormone action. *American Journal of Pathology* 121, 531-551.
- Aitken, I.D. 2000. Chlamydial abortion, En: *Diseases of Sheep*. Martin, W.D., Aitken, I.D. (Eds.). Blackwell Science, Oxford, 81-86.
- 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. *Reproduction Fertility and Development* 11, 317-322.
- Albrecht, M., Sharma, C.M., Dittrich, M.T., Mueller, T., Reinhardt, R., Vogel, J., Rudel, T., 2011. The transcriptional landscape of *Chlamydia pneumoniae*. *Genome Biology* 12, 98.
- Amadori, A., Zamarchi, R., Desilvestro, G., Forza, G., Cavatton, G., Danieli, G.A., Clementi, M., Chiecobianchi, L., 1995. Genetic control of the CD4/CD8 T-cell ratio in humans. *Nature Medicine* 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 Microbiology* 11, 150.
- Arranz-Solís, D., Benavides, J., Regidor-Cerrillo, J., Horcajo, P., Castano, P., Ferreras, M.D., Jiménez-Pelayo, L., Collantes-Fernández, E., Ferre, I., Hemphill, A., Pérez, V., Ortega-Mora, L.M., 2016. Systemic and local immune responses in sheep after *Neospora caninum* experimental infection at early, mid and late gestation. *Veterinary Research* 47, 2.
- Asselin, E., Johnson, G.A., Spencer, T.E., Bazer, F.W., 2001. Monocyte chemotactic protein-1 and-2 messenger ribonucleic acids in the ovine uterus: regulation by pregnancy, progesterone, and interferon-tau. *Biology of Reproduction* 64, 992-1000.
- Azenabor, A.A., Kennedy, P., Balistreri, S., 2007. *Chlamydia trachomatis* infection of human trophoblast alters estrogen and progesterone biosynthesis: an insight into role of infection in pregnancy sequelae. *International Journal of Medicine Science* 4, 223-231.
- B**abiuk, L.A., Pontarollo, R., Babiuk, S., Loehr, B., Little-van den Hurk, S.V., 2003. Induction of immune responses by DNA vaccines in large animals. *Vaccine* 21, 649-658.
- Bartlewski, P.M., Baby, T.E., Giffin, J.L., 2011. Reproductive cycles in sheep. *Animal Reproduction Science* 124, 259-268.
- 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. *Journal of Reproduction and Fertility* 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.
- Bassett, J.M., Oxborrow, T.J., Smith, I.D., Thorburn, G.D., 1969. Concentration of progesterone in peripheral plasma of pregnant ewe. *Journal of Endocrinology* 45, 449-457.
- Bavoil, P., Ohlin, A., Schachter, J., 1984. Role of disulfide bonding in outer membrane structure and permeability in *Chlamydia trachomatis*. *Infection and Immunity* 44, 479-485.

Bibliografia

- Bavoil, P., Kaltenboeck, B., Greub, G., 2013. In *Chlamydia* veritas. Pathogens and Disease 67, 89-90.
- Bavoil, P.M., 2014. What's in a word: the use, misuse, and abuse of the word "persistence" in *Chlamydia* biology. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 4, 27.
- Bazer, F.W., Spencer, T.E., Ott, T.L., 1997. Interferon Tau: a novel pregnancy recognition signal. *American Journal of Reproductive Immunology* 37, 412-420.
- Bazer, F.W., 2013. Pregnancy recognition signaling mechanisms in ruminants and pigs. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 4, 23.
- Beagley, K.W., Gockel, C.M., 2003. Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 38, 13-22.
- Beatty, W.L., Byrne, G.I., Morrison, R.P., 1993. Morphologic and antigenic characterization of interferon gamma-mediated persistent *Chlamydia trachomatis* infection *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 3998-4002.
- 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.
- Bedson, S.P., Western, G.T., Simpson, S.L., 1930. Observations on the aetiology of psittacosis. *Lancet* 1, 235-236.
- Belland, R.J., Zhong, G.M., Crane, D.D., Hogan, D., Sturdevant, D., Sharma, J., Beatty, W.L., Caldwell, H.D., 2003a. Genomic transcriptional profiling of the developmental cycle of *Chlamydia trachomatis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 8478-8483.
- Belland, R.J., Nelson, D.E., Virok, D., Crane, D.D., Hogan, D., Sturdevant, D., Beatty, W.L., Caldwell, H.D., 2003b. Transcriptome analysis of chlamydial growth during IFN-gamma-mediated persistence and reactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 15971-15976.
- Bentley, P.J. 2001. Sex Hormones in Vertebrates. En: *Encyclopedia of Life Sciences.*, John Wiley and Sons (Eds.). Londres.
- Berthois, Y., Katzenellenbogen, J.A., Katzenellenbogen, B.S., 1986. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 2496-2500.
- Bhavanam, S., Snider, D.R., 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.
- Blumer, S., Greub, G., Waldvogel, A., Haessig, M., Thoma, R., Tschuor, A., Pospischil, A., Borel, N., 2011. *Waddlia*, *Parachlamydia* and Chlamydiaceae in bovine abortion. *Veterinary Microbiology* 152, 385-393.
- 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. *Veterinary Research Communications* 29, 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. *Molecular and Cellular Probes* 22, 55-64.
- 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.
- Borel, N., Dumrese, C., Ziegler, U., Schifferli, A., Kaiser, C., Pospischil, A., 2010. Mixed infections with *Chlamydia* and porcine epidemic diarrhea virus - a new *in vitro* model of chlamydial persistence. *BMC Microbiology* 10, 201.
- Borel, N., Frey, C.F., Gottstein, B., Hilbe, M., Pospischil, A., Franzoso, F.D., Waldvogel, A., 2014. Laboratory diagnosis of ruminant abortion in Europe. *Veterinary Journal* 200, 218-229.
- Bouakane, A., Benchaïeb, I., Rodolakis, A., 2003. Abortive potency of *Chlamydophila abortus* in pregnant mice is not directly correlated with placental and fetal colonization levels. *Infection and Immunity* 71, 7219-7222.
- Brickman, T.J., Barry, C.E., Hackstadt, T., 1993. Molecular cloning and expression of hctB encoding a strain-variant chlamydial histone-like protein with DNA-binding activity. *Journal of Bacteriology* 175, 4274-4281.
- Brown, J., Entrican, G., 1996. Interferon-gamma mediates long-term persistent *Chlamydia psittaci* infection in vitro. *Journal of Comparative Pathology* 115, 373-383.
- Brown, J., Howie, S.E.M., Entrican, G., 2001. A role for tryptophan in immune control of chlamydial abortion in sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 82, 107-119.
- Budai, I., 2007. *Chlamydia trachomatis*: milestones in clinical and microbiological diagnostics in the last hundred years: a review. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica* 54, 5-22.
- Buendia, A.J., de Oca, R.M., Navarro, J.A., Sanchez, J., Cuello, F., Salinas, J., 1999. Role of polymorphonuclear neutrophils in a murine model of *Chlamydia psittaci*-induced abortion. *Infection and Immunity* 67, 2110-2116.
- Bush, R.M., Everett, K.D.E., 2001. Molecular evolution of the *Chlamydiaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 203-220.
- Buxton, D., Barlow, R.M., Finlayson, J., Anderson, I.E., Mackellar, A., 1990. Observations on the pathogenesis of *Chlamydia psittaci* infection of pregnant sheep. *Journal of Comparative Pathology* 102, 221-237.
- Buxton, D., Anderson, I.E., Longbottom, D., Livingstone, M., Wattedgedera, S., Entrican, G., 2002. Ovine chlamydial abortion: Characterization of the inflammatory immune response in placental tissues. *Journal of Comparative Pathology* 127, 133-141.
- Byrne, G.I., Lehmann, L.K., Landry, G.J., 1986. Induction of tryptophan catabolism is the mechanism for gamma-interferon-mediated inhibition of intracellular *Chlamydia psittaci* replication in T24 cells. *Infection and Immunity* 53, 347-351.
- Byrne, G. I., Ouellette, S.P., Wang, Z., Rao, J.P., Lu, L., Beatty, W. L., Hudson, A.P., 2001. *Chlamydia pneumoniae* expresses genes required for DNA replication but not cytokinesis during persistent infection of HEp-2 cells. *Infection and Immunity* 69, 5423-5429.

