

CONICET



Universidad  
Nacional  
de Córdoba

---

C I B I C I

*“Infección en el tracto genital  
masculino por Chlamydia muridarum:  
importancia de la citocina anti-  
inflamatoria IL10”*

---

Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas

Lic. en Bioq. Leonardo R. Sánchez

Directora de Tesis: Prof. Dra. Virginia Elena Rivero

Año 2015

**Comisión Asesora:**

Dra. Fabiana Alovero

Dra. Cecilia Cuffini

Dra. Adriana Gruppi

**Evaluador Externo:**

Dr. Fernando Chirido

**El presente trabajo de tesis fue financiado gracias al apoyo económico obtenido a través de becas y subsidios otorgados por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT-FONCyT), y la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (Secyt-UNC).**



**Índice**

ABREVIATURAS .....	1
RESUMEN .....	4
INTRODUCCIÓN .....	6
Generalidades .....	7
Biología de <i>Chlamydia</i> .....	8
Infección del Tracto genital masculino por <i>Chlamydia</i> .....	10
Respuesta Inmune del hospedador contra <i>Chlamydia</i> .....	13
<i>Respuesta inmune Innata</i> .....	13
<i>Respuesta inmune adaptativa</i> .....	18
<i>Chlamydia</i> y sus mecanismos de evasión de la respuesta inmune .....	22
Linfocitos productores de IL10.....	26
OBJETIVOS.....	29
RESULTADOS: Parte I .....	30
I. Infección del TUGM por <i>C. muridarum</i> y la respuesta inmune generada en ratones NOD.....	31
<i>I.1 Presencia de ADN de Chlamydia durante el curso de la infección murina</i> ..31	
<i>I.2 Infiltrado inflamatorio en el TUGM durante el curso de la infección por C. muridarum</i> .....	33
<i>I.3 Sintomatología asociada a la inflamación durante la infección por C. muridarum</i> .....	38
<i>I.4 Respuesta inmune específica durante el curso de la infección del TUGM por C. muridarum</i> .....	39
<i>I.5 Infección por C. muridarum del TUGM en otras cepas de ratones</i> .....	42
RESULTADOS: Parte II .....	48
II.1 Participación de la citocina anti-inflamatoria IL10 en el curso de la infección del TUGM por <i>C. muridarum</i> .....	49
<i>II.1.1 Citocinas producidas por CMN de bazo luego del estímulo por C. muridarum inactivada</i> .....	49
<i>II.1.2 Principal población celular productora de IL10 en la infección por C. muridarum</i> .....	51
<i>II.1.3 Participación de PAMPs y Receptores de la inmunidad innata (PRRs) en la producción de IL10 por LB</i> .....	60
<i>II.1.4 Caracterización de LB productores de IL10 en la infección del TUGM por C. muridarum</i> .....	63
II.2 IL10 y LB regulatorios como moduladores de la respuesta inmune en la infección del TUGM por <i>C. muridarum</i> .....	71
DISCUSIÓN.....	81
MATERIALES Y MÉTODOS.....	98

Microorganismo utilizado .....	99
Purificación de cuerpos elementales (CE) de <i>Chlamydia muridarum</i> .....	99
Obtención de HSP60 recombinante .....	100
Cepas de ratones utilizadas.....	100
Protocolo de infección por <i>C. muridarum</i> .....	101
Purificación de ADN de <i>C. muridarum</i> del tejido .....	101
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	101
PCR en tiempo real .....	102
Detección de leucocitos infiltrantes de tejidos por Citometría de Flujo.....	102
Estudios histológicos.....	102
Estudios de inmunohistoquímicos.....	103
Secreción de citocinas por Células CMN de bazo y células de nódulos linfáticos drenantes de próstata .....	103
Expresión de quimiocinas en el tejido prostático.....	104
Medición del dolor pélvico .....	104
Obtención de muestras de suero sanguíneo .....	104
ELISA indirecto para detección de IgG anti HSP60.....	105
Inmunofluorescencia indirecta para la detección de IgG anti <i>C. muridarum</i> .....	105
Citometría de flujo de moléculas de superficie e intracelular .....	105
<i>Citometría de flujo de moléculas de superficie</i> .....	105
<i>Citometría de flujo de moléculas intracelulares</i> .....	106
Purificación de LB .....	106
<i>Purificación de LB por Cell-sorting</i> .....	107
<i>Purificación de LB por Perlas magnéticas</i> .....	107
<i>Purificación de LB de zona marginal y LB foliculares</i> .....	107
Cuantificación de IgM, IgG e Isotipos de IgG en sobrenadantes de LB purificados estimulados con <i>C. muridarum</i> .....	108
Tratamientos de bloqueo de IL10 o depleción de células CD20 <sup>+</sup> .....	108
Análisis estadístico .....	108
BIBLIOGRAFÍA .....	109

**ABREVIATURAS**

<b>BCR</b>	Receptor de linfocitos B
<b>Breg</b>	Linfocitos B regulatorios
<b>CA</b>	Cuerpo aberrante
<b>CCL</b>	$\beta$ quimiocinas
<b>CD</b>	Célula dendrítica
<b>CE</b>	Cuerpo elemental
<b>cLPS</b>	Lipopolisacárido de <i>Chlamydia spp.</i>
<b>CLRs</b>	Receptores de lectinas del tipo C
<b>CMN</b>	Células mononucleares
<b>CPA</b>	Célula presentadora de antígenos
<b>CPAF</b>	Factor <i>clamidial</i> con actividad proteasa
<b>CpG</b>	Dinucleótido deoxicitidil-fosfato-deoxiguanosina no metilado (ligando de TLR9)
<b>CR</b>	Cuerpo reticular
<b>CTLA4</b>	Antígeno 4 asociado al Linfocito T citotóxico
<b>CXCL</b>	$\alpha$ quimiocinas
<b>DAMPs</b>	Señales de daño asociadas a patógenos
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
<b>AND</b>	Acido desoxirribonucleico
<b>DO</b>	densidad óptica
<b>Dpi</b>	Días pos-infección
<b>ELISA</b>	Enzimoinmunoensayo
<b>Fc</b>	Fracción constante
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>HSP60</b>	Proteína de shock térmico 60 de <i>Chlamydia spp.</i>
<b>IFI</b>	Inmunofluorescencia indirecta
<b>IDO</b>	Enzima indoleamina 2, 3-dioxigenasa
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IL10R</b>	Receptor de IL10

---

<b>LBI</b>	Linfocito B innato
<b>kB</b>	Kilo-Bases
<b>KC</b>	Quimiocina derivada de queratinocitos
<b>LB</b>	Linfocito B
<b>LB de ZM</b>	Linfocito B de zona marginal
<b>LB1</b>	Linfocito B1
<b>LB2</b>	Linfocito B2 o folicular
<b>LLCMK2</b>	Línea celular de carcinoma de riñón de mono
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido de <i>Escherichia coli</i>
<b>LT</b>	Linfocito T
<b>LTh</b>	Linfocito T helper o cooperador
<b>M</b>	Molar
<b>MAPK/ERK</b>	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MOMP</b>	Proteína mayor de la membrana externa de <i>Chlamydia spp.</i>
<b>MyD88</b>	Factor de diferenciación mieloide 88
<b>N</b>	Número de animales de experimentación
<b>NFκB</b>	Factor de transcripción nuclear NFκB
<b>NGF</b>	Factor de crecimiento nervioso
<b>NK</b>	Célula asesina natural ( <i>Natural Killer</i> )
<b>NLRs</b>	Receptores para dominio de oligomerización para la unión de nucleótidos
<b>Nm</b>	Nanómetros
<b>NOD</b>	No obesos diabéticos
<b>Nod1</b>	Receptores de dominio de unión y oligomerización de nucleótidos 1
<b>NOD-SCID</b>	No obesos diabéticos con inmunodeficiencia combinada severa
<b>PAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos
<b>PBMCs</b>	Células mono-nucleares de sangre periférica humana
<b>PBS</b>	Solución tampón fosfato salino
<b>pCD</b>	Célula dendrítica plasmacitoidea

<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PD1</b>	Receptor de muerte programada 1
<b>PDL1</b>	Ligando del receptor de muerte programada 1
<b>PDL2</b>	Ligando del receptor de muerte programada 2
<b>Pi</b>	Pos-infección
<b>PMA</b>	Ésteres de forbolmiristato
<b>pMAPK/ERK</b>	Proteínas quinasas activadas por mitógenos fosforilados
<b>PMN</b>	Polimorfonucleares
<b>PpmD</b>	Proteína polimórfica de membrana D
<b>PRRs</b>	Receptor de reconocimiento de patrones moleculares
<b>pSTAT3</b>	Transductor de señal y activador de la transcripción 3 fosforilado
<b>qPCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
<b>RIGs</b>	Receptores de genes inducibles por ácido retinoico
<b>SEM</b>	Error estándar de la media
<b>SFB</b>	Suero bovino fetal
<b>SPG</b>	Solución tampón; sucrosa - fosfato - ácido glutámico
<b>spp.</b>	Especies
<b>STAT3</b>	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
<b>TLRs</b>	Receptores del tipo Toll
<b>TMB</b>	3,3',5,5' tetrametilbencidina
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>Tr1</b>	Linfocito T regulador tipo 1
<b>Treg</b>	Linfocito T regulatorio Foxp3 <sup>+</sup>
<b>TUGM</b>	Tracto urogenital masculino
<b>UI</b>	Unidades internacionales
<b>UFI</b>	Unidades formadoras de inclusión
<b>Wt</b>	<i>Wild type</i>
<b><math>\alpha</math>CD20</b>	Anti CD20
<b><math>\alpha</math>IL10</b>	Anti IL10

## **RESUMEN**

*Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) es el agente bacteriano más prevalente entre las infecciones de transmisión sexual en todo el mundo. Al presente, se tiene amplio conocimiento sobre la inmunopatogénesis de la infección causada por *C. trachomatis* en el tracto genital femenino. No obstante, se conoce muy poco sobre la infección del tracto urogenital masculino (TUGM).

En el presente trabajo de tesis se describió un modelo de infección del TUGM utilizando ratones de la cepa NOD y la bacteria *Chlamydia muridarum* (*C. muridarum*), una especie de *Chlamydia* que causa en ratones una enfermedad de características similares a la causada por *C. trachomatis* en humanos.

Ratones machos de la cepa NOD inoculados en meato urinario con *C. muridarum* presentaron una infección ascendente, detectándose ADN bacteriano en varios tejidos del TUGM a tiempos tempranos pos-infección (pi), pero a tiempos tardíos pi solamente en próstata. Al realizar una comparación entre distintas cepas de ratones (NOD, C57BL/6 y BALB/c), se demostró que *C. muridarum* fue eliminada del tejido prostático más lentamente en la cepa NOD. Durante la infección se produjo un importante infiltrado inflamatorio en el TUGM, con presencia de mayores cantidades de leucocitos CD45<sup>+</sup> infiltrando próstata de ratones NOD, cuando se comparó con los valores hallados en próstata de ratones C57BL/6. El infiltrado leucocitario estaba compuesto mayoritariamente por células GR1<sup>+</sup> y, en menor medida, por células CD3<sup>+</sup> y CD19<sup>+</sup>. Además, se determinaron incrementos en la expresión prostática de CXCL1, CXCL2 y CCL5, quimiocinas relacionadas al reclutamiento de leucocitos polimorfonucleares (PMN).

El análisis de la respuesta inmune adaptativa desarrollada luego de la infección del TUGM por *C. muridarum*, demostró la presencia de anticuerpos IgG específicos contra antígenos de la bacteria en suero de los ratones infectados a lo largo de la cinética de la infección. En cuanto a la respuesta celular frente al patógeno, se observó una importante producción de IL10 en cultivos de células mononucleares (CMN) de bazo o de nódulos drenantes de próstata estimulados con *C. muridarum*. Esta producción de IL10 fue mayor durante los primeros días de la infección y también más elevada en sobrenadantes provenientes de ratones NOD, en comparación con lo observado para las cepas C57BL/6 y BALB/c.

