

Influencia de las hormonas sexuales en la cinética de infección por *Chlamydia abortus* en modelo murino

A. Murcia-Belmonte^{1,*}, D. Álvarez¹, A.J. Buendía², E. Gómez-Lucía³, M.R. Caro¹, J. Salinas¹

¹ Departamento de Sanidad Animal, ² Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, España, *antonio.murcia1@um.es.

³ Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, España.

1. Hipótesis y objetivos

Chlamydia abortus (*C. abortus*) es el agente causal del aborto enzoótico ovino (AEO). Esta bacteria produce en animales no gestantes una infección que cursa de forma asintomática y puede permanecer de forma subclínica o latente hasta que el animal queda gestante. Se produce entonces una reactivación de la infección y la colonización de la placenta, que desemboca en procesos patológicos durante el último tercio de gestación y en abortos. Después del aborto, los animales quedarán como portadores que diseminarán la bacteria en los siguientes estros. En este proceso de latencia/multiplicación activa que desencadena la reactivación del ciclo clamidial en ciertos momentos de la gestación y del ciclo estral, varios trabajos indican un importante papel relacionado con las hormonas sexuales. Así, estudios previos han demostrado que el 17 β -estradiol y la progesterona, son capaces de modular la respuesta inmune frente a las bacterias así como influir en la interacción patógeno intracelular célula hospedadora [1,6]. Sin embargo, los mecanismos por los cuales las hormonas sexuales intervienen en la fisiopatología clamidial todavía no están claros y necesitan ser estudiados en profundidad.

Por tanto, el objetivo principal de nuestros estudios es analizar la influencia y posibles efectos de las hormonas reproductivas, 17 β -estradiol y progesterona, sobre la cinética de la infección por *C. abortus* en ratonas Swiss OF1 ovariectomizadas tratadas con las hormonas propuestas. En este modelo murino se analizan la morbilidad de la infección mediante el registro del peso de los ratones a lo largo del experimento, la cinética de la infección mediante el aislamiento de *C. abortus* a partir de muestras de hígado (órgano diana de la infección clamidial), así como las alteraciones histopatológicas inducidas por la bacteria mediante técnicas inmunohistoquímicas, en ratones tratados con las hormonas citadas anteriormente. Posteriormente se analizará la producción de varias citoquinas asociadas a la respuesta inmune y regulación proinflamatoria frente a la infección por *C. abortus*, como el IFN- γ y la IL-10.

2. Material y métodos

Se utilizaron un total de 73 ratonas Swiss ovariectomizadas [10], que fueron distribuidas en 5 grupos: No infectado (Ni), Control de infección (C), tratadas con Estradiol (ET), Progesterona (PG) o Estradiol + Progesterona (Mix). Todos los animales fueron tratados por vía subcutánea los días -2, -1, 1, 4 y 8 pi. con las siguientes dosis de hormona o en su caso (grupos Ni y C), aceite de sésamo:

- Grupo ET (19 ratonas): 3 µg de 17β-estradiol en 0,2 ml de aceite sésamo.
- Grupo PG (19 ratones): 3 mg de progesterona en 0,2 ml de aceite de sésamo.
- Grupo C (19 ratones) C: 0,2 ml de aceite de sésamo.
- Grupo Mix (12 ratones): 3 µg de estradiol y 3 mg de progesterona en 0,2 ml de aceite de sésamo.
- Grupo Ni (4 ratones): Grupo control para la evolución de los pesos. Se tratará con 0,2 ml de aceite de sésamo sin hormonas, y con 0,2 ml de PBS vía intraperitoneal en el día de la infección del resto de grupos.

El grupo Mix fue incluido en esta experiencia para determinar posibles sinergias o antagonismos entre las dos hormonas empleadas. Asimismo, el grupo Ni, fue incluido para determinar el posible efecto en de la inoculación de aceite de sésamo en los ratones. El desafío de los animales se realizó inoculando por vía intraperitoneal la cepa AB7 de *C. abortus* con un de título 5×10^9 UFI/ml, a una dosis de 5×10^6 UFIs en 0,2 ml de PBS (dilución 1/200). La morbilidad de la infección se midió de forma objetiva controlando a diario el peso de todos los animales de cada grupo. También se observó diariamente a los animales para detectar la aparición de síntomas clínicos asociados a la infección clamidial. Se sacrificaron 7 animales de los grupos ET, PG y C y 4 del grupo Mix, los días 4 y 8 postinfección (pi.). El día 11 pi., se sacrificaron 5 animales de los grupos ET, PG y C y 4 del grupo Mix. Por otro lado, las 4 ratonas del grupo Ni, fueron sacrificadas los días 8 y 11 pi., a razón de dos animales por día.