- Caldwell, H.D., Kromhout, J., Schachter, J., 1981. Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Infection and Immunity* 31, 1161-1176.
- Campbell, R.P., Kintner, J., Whittimore, J., Schoborg, R.V., 2012. *Chlamydia muridarum* enters a viable but non-infectious state in amoxicillin-treated BALB/c mice. *Microbes and Infection* 14, 1177-1185.
- 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. *Infection and Immunity* 70, 3793-3803.
- Carabeo, R.A., Mead, D.J., Hackstadt, T., 2003. Golgi-dependent transport of cholesterol to the *Chlamydia trachomatis* inclusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 6771-6776.
- 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. *American Journal of Reproductive Immunology* 69, 475-485.
- Carlin, J.M., Weller, J.B., 1995. Potentiation of interferon-mediated inhibition of *chlamydia* infection by interleukin-1 in human macrophage cultures. *Infection and Immunity* 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 *Chlamydoiphila abortus* in a mouse model. *Veterinary Record* 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., Del Rio, L., Ortega, N., Gallego, M.C., Cuello, F., Navarro, J.A., Sanchez, J., Salinas, J., 2009. *Chlamydoiphila abortus* infection in the mouse: a useful model of the ovine disease. *Veterinary Microbiology* 135, 103-111.
- Chalmers, W.S.K., Simpson, J., Lee, S.J., Baxendale, W., 1997. Use of a live chlamydial vaccine to prevent ovine enzootic abortion. *Veterinary Record* 141, 63-67.
- Chen, Y.Z., Antoniou, E., Liu, Z.L., Hearne, L.B., Roberts, R.M., 2007. A microarray analysis for genes regulated by interferon-tau in ovine luminal epithelial cells. *Reproduction* 134, 123-135.
- Choi, Y., Johnson, G.A., Spencer, T.E., Bazer, F.W., 2003. Pregnancy and interferon tau regulate major histocompatibility complex class I and beta(2)-microglobulin expression in the ovine uterus. *Biology of Reproduction* 68, 1703-1710.
- Chon, T.W., Bixler, S., 2010. Interferon-tau: Current Applications and Potential in Antiviral Therapy. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 30, 477-485.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 10166-10171.

- Coles, A.M., Reynolds, D.J., Harper, A., Devitt, A., Pearce, J.H., 1993. Low-nutrient induction of abnormal chlamydial development: a novel component of chlamydial pathogenesis? *FEMS Microbiology Letters* 106, 193-200.
- Coyle, C., Wheelhouse, N., Jacques, M., Longbottom, D., Svoboda, P., Pohl, J., Duncan, W.C., Rae, M.T., Barlow, P.G., 2016. Ovine trophoblasts express cathelicidin host defence peptide in response to infection. *Journal of Reproductive Immunology* 117, 10-16.
- 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. *Infection and Immunity* 70, 3413-3418.
- Dawson, C.R., 2009. Trachoma: a blinding scourge from the bronze age to the twenty-first century. *Clinical Infectious Diseases* 48, 845-846.
- De Briyne, N., Atkinson, J., Pokludova, L., Borriello, S.P., 2014. Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe. *Veterinary Record* 175, 325.
- Dehoux, P., Flores, R., Dauga, C., Zhong, G.M., Subtil, A., 2011. Multi-genome identification and characterization of chlamydiae-specific type III secretion substrates: the Inc proteins. *BMC Genomics* 12, 109.
- Delevoye, C., Nilges, M., Dehoux, P., Paumet, F., Perrinet, S., Dautry-Varsat, A., Subtil, A., 2008. SNARE protein mimicry by an intracellular bacterium. *PLoS Pathogens* 4, e1000022.
- Di Pietro, M., Tramonti, A., De Santis, F., De Biase, D., Schiavoni, G., Filardo, S., Zagaglia, C., Sessa, R., 2012. Analysis of gene expression in penicillin G induced persistence of *Chlamydia pneumoniae*. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* 26, 277-284.
- Dille, S., Herbst, K., Volceanov, L., Nolke, T., Kretz, O., Hacker, G., 2014. Golgi fragmentation and sphingomyelin transport to *Chlamydia trachomatis* during penicillin-induced persistence do not depend on the cytosolic presence of the chlamydial protease CPAF. *Plos One* 9, e103220.
- Eb, F., Orfila, J., Lefebvre, J.F., 1976. Ultrastructural study of development of agent of ewes abortion. *Journal of Ultrastructure Research* 56, 177-185.
- 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 Pathogens* 4, e1000021.
- Elwell, C.A., Engel, J.N., 2012. Lipid acquisition by intracellular *Chlamydiae*. *Cellular Microbiology* 14, 1010-1018.
- Entrican, G., Wheelhouse, N., Wattedgedera, S.R., Longbottom, D., 2012. New challenges for vaccination to prevent chlamydial abortion in sheep. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases* 35, 271-276.
- Everett, K.D.E., 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 for the identification of organisms. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 415-440.