Mediante marcación de moléculas de superficie de linaje celular e intracelular de IL10 se concluyó que la población de células productoras de esta citocina fueron principalmente las CD19<sup>+</sup>, es decir los LB. Además, LB purificados mediante *cell-sorting* o perlas magnéticas fueron capaces de producir IL10 en respuesta al estímulo de *C.*

*muridarum*, sin colaboración de otras poblaciones celulares. Utilizando ratones deficientes en TLR2 o TLR4 se determinó que la producción de IL10 en respuesta a *C. muridarum* era dependiente de la presencia de TLR4. En concordancia, la estimulación de LB con LPS de *Chlamydia*, indujo la producción de IL10 por LB purificados. Luego del estímulo con *C. muridarum*, los LB IL10<sup>+</sup> presentaron un fenotipo regulatorio, con incrementos en la expresión de CD39, PD-L1 y además activación de STAT3 y la vía MAPK/ERK.

Mediante purificación de sub-poblaciones de LB, demostramos que los LB de zona marginal, pero no LB foliculares, produjeron IL10 en respuesta a *C. muridarum*. Además, los LB estimulados secretaron importantes cantidades de IgM, lo que en conjunto sugiere que se trataría de LB del tipo innatos (LBI) con potencial función regulatoria.

En experimentos realizados con ratones deficientes en IL10 o sometidos a tratamientos con anticuerpos bloqueantes de IL10, se demostró que la ausencia o disminución de esta citocina en tiempos tempranos se asoció con una mejor eliminación bacteriana. De la misma manera, en experimentos realizados con ratones  $\mu$ MT (deficientes en LB) o tratados con un anticuerpo que depleta LB, se observó que la ausencia o reducción de esta población celular se asoció también con una mejor eliminación bacteriana. En todos los casos en los que se vio una mejoría en la eliminación de *C. muridarum* del TUGM se evidenció incrementos en la respuesta Th1 específica, sugiriendo que la presencia tanto de IL10 como de LB atenúa la generación de una respuesta Th1 protectora.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis doctoral demuestran el importante rol de los LB regulatorios secretores de IL10 en el modelo de infección por *Chlamydia* y sugieren que la inducción de esta citocina, mediada por componentes de la bacteria, sería un mecanismo que la misma desarrolla para modular negativamente la respuesta inmune protectora del hospedador.

# INTRODUCCIÓN

---

## **Generalidades**

Las bacterias Gram negativas, pertenecen a la familia *Chlamydiaceae* y son responsables de un amplio espectro de enfermedades en el hombre. La familia *Chlamydiaceae* consta de un único género, *Chlamydia*, y dentro del mismo las siguientes especies: *C. muridarum*, *C. trachomatis*, *Chlamydia suis*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia felis*, *Chlamydia caviae* y *Chlamydia abortus*. *C. trachomatis* se subdivide en las biovariantes trachoma y linfogranuloma venéreo, las cuales presentan gran homología entre ellas y afectan principalmente al tracto genital. La especie *C. muridarum* o *C. trachomatis mouse pneumonitis* se encuentra filogenéticamente más distante a las anteriores y, en modelos murinos, causa una enfermedad de características similares a la observada en pacientes con *C. trachomatis* (Redgrove y McLaughlin 2014).

*Chlamydia* presenta un tropismo especial por las mucosas, siendo las mucosas del tracto genital, respiratorio y ocular muy susceptibles a la infección por las diferentes especies de *C. trachomatis* (Debattista y col. 2003; Brunham y Rey-Ladino 2005). Sin embargo, aunque las infecciones se encuentran principalmente limitadas a los epitelios de mucosas, *C. trachomatis* también puede infectar eficientemente cultivos *in vitro* derivados de una amplia variedad de linajes celulares de diferentes especies.

Las infecciones por *C. trachomatis* constituyen la enfermedad de transmisión sexual bacteriana más frecuente en todo el mundo (Brunham y Rey-Ladino 2005; Occhionero y col. 2015), con cifras de 100 millones de nuevos casos diagnosticados anualmente y muchos más casos que permanecen sub-diagnosticados. Estas infecciones representan un serio problema para la salud pública, ya que esta bacteria afecta principalmente a adolescentes y adultos jóvenes de todos los niveles socio-económicos. La mayoría de los casos de infección se observan en individuos jóvenes, sexualmente activos, menores de 25 años (Mylonas 2012). Un aspecto importante a tener en cuenta es la alta proporción de infecciones asintomáticas que se producen con *C. trachomatis*, con cifras de aproximadamente 75% de infecciones asintomáticas en mujeres y 50% de casos asintomáticos en hombres permaneciendo la mayoría de ellos sub-diagnosticados (Redgrove y McLaughlin 2014). *C. trachomatis* afecta a hombres y mujeres con una prevalencia similar; sin embargo, la mayoría de los estudios y estrategias de monitoreo se centran en la infección del tracto genital femenino debido a las consecuencias que la infección genera en una importante proporción de mujeres.

La infección por *C. trachomatis* en la mujer puede generar uretritis, cervicitis mucopurulenta, endometritis, salpingitis, enfermedad inflamatoria pélvica, peri-hepatitis, peri-

apendicitis, embarazos ectópicos e infertilidad. Cuando estas infecciones no son tratadas de manera adecuada pueden producirse complicaciones reproductivas severas (Mackern-Oberti y col. 2013).

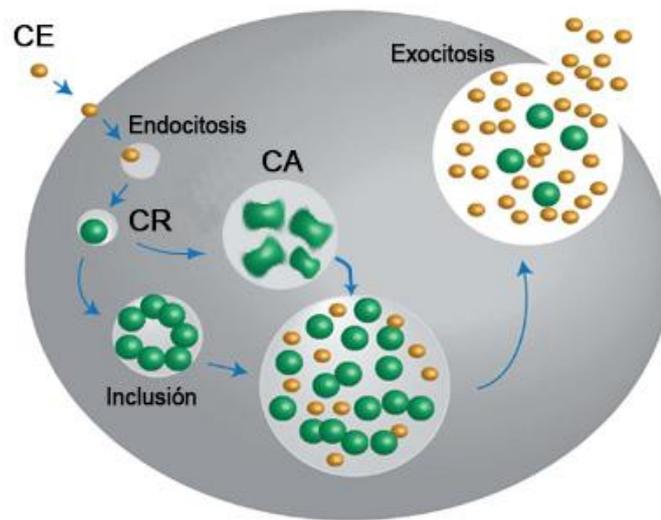
En el hombre, la infección por *C. trachomatis* afecta varios órganos que componen el TUGM, provocando uretritis, epididimitis, epidídimo-orquitis y prostatitis (Mackern-Oberti y col. 2013; Redgrove y McLaughlin 2014). Estudios epidemiológicos sugieren que un 13% de hombres jóvenes pueden tener infecciones genitales por *C. trachomatis*, presentado solo la mitad de ellos algún síntoma y, en consecuencia sólo algunos recibirán un tratamiento adecuado. La gran mayoría de los estudios y bibliografía relacionada a *C. trachomatis* demuestra que esta bacteria es un agente etiológico importante de infertilidad femenina. Sin embargo, el tracto genital masculino también es blanco de infecciones por esta bacteria, y las características de la infección en hombres, como así también las consecuencias que la misma pudiera tener, necesitan ser exploradas (Mackern-Oberti y col. 2013).

### **Biología de Chlamydia**

*C. trachomatis* es una bacteria intracelular obligada rodeada por una pared celular rígida. Su cromosoma se compone de aproximadamente un millón de pares de bases y tiene la capacidad de codificar para un máximo de 600 proteínas. Debido a su incapacidad para sintetizar nutrientes esenciales, esta bacteria necesita infectar células vivas para poder multiplicarse. *C. trachomatis* es capaz de infectar a una gran cantidad de células en cultivo, lo que sugiere que el receptor que facilita la entrada de la misma a la célula hospedador podría ser de naturaleza ubicua. Otra posibilidad sería que se trate de varios tipos de receptores expresados en diferentes células (Redgrove y McLaughlin 2014). Para algunas especies, se cree que la unión podría ser un proceso de dos pasos que implica una interacción electrostática inicial reversible mediada por los proteoglicanos de heparán sulfato, moléculas que se expresan en la mayoría de las superficies celulares. Se postula que el segundo paso sería una unión de alta afinidad irreversible a un receptor secundario (Jian Ping Zhang y Stephens 1992; Su y col. 1996; Davis y Wyrick 1997).

El ciclo infectivo de *Chlamydia spp.* está definido por dos estadios biológicos principales de la bacteria, el llamado cuerpo elemental (CE) y el cuerpo reticular (CR) (Figura 1). El CE es metabólicamente inactivo pero es el que tiene la capacidad de infectar células. Cuando el CE entra en contacto con las membranas celulares de los epitelios susceptibles a la infección es internalizado y queda rodeado por una membrana endosomal evadiendo de alguna forma la vía de degradación lisosomal. Aproximadamente, dos horas

más tarde, este CE aumenta de tamaño y se diferencia a CR, que es el metabólicamente activo pero no infeccioso, dividiéndose por fisión binaria dentro del endosoma que lo contiene. A esta vesícula que alberga los CR se la denomina inclusión *clamidial*. La inclusión *clamidial* va aumentando de tamaño debido a la duplicación de la bacteria dentro de la misma, provocando que la célula sufra en algún punto la escasez de nutrientes. Esto último origina que los CR se diferencien a CE infecciosos, los cuales pueden ser liberados al exterior de la célula por exocitosis o bien por lisis celular debido al crecimiento ilimitado de la inclusión *clamidial*. Una vez fuera de la célula, estos CE diseminados pueden infectar células epiteliales contiguas, iniciando otro ciclo infeccioso (Brunham y Rey-Ladino 2005).



**Figura 1: Ciclo infeccioso de *Chlamydia* spp.** El ciclo de esta bacteria es bifásico representado por dos estadios principales, el cuerpo elemental (CE) y el cuerpo reticular (CR). El CE es el que tiene la capacidad de infectar a la célula, ingresa a la misma por endocitosis y, una vez dentro, se diferencia a CR. Este es metabólicamente activo, se divide por fisión binaria dentro de la vacuola, o inclusión *clamidial*, que lo contiene. Esta inclusión aumenta de tamaño conforme los CR se multiplican en su interior. En un determinado momento, los CR se diferencian a CE y, mediante exocitosis, la inclusión libera su contenido al medio extracelular completando de esta forma el ciclo infeccioso. Bajo condiciones de estrés (IFN $\gamma$ , ciertos antibióticos), se generan estructuras o cuerpos aberrantes (CA) que detienen su desarrollo hasta que se reviertan las condiciones adversas. Figura modificada de Redgrove y McLaughlin, 2014.

A partir de cultivos celulares, se demostró *in vitro*, que el ciclo infeccioso bifásico de *C. trachomatis* puede ser afectado por agentes externos que causan estrés, como ciertos antibióticos (ej. penicilina), la deprivación de nutrientes y la presencia de ciertas citocinas (ej. IFN $\gamma$ ). Esto provoca la diferenciación de los CR a estructuras o cuerpos aberrantes (CA), las cuales son incapaces de infectar otras células mientras dure el efecto del agente estresor (Figura 1). Durante este estado de persistencia, *C. trachomatis* pone en marcha la activación de una serie de genes para montar una adaptación a la respuesta inmune que

genera el hospedador. Cuando el agente estresor es removido del medio, la bacteria continua con su ciclo infeccioso (Belland y col. 2003). Estos datos indican que bajo ciertas condiciones, *Chlamydia spp.* puede desarrollar estructuras de resistencia, las que podrían contribuir, de alguna forma, a la naturaleza de las infecciones crónicas y persistentes que la misma causa (Hogan y col. 2004; Carey y col. 2013).