Durante los sacrificios, se tomaron las siguientes muestras:

- Sangre intracardiaca para la obtención de suero para determinación de citoquinas Th1/Th2 (IFN-γ e IL-10 respectivamente) [4] (En progreso).
- Hígado para fijación en formol (histopatología) y zinc (inmunocitoquímica).
- Hígado para congelación para aislamiento bacteriológico [9].
- Hígado para RT-PCR en ARN-later para expresión de genes relacionados con la respuesta inmune del ratón [2] (En progreso).

3. Resultados

3.1. Morbilidad

Todos los grupos de ratones perdieron peso tras la infección por *C. abortus*, volviendo incrementar su peso a partir del día 3 pi. y a recuperar su peso inicial entre los días 6 y 7 en los grupos ET, C y Mix. A partir estos últimos días, el peso de los animales de los grupos ET y C, mantiene una tendencia al alza hasta el final del estudio. Sin embargo las ratonas del grupo ET experimentan una caída de peso a partir del día 9 pi. para luego volver subir el día 11 pi. Algo similar aunque más acusado se observa en los animales del grupo Mix, donde el peso de las ratonas disminuyó por debajo del peso al inicio del tratamiento hormonal, durante el día 8 pi., para volver a recuperarlo e incluso superarlo durante el día 11 pi.

Estas fluctuaciones pueden ser debidas a la variabilidad de peso entre ratones observada dentro de cada uno de los grupos. Por otro lado, el peso de las ratonas del grupo PG comenzó a aumentar a partir del día 5 pi., siendo el grupo más tardío en recuperar su peso inicial al día 10 pi. Por su parte, el peso de los animales del grupo Ni, fluctúa mínimamente por debajo del peso inicial durante gran parte de la experiencia, para luego volver a incrementarse hacia el final del experimento (Figura 1).

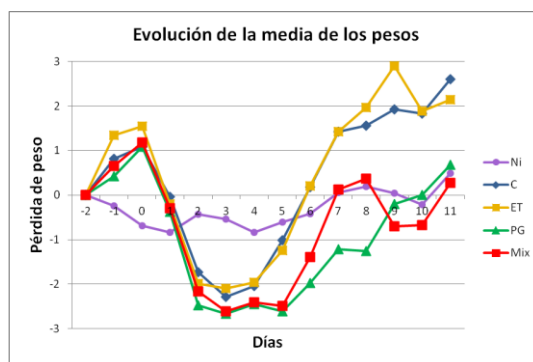


Figura 1: Morbilidad de la infección medida como pérdida de peso.

3.2. Aislamiento de *C. abortus*

Para determinar la carga bacteriana en el hígado, se utilizó la técnica de aislamiento *in vitro* de *C. abortus* sobre células McCoy según el protocolo descrito por Salinas *et al.* [9]. La carga bacteriana más alta se detectó en los animales de los grupos PG y Mix durante el día 4 pi. Sin embargo, en el día 8 pi., la mayor carga clamidial se detectó en los animales del grupo PG y C. Por último, en el día 11 pi., los animales de los grupos Mix y C, fueron los que mostraron mayor carga clamidial, seguidos por los animales de los grupos PG y con menor carga, los del grupo ET, que fueron los que menor carga clamidial mostraron a lo largo del estudio (Figura 2).

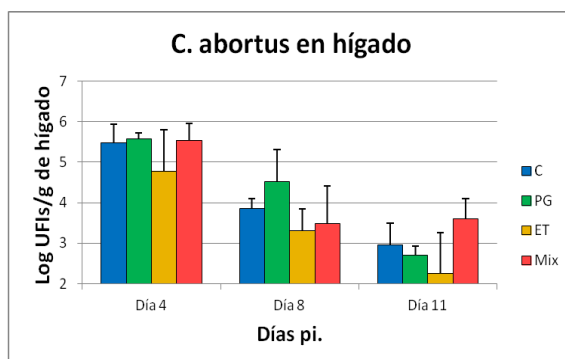


Figura 2: Aislamiento de *C. abortus* medida en Unidades Formadoras de Inclusiones (UFIs) por gramo de hígado.