- Fahey, J.V., Wira, C.R., 2002. Effect of menstrual status on antibacterial activity and secretory leukocyte protease inhibitor production by human uterine epithelial cells in culture. *Journal of Infectious Diseases* 185, 1606-1613.
- Feinshtein, V., Ben-Zvi, Z., Sheiner, E., Amash, A., Sheizaf, B., Holcberg, G., 2010. Progesterone levels in cesarean and normal delivered term placentas. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 281, 387-392.
- Foo, Y.Z., Nakagawa, S., Rhodes, G., Simmons, L.W., 2017. The effects of sex hormones on immune function: a meta-analysis. *Biological Reviews* 92, 551-571.
- Freestone, P.P.E., Sandrini, S.M., Haigh, R.D., Lyte, M., 2008. Microbial endocrinology: how stress influences susceptibility to infection. *Trends in Microbiology* 16, 55-64.
- 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.
- Gallichan, W.S., Rosenthal, K.L., 1996. Effects of the estrous cycle on local humoral immune responses and protection of intranasally immunized female mice against herpes simplex virus type 2 infection in the genital tract. *Virology* 224, 487-497.
- García de la Fuente, J.N., Gutiérrez-Martín, C.B., Ortega, N., Rodríguez-Ferri, E.F., del Río, M.L., González, O.R., Salinas, J., 2004. Efficacy of different commercial and new inactivated vaccines against ovine enzootic abortion. *Veterinary Microbiology* 100, 65-76.
- García-Gómez, E., González-Pedrajo, B., Camacho-Arroyo, I., 2013. Role of sex steroid hormones in bacterial-host interactions. *Biomed Research International* 2013, 928290.
- García-Seco, T., Pérez-Sancho, M., Salinas, J., Navarro, A., Díez-Guerrier, A., García, N., Pozo, P., Goyache, J., Domínguez, L., Álvarez, J., 2016. Effect of preventive *Chlamydia abortus* vaccination in offspring development in sheep challenged experimentally. *Frontiers in Veterinary Science* 3, 67.
- Ghosh, S., Klein, R.S., 2017. Sex drives dimorphic immune responses to viral infections. *Journal of Immunology* 198, 1782-1790.
- Gifford, C.A., Racicot, K., Clark, D.S., Austin, K.J., Hansen, T.R., Lucy, M.C., Davies, C.J., Ott, T.L., 2007. Regulation of interferon-stimulated genes in peripheral blood leukocytes in pregnant and bred, nonpregnant dairy cows. *Journal of Dairy Science* 90, 274-280.
- Gillgrass, A.E., Fernandez, S.A., Rosenthal, K.L., Kaushic, C., 2005. Estradiol regulates susceptibility following primary exposure to genital herpes simplex virus type 2, while progesterone induces inflammation. *Journal of Virology* 79, 3107-3116.
- Girón-González, J.A., Moral, F.J., Elvira, J., García-Gil, D., Guerrero, F., Gavilán, I., Escobar, L., 2000. Consistent production of a higher T(H)1 : T(H)2 cytokine ratio by stimulated T cells in men compared with women. *European Journal of Endocrinology* 143, 31-36.
- Gockel, C.M., Bao, S.S., Holland, M.K., Beagley, K.W., 2003. Influence of the murine oestrous cycle on the induction of mucosal immunity. *American Journal of Reproductive Immunology* 50, 369-379.
- Goellner, S., Schubert, E., Liebler-Tenorio, E., Hotzel, H., Saluz, H.P., Sachse, K., 2006. Transcriptional response patterns of *Chlamydophila psittaci* in different *in vitro* models of persistent infection. *Infection and Immunity* 74, 4801-4808.

- Graham, J.D., Clarke, C.L., 1997. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocrine Reviews* 18, 502-519.
- Greig, J.R., 1936. Enzootic abortion in ewes; a preliminary note. *Veterinary Record* 42, 1225-1227.
- Grieshaber, N.A., Fischer, E.R., Mead, D.J., Dooley, C.A., Hackstadt, T., 2004. Chlamydial histone-DNA interactions are disrupted by a metabolite in the methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 7451-7456.
- Guerriero, G., 2009. Vertebrate sex steroid receptors: evolution, ligands, and neurodistribution. *Trends in Comparative Endocrinology and Neurobiology* 1163, 154-168.
- 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. *Infection and Immunity* 71, 4700-4710.
- Hackstadt, T., Baehr, W., Ying, Y., 1991. *Chlamydia trachomatis* developmentally regulated protein is homologous to eukaryotic histone H1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 3937-3941.
- Hackstadt, T., Rockey, D.D., Heinzen, R.A., Scidmore, M.A., 1996. *Chlamydia trachomatis* interrupts an exocytic pathway to acquire endogenously synthesized sphingomyelin in transit from the Golgi apparatus to the plasma membrane. *The EMBO Journal* 15, 964-977.
- Hackstadt, T. 1999. Cell biology, En: *Chlamydia: intracellular biology, pathogenesis and immunity*. Stephens, R.S. (Ed.). ASM Press, Washington DC. 101-138.
- Hackstadt, T., Scidmore-Carlson, M.A., Shaw, E.I., Fischer, E.R., 1999. The *Chlamydia trachomatis* IncA protein is required for homotypic vesicle fusion. *Cellular Microbiology* 1, 119-130.
- Hafner, L.M., Cunningham, K., Beagley, K.W., 2013. Ovarian steroid hormones: effects on immune responses and *Chlamydia trachomatis* infections of the female genital tract. *Mucosal Immunology* 6, 859-875.
- Haldorson, G.J., Stanton, J.B., Mathison, B.A., Suarez, C.E., Baszler, T.V., 2006. *Neospora caninum*: antibodies directed against tachyzoite surface protein NcSRS2 inhibit parasite attachment and invasion of placental trophoblasts *in vitro*. *Experimental Parasitology* 112, 172-178.
- 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. *Cellular Microbiology* 13, 1183-1199.
- Hammond, G.L., 2016. Plasma steroid-binding proteins: primary gatekeepers of steroid hormone action. *Journal of Endocrinology* 230, 13-25.
- 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. *Infection and Immunity* 68, 1457-1464.
- Hart, S.M., 2002. Modulation of nuclear receptor dependent transcription. *Biological Research* 35, 295-303.

Bibliografia

- Hatch, T.P., 1996. Disulfide cross-linked envelope proteins: The functional equivalent of peptidoglycan in chlamydiae? *Journal of Bacteriology* 178, 1-5.
- Hechard, C., Grepinet, O., Rodolakis, A., 2004. Molecular cloning of the *Chlamydomophila abortus groEL* gene and evaluation of its protective efficacy in a murine model by genetic vaccination. *Journal of Medical Microbiology* 53, 861-868.
- Hegemann, J.H., Moelleken, K. 2012. Chlamydial adhesion and adhesins, En: Intracellular pathogens I: Chlamydiales. Tan, M., Bavoil, P.M. (Eds.). American Society for Microbiology, Washington DC, 97-125.
- Heuer, D., Brinkmann, V., Meyer, T.F., Szczepek, A.J., 2003. Expression and translocation of chlamydial protease during acute and persistent infection of the epithelial HEp-2 cells with *Chlamydomophila (Chlamydia) pneumoniae*. *Cellular Microbiology* 5, 315-322.
- Hillier, S.G., Whitelaw, P.F., Smyth, C.D., 1994. Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited. *Molecular and cellular endocrinology* 100, 51-54.
- Hogan, R.J., Mathews, S.A., Kutlin, A., Hammerschlag, M.R., Timms, P., 2003. Differential expression of genes encoding membrane proteins between acute and continuous *Chlamydia pneumoniae* infections. *Microbial Pathogenesis* 34, 11-16.
- Hogan, R.J., Mathews, S.A., Mukhopadhyay, S., Summersgill, J.T., Timms, P., 2004. Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm. *Infection and Immunity* 72, 1843-1855.
- Hsia, R.C., 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 and Infection* 2, 761-772.
- Hu, Y.Q., Chen, L.L., Wang, C., Xie, Y.F., Chen, Z.X., Liu, L.Z., Su, Z.H., Wu, Y.M., 2015. Transcriptional analysis of 10 selected genes in a model of penicillin G induced persistence of *Chlamydomophila psittaci* in HeLa cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 25, 1246-1256.
- Huston, W.M., Theodoropoulos, C., Mathews, S.A., Timms, P., 2008. *Chlamydia trachomatis* responds to heat shock, penicillin induced persistence, and IFN-gamma persistence by altering levels of the extracytoplasmic stress response protease HtrA. *BMC Microbiology* 8, 190.
- Hybiske, K., Stephens, R.S., 2007. Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium *Chlamydia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 11430-11435.
- Jacquier, N., Viollier, P.H., Greub, G., 2015. The role of peptidoglycan in chlamydial cell division: towards resolving the chlamydial anomaly. *FEMS Microbiology Reviews* 39, 262-275.
- Jansson, L., Holmdahl, R., 1998. Estrogen-mediated immunosuppression in autoimmune diseases. *Inflammation Research* 47, 290-301.
- Johnson, G.A., Burghardt, R.C., Newton, G.R., Bazer, F.W., Spencer, T.E., 1999. Development and characterization of immortalized ovine endometrial cell lines. *Biology of Reproduction* 61, 1324-1330.
- Johnson, R.M., 2004. Murine oviduct epithelial cell cytokine responses to *Chlamydia muridarum* infection include interleukin-12-p70 secretion. *Infection and Immunity* 72, 3951-3960.