### **Infección del Tracto genital masculino por *Chlamydia***

El TUGM está compuesto por uretra, pene, vejiga, testículos, epidídimos, conductos deferentes y glándulas sexuales anexas o accesorias. Estas últimas comprenden a las glándulas bulbo-uretrales: glándula prostática y vesículas seminales.

La infección del TUGM y en particular de glándulas accesorias generalmente es consecuencia de la diseminación de microorganismos, principalmente vía uretra, que llegan a la glándula prostática, vesícula seminal, conductos deferentes, epidídimo y en algunas oportunidades hasta el testículo. Todavía no está muy claro en cuánto tiempo una uretritis puede evolucionar a una infección de glándulas accesorias. Es probable que este tiempo sea muy variable y dependa del tipo y cantidad de agente infeccioso involucrado y de los tejidos afectados. Dentro de los agentes bacterianos infecciosos asociados al TUGM, podemos citar a *Neisseria gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y en menor medida enterobacterias como *Klebsiella spp.*, entre otras. Los signos más frecuentes en este tipo de infecciones son la presencia de leucocitos en semen (leucospermia), acompañada de niveles elevados de mediadores inflamatorios como citocinas y especies reactivas del oxígeno (Weidner y col. 1999).

*C. trachomatis* es el agente causal de la mayoría de las infecciones bacterianas de transmisión sexual más frecuentes y, tanto en el hombre como en la mujer, se trata de procesos patológicos que se asocian a una pobre sintomatología. Se postula que la infección por *Chlamydia* presenta un período de incubación de 8 a 15 días y los síntomas aparecen entre 1 y 3 semanas después de la primo-infección; sin embargo, en casi la totalidad de los casos el momento de la primo-infección es desconocido. En la mujer, puede aparecer flujo inespecífico, blanquecino, filante, con poco ardor y dolor abdominal o de espalda durante una relación sexual. No obstante, el 75% de las mujeres afectadas no presentan síntomas marcados que las lleven a buscar atención médica y, hasta en el 40% de los casos, no se observa en el examen físico ninguna anomalía macroscópica en el cuello del útero. Si esta infección no es tratada, asciende a los órganos intra-pelvianos, provocando la enfermedad inflamatoria pélvica que se acompaña de dolor y puede afectar las trompas de Falopio (Mitchell y Prabhu 2013). En el hombre, *C. trachomatis* también

provoca una infección acompañada de una muy pobre sintomatología. La mayoría de los hombres no exhiben síntomas de uretritis y, en el caso de pacientes con prostatitis crónica, se ha observado que aquellos que son positivos para *C. trachomatis* tienen niveles elevados de leucocitos en expresión prostática acompañados de mayores niveles de dolor (Redgrove y McLaughlin 2014). Sin embargo, existe muy escasa bibliografía que haya evaluado el dolor asociado a infección del TUGM por *C. trachomatis*, ya sea en pacientes o en modelos animales.

El sitio primario de la infección por *C. trachomatis* en el hombre es la uretra, siendo la uretritis la presentación clínica más frecuente. Los CE que infectan las células epiteliales de la uretra, desarrollan en su interior el ciclo infeccioso, se diferencian a CR con el fin de replicarse por fisión binaria, y finalmente se transforman en CE. Se postula que estos CE infectivos son liberados al medio extracelular y de esta forma continúan infectando células epiteliales contiguas, desarrollando en el tracto genital una infección ascendente, como ha sido descrito en distintos modelos animales de experimentación (Mackern-Oberti y col. 2013).

En nuestro grupo de trabajo, se estudiaron desde hace varios años situaciones en las que se observa inflamación en el TUGM, especialmente en la glándula prostática. La próstata es una glándula sexual accesoria masculina que rodea al cuello de la vejiga y uretra, y es recorrida en su parte posterior por los conductos eyaculadores. La próstata es una glándula esencialmente secretora. Los conductos glandulares prostáticos vacían las secreciones en la porción prostática de la uretra, las cuales representan gran parte del volumen total del líquido seminal. Estas secreciones contienen ácido cítrico, prostaglandinas, diferentes sustancias antioxidantes, zinc, lisozimas, inmunoglobulinas, citocinas, numerosas enzimas y muchas otras proteínas cuyo rol aún es desconocido. La próstata es blanco de enfermedades de elevada incidencia en la población. La hiperplasia prostática benigna, el carcinoma prostático y las inflamaciones de la glándula son algunas de las patologías más frecuentes que afectan a la próstata (Lee y col. 2011). Dentro de estas últimas, *C. trachomatis* es la bacteria más frecuentemente asociada uretritis infecciosas, prostatitis crónica, epididimitis y epidídimo-orquitis (Cunningham y Beagley 2008). Se ha reportado que esta bacteria sería la responsable del 18% de los casos de uretritis y del 30% de los casos de epididimitis, mientras que sería responsable de hasta el 50% de los casos de prostatitis (Skerk y col. 2004; Preena y col. 2007).

Las muestras apropiadas para el diagnóstico de infección por *C. trachomatis* en hombres son el hisopado uretral, orina, orina pre y post masaje prostático, expresión prostática y semen. Es difícil elegir una muestra adecuada para realizar el diagnóstico diferencial entre prostatitis y otras infecciones del TUGM causadas por este patógeno. En

el caso de las prostatitis, las muestras de expresión prostática tienen una limitación, ya que se puede producir contaminación de la misma por el pasaje del fluido por la uretra, especialmente si anteriormente ha ocurrido algún episodio de uretritis por *C. trachomatis*. Las muestras de semen no ayudan a identificar u orientar respecto al sitio particular del TUGM en el que se asienta la infección, pero al contener espermatozoides, secreciones prostáticas y secreciones provenientes de vesícula seminal son adecuadas para detectar presencia de microorganismos provenientes de vías altas del TUGM. Se han realizado también estudios con muestras de biopsias o de resección trans-uretral (Weidner y col. 2002). Cuando se comparó la detección de la bacteria en estas muestras, se observaron grandes diferencias principalmente por las diversas técnicas empleadas. Aunque en la actualidad la amplificación de ADN por PCR es la técnica de referencia de detección de *Chlamydia spp.* presentando mayor sensibilidad y especificidad, muchos laboratorios continúan desarrollando técnicas de aislamiento por cultivo celular y detección directa utilizando anticuerpos o sondas de ADN marcadas (Wagenlehner y col. 2006; Gaydos y col. 2008).

Hasta el presente existe escasa información en relación a modelos experimentales de infecciones del TUGM por *Chlamydia spp.* Pal y col. desarrollaron un modelo de infección del tracto masculino en ratones de la cepa C3H/HeN. En sus estudios, luego de inocular la bacteria en meato urinario, lograron aislar al patógeno de uretra, vejiga, epidídimo y testículo (Pal y col. 2004). Lamentablemente, en este estudio y otros realizados por el mismo grupo no analizaron la presencia de *Chlamydia* en próstata o vesícula seminal. Jantos y col. también realizaron estudios de infección en tracto genital masculino utilizando ratas. En sus estudios inocularon quirúrgicamente animales en vasos deferentes con *C. trachomatis* encontrando posteriormente la bacteria en próstata, epidídimo y testículo (Jantos y col. 1998). Aunque en este caso se detectó la presencia de *C. trachomatis* en próstata, la vía de inoculación utilizada es muy diferente de la forma en la que naturalmente esta bacteria infecta al tracto genital masculino.

Se han desarrollado modelos de infección *in vitro* de células epiteliales prostáticas (Mackern-Oberti y col. 2006; Mackern-Oberti y col. 2011a, 2011b) e *in vivo* del TUGM con *C. muridarum* (MacKern-Oberti y col. 2011c; Motrich y col. 2012). Inoculando ratas macho de la cepa Wistar con *C. muridarum* en meato urinario se ha demostrado que la bacteria produce una infección ascendente caracterizada por un especial tropismo por la glándula prostática, a tiempos tardíos post infección (MacKern-Oberti y col. 2011c). Estudios histológicos de diferentes tejidos del TUGM, han demostrado una alta incidencia de infiltrado inflamatorio intersticial en próstata y presencia de la bacteria en esta glándula a tiempos tardíos post infección (MacKern-Oberti y col. 2011c). Además, se determinó que a

pesar de detectar presencia de la bacteria en el TUGM e incluso en las muestras de semen de los animales infectados, no se observaron alteraciones en la viabilidad o movilidad de los espermatozoides, ni tampoco en los índices de fertilidad masculina (Motrich y col. 2012). Aunque los resultados obtenidos en el modelo en ratas fueron muy importantes, teniendo en cuenta la disponibilidad de cepas murinas presentes en nuestro bioterio y la amplia batería de reactivos existente para modelos murinos, la posibilidad de estudiar la infección del TUGM en modelos en ratón potencialmente permitiría un avance significativo en el estudio de la infección por *Chlamydia*.

## **Respuesta Inmune del hospedador contra *Chlamydia***

### ***Respuesta inmune Innata***

La primera línea de defensa contra la infección del tracto genital es la barrera mucosa. Sin embargo, cuando los agentes infecciosos penetran este revestimiento mucoso, es el sistema inmune innato a través de sus receptores el que monta la defensa contra ellos. La respuesta inmune innata se desencadena después de que se activan receptores llamados PRRs (receptores de reconocimiento de patrones) que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Estas estructuras microbianas, o PAMPs, por lo general son importantes para la supervivencia del patógeno y por ello se conservan evolutivamente. Dentro de los PRRs, se encuentran los receptores de tipo Toll (TLRs), los receptores para dominios de oligomerización para la unión de nucleótidos (NLRs), los receptores de genes inducibles por ácido retinoico (RIG) y los receptores de lectinas del tipo C (CLRs). Estos receptores se expresan predominantemente en células efectoras de la inmunidad innata, como los macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, aunque también se expresan en células epiteliales y endoteliales (Kawai and Akira, 2005; Kawai and Akira, 2010). En relación al tracto genital, distintas investigaciones han descrito la expresión de distintos PRRs tanto en tracto genital femenino, como masculino (Darville y col. 2003; Pioli y col. 2004; Andersen y col. 2006; Riccioli y col. 2006; Palladino y col. 2007).

Se conoce que *Chlamydia* interactúa con PRRs presentes en epitelios y células de la inmunidad innata. Sellami y col. identificaron el incremento en la expresión de TLR2, TLR4, MyD88 en una línea celular de células epiteliales de cáncer de próstata infectadas con *C. trachomatis* (Sellami y col. 2014). En relación a PAMPs presentes en *Chlamydia*, se han descrito el LPS de *Chlamydia spp.* (cLPS) y a la proteína de shock térmico 60 (HSP60) los cuales serían reconocidos por TLR4 y TLR2 (Vabulas y col. 2001). Se ha reportado también la presencia de una lipoproteína de *Chlamydia* denominada

“*Macrophage infectivity potentiator*” la cual sería reconocida a través del TLR2 (Bas y col. 2008) Además como en toda bacteria, el ADN de *Chlamydia* y sus motivos CpG son reconocidos por TLR9 (Ouburg y col. 2009).