3.3. Inmunohistopatología

El análisis preliminar mediante visualización por microscopía óptica de las muestras de hígado inmunoteñidas para la detección de antígeno clamidial reveló que todos los animales de todos los grupos mostraron mayor presencia de antígeno clamidial, en hígado durante el día 4 pi. En los animales del grupo PG fue donde subjetivamente se apreció una mayor presencia de antígeno clamidial, en relación a los animales de los grupos Mix, C y ET durante el día 4 pi. Durante el día 8 pi. la presencia de antígeno clamidial disminuyó de forma importante en todos los grupos del estudio. En este día pi. y al igual que en el día 4 pi., los animales del grupo PG presentaron una mayor presencia de antígeno en hígado, aunque en una cantidad menor que durante el día 4 pi. Así mismo, en el resto de grupos sólo se detectaron pequeños focos de antígeno clamidial en el día 8 pi.

Por otro lado, durante el día 11 pi., la mayor presencia de antígeno clamidial se observó en los animales del grupo Mix, seguido por los de los grupos PG, ET y, por último del grupo C (Figura 3).

4. Discusión

Los resultados preliminares obtenidos indican que, la mayor morbilidad de la infección, la mayor carga clamidial en hígado y la mayor presencia de antígeno clamidial del estudio, se observaron

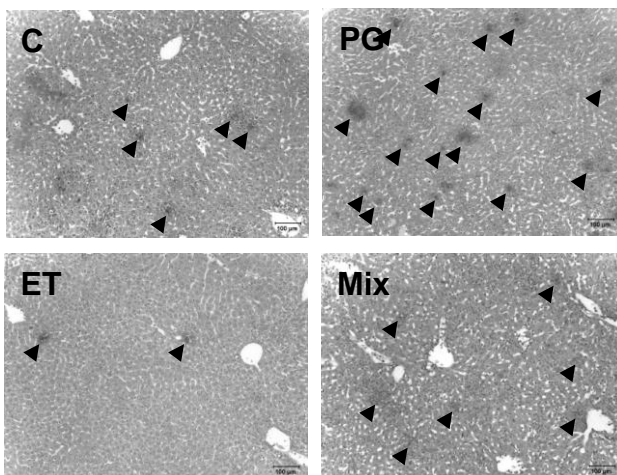


Figura 3: Detección de antígeno clamidial en el día 4 pi.

en las ratonas del grupo tratado con progesterona (PG). Estos hallazgos nos indican, a priori, un efecto de esta hormona en la respuesta inmune generada tras la infección por *C. abortus*. Así, Kaushic *et al.* [6] observaron resultados similares a los de este estudio en ratas ovariectomizadas que al ser infectadas con *C. trachomatis* por vía intrauterina y tratadas con progesterona, mostraban una infección más acusada y acompañada de una reacción inflamatoria más fuerte, que aquellas tratadas con estradiol. Se ha demostrado que las hormonas sexuales pueden representar un papel importante sobre el desarrollo y posibles efectos de la respuesta inmune, lo que puede influir en procesos como la presentación de antígenos, el tráfico de células de la respuesta inmune y la regulación de mecanismos inflamatorios mediados por la producción de ciertas citoquinas [6,12]. Diversos estudios realizados en ratonas ovariectomizadas indican que el estradiol es capaz de incrementar la actividad del promotor de IFN- γ en los linfocitos T, así como incrementar el ARNm que codifica para la síntesis de IFN- γ en esplenocitos [7], favoreciendo la aparición de una respuesta inmune Th1 con altos niveles de IFN- γ fundamental para la resolución de la infección clamidial [4]. Sin embargo, otros estudios sugieren que el estradiol también podría regular una exacerbada respuesta celular de tipo Th1, estimulando la producción de IL-4, IL-10, disminuyendo los niveles de TNF e IFN- γ , y reduciendo el número de linfocitos T CD4 y CD8 [3]. Esta doble acción del estradiol sobre el sistema inmune depende de la concentración de esta hormona en el organismo. Así pues, el estradiol a bajas concentraciones, es capaz de mejorar la secreción de IFN- γ , mientras que a altas concentraciones (>5 $\mu\text{g/ml}$) favorece la secreción de IL-10 [3]. Los resultados obtenidos hasta la fecha en nuestro estudio de los animales tratados con estradiol parecen contradecir estas conclusiones. Así, utilizando una dosis de 15 $\mu\text{g/ml}$ de estradiol (3 $\mu\text{g}/0,2$ ml), observamos una menor presencia de antígeno y carga clamidial, así como una menor morbilidad en los animales tratados con esta hormona comparados con el resto de grupos, sugiriendo que el estradiol parece estar fomentando la instauración de una respuesta inmune eficaz contra *C. abortus*, también a altas dosis.

No obstante, es necesario el análisis de las citoquinas presentes en el suero de los ratones tratados con estradiol para poder comprobar la presencia y concentración de IFN- γ y así corroborar esta hipótesis, además de, completar el resto de los análisis que planteamos en la Metodología del estudio y que actualmente están en progreso.