- Johnson, R.M., Kerr, M.S., 2015. Modeling the transcriptome of genital tract epithelial cells and macrophages in healthy mucosa versus mucosa inflamed by *Chlamydia muridarum* infection. *Pathogens and Disease* 73, 100.
- Jones, G.E., Anderson, I.E., 1988. *Chlamydia psittaci*: is tonsillar tissue the portal of entry in ovine enzootic abortion? *Research in Veterinary Science* 44, 260-261.
- Katzenellenbogen, B.S., 2000. Mechanisms of action and cross-talk between estrogen receptor and progesterone receptor pathways. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 7, 33-37.
- 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. *Infection and Immunity* 68, 4207-4216.
- Kawana, K., Quayle, A.J., Ficarra, M., Ibane, J.A., Shen, L., Kawana, Y., Yang, H.X., Marrero, L., Yavagal, S., Greene, S.J., Zhang, Y.X., Pyles, R.B., Blumberg, R.S., Schust, D.J., 2007. CD1d degradation in *Chlamydia trachomatis*-infected epithelial cells is the result of both cellular and chlamydial proteasomal activity. *Journal of Biological Chemistry* 282, 7368-7375.
- Kelver, M.E., Kaul, A., Nowicki, B., Findley, W.E., Hutchens, T.W., Nagamani, M., 1996. Estrogen regulation of lactoferrin expression in human endometrium. *American Journal of Reproductive Immunology* 36, 243-247.
- Kemege, K.E., Hickey, J.M., Barta, M.L., Wickstrum, J., Balwalli, N., Lovell, S., Battaile, K.P., Hefty, P.S., 2015. *Chlamydia trachomatis* protein CT009 is a structural and functional homolog to the key morphogenesis component RodZ and interacts with division septal plane localized MreB. *Molecular Microbiology* 95, 365-382.
- Kerr, K., Entrican, G., McKeever, D., Longbottom, D., 2005. Immunopathology of *Chlamydia abortus* infection in sheep and mice. *Research in Veterinary Science* 78, 1-7.
- Kintner, J., Lajoie, D., Hall, J., Whittimore, J., Schoborg, R.V., 2014. Commonly prescribed beta lactam antibiotics induce *C. trachomatis* persistence/stress in culture at physiologically relevant concentrations. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 4, 44.
- Kintner, J., Schoborg, R.V., Wyrick, P.B., Hall, J.V., 2015. Progesterone antagonizes the positive influence of estrogen on *Chlamydia trachomatis* serovar E in an Ishikawa/SHT-290 co-culture model. *Pathogens and Disease* 73, pii: ftv015.
- Klos, A., Thalmann, J., Peters, J., Gerard, H.C., Hudson, A.P., 2009. The transcript profile of persistent *Chlamydia (Chlamydia) pneumoniae in vitro* depends on the means by which persistence is induced. *FEMS Microbiology Letters* 291, 120-126.
- 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. *Microbial Pathogenesis* 22, 133-142.
- Korch, C., Spillman, M.A., Jackson, T.A., Jacobsen, B.M., Murphy, S.K., Lessey, B.A., Jordan, V.C., Bradford, A.P., 2012. DNA profiling analysis of endometrial and ovarian cell lines reveals misidentification, redundancy and contamination. *Gynecologic Oncology* 127, 241-248.
- Kornman, K.S., Loesche, W.J., 1982. Effects of estradiol and progesterone on *Bacteroides melaninogenicus* and *Bacteroides gingivalis*. *Infection and Immunity* 35, 256-263.

Bibliografia

- Kuo, C.C., Wang, S.P., Grayston, J., 1972. Differentiation of TRIC and LGV organisms based on enhancement of infectivity by DEAE-dextran in cell culture. *Journal of Infectious Diseases* 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. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 3721-3723.
- Lambden, P.R., Pickett, M.A., Clarke, I.N., 2006. The effect of penicillin on *Chlamydia trachomatis* DNA replication. *Microbiology* 152, 2573-2578.
- 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 *Chlamydophila abortus* strains by multilocus VNTR analysis. *Veterinary Microbiology* 137, 335-344.
- Laroucau, K., Vorimore, F., Sachse, K., Vretou, E., Siarkou, V.I., Willems, H., Magnino, S., Rodolakis, A., Bavoil, P.M., 2010. Differential identification of *Chlamydophila abortus* live vaccine strain 1B and *C. abortus* field isolates by PCR-RFLP. *Vaccine* 28, 5653-5656.
- Leaver, H.A., Howie, A., Aitken, I.D., Appleyard, B.W., Anderson, I.E., Jones, G., Hay, L.A., Williams, G.E., Buxton, D., 1989. Changes in progesterone, oestradiol 17-beta and intrauterine prostaglandin E2 during late gestation in sheep experimentally infected with an ovine abortion strain of *Chlamydia psittaci*. *Journal of General Microbiology* 135, 565-573.
- Leaver, H.A., Howie, A., Appleyard, W., Aitken, I.D., Hay, L.A., 1987. Altered steroid hormone and prostaglandin metabolism during chlamydial infection in sheep. *Biochemical Society Transactions* 15, 479-479.
- Leonard, C.A., Dewez, F., Borel, N., 2016. Penicillin G-induced chlamydial stress response in a porcine strain of *Chlamydia pecorum*. *International Journal of Microbiology* 2016: 3832917.
- 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 17 beta-estradiol. *Journal of Infectious Diseases* 189, 339-345.
- Liechti, G.W., Kuru, E., Hall, E., Kalinda, A., Brun, Y.V., VanNieuwenhze, M., Maurelli, A.T., 2014. A new metabolic cell-wall labelling method reveals peptidoglycan in *Chlamydia trachomatis*. *Nature* 506, 507-510.
- Livingstone, M., Wheelhouse, N., Maley, S.W., Longbottom, D., 2009. Molecular detection of *Chlamydophila abortus* in post-abortion sheep at oestrus and subsequent lambing. *Veterinary Microbiology* 135, 134-141.
- Longbottom, D., Coulter, L.J., 2003. Animal chlamydioses and zoonotic implications. *Journal of Comparative Pathology* 128, 217-244.