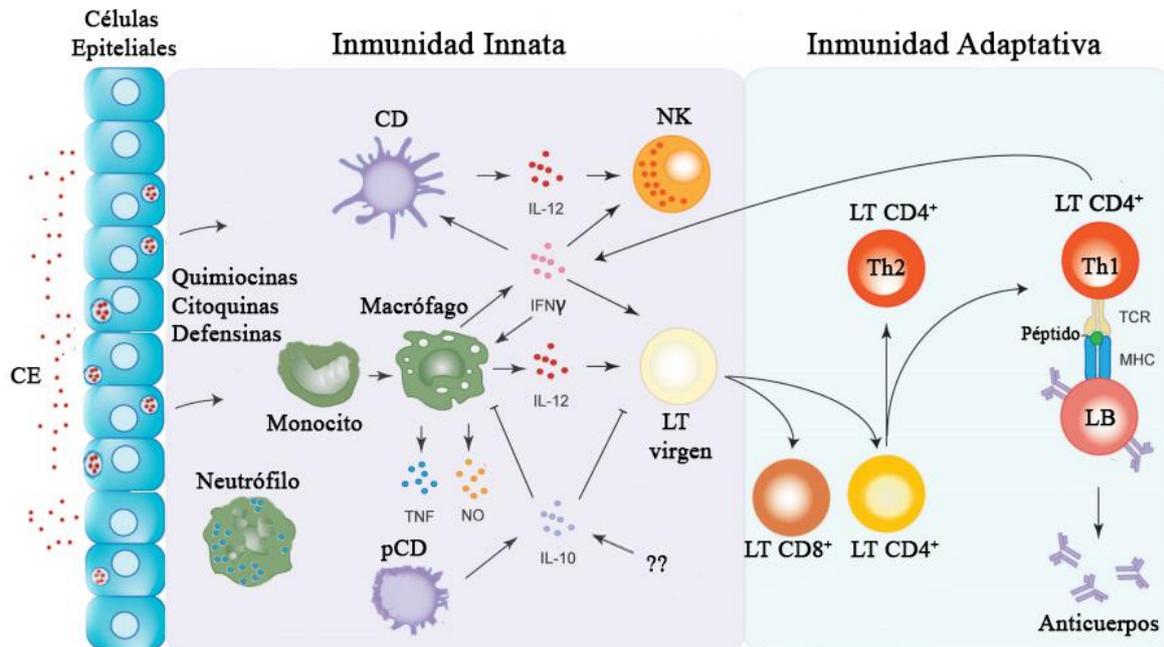
Los PRRs, después de reconocer sus ligandos, activan una serie de cascadas de señalización intracelular con el fin de montar una respuesta frente a la noxa. Estas cascadas involucran diferentes moléculas adaptadoras, quinasas y moléculas efectoras. La activación finalmente lleva a la producción de distintos mediadores entre los que son abundantes las citocinas inflamatorias. También a través de PAMPs algunos microorganismos inducen la secreción de citocinas anti-inflamatorias como IL10 y con ello logran el efecto contrario al desarrollo de una respuesta inflamatoria eficaz para eliminar el patógeno (Elcombe y col. 2013). Se ha descrito que esta respuesta inflamatoria/anti-inflamatoria temprana generada por la activación de PRRs/PAMPs puede ser distinta entre los individuos y de esta manera puede influenciar la susceptibilidad del hospedador a la infección y/o al desarrollo de daño en el tejido. En este sentido, se ha visto que la cepa de ratones C57BL/6 es más resistente a la infección por *Chlamydia* comparada con la cepa de ratones BALB/c. En la cepa C57BL/6, las citocinas inflamatorias secretadas durante la etapa temprana de la infección correlacionan con la rápida erradicación de la infección. Por otro lado, cepas como la BALB/c, muestran una producción de citocinas inflamatorias retrasada y prolongada, exhibiendo una eliminación de la bacteria demorada en el tiempo y acompañada de mayor daño en el tejido infectado (Darville y col. 2001; Jiang y col. 2010). Experimentos realizados en ratones deficientes en distintos PRRs, y luego infectados con *Chlamydia spp.*, demostraron que la ausencia de Nod1, TLR4 y TLR9 no tenía efectos significativos sobre la carga bacteriana en tracto genital, ni consecuencias sobre el daño en tejido (Darville y col. 2003; Welter-Stahl y col. 2006). En el caso de ratones deficientes en TLR2 (TLR2<sup>-/-</sup>), se observó que desarrollaban una infección similar a los controles, eliminando la bacteria de manera equivalente pero mostrando menor daño tisular en el tracto genital femenino superior. Estos datos sugieren que el receptor TLR2 participaría en la respuesta inmune patológica observada en la infección por *Chlamydia* (Darville y col. 2003). Se conoce que el factor de activación mieloide 88 (MyD88) participa en la señalización de la mayoría de las vías activadas por los TLRs, y es una molécula involucrada en la inducción de citocinas inflamatorias. Cuando ratones deficientes en esta molécula (MyD88<sup>-/-</sup>) fueron infectados por *Chlamydia*, se observó que presentaban una eliminación bacteriana demorada, efecto atribuido a una disminución en la capacidad de activar la respuesta inmune adaptativa contra el patógeno (Chen y col. 2010; Nagarajan y col. 2011). De esta manera, los PRRs situados en células epiteliales o inmunes presentes en tracto genital, y PAMPs provenientes de *Chlamydia*, pueden condicionar el desarrollo de

la infección en el tracto genital. Además serían capaces de estimular y/o modular la inmunidad adaptativa en respuesta a la infección mediante la regulación de la secreción temprana de citocinas y quimiocinas por parte del hospedador. Es importante destacar que todos estos estudios han sido realizados en el modelo de infección del tracto genital femenino, no existiendo aún información sobre la importancia de estos receptores en la eliminación de *Chlamydia* en el TUGM.

Como se mencionó anteriormente, las **células epiteliales** son las primeras en contactar con *Chlamydia*. A pesar de no ser consideradas parte del sistema inmune clásico, estas células son capaces de iniciar y sostener una respuesta inmune innata contra los microorganismos patogénicos (Figura 2). Las células epiteliales responden frente a estos micro-organismos reconociéndolos a través de PRRs y activando diferentes vías de señalización que llevan a la producción de ciertas citocinas, quimiocinas y péptidos antimicrobianos (Mackern Oberti y col. 2011b). La secreción de estos mediadores es crucial para la activación de los leucocitos residentes, así como para el reclutamiento de leucocitos circulantes hacia el sitio donde se está montando la respuesta inmune. Se sabe que células epiteliales humanas y murinas infectadas con *C. trachomatis* producen citocinas pro-inflamatorias como por ejemplo IL1 $\beta$ , IL6, TNF $\alpha$  (Johnson, 2004). También son capaces de producir quimiocinas como la derivada de queratinocitos (KC) y la IL8, las cuales tienen la función de reclutar células de la inmunidad innata como neutrófilos, las células *natural killer* (NK) y células dendríticas (CD) que son abundantes en la mucosa genital. También se ha podido determinar que los epitelios uretrales pueden secretar defensinas, las cuales presentan actividad protectora contra *C. trachomatis*. Estas defensinas son proactivas y adquieren actividad biológica cuando son clivadas por ciertas enzimas presentes en el sitio de la infección (Porter y col. 2005).

Los **neutrófilos** son una de las primeras poblaciones celulares de la inmunidad innata que son reclutadas al sitio de la infección por *C. trachomatis*. Se postula que ellos reducen la infección limitando la diseminación de esta bacteria. Se ha descrito que neutrófilos humanos son una fuente importante de péptidos antimicrobianos que poseen actividad anti-chlamydia. Sin embargo, los neutrófilos de ratones carecen de la expresión de defensinas (Risso 2000). En animales infectados por *Chlamydia* y depletados de neutrófilos, se observa una alta carga bacteriana en comparación con el grupo control de animales infectados sin depletar. Sin embargo, se ha visto que la resolución de la patología en estos dos grupos experimentales ocurre al mismo tiempo post-infección (pi). Estos resultados limitan el entendimiento de la función de los neutrófilos durante la infección por *C. trachomatis*, por un lado sugiriendo que los mismos ayudan a resolver la infección y por

el otro, algunos autores postulan que podrían facilitar la propagación de la infección al provocar la ruptura del epitelio infectado (Rank y col. 2008).



**Figura 2: Respuesta Inmune Innata y adaptativa frente a la infección por *Chlamydia*.** Tras la infección, las células epiteliales del tracto genital responden secretando quimiocinas, citoquinas y defensinas. Las primeras poblaciones reclutadas son los neutrófilos constituyendo la primera defensa contra el patógeno. Las células presentadoras de antígeno (CPA), tales como macrófagos y células dendríticas (CD), arriban al sitio de la infección en donde comienzan a liberar citocinas pro-inflamatorias como IFN $\gamma$  e IL12. Estas citocinas, a su vez activan las células *natural killer* (NK), a los mismos macrófagos e inducen la maduración de los linfocitos T (LT) vírgenes CD8 $^{+}$  o CD4 $^{+}$ . Los LT CD4 $^{+}$ , en función al ambiente de citocinas presente en el sitio de la inducción de la respuesta inmunológica, se pueden polarizar hacia un perfil T helper 1 (Th1) o T helper 2 (Th2). Linfocitos Th1, mediante su receptor (TCR), pueden interactuar con linfocitos B (LB) a través del reconocimiento de un péptido específico de *Chlamydia* presentado por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) presente en la membrana del LB en este caso. Los LB pueden generar anticuerpos específicos para estructuras antigénicas de la bacteria. Durante la infección por *C. trachomatis* se ha descrito la presencia de IL10 producida por células dendríticas plasmacitoideas (pCD) y otras fuentes celulares aún no identificadas. Figura modificada de Redgrove y McLaughlin 2014.

Las **células NK** también son reclutadas rápidamente al sitio durante la infección por *C. trachomatis*. Estas células reconocen y lisan células infectadas por *Chlamydia* y, al mismo tiempo, secretan grandes cantidades de IFN $\gamma$ , citocina que polariza la respuesta inmune hacia un perfil Th1 protector, favoreciendo así la eliminación bacteriana. Además se ha reportado que la capacidad de células NK para eliminar a la bacteria se ve incrementada en presencia citocinas pro-inflamatorias como IL12 o IFN $\gamma$  presentes en el medio (Reading y col. 2006).

Los **macrófagos** son células fagocíticas del sistema inmune y provienen de la diferenciación de monocitos circulantes. Estas células poseen también la capacidad de realizar presentación antigénica. Expresan en su superficie PRRs que les permiten reconocer PAMPs expresados en diferentes patógenos y también receptores de moléculas asociadas al daño (DAMPs) (Kawai y Akira 2005; Jounai y col. 2012). Durante la infección con *Chlamydia*, los macrófagos migran al sitio donde se está montando la respuesta inmune, fagocitan la bacteria, y dependiendo del receptor o receptores que se activen (PAMPs/DAMPs), estos macrófagos pueden producir diversas citocinas (Redgrove y McLaughlin 2014). Los macrófagos son principalmente activados por IFN $\gamma$ , que puede provenir de varias fuentes celulares (ej., LT CD4 $^+$ , LT CD8 $^+$ , NK), incrementando su capacidad de presentar antígenos en su superficie, la producción de citocinas inflamatorias, la generación de mediadores tóxicos y la fagocitosis mediada por el complemento. La destrucción de *Chlamydia*, una vez que es fagocitada por el macrófago, ocurre mediante la autofagia, un proceso por el cual las células degradan proteínas del citoplasma y organelas (Al-Zeer y col. 2013).

Las **CD**, son reconocidas por ser las células presentadoras de antígenos (CPA) por excelencia y participan como nexo entre la inmunidad innata y la adaptativa. Estas células captan y procesan el antígeno para luego presentarlo a los linfocitos específicos. Además de presentar antígenos, las CD producen citocinas y señales que modulan la respuesta inmune hacia diferentes perfiles, razón por la cual las CD son blancos elegidos para diseñar vacunas que generen protección contra esta bacteria (Brunham y Rey-Ladino 2005; Karunakaran y col. 2008; Brunham y Rappuoli 2013). Durante la infección murina con *Chlamydia*, se ha reportado la activación de dos subtipos de CD, las células CD11b $^+$  clásicas y las CD plasmacitoideas (Moniz y col. 2009). En modelos murinos, la infección genital indujo el influjo de estos dos tipos de CD al tracto genital femenino y también a los nódulos drenantes. La infección estimuló la expresión de moléculas coestimuladoras en CD clásicas y la secreción de citocinas asociadas al perfil Th1. Sin embargo en CD plasmacitoideas se observaron bajos niveles de moléculas coestimuladoras y producción de IL6 e IL10. Otros autores también reportaron la presencia de CD productoras de grandes concentraciones de IL10 en tracto genital femenino inferior, la cual se asoció a la inducción de linfocitos T regulatorios (Marks y col. 2010).