Por otro lado, numerosos estudios en diferentes modelos animales demuestran que la progesterona podría tener un efecto regulador sobre la respuesta inflamatoria del hospedador frente a la infección de numerosos patógenos [8], indicando que la progesterona parece tener un efecto inmunosupresor sobre el sistema inmune en este aspecto [3]. Estas observaciones concuerdan con los resultados obtenidos hasta la fecha en nuestro estudio, donde los ratones tratados con progesterona presentaron una mayor morbilidad y mayor carga y presencia de antígeno clamidial que el resto de grupos. Algunos estudios, han demostrado que esta hormona disminuye la presentación de antígenos y el número de células de la respuesta inmune [11]. Sin embargo, todavía no están del todo claros los mecanismos por los cuales la progesterona interfiere en la respuesta inmune [6].

Son necesarios más experimentos para esclarecer el papel del estradiol y la progesterona en la infección por *C. abortus*. El análisis del perfil de respuesta inmune desarrollado bajo la influencia de cada una de estas hormonas, determinado en base a la detección de citoquinas (IFN- γ e IL-10 fundamentalmente), perfil celular de la respuesta inmune desarrollada, así como la detección de genes implicados en la respuesta inmune de ratón, podría arrojar luz a cuestiones todavía no resueltas sobre el efecto del estradiol y la progesterona durante la infección por *C. abortus*. Actualmente, continuamos desarrollando estos y otros estudios que, confiamos, aporten conocimiento sobre el papel de las hormonas sexuales en la infección de *C. abortus* y sobre los mecanismos inmunopatológicos desarrollados en la respuesta inmune por parte del hospedador, lo que constituye el objetivo principal de mi Tesis Doctoral.

5. Bibliografía

- [1] Agrawal, T., Vats, V., Salhan, S., Mittal, A. 2009. Determination of chlamydial load and immune parameters in asymptomatic, symptomatic and infertile women. *FEMS Immunol Med Microbiol* 55: 250–257.
- [2] Amirshahi, A., Wan, C., Beagley, K., Latter, J., Symonds, I., Timms, P., 2011. Modulation of the *Chlamydia trachomatis* *in vitro* transcriptome response by the sex hormones estradiol and progesterone. *BMC Microbiol* 11, 150.
- [3] Beagley, K.W., Gockel, C.M. 2003. Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone. *FEMS Immunol Med Microbiol* 38: 13–22.
- [4] Del Rio, L., Buendía, A.J., Sánchez, J., Gallego, M.C., Caro, M.R., Ortega, N., Seva, J., Pallarés, F.J., Cuello, F., Salinas, J. 2001. Endogenous interleukin-12 is not required for resolution of *Chlamydomydia abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1) infection in mice. *Infect Immun* 69: 4808–4815.
- [5] Hsu, S.M., Raine, L., Fanger, H. 1981. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29: 577–580.
- [6] Kaushic, C., Zhou, F., Murdin, A.D., Wira, C.R. 2000. Effects of estradiol and progesterone on susceptibility and early immune responses to *Chlamydia trachomatis* infection in the female reproductive tract. *Infect Immun* 68: 4207–4216.
- [7] Maret, A., Coudert, J.D., Garidou, L., Foucras, G., Gourdy, P., Krust, A., Dupont, S., Chambon, P., Druet, P., Bayard, F., Guery, J.-C., 2003. Estradiol enhances primary antigen-specific CD4 T cell responses and Th1 development *in vivo*. Essential role of estrogen receptor alpha expression in hematopoietic cells. *Eur J Immunol* 33, 512–521.
- [8] Rank, R.G., White, H.J., Hough, A.J.J., Pasley, J.N., Barron, A.L., 1982. Effect of estradiol on chlamydial genital infection of female guinea pigs. *Infect Immun* 38, 699–705.
- [9] Salinas, J., Sánchez, J., Buendía, A.J., Souriau, A., Rodolakis, A., Bernabé, A., Cuello, F. 1994. The LPS localization might explain the lack of protection of LPS-specific antibodies in abortion-causing *Chlamydia psittaci* infections. *Res Microbiol* 145: 611–620.
- [10] Ström, J.O., Theodorsson, A., Ingberg, E., Isaksson, I.-M., Theodorsson, E. 2012. Ovariectomy and 17 β -estradiol replacement in rats and mice: a visual demonstration. *J Vis Exp*. 7; (64):e4013. doi: 10.3791/4013.
- [11] Wira, C.R., Rossoll, R.M., 1995. Antigen-presenting cells in the female reproductive tract: influence of sex hormones on antigen presentation in the vagina. *Immunology* 84, 505–508.

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