- Longbottom, D., Livingstone, M., 2006. Vaccination against chlamydial infections of man and animals. *Veterinary Journal* 171, 263-275.
- Longbottom, D., Livingstone, M., Maley, S., van der Zon, A., Rocchi, M., Wilson, K., Wheelhouse, N., Dagleish, M., Aitchison, K., Wattegedera, 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.
- Losel, R., Wehling, M., 2003. Nongenomic actions of steroid hormones. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4, 46-56.
- Lu, 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. *Clinical and Experimental Immunology* 128, 10-20.
- 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. *Infection and Immunity* 78, 3678-3688.
- Lyte, M., 2004. Microbial endocrinology and infectious disease in the 21st century. *Trends in Microbiology* 12, 14-20.
- M**ainar-Jaime, R.C., de la Cruz, C., Vázquez-Boland, J.A., 1998. Epidemiologic study of chlamydial infection in sheep farms in Madrid, Spain. *Small Ruminant Research* 28, 131-138.
- Margolin, W., 2005. FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 862-871.
- 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*. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 159, 1006-1014.
- Matsumoto, A., 1982. Electron microscopic observations of surface projections on *Chlamydia psittaci* reticulate bodies. *Journal of Bacteriology* 150, 358-364.
- 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 of ewes II. Immunisation and infection experiments. *The Veterinary Record* 63, 197-201.
- Miller, L., Hunt, J.S., 1996. Sex steroid hormones and macrophage function. *Life Sciences* 59, 1-14.
- Moelleken, K., Hegemann, J.H., 2008. The *Chlamydia* outer membrane protein OmcB is required for adhesion and exhibits biovar-specific differences in glycosaminoglycan binding. *Molecular Microbiology* 67, 403-419.
- Moulder, J.W., 1966. Relation of psittacosis group (*Chlamydiae*) to bacteria and viruses. *Annual Review of Microbiology* 20, 107-130.
- Moulder, J.W., 1993. Why is *Chlamydia* sensitive to penicillin in the absence of peptidoglycan? *Infectious Agents and Disease* 2, 87-99.
- N**asar, A., 2006. Hormonal changes in the uterus during pregnancy - lessons from the ewe: a review. *Journal of Agriculture and Rural Development* 4, 1-7.

Bibliografía

- Navarro, J.A., de la Fuente, J.N.G., Sánchez, J., Martínez, C.M., Buendía, A.J., Gutiérrez-Martín, C.B., Rodríguez-Ferri, E.F., Ortega, N., Salinas, J., 2004. Kinetics of infection and effects on the placenta of *Chlamydophila abortus* in experimentally infected pregnant ewes. *Veterinary Pathology* 41, 498-505.
- Navarro, J.A., Ortega, N., Buendía, A.J., Gallego, M.C., Martínez, C.M., Caro, M.R., Sánchez, J., Salinas, J., 2009. Diagnosis of placental pathogens in small ruminants by immunohistochemistry and PCR on paraffin-embedded samples. *Veterinary Record* 165, 175-178.
- Nicholson, T. and Stephens, R. S., 2002. Chlamydial genomic transcriptional profile for penicillin-induced persistence. En: *Chlamydial infections. Proceedings of the Tenth International Symposium on Human Chlamydial Infections*. Schachter, J., Christiansen, G., Clarke, I. N., Hammerschlag, M. R., Kaltenboeck, B., Kuo, C.C., Rank, R. G., Ridgway, G. L., Saikku, P., Stamm, W. E., Stephens, R. S., Summersgill, J. T., Timms, P., Wyrick, P. B. (Eds.). International *Chlamydia* Symposium, San Francisco, California, 611-614
- Nicholson, T.L., Olinger, L., Chong, K., Schoolnik, G., Stephens, R.S., 2003. Global stage-specific gene regulation during the developmental cycle of *Chlamydia trachomatis*. *Journal of Bacteriology* 185, 3179-3189.
- Nietfeld, J.C., 2001. Chlamydial infections in small ruminants. *Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice* 17, 301-314.
- OIE, 2012. Enzootic abortion of ewes (ovine chlamydiosis). World Organisation for Animal Health: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Chapter 2.7.7.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 19781-19785.
- Ortiz, M.V., 1983. Frequent lambing of sheep flocks in Spain: productivity and management consequences. *Livestock Production Science* 10, 49-58.
- Osaka, I., Hefty, P.S., 2014. Lipopolysaccharide-binding alkylpolyamine DS-96 inhibits *Chlamydia trachomatis* infection by blocking attachment and entry. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58, 3245-3254.
- Osman, R.A., Andria, M.L., Jones, A.D., Meizel, S., 1989. Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 160, 828-833.
- Ou, C.B., Tian, D.Y., 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. *International Immunopharmacology* 16, 505-510.
- Pant, H.C., Hopkinson, C.R., Fitzpatrick, R.J., 1977. Concentration of oestradiol, progesterone, luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the jugular venous plasma of ewes during the oestrous cycle. *Journal of Endocrinology* 73, 247-255.
- Pantchev, A., Sting, R., Bauerfeind, R., Tyczka, J., Sachse, K., 2009. New real-time PCR tests for species-specific detection of *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila abortus* from tissue samples. *Veterinary Journal* 181, 145-150.