Si bien la respuesta inmune innata en tracto genital femenino mediada principalmente por las células epiteliales, neutrófilos, células NK, macrófagos y CD actúa como la primera defensa contra *Chlamydia* respondiendo en forma rápida, la misma no es suficiente para detener el avance de la bacteria y además no tiene capacidad de generar memoria inmunológica. Al presente, se cuenta con poca información respecto a que tipos

celulares son reclutados y que tejidos son los principalmente afectados durante la infección del TUGM por *Chlamydia*.

### **Respuesta inmune adaptativa**

La respuesta inmune adaptativa es la que intentará eliminar por completo al patógeno y proveerá protección en el caso de que ocurra una nueva exposición (Figura 2). Existen dos tipos celulares que participan de la respuesta adaptativa; los **Linfocitos T** (LT) y los **Linfocitos B** (LB). Estas poblaciones celulares tienen la capacidad de reconocer antígenos extraños usando receptores específicos presentes en sus membranas. Cuando estas poblaciones celulares no pueden cumplir correctamente su función o por algún motivo no están presentes, *Chlamydia* desarrolla infecciones crónicas en el hospedador. Ejemplo de ello se observa en ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID, que no tienen LT ni LB), o en ratones “nude”, (que no tienen LT maduros), los que presentan infecciones prolongadas en el tiempo con cargas bacterianas elevadas (Hawkins y col. 2002; Pal y col. 2009).

Los **Linfocitos T** son incapaces de reconocer antígenos de patógenos sin la ayuda de las CPA (como las CD y los macrófagos). Una vez que estas células fagocitan los CE, o células infectadas que contienen los CR, los procesan y presentan los péptidos de degradación en el contexto de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I/II. De esta forma los LT que posean en su superficie el receptor específico para los péptidos presentados en el contexto de MHC, son los que se van a activar y podrán ejercer sus funciones. Estudios realizados en animales y en pacientes indican que LT CD4<sup>+</sup> y LT CD8<sup>+</sup> están presentes en el sitio de infección con *Chlamydia* (Morrison and Morrison 2000; Rank y col. 2000) y son capaces de reconocer diferentes antígenos de la bacteria (Redgrove y McLaughlin 2014).

Se ha demostrado que el perfil de respuesta inmunológica Th1 es el más apropiado para eliminar bacterias intracelulares, como es el caso de *Chlamydia*. Así es que, cuando los LT CD4<sup>+</sup> son activados hacia este perfil de respuesta, proliferan, se diferencian y migran hacia el sitio de la infección, liberando allí grandes cantidades de IFN $\gamma$  que ayuda a controlar la infección bacteriana. De hecho, en animales que no poseen esta población celular (CD4<sup>-/-</sup>), la infección *clamidial* transcurre con mayor carga bacteriana y se genera poca protección frente a una re-infección (Johansson y col. 1997a). Para que se produzca el perfil de respuesta Th1 se necesita de IL12, principalmente liberada al espacio extracelular por las CD en el sitio de la infección o en los ganglios drenantes. Se ha visto que CD pulsadas en cultivo con *Chlamydia* muerta y luego transferidas a ratones antes del

desafío con la bacteria, secretan grandes cantidades de IL12, provocando una fuerte polarización de la respuesta inmune hacia un perfil Th1, generando así protección contra el patógeno. Se sabe que este tipo de inmunización no solo puede reducir la carga bacteriana en el tracto genital de los ratones, sino que también evita el desarrollo de la enfermedad inflamatoria en el tejido y sus secuelas obstructivas (hidrosalpingitis) (Su y col. 1998). Ratones deficientes en el receptor del IFN $\gamma$  muestran mayores cargas bacterianas y gran diseminación de la infección, resultados que también refuerzan la importancia del perfil Th1 en la protección (Wang y col. 1999).

En relación al subtipo de linfocitos T CD4<sup>+</sup> Th2, la bibliografía indica que estas células no generan protección contra la infección por *Chlamydia*. Las citocinas IL4, IL5, IL13 no tienen influencia sobre el *clearance* de la bacteria y en algunos casos se asocian con exacerbación de la patología (Wang y col. 1999). Durante la infección, se ha observado también la generación de LTh17. La IL17 no tiene efecto directo sobre *C. trachomatis in vitro*, pero si aumenta la producción de mediadores inflamatorios responsables de reclutar leucocitos al sitio. Intentos para dilucidar el rol de Th17 en infección por esta bacteria no han sido concluyentes (Meara y col. 2014). La depleción de IL17ra resultó en la reducción del reclutamiento de LTh1. Ratones IL17ra<sup>-/-</sup> resuelven la infección normalmente y no se observan diferencias en la inmunopatología cuando se comparan con ratones *wild type (wt)* (Scurlock y col. 2011). Utilizando ratones IL17ra<sup>-/-</sup>, los autores demostraron que IL17 contribuye a la generación de LTh1 y al reclutamiento de neutrófilos, pero no tendría efecto sobre el reclutamiento de macrófagos o la resolución de la infección. Con respecto al subtipo de linfocitos CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (Treg), se observó que la depleción de esta población previo a la infección redujo marcadamente el número de LTh17, observándose menor inflamación y reclutamiento de neutrófilos (Moore-Connors y col. 2013). La bibliografía presenta diferentes datos en relación al rol que cumplen los LT CD4<sup>+</sup> en el curso de la infección por *Chlamydia*. Un aspecto importante a tener en cuenta es que se ha observado que estos dependen principalmente de la especie de *Chlamydia* que se utilice para infectar los animales (Morrison y col. 2011).

Por otro lado, los LT CD8<sup>+</sup> serían capaces de inducir una protección parcial en animales infectados por *Chlamydia*. Estos ejercerían un rol protector ejecutando varios mecanismos, que incluyen: citotoxicidad vía exocitosis de gránulos, producción de péptidos antimicrobianos, producción de quimiocinas y citocinas (Wizel y col. 2008). Esta reducida protección de LT CD8<sup>+</sup> citotóxicos frente a la infección por *Chlamydia* podría ser atribuida a una inhibición de la presentación antigénica por parte del tejido epitelial infectado, lo que no permitiría la activación de los LT CD8<sup>+</sup> (Meara y col. 2014). Además, también se ha reportado el aumento en la expresión de ciertas moléculas inhibitorias en los tractos

infectados por esta bacteria. Por ejemplo, el incremento de la expresión de PD-L1 en el tracto genital femenino debido a la infección por *C. trachomatis*, que altera el fenotipo de memoria de los LT CD8<sup>+</sup> y disminuiría su función efectora, limitando así la capacidad de los LT CD8<sup>+</sup> para controlar la infección (Fankhauser y Starnbach 2014).

Sin duda, ambas poblaciones celulares de LT (CD4 y CD8) contribuyen a la inmunidad contra la infección del tracto genital femenino por *Chlamydia*, existe bibliografía que apoya tanto a los LT CD4<sup>+</sup> como a los LT CD8<sup>+</sup>, independientemente uno de otro, por su capacidad de mediar protección contra esta bacteria a través de la producción de IFN $\gamma$  (Nogueira y col. 2015). Es importante tener en cuenta, además que los LT también participan activamente en el daño generado en el tracto genital, como producto de la respuesta inmune montada contra el patógeno. Por ejemplo, los LT CD8<sup>+</sup> citotóxicos han sido fuertemente vinculados con el desarrollo de la patología en oviducto en tracto genital femenino. Estos hechos se sustentan en los datos obtenidos con experimentos de depleción de LT CD8<sup>+</sup>, de perforina, o de la proteína asociada con la presentación antigénica TAP1, en ratones infectados con *Chlamydia*. En estas situaciones, se observó una reducción significativa en el daño del tejido genital, sin afectar la cinética de eliminación bacteriana revelando un rol patogénico para los LT CD8<sup>+</sup> en la inducción del daño tisular (Murthy y col. 2011; Kamalakaran y col. 2013).

En las infecciones bacterianas, además de los LT, la inmunidad adaptativa cuenta con la población de **Linfocitos B**. Los LB participan activamente durante la generación de una respuesta inmune como CPA, como células productoras de anticuerpos, y también a través de su capacidad de secretar citocinas que son capaces de regular las respuestas inmunes. En los últimos años, se ha descrito una población de LB que a través de la producción de IL10 regulan negativamente las respuestas inmunes (Dilillo y col. 2010).

En relación a los anticuerpos producidos por esta población celular, la capacidad de los mismos de proteger al hospedador durante la infección por *Chlamydia* no se encuentra completamente dilucidada. Dentro de los mecanismos por los cuales los LB y sus anticuerpos participarían, se puede citar a la neutralización de la bacteria mediada por anticuerpos (Bartolini y col. 2013). En este sentido, se ha demostrado que la transferencia adoptiva de anticuerpos monoclonales contra epítopes inmuno-dominantes anti MOMP, un antígeno de membrana de *Chlamydia*, puede proteger a los ratones contra la infección en tracto genital femenino (Cotter y col. 1995). De manera interesante, un estudio *in vitro*, demostró que los anticuerpos pre-existentes contra los antígenos principales de superficie de *Chlamydia*, como MOMP y LPS, pueden bloquear la unión de otros anticuerpos protectores, como los dirigidos contra la proteína polimórfica de membrana D (PpmD). Esto podría impedir la acción de otros anticuerpos neutralizantes potencialmente más eficaces

(Crane y col. 2006). Anticuerpos de isotipo IgA e IgG son capaces de neutralizar especies de *Chlamydia in vitro*, y el aumento de los títulos de estos anticuerpos específicos durante el curso de la infección; muchas veces, se ha asociado directamente con una mejor eliminación de la bacteria (Meara y col. 2014). Se piensa que la IgA secretora reduce la infección al impedir directamente la unión o interacción de la bacteria con las células epiteliales del hospedador. En este sentido, se encontró un incremento significativo en la infectividad de *Chlamydia* cuando se evaluó la misma en animales que no tenían IgA en el tracto genital. Estos animales eran deficientes en el receptor de inmunoglobulina polimérica que es el responsable del transporte de esta inmunoglobulina hacia el lumen del tracto (Cunningham y Beagley 2008). El potencial rol neutralizante de la IgG específica para *Chlamydia* parece ser independiente de la agregación y de la inducción del complemento (Caldwell y Perry 1982). Otro mecanismo por el cual los anticuerpos podrían actuar, es la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos, en donde anticuerpos específicos se unen a células blanco para posteriormente generar su lisis. Se ha demostrado que ratones deficientes en receptores para la fracción constante (Fc) de los anticuerpos, evidenciaron un aumento en la carga bacteriana en el tracto genital femenino después de re-infectarlos con este patógeno, lo que indicaría la posible participación de la citotoxicidad celular dependiente de IgG, la opsonización y la fagocitosis por macrófagos (Moore y col. 2002). Además, los LB colaboran en la formación de complejos inmunes (antígeno-anticuerpo) que terminan por unirse a receptores expresados sobre las CPA. Esto aumentaría la fagocitosis de *Chlamydia* y la presentación a LT CD4<sup>+</sup> (Igietseme y col. 2004).

A pesar de que durante la infección se producen anticuerpos específicos, desde hace mucho tiempo se ha asociado a los LB con una pobre o baja participación en la eliminación de *Chlamydia* durante una infección primaria. Algunos datos experimentales apoyan la idea de que los anticuerpos serían importantes en la protección frente a una segunda exposición al patógeno. Con el objeto de apoyar esta idea, se realizó un estudio en donde se demostró que la transferencia pasiva de suero de un ratón infectado por *Chlamydia* a un ratón deficiente en LB, le confirió protección completa frente una re-infección en ausencia de la inmunidad mediada por LT (Morrison y Morrison 2005). En un esfuerzo por establecer la contribución de las distintas poblaciones de la inmunidad adaptativa que podrían actuar frente a una re-infección por *Chlamydia*, algunos investigadores llevaron a cabo una serie de experimentos eliminando LT CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, o ambas poblaciones y se demostró que cuando la inmunidad mediada por anticuerpos está intacta, ninguna de estas poblaciones son absolutamente necesarias para la resolución de una re-infección por este microorganismo. Por otra parte, cuando se realizaron experimentos similares en ratones deficientes en LB, estos ratones fueron incapaces de

resolver esta infección sólo en ausencia de LT CD4<sup>+</sup> (Morrison y Morrison 2001). De esta manera la importancia de los LB como productores de anticuerpos ha sido demostrada en la re-infección por *C. trachomatis*, mientras que su rol y el de los anticuerpos en la primo-infección no se encuentra dilucidado.

Menos aún se conoce a cerca del rol de otras actividades funcionales de los LB en la respuesta contra *C. trachomatis*. Recientemente, los LB reguladores se han descrito como un subtipo de LB que modulan las respuestas inmunes en numerosas infecciones bacterianas principalmente mediante la producción de IL10 (Lee y Kung 2012). Sin embargo, en la infección por *Chlamydia* se desconoce si esta población de LB reguladores tienen alguna participación.

En conjunto, estos hallazgos demuestran que la resolución de la infección primaria de tracto femenino por *Chlamydia* sería dependiente de la respuesta proporcionada principalmente por LT CD4<sup>+</sup> Th1 y que los LB a través de la producción de anticuerpos tendrían una activa participación durante la re-infección. La participación de los LB como células productoras de citocinas que modulen la respuesta inmune en la infección por *C. trachomatis* ha sido, hasta ahora, escasamente explorada.

### **Chlamydia y sus mecanismos de evasión de la respuesta inmune**

Como se describió con anterioridad, durante la infección del tracto genital por *Chlamydia*, se genera una respuesta inflamatoria. Previamente mencionamos que en ciertos individuos, *C. trachomatis* puede persistir asintómicamente por muchos meses antes de ser completamente eliminada (Parks y col. 1997; Golden y col. 2000). Un área de intensa investigación actualmente, se centra en estudiar los mecanismos que esta bacteria sería capaz de utilizar para desarrollar infecciones persistentes.

Distintos investigadores han descrito una amplia variedad de estrategias que *Chlamydia* podría usar para desestabilizar la respuesta inmune del hospedador (Bastidas y col. 2013) y persistir por largos periodos de tiempo. Una de estas estrategias es la capacidad de *Chlamydia* de bloquear la vía de activación del factor NF-κB. Se ha observado que esta bacteria bloquea la degradación de un factor de inhibición de NF-κB y con ello impide la translocación de NF-κB al núcleo. Esta actividad ha sido atribuida a las proteínas ChlADub1 y ChlADub2 las cuales interfieren con las vías de ubiquitinación celular (Misaghi y col. 2006). Se ha demostrado que *Chlamydia* también bloquea la activación de NF-κB directamente a través de la proteólisis de la subunidad p65/RelA. Esta capacidad ha sido atribuida a la proteína de *Chlamydia* CPAF (*Chlamydial protease-like activity factor*)

(Christian y col. 2010). Debido a que NF- $\kappa$ B es un factor crucial en las vías de inducción de mediadores inflamatorios, la estrategia de *Chlamydia* por este camino es bloquear la inducción de mediadores inflamatorios y con ello generar una inflamación menor con menor reclutamiento de células inmunes efectoras que podrían eliminarla.

Se ha reportado que *Chlamydia* también ha desarrollado un mecanismo para limitar el reconocimiento de PAMPs garantizando la estabilidad de la inclusión durante los estadios intracelulares de la infección. Esto lo logra mediante la reorganización de actina y filamentos intermedios en la periferia de la inclusión *clamidial*, evitando así la fuga de contenidos de la inclusión al citoplasma, lo que sería detectado por la célula hospedador y culminaría con la inducción de la quimiocina IL8, entre otras (Kumar y Valdivia 2008). La estrategia de *Chlamydia*, mediante esta vía, es bloquear la inducción quimiocinas y el reclutamiento de células inmunes.

Se ha demostrado, además, que *Chlamydia* ha desarrollado estrategias que le permiten limitar su detección por parte de LT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Esto lo hace también a través de la proteína CPAF, promoviendo la degradación de los factores RFX5 y USF-1 reguladores de la inducción de los genes del MHC tipo I y II mediada por IFN $\gamma$  (Germain, 1994). La proteína CPAF de *Chlamydia* también estimula la degradación de las moléculas CD1d y de proteínas MHC-*like* involucradas en la estimulación de células NK y NKT (Kawana y col. 2007, 2008). La proteína CPAF también es capaz de clivar un grupo de proteínas secretadas por la misma bacteria cercenando la habilidad de estos antígenos para la presentación antigénica (Jorgensen y col. 2011). De esta manera, al bloquear la inducción de moléculas involucradas en la presentación antigénica, como moléculas del MHC, CD1d y otras y también bloquear la disponibilidad de antígenos para la presentación antigénica, la bacteria se hace menos visible para la inmunidad adaptativa.

También se ha visto que *Chlamydia* interfiere con múltiples vías pro-apoptóticas y necróticas garantizando su sobrevivencia en la célula hospedador (Yu y col. 2010). Esto lo haría mediante la degradación, mediada por CPAF de las proteínas pro-apoptóticas Bad, Bim y Puma (Pirbhai y col. 2006). Se ha reportado además que la bacteria promueve la estabilización de inhibidores apoptóticos como la proteína IHF-1 $\alpha$  y la inducción de factores de sobrevivencia como Mcl-1 (Sharma y col. 2011).

Como se mencionó anteriormente, las respuestas Th1 y el IFN $\gamma$  son claves para la eliminación de esta bacteria intracelular. Sin embargo *Chlamydia* es capaz de desarrollar formas persistentes en presencia de IFN $\gamma$ . Se ha demostrado que el IFN $\gamma$  induce la depleción de triptófano mediante la inducción de la enzima IDO. La depleción de triptófano es perjudicial para esta bacteria ya que se trata de un aminoácido esencial para su

crecimiento. En esta situación, *Chlamydia* induce la expresión de triptófano sintetasa con la que puede sintetizarlo y ser rescatada de la inanición de triptófano. En esta situación de estrés la bacteria forma los cuerpos aberrantes (CA), también llamados formas o estados persistentes (Meara y col. 2014). Esta situación ha sido descrita para *C. trachomatis*, pero no para la especie *C. muridarum*, ya que esta última carece de la enzima triptófano sintetasa. De esta manera, aunque las células del sistema inmune liberen IFN $\gamma$  en el sitio, la bacteria tiene la capacidad de persistir.

Además de los mecanismos antes descritos, distintos investigadores han sugerido que *Chlamydia* es capaz de regular la respuesta inmune del hospedador mediante la modulación de la expresión de citocinas anti-inflamatorias (Batteiger y col. 2010; Hakimi y col. 2014b). Algunos estudios indican que el desbalance en la producción de IL10 puede estar asociado al desarrollo o establecimiento de infecciones crónicas. En este sentido, se ha reportado la producción de IL10 durante la infección por *Chlamydia* (del Rio y col. 2013). La inducción de la citocina anti-inflamatoria IL10 durante la infección podría tener efectos beneficiosos y perjudiciales. Su producción podría favorecer la tolerancia contra antígenos propios liberados durante la infección en el tracto genital y ayudar a alcanzar la homeostasis inmune después de la eliminación de *Chlamydia* (Hakimi y col. 2013). Por otra parte, la producción de IL10 podría inhibir la generación de respuestas que involucren IFN $\gamma$  y otras citocinas reguladas por IL10.

La IL10 es la principal citocina anti-inflamatoria, y es producida por diversos tipos celulares que constituyen el sistema inmune, entre los que podemos mencionar a LT regulatorios, LTh2, LB, macrófagos activados y otras poblaciones (Zhang, 2013). Existen dos factores de transcripción que son importantes para la regulación de la expresión de IL10 por parte de las células inmunes, el factor SP1 y el factor SP3. El gen de IL10 está localizado en la posición lq31-lq32 y tiene aproximadamente 5,2 kB. Está compuesto por cinco exones que codifican para una proteína de 178 aminoácidos llamada pro-IL10 (Hakimi y col. 2014b). Esta pro-IL10 necesita clivarse para ser activada y tener la capacidad de interactuar con su receptor (IL10R). La interacción entre IL10/IL10R produce la activación de varias cascadas intracelulares. Al tratarse de una citocina con características regulatorias, actúa reduciendo las funciones inflamatorias de varios tipos celulares como LTh1, LTh2, LB, NK, macrófagos y CD (Sabat y col. 2010; Scapini y col. 2011). Como se mencionó anteriormente, las fases tempranas de una infección son las etapas claves en las cuales la inflamación y la respuesta regulatoria y/o de memoria son preferencialmente inducidas (Duell y col. 2012). La calidad de la respuesta inmune que se logre montar durante esta ventana de tiempo será la que determinará el curso de la infección. Recientes estudios indican que niveles elevados de IL10 en etapas tempranas

de la infección pueden dirigir el desarrollo de la respuesta inmune celular hacia una respuesta más bien del tipo regulatoria. Debido a esto, una producción a tiempos inapropiados o en niveles elevados de esta citocina podría alterar la eliminación del patógeno y por lo tanto llevar a infecciones persistentes.

Algunos estudios han demostrado que IL10 suprime la expresión de moléculas pro-inflamatorias que están asociadas con la eliminación de *Chlamydia*. En este sentido, se observó que la adición de IL10 exógena es capaz de inhibir la secreción de TNF $\alpha$ , IL6 e IL8 por parte de células epiteliales y macrófagos humanos infectados con esta bacteria (Gupta y col. 2009). Otros reportes han demostrado que esta citocina se encuentra aumentada durante el curso de la infección. Por ejemplo, se ha visto que los niveles de expresión de IL10 se encontraban significativamente incrementados en el semen de pacientes que padecían infección por *C. trachomatis*, en comparación con los niveles de expresión de IL10 en individuos sanos. Gupta y col. han demostrado que linfocitos CD4<sup>+</sup> cervicales provenientes de mujeres infértiles infectadas por esta bacteria luego de ser estimulados con antígenos de *Chlamydia*, producían mayores niveles de IL10 cuando se los comparó con las concentraciones de estas citocinas presentes en sobrenadantes de mujeres no infectadas o de mujeres fértiles infectadas por *C. trachomatis*. Por otra parte, la estimulación de CMN de sangre periférica (PBMCs) de mujeres infectadas con este patógeno produjo mayores niveles de IL10 que PBMCs provenientes de mujeres sanas (Gupta y col. 2009). En varios estudios similares, realizados con células inmunes derivadas de pacientes infectados por *Chlamydia spp*, se ha podido observar el mismo efecto (Hakimi y col. 2014b). Además, se ha demostrado que proteínas de *Chlamydia* como HSP60 y MOMP inducen la liberación de IL10 en cultivos de PBMCs aisladas de mujeres infértiles (Kinnunen y col. 2003; Vats y col. 2007). En los estudios que involucran cultivos de PBMCs se podría pensar que la liberación de IL10 podría provenir de monocitos, LT regulatorios o de LB. En todos estos casos antes citados se han observado niveles elevados de IL10, pero en ningún caso se ha analizado que tipo celular es el responsable de este aumento. Se ha sugerido, además, que polimorfismos en el gen de IL10 asociados a diferente expresión de esta citocina podrían ser considerados factores de riesgo para la persistencia de la infección (Ohman y col. 2006).