- Papp, J.R., Shewen, P.E., Gartley, C.J., 1994. Abortion and subsequent excretion of chlamydiae from the reproductive tract of sheep during estrus. *Infection and Immunity* 62, 3786-3792.
- Pasley, J.N., Rank, R.G., Hough, A.J., Cohen, C., Barron, A.L., 1985a. Effects of various doses of estradiol on chlamydial genital infection in ovariectomized guinea pigs. *Sexually Transmitted Diseases* 12, 8-13.
- Pasley, J.N., Rank, R.G., Hough, A.J., Cohen, C., Barron, A.L., 1985b. Absence of progesterone effects on chlamydial genital infection in female guinea pigs. *Sexually Transmitted Diseases* 12, 155-158.
- Pérez-Martínez, J.A., Storz, J., 1985. Persistent infection of L-cells with an ovine abortion strain of *Chlamydia psittaci*. *Infection and Immunity* 50, 453-458.
- Phillips, D.M., Burillo, C.A., 1998. Ultrastructure of the murine cervix following infection with *Chlamydia trachomatis*. *Tissue and Cell* 30, 446-452.
- Pospischil, A., Thoma, R., Hilbe, M., Gresi, P., Gebbers, J.O., 2002. Abortion in woman caused by caprine *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* serovar 1). *Swiss Medical Weekly* 132, 64-66.
- 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*. *Veterinary Microbiology* 135, 147-156.
- Quayle, A.J., Porter, E.M., Nussbaum, A.A., Wang, Y.M., Brabec, C., Yip, K.P., Mok, S.C., 1998. Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract. *American Journal of Pathology* 152, 1247-1258.
- Raulston, J.E., 1997. Response of *Chlamydia trachomatis* serovar E to iron restriction *in vitro* and evidence for iron-regulated chlamydial proteins. *Infection and Immunity* 65, 4539-4547.
- Rockey, D.D., Heinzen, R.A., Hackstadt, T., 1995. Cloning and characterization of a *Chlamydia psittaci* gene coding for a protein localized in the inclusion membrane of infected cells. *Molecular Microbiology* 15, 617-626.
- Rodel, J., Grosse, C., Yu, H.X., Wolf, K., Otto, G.P., Liebler-Tenorio, E., Forsbach-Birk, V., Straube, E., 2012. Persistent *Chlamydia trachomatis* infection of HeLa cells mediates apoptosis resistance through a *Chlamydia* protease-like activity factor-independent mechanism and induces high mobility group box 1 release. *Infection and Immunity* 80, 195-205.
- Rodolakis, A., Souriau, A., 1979. Clinical evaluation of a commercial vaccine against chlamydial abortion of ewes. *Annales De Recherches Veterinaires* 10, 41-48.
- Rodolakis, A., Souriau, A., 1983. Response of ewes to temperature-sensitive mutants of *Chlamydia psittaci* (var-ovis) obtained by NTG mutagenesis. *Annales De Recherches Veterinaires* 14, 155-161.
- Rodolakis, A., Salinas, J., Papp, J., 1998. Recent advances on ovine chlamydial abortion. *Veterinary Research* 29, 275-288.
- Rodolakis, A., Mohamad, K.Y., 2010. Zoonotic potential of *Chlamydophila*. *Veterinary Microbiology* 140, 382-391.

Bibliografía

- Rodolakis, A., Laroucau, K., 2015. *Chlamydiaceae* and chlamydial infections in sheep or goats. *Veterinary Microbiology* 181, 107-118.
- Rosa, H.J.D., Bryant, M.J., 2003. Seasonality of reproduction in sheep. *Small Ruminant Research* 48, 155-171.
- Rosario, C.J., Tan, M., 2012. The early gene product EUO is a transcriptional repressor that selectively regulates promoters of *Chlamydia* late genes. *Molecular Microbiology* 84, 1097-1107.
- Rosario, C.J., Hanson, B.R., Tan, M., 2014. The transcriptional repressor EUO regulates both subsets of *Chlamydia* late genes. *Molecular Microbiology* 94, 888-897.
- Rowland, S.S., Falkler, W.A., Bashirelahi, N., 1992. Identification of an estrogen-binding protein in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 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. *Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift* 125, 138-143.
- Sachse, K., Hotzel, H., Slickers, P., Ellinger, T., Ehricht, R., 2005. DNA microarray-based detection and identification of *Chlamydia* and *Chlamydophila* spp. *Molecular and Cellular Probes* 19, 41-50.
- Sachse, K., Vretou, E., Livingstone, M., Borel, N., Pospischil, A., Longbottom, D., 2009. Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. *Veterinary Microbiology* 135, 2-21.
- 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. *Systematic and Applied Microbiology* 38, 99-103.
- 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. *Molecular Microbiology* 82, 1185-1203.
- Salas, E., López, M.G., Villarroya, M., Sánchez-García, P., De Pascual, R., Dixon, W.R., García, A.G., 1994. Endothelium-independent relaxation by 17-alpha-estradiol of pig coronary-arteries. *European Journal of Pharmacology* 258, 47-55.
- 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. *Veterinary Microbiology* 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. *Veterinary Journal* 194, 133-134.
- 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 *Chlamydophila abortus*. *Journal of Comparative Pathology* 135, 83-92.
- Sammin, D., Markey, B., Bassett, H., Buxton, D., 2009. The ovine placenta and placentitis - A review. *Veterinary Microbiology* 135, 90-97.

- Santiago-Moreno, J., López-Sebastián, A., González-Bulnes, A., Gómez-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. *Reproduction Nutrition Development* 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. *New Zealand Veterinary Journal* 63, 284-287.
- Schachter, J., Banks, J., Sugg, N., Sung, M., Storz, J., Meyer, K.F., 1974. Serotyping of *Chlamydia*. I. isolates of ovine origin. *Infection and Immunity* 9, 92-94.
- Schachter, J., Stephens, R.S., Timms, P., Kuo, C., Bavoil, P.M., Birkelund, S., Boman, J., Caldwell, H., Campbell, L.A., Chernesky, M., Christiansen, G., Clarke, I.N., Gaydos, C., Grayston, J.T., Hackstadt, T., Hsia, R., Kaltenboeck, B., Leinonen, M., Ocjius, D., McClarty, G., Orfila, J., Peeling, R., Puolakkainen, M., Quinn, T.C., Rank, R.G., Raulston, J., Ridgeway, G.L., Saikku, P., Stamm, W.E., Taylor-Robinson, D., Wang, S.P., Wyrick, P.B., 2001. Radical changes to chlamydial taxonomy are not necessary just yet. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 249.
- Schoborg, R.V., 2011. *Chlamydia* persistence - a tool to dissect chlamydia-host interactions. *Microbes and Infection* 13, 649-662.
- Scidmore-Carlson, M.A., Shaw, E.I., Dooley, C.A., Fischer, E.R., Hackstadt, T., 1999. Identification and characterization of a *Chlamydia trachomatis* early operon encoding four novel inclusion membrane proteins. *Molecular Microbiology* 33, 753-765.
- 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. *Molecular Microbiology* 37, 913-925.
- Shemer, Y., Sarov, I., 1985. Inhibition of growth of *Chlamydia trachomatis* by human gamma interferon. *Infection and Immunity* 48, 592-596.
- Shughure, P.J., Lane, M.V., Scrimo, P.J., Merchenthaler, I., 1998. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the rat pituitary, gonad, and reproductive tract. *Steroids* 63, 498-504.
- Siarkou, V., Lambropoulos, A.F., Chrisafi, S., Kotsis, A., Papadopoulos, O., 2002. Subspecies variation in Greek strains of *Chlamydophila abortus*. *Veterinary Microbiology* 85, 145-157.
- Skipp, P.J., 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.
- Song, G., Bazer, F.W., Spencer, T.E., 2007. Pregnancy and interferon tau regulate RSAD2 and IFIH1 expression in the ovine uterus. *Reproduction* 133, 285-295.
- Spencer, T.E., Bazer, F.W., 1995. Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. *Biology of Reproduction* 53, 1527-1543.
- Stamp, J.T., McEwen, A.D., Watt, J.A.A., Nisbet, D.I., 1950. Enzootic abortion in ewes; transmission of the disease. *The Veterinary record* 62, 251-254.