En relación a modelos de infección en ratones, también existen reportes que muestran incrementos en la citocina IL10 en el curso de la infección. Campbell y col. han reportado que la inoculación intranasal con *C. pneumoniae* resulta en un incremento en los niveles séricos de IL10 en ratones C57BL/6 (Campbell y col. 2010). En el modelo de infección de tracto femenino, se ha demostrado que el tracto genital inferior se encuentra provisto de CD secretoras de IL10 que concomitantemente inducen una pobre respuesta

Th1 (Marks y col. 2010). De manera que distintos datos muestran incrementos en IL10 durante la infección por *Chlamydia*; sin embargo, no existe en la bibliografía un análisis en relación a que tipos celulares están involucrados y menos aún respecto a si este aumento tiene un rol crítico en la eliminación de la bacteria.

### **Linfocitos productores de IL10**

Como se mencionó anteriormente, la IL10 puede ser producida por distintas poblaciones de células inmunes. Tanto los LT como los LB pueden producir IL10 y se han descrito sub-poblaciones de LT y de LB cuya principal función es la de regular las respuestas inmunes a través de la secreción de IL10.

Para el caso de los LT, a esta sub-población se la denomina linfocitos T regulatorios tipo 1 (Tr1) la cual tiene un papel importante en la promoción y el mantenimiento de la tolerancia y el principal mecanismo por el cual esta población controla la respuesta inmune es a través de la secreción de altos niveles de IL10. Los LTr1 se diferencian de las clásicas Treg Foxp3<sup>+</sup> por la falta de expresión del factor Foxp3 y la expresión del factor de transcripción cMaf. Recientemente, se han identificado a las moléculas CD49b y LAG3 como biomarcadores Tr1 específicos en linfocitos humanos y murinos. Además de ejercer su acción regulatoria mediante IL10, se ha descrito que los linfocitos Tr1 liberan granzimas y perforinas y lisan células mieloides. Los LTr1 inhiben las respuestas de otras poblaciones de linfocitos T mediante mecanismos dependientes de contacto y vía CTLA4 o PD1 (Roncarolo y col. 2014).

En el caso de los LB, además de actuar como CPA y de secretar anticuerpos, se han descrito sub-poblaciones de LB productores de IL10 con capacidad regulatoria. Estas poblaciones de LB regulatorios no poseen un fenotipo característico y no expresan factores de transcripción característicos. En ratones, se han identificado tres sub-poblaciones principales de LB maduros: LB2 foliculares, LB1 (incluyen a los CD5<sup>+</sup> B1a y CD5<sup>-</sup> B1b) y los LB de Zona Marginal (LB de ZM) (Candando y col. 2014). Las funciones reguladoras antes mencionadas se han descrito principalmente para las poblaciones celulares que poseen marcadores de superficie expresados en LB1 y en LB de ZM. Los B2 son los responsables de la respuesta frente a antígenos timo dependientes y con la colaboración de LT forman los centros germinales y generan los anticuerpos de alta afinidad. Los B1 y los LB de ZM responden rápidamente a antígenos timo independientes, producen anticuerpos de baja afinidad y reactividad amplia y además poseen una diversidad limitada en sus receptores BCRs. Por estas características se los ha llamado LB innatos (LBI) (Zhang, 2013).

Los LBI producen anticuerpos poli-reactivos, auto-reactivos y con capacidad de reconocer estructuras conservadas entre las especies. Generalmente, estos LBIs presentan ciertas características comunes: son la mayor fuente de anticuerpos naturales en estado basal, expresan altos niveles de IgM y bajos niveles de IgD en su superficie, muestran una pobre activación vía BCR seguida del entrecruzamiento de inmunoglobulinas, y son capaces de activarse después de una estimulación del tipo innata (Zhang 2013). Estos LBI se activan a través de receptores PRRs, como los TLR que son activados por patógenos microbianos, y así producen grandes cantidades de anticuerpos naturales, principalmente del tipo IgM, generando de esta forma una defensa temprana crítica contra infecciones. Se ha reportado que LPS o CpG pueden estimular a través de TLR4 o TLR9 respectivamente, a las poblaciones de LB1 y LB de ZM a producir grandes cantidades de IgM (Gunn y Brewer 2006). En experimentos *in vivo*, la inyección intraperitoneal de LPS o bacterias, genera que LB1 migren rápidamente al bazo y se diferencien a LB productores de IgM (Ha y col. 2006; Yang y col. 2007). En otro estudio, se describió que la inoculación endovenosa de *Streptococcus pneumoniae* fue capaz de que LB1 y LB de ZM se activen y se diferencien a LB productores de IgM dentro de los 3 días de producido el desafío con el patógeno (Martin y col. 2001). Cabe destacar que, además de activarse y secretar IgM, estos linfocitos pueden cumplir funciones regulatorias mediante la producción de elevados niveles de IL10.

La función regulatoria de los LB fue demostrada primero en modelos murinos de autoinmunidad (Wolf y col. 1996; Fillatreau y col. 2002; Mauri y col. 2003), y en modelos murinos de enfermedades inflamatorias (Mizoguchi y col. 2002). En el año 2006, se introdujo en la comunidad científica el término de “LB regulatorios” (Breg) para agrupar a estas poblaciones de LB que mostraban funciones regulatorias (Mizoguchi y Bhan 2006). Se ha reportado, además, que distintos tipos de microbios, tanto parásitos como bacterias, son capaces de estimular a las LBIs para que produzcan IL10, y de esta forma estas Breg pueden ejercer una función regulatoria durante el curso de la infección. Hasta el momento, sólo unos pocos estudios han abordado el papel de Bregs en las infecciones bacterianas. Por ejemplo, se ha demostrado que *Salmonella typhimurium* puede estimular directamente las células B para producir IL10 de manera MyD88 y TLR2/4 dependiente (Neves y col. 2010). Se observó que después de una infección intravenosa con *S. typhimurium*, se detectaron LB productores de IL10 en el bazo a tiempos tempranos pos-infección. La rapidez de esta respuesta sugirió que *S. typhimurium* activaba una población de LBIs, a pesar de que su fenotipo no fue descrito con detalle en ese trabajo. Utilizando ratones quiméricos que tenían LB deficientes para la molécula adaptadora MyD88 o IL10 se demostró que la producción de IL10 por LB activados de forma innata era capaz de

suprimir la inmunidad protectora contra *S. typhimurium*. En estos ratones, que carecían de LB productores de IL10, se reclutaron mayores niveles de neutrófilos y se generó una fuerte respuesta Th1 (Neves y col. 2010). Recientemente, se ha demostrado que *Listeria monocytogenes* puede estimular a los LB de ZM para producir grandes cantidades de IL10 a través de TLR2/4, y que la IL10 derivada de los LB de ZM inhibía la inmunidad innata contra esta bacteria y aumentaba la susceptibilidad del hospedador a la infección con la misma (Lee y Kung 2012). De esta manera, se ha reportado que IL10 y más precisamente la producida por LB en etapas tempranas de la infección bacteriana influencia de manera negativa la inmunidad, produciendo una modulación de la respuesta innata y adaptativa y favoreciendo la permanencia de la bacteria por más tiempo en el hospedador.

Como se expresó anteriormente, durante el curso de la infección por *Chlamydia* se ha observado producción de IL10, con datos que muestran una asociación entre la presencia de esta citocina y el aumento de la sobrevivencia de esta bacteria en el tracto genital. Sin embargo, hasta el presente, no se ha documentado que durante la infección por *Chlamydia* se induzcan linfocitos productores de IL10 Tr1 o Breg que secreten esta citocina reguladora.

## OBJETIVOS

---

Teniendo en cuenta los antecedentes previos de nuestro grupo y los antecedentes bibliográficos, se plantearon los siguientes objetivos:

### Objetivos específicos

I- Estudiar el curso de la infección por *C. muridarum* en el TUGM y la respuesta inmune innata y adaptativa generadas por la infección.

II- Estudiar el rol de la citocina anti-inflamatoria IL10 en el curso de la infección del TUGM por *C. muridarum*, la fuente celular de la misma, su posible rol modulador de la respuesta inmune y sus consecuencias sobre la eliminación bacteriana.

# RESULTADOS: Parte I

---

*Curso de la infección por C. muridarum en el TUGM y la respuesta inmune innata y adaptativa generadas por la infección.*

## I. Infección del TUGM por *C. muridarum* y la respuesta inmune generada en ratones NOD

### ***I.1 Presencia de ADN de Chlamydia durante el curso de la infección murina***

Como se mencionó anteriormente, en nuestro grupo de trabajo se han desarrollado modelos de infección *in vitro* de células epiteliales prostáticas, y también modelos de infección *in vivo* del TUGM con *C. muridarum*. Para ello, se inocularon en el meato urinario de ratas macho, simulando de esta manera la vía de ingreso natural que usa *Chlamydia* para infectar el tracto genital. Nuestros resultados previos en el modelo en ratas demostraron que la bacteria producía una infección ascendente, mostrando especial tropismo por la glándula prostática a tiempos tardíos pi.

Con el objetivo de estudiar y describir el curso de la infección del TUGM en modelos murinos, en el presente trabajo de tesis se infectó a un grupo de ratones de la cepa NOD, como se mencionó anteriormente. Se eligió esta cepa de ratones debido a que en nuestro grupo de trabajo se demostró previamente que la cepa NOD desarrolla inflamación prostática con la edad y es más susceptible a desarrollar prostatitis crónicas autoinmunes en comparación con otras cepas de ratones como las cepas C57BL/6 y BALB/c (Motrich y col. 2007). Luego de la inoculación de los animales, los mismos se sacrificaron a distintos tiempos pi, se obtuvieron los órganos del tracto urogenital y se determinó la presencia de ADN bacteriano mediante el uso de PCR convencional.

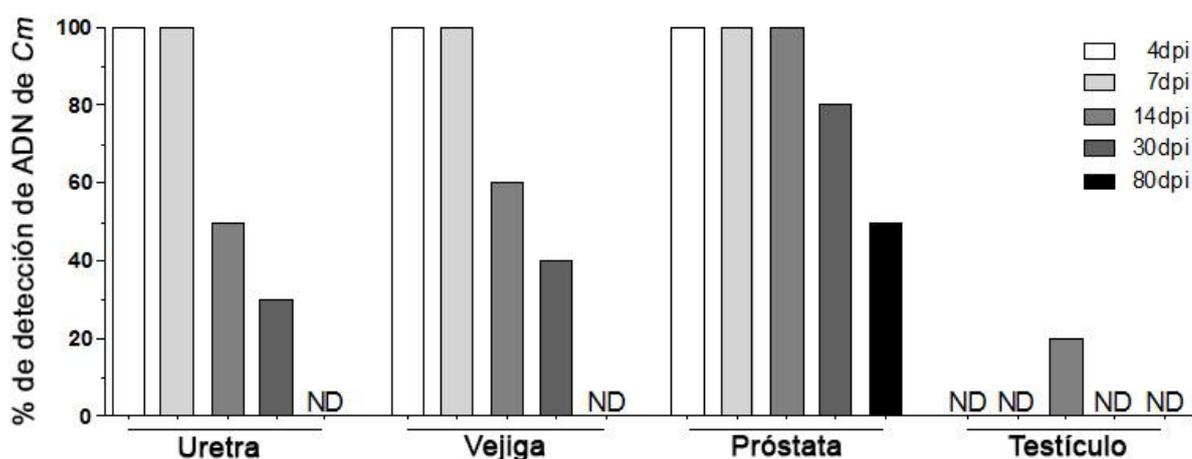
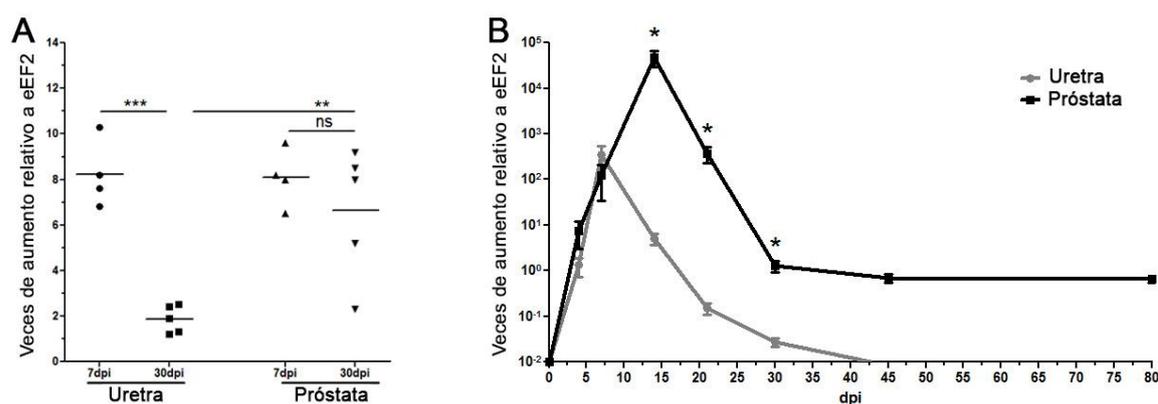


Figura 3: **Detección de *C. muridarum* en distintos órganos del TUGM.** En el gráfico se ha representado el porcentaje de tejidos positivos para *C. muridarum*, es decir, tejidos donde se pudo detectar por PCR el ADN de esta bacteria (gen OMP1). La detección fue realizada para cada tejido a distintos tiempos pos-infección. Próstata n = 20, Uretra n = 10, Vejiga y testículo n = 10. ND = No detectado, Cm = *C. muridarum*. El gráfico es representativo de tres experimentos individuales.