Bibliografia

- Stephens, R.S., Myers, G., Eppinger, M., Bavoil, P.M., 2009. Divergence without difference: phylogenetics and taxonomy of *Chlamydia* resolved. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 55, 115-119.
- Stuedli, A., Grest, P., Schiller, I., Pospischil, A., 2005. Mixed infections *in vitro* with different *Chlamydiaceae* strains and a cell culture adapted porcine epidemic diarrhea virus. *Veterinary Microbiology* 106, 209-223.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 11143-11148.
- Su, L., Sun, Y.X., Ma, F., Lu, P.P., Huang, H.F., Zhou, J., 2009. Progesterone inhibits Toll-like receptor 4-mediated innate immune response in macrophages by suppressing NF-kappa B activation and enhancing SOCS1 expression. *Immunology Letters* 125, 151-155.
- Sugarman, B., Mummaw, N., 1990. Estrogen binding by and effect of estrogen on trichomonads and bacteria. *Journal of Medical Microbiology* 32, 227-232.
- Summersgill, J.T., Sahney, N.N., Gaydos, C.A., Quinn, T.C., Ramírez, J.A., 1995. Inhibition of *Chlamydia pneumoniae* growth in HEP-2 cells pretreated with gamma interferon and tumor necrosis factor alpha. *Infection and Immunity* 63, 2801-2803.
- Sweet, R.L., Blankfortdoyle, M., Robbie, M.O., Schacter, J., 1986. The occurrence of chlamydial and gonococcal salpingitis during the menstrual cycle. *Journal of the American Medical Association* 255, 2062-2064.
- Szekeres-Bartho, J., Barakonyi, A., Par, G., Polgar, B., Palkovics, T., Szereday, L., 2001. Progesterone as an immunomodulatory molecule. *International Immunopharmacology* 1, 1037-1048.
- Tan, I.J., Peeva, E., Zandman-Goddard, G., 2015. Hormonal modulation of the immune system - A spotlight on the role of progestogens. *Autoimmunity Reviews* 14, 536-542.
- Taraborrelli, S., 2015. Physiology, production and action of progesterone. *Acta Obstetricia Et Gynecologica Scandinavica* 94, 8-16.
- 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 *Chlamydia abortus* genome sequence reveals an array of variable proteins that contribute to interspecies variation. *Genome Research* 15, 629-640.
- Timms, P., Good, D., Wan, C., Theodoropoulos, C., Mukhopadhyay, S., Summersgill, J., Mathews, S., 2009. Differential transcriptional responses between the interferon-gamma-induction and iron-limitation models of persistence for *Chlamydia pneumoniae*. *Journal of Microbiology Immunology and Infection* 42, 27-37.
- Tsuyuguchi, K., Suzuki, K., Matsumoto, H., Tanaka, E., Amitani, R., Kuze, F., 2001. Effect of oestrogen on *Mycobacterium avium* complex pulmonary infection in mice. *Clinical and Experimental Immunology* 123, 428-434.
- 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. *Tijdschrift Voor Diergeneeskunde* 137, 450-457.

- 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. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 26, 333-344.
- Vretou, E., Loutrari, H., Mariani, L., Costelidou, K., Eliades, P., Conidou, G., Karamanou, S., Mangana, O., Siarkou, V., Papadopoulos, O., 1996. Diversity among abortion strains of *Chlamydia psittaci* demonstrated by inclusion morphology, polypeptide profiles and monoclonal antibodies. *Veterinary Microbiology* 51, 275-289.
- Vretou, E., Psarrou, E., Kaiser, 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 (*Chlamydophila abortus*). *Infection and Immunity* 69, 607-612.
- Waldner, G., Hotzel, H., Brezinka, C., Gritsch, W., Tauber, R., Wurzner, R., Ploner, F., 2005. An unusual cause of sepsis during pregnancy - Recognizing infection with *Chlamydophila abortus*. *Obstetrics and Gynecology* 106, 1215-1217.
- Walmer, D.K., Wrona, M.A., Hughes, C.L., Nelson, K.G., 1992. Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle: correlation with circulating estradiol and progesterone. *Endocrinology* 131, 1458-1466.
- 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. *American Journal of Reproductive Immunology* 71, 165-177.
- Washington, A.E., Gove, S., Schachter, J., Sweet, R.L., 1985. Oral contraceptives, *Chlamydia trachomatis* infection, and pelvic inflammatory disease. A word of caution about protection. *Journal of the American Medical Association* 253, 2246-2250.
- Weinstein, Y., Ran, S., Segal, S., 1984. Sex associated differences in the regulation of immune responses controlled by the MHC of the mouse. *Journal of Immunology* 132, 656-661.
- Weiss, G., Rifkin, I., 1975. Progesterone and estrogen secretion by puerperal human ovaries. *Obstetrics and Gynecology* 46: 557-559.
- Wheelhouse, N., Wattedegera, S., Stanton, J., Maley, S., Watson, D., Jepson, C., Deane, D., Buxton, D., Longbottom, D., Baszler, T., Entrican, G., 2009. Ovine trophoblast is a primary source of TNF alpha during *Chlamydophila abortus* infection. *Journal of Reproductive Immunology* 80, 49-56.
- Wheelhouse, N., Aitchison, K., Laroucau, K., Thomson, J., Longbottom, D., 2010. Evidence of *Chlamydophila abortus* vaccine strain 1B as a possible cause of ovine enzootic abortion. *Vaccine* 28, 5657-5663.
- Wheelhouse, N., Longbottom, D., 2012. Endemic and emerging chlamydial infections of animals and their zoonotic implications. *Transboundary and Emerging Diseases* 59, 283-291.
- Wheelhouse, N., Sait, M., Wilson, K., Aitchison, K., McLean, K., Smith, D.G.E., Longbottom, D., 2012. Expression patterns of five polymorphic membrane proteins during the *Chlamydia abortus* developmental cycle. *Veterinary Microbiology* 160, 525-529.

Bibliografía

- Whitacre, C.C., 2001. Sex differences in autoimmune disease. *Nature Immunology* 2, 777-780.
- Wilkat, M., Herdoiza, E., Forsbach-Birk, V., Walther, P., Essig, A., 2014. Electron tomography and cryo-SEM characterization reveals novel ultrastructural features of host-parasite interaction during *Chlamydia abortus* infection. *Histochemistry and Cell Biology* 142, 171-184.
- Wilsmore, A.J., Izzard, K.A., Dagnall, G.J.R., Wilsmore, B.C., Woodland, R.M., 1990. Protection of ewes vaccinated with A22 strain *Chlamydia psittaci (ovis)* against challenge in pregnancy with homologous and heterologous strains of the organism. *British Veterinary Journal* 146, 349-353.
- Wyrick, P.B., 2010. *Chlamydia trachomatis* persistence *in vitro*: an overview. *Journal of Infectious Diseases* 201, 88-95.
- Yanamura, H.Y., Meyer, K.F., 1941. Studies on the virus of psittacosis cultivated *in vitro*. *Journal of Infectious Diseases* 68, 1-15.
- Yang, C.F., Starr, T., Song, L.H., Carlson, J.H., Sturdevant, G.L., Beare, P.A., Whitmire, W.M., Caldwell, H.D., 2015. Chlamydial lytic exit from host cells is plasmid regulated. *MBio* 6, e01648-15.
- Yankey, S.J., Hicks, B.A., Carnahan, K.G., Assiri, A.M., Sinor, S.J., Kodali, K., Stellflug, J.N., Ott, T.L., 2001. Expression of the antiviral protein Mx in peripheral blood mononuclear cells of pregnant and bred, non-pregnant ewes. *Journal of Endocrinology* 170, 7-11.
- Zhang, F., Li, S., Yang, J., Yang, L., He, C., 2009. Induction of a protective immune response against swine *Chlamydophila abortus* infection in mice following co-vaccination of omp-1 DNA with recombinant MOMP. *Zoonoses and Public Health* 56, 71-76.
- Zhong, G., 2011. *Chlamydia trachomatis* secretion of proteases for manipulating host signaling pathways. *Frontiers in Microbiology* 2, 14.
- Zugel, U., Kaufmann, S.H., 1999. Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews* 12, 19-39.
- Zuck, M., Sherrid, A., Suchland, R., Ellis, T., Hybiske, K., 2016. Conservation of extrusion as an exit mechanism for *Chlamydia*. *Pathogens and Disease* 74, pii: ftw093.

ANEXOS

ANEXO I. Composición de los medios de cultivo y soluciones tamponadoras**1. Generales****PBS (pH 7,2) Phosphate buffered saline**

Componentes	g/l
NaCl	7,65
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	0,724
KH ₂ PO ₄	0,21

PBS-DEAE-D (pH 7,2) Dietilaminoetil-Dextrano

Componentes	g/l
PBS	
DEAE-Dextrano	10

PBS-glicerol (pH 8,6)

Componentes	Concentración
PBS	10%
Glicerol (Sigma-Aldrich)	90%

2. Cultivos celulares**Solución de tripsina/EDTA (pH 7,2)**

Componentes	Concentración	
	McCoy	LE y AH-1
PBS	99,4%	99,86%
Tripsina	0,2%	0,12%
EDTA	0,4%	0,02%

Medio mínimo esencial de Eagle (MEM) suplementado

Medio base MEM en polvo (Gibco) disuelto en agua destilada y suplementado con:

Componentes	Concentración
Charcoal stripped FBS (Gibco)	10%
L-Glutamina (Gibco) 200 mM	1%
Piruvato sódico (Sigma) 100 mM	1%
Gentamicina (Sigma) 50 mg/ml	0,1%
Anfotericina B (Gibco) 250 µg/ml	1%
Extracto de levadura	1 g/L
Glucosa anhidra	3,7 g/L
Bicarbonato sódico	1,4 g/L
Hidrolizado de lactoalbúmina	5 g/L

Medio esencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado

Medio base DMEM líquido, 4,5 g/L glucosa, sin rojo fenol (Gibco) suplementado con:

Componentes	Concentración
Charcoal stripped FBS (Gibco)	10%
L-Glutamina (Gibco) 200 mM	1%
Gentamicina (Sigma) 50 mg/ml	0,1%
Anfotericina B (Gibco) 250 µg/ml	1%

Medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) suplementado

Medio base IMDM líquido, sin rojo fenol (Gibco) suplementado con:

Componentes	Concentración
Charcoal stripped FBS (Gibco)	10%
L-Glutamina (Gibco) 200 mM	1%
Gentamicina (Sigma) 50 mg/ml	0,1%
Anfotericina B (Gibco) 250 µg/ml	1%

ANEXO II. Abreviaturas

AcMo	Anticuerpo/s monoclonales
AEO	Aborto enzoótico ovino
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMP	Adenosín monofosfato
ARN	Ácido ribonucleico
BCA	Ácido bicinchonínico
CA	Cuerpo/s aberrante/s
CBG	Globulina transportadora de corticosteroides
CE	Cuerpo/s elemental/es
CI	Cuerpo/s intermedio/s
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
COMC	Complejo de la membrana externa clamidial
C _q	Ciclo de cuantificación (sinónimo de “C _t ”, ciclo umbral)
DEAE-D	Dietilaminoetil-Dextrano
DIVA	Diferenciación de animales infectados de vacunados
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
E1	Estrona
E2	17β-Estradiol
E3	Estriol
EB	<i>Elementary body</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ER	Receptor de estrógenos
FBS	Suero fetal bovino
FSH	Hormona estimuladora del folículo
Hpi	Horas post-infección / hours post-infection
Hsp	Proteína de choque térmico
IB	<i>Intermediate body</i>
IDO	indoleamina 2,3-dioxigenasa
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IFN	Interferón

IL	Interleuquina
LH	Hormona luteinizante
LOS	Lipooligosacárido
LPS	Lipopolisacárido
MEM	Medio esencial mínimo de Eagle
MOI	Multiplicidad de infección
MOMP	Proteína principal de la membrana externa
NK	<i>Natural killer</i>
NKT	<i>Natural killer T cell</i>
P4	Progesterona
PR	Receptor de progesterona
PBS	Tampón salino fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMN	Polimorfonuclear / neutrófilo
Pmp	Proteínas polimórficas de membrana
qPCR	PCR cuantitativa
RB	<i>Reticular body</i>
RFC	Reacción de fijación del complemento
SHBG	Globulina transportadora de hormonas sexuales
SRE	Elemento de respuesta a esteroides
T3SS	Sistema de secreción tipo III
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
UFI	Unidad formadora de inclusiones

ANEXO III. Producción científica derivada de esta Tesis doctoral

Algunos de los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis han sido incluidos en las siguientes publicaciones:

➤ ARTÍCULOS

D. Álvarez, M.R. Caro, L. del Río, C. Schnee, A.J. Buendía, N. Ortega, J.A. Navarro, A. Murcia-Belmonte, J. Salinas. **Effect of female sex hormones 17 β -estradiol and progesterone on the developmental cycle of *Chlamydia abortus* compared to a penicillin-induced model of persistent infection.** (En preparación).

➤ COMUNICACIONES A CONGRESOS

D. Álvarez, A. Murcia-Belmonte, A.J. Buendía, J.A. Navarro, C. Schnee, J. Salinas, M.R. Caro. **Effect of estradiol and progesterone on the life cycle of *in vitro* cultured *Chlamydia abortus*.** Póster. 4th European Meeting on Animal Chlamydioses and Zoonotic Implications (EMAC-4). Zagreb (Croacia), 2017.

D. Álvarez, A. Murcia-Belmonte, A.J. Buendía, N. Ortega, M.C. Gallego, L. del Río, M.R. Caro. **Influence of female sex hormones on the gene expression of *in vitro* cultured *Chlamydia abortus*.** Póster. 8th Meeting of the European Society for Chlamydia Research. Oxford (Reino Unido), 2016

D. Álvarez, A. Murcia-Belmonte, A.J. Buendía, M.C. Gallego, N. Ortega, L. del Río, J.A. Navarro, M.R. Caro, J. Salinas. **Influence of sex hormones on the kinetics of *Chlamydia abortus* infection using *in vitro* and *in vivo* models.** Póster. 3rd European Meeting on Animal Chlamydioses and Zoonotic Implications (EMAC-3). París (Francia), 2015