Como se puede observar en la Figura 3, al investigar la presencia de ADN bacteriano, a distintos tiempos pi, pudimos demostrar que en ratones NOD la bacteria desarrolla una infección ascendente a lo largo del TUGM. La uretra y la vejiga evidenciaron una cinética de presencia bacteriana muy similar, con un máximo de detección de *C. muridarum* a tiempos tempranos (4 y 7 dpi), mientras que a tiempos tardíos (80 dpi) no se observó presencia de ADN bacteriano en estos tejidos. Al analizar la presencia de ADN de *C. muridarum* en próstata, se detectó ADN bacteriano a tiempos tempranos y también este patógeno pudo ser detectado por más tiempo durante el curso de la infección. Aún a 80 dpi se pudo revelar la presencia de ADN de *C. muridarum* en el 50% de los tejidos prostáticos analizados. Estos resultados indican que la bacteria posee capacidad de permanecer más tiempo infectando próstata. Por último, cabe destacar que en tejido testicular, *C. muridarum* pudo ser detectada sólo a 14 dpi. De esta manera, pudimos concluir que *Chlamydia*, en el modelo de infección en ratones NOD, puede infectar de manera ascendente diferentes órganos que componen el TUGM y permanecer por más tiempo en próstata.

Además de analizar qué órganos presentaban ADN de *C. muridarum* en nuestro modelo experimental, nos interesó determinar la carga bacteriana en estos tejidos para poder caracterizar mejor la cinética de eliminación bacteriana. Para ello mediante PCR convencional semi-cuantitativa, se determinó la carga bacteriana en dos tejidos del TUGM: en la uretra como tejido del tracto urogenital inferior y en la próstata como órgano perteneciente al tracto urogenital superior (Figura 4).



**Figura 4: Carga bacteriana durante el curso de la infección de ratones NOD por *C. muridarum*.** A) PCR convencional semi-cuantitativa en uretra y próstata. Cada individuo está representado por un punto y la línea indica la media de esos datos, representativos de dos experimentos independientes con resultados muy similares. B) PCR en tiempo real en los mismos tejidos. Valores de expresión relativa de OMP1 en función a eEF2 (gen utilizado como control endógeno). Se muestran como la media  $\pm$  SEM, n = 5, el gráfico es representativo de dos experimentos independientes con resultados muy similares. Valores de \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 fueron considerados estadísticamente significativos, ns = no significativo.

Los resultados que se obtuvieron en estos experimentos demuestran que ambos tejidos presentaban una carga bacteriana similar a tiempos tempranos (7 dpi), con un incremento cercano a 8 veces en relación al control endógeno. Sin embargo, a los 30 dpi, la carga bacteriana en uretra disminuyó de forma significativa en comparación con lo que ocurría en próstata (Figura 4A).

Con el mismo objetivo, se realizó una PCR en tiempo real, abarcando varios tiempos pi. Los resultados de estos experimentos demostraron que la eliminación de la bacteria ocurrió mucho más rápido en la uretra comparando con lo que se observó en próstata. La máxima carga bacteriana medida en uretra se observó a los 7 dpi, mientras que en la próstata esto ocurrió a los 14 dpi. A tiempos tardíos pi (45 y 80 dpi), *C. muridarum* se encontró únicamente en el tejido prostático (Figura 4B). Estos resultados indican que esta bacteria permanece por más tiempo y en mayor cantidad infectando la próstata en el modelo desarrollado en ratones NOD.

## 1.2 Infiltrado inflamatorio en el TUGM durante el curso de la infección por *C. muridarum*

En el modelo experimental de ratas de la cepa Wistar se había observado, mediante histología, una alta incidencia de infiltrado inflamatorio intersticial en próstata y otros tejidos del TUGM (MacKern-Oberti y col. 2011c). Para continuar describiendo el modelo de infección murino utilizado, decidimos evaluar la presencia de infiltrado inflamatorio en el TUGM luego de la infección por *C. muridarum*. Para ello, ratones NOD machos se infectaron y se determinó, mediante citometría de flujo, la cantidad de células leucocitarias CD45<sup>+</sup> que estaban infiltrando cada tejido (Figura 5).

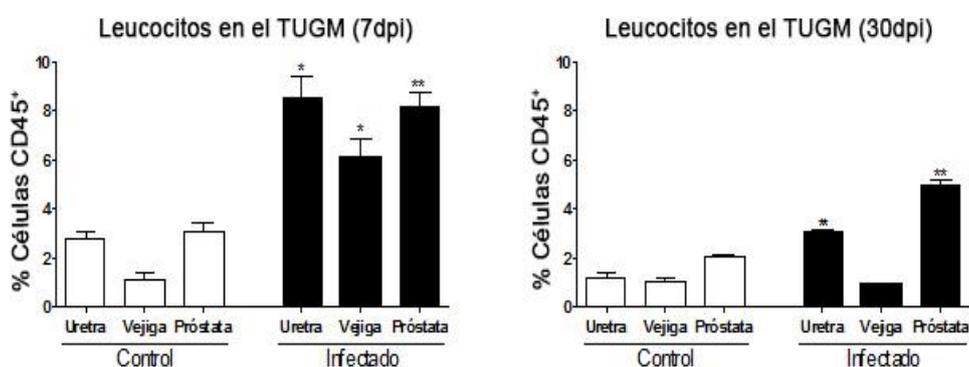
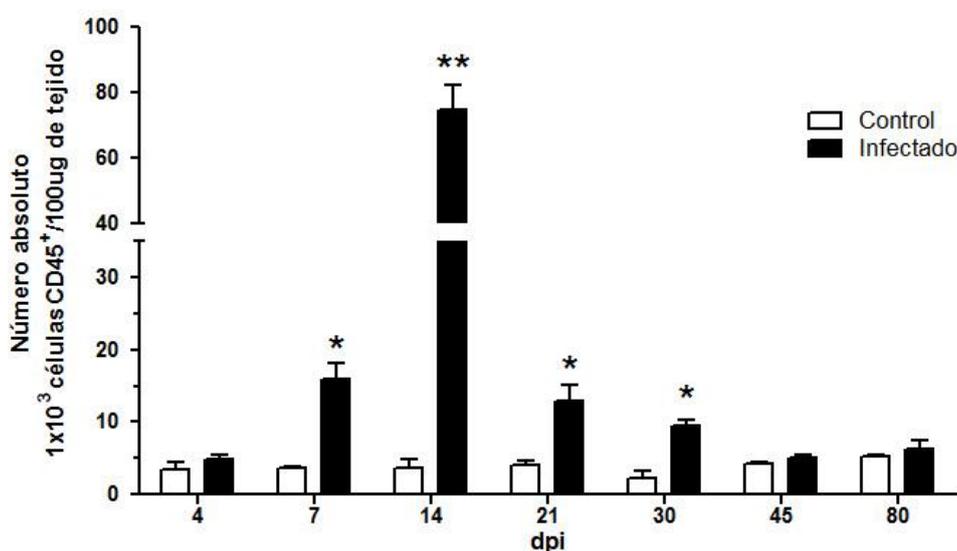


Figura 5: **Infiltrado inflamatorio en el TUGM de ratones NOD infectados con *C. muridarum*.** En los gráficos está representado el porcentaje de leucocitos (CD45<sup>+</sup>) infiltrando cada tejido a los 7 y 30 dpi. Las barras blancas corresponden al grupo control y las barras negras al grupo infectado. La detección de células CD45<sup>+</sup> fue realizada mediante citometría de flujo. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM, n = 6, el gráfico es representativo de dos experimentos independientes con resultados muy similares. Valores de \* p<0,05; \*\* p<0,01 fueron considerados estadísticamente significativos respecto al grupo control.

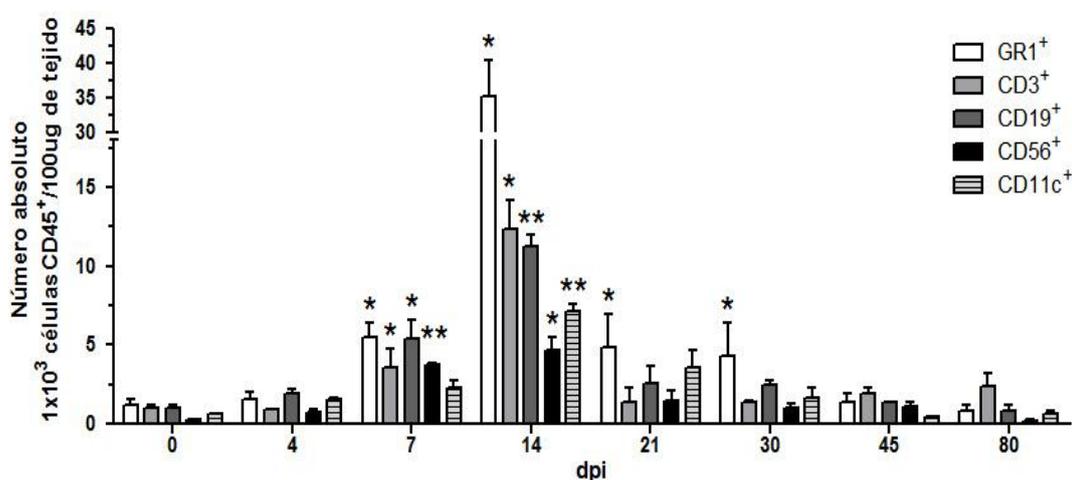
Como se muestra en la Figura 5, se observó una baja proporción de células CD45<sup>+</sup> leucocitarias en los tres tejidos analizados de los ratones controles no infectados, tratándose probablemente de leucocitos residentes. Al analizar tejidos del TUGM de ratones infectados por *C. muridarum*, se encontraron mayores porcentajes de células CD45<sup>+</sup> a los 7 dpi en uretra, vejiga y próstata, cuando se comparó con los valores observados en ratones del grupo control. Las proporciones de células CD45<sup>+</sup> a tiempos posteriores (30 dpi) fueron también significativamente mayores en uretra y en próstata, pero no en vejiga (Figura 5). Los resultados mostraron que el porcentaje de leucocitos infiltrantes disminuye a medida que transcurre el tiempo, y que esta reducción del infiltrado fue más acentuada en uretra que en próstata. Correlacionando con los resultados presentados anteriormente, se podría deducir que el infiltrado inflamatorio acompaña la presencia de la bacteria en el tejido.

Un análisis de la cinética del infiltrado inflamatorio en el tejido prostático a lo largo de la infección indicó que la presencia de células CD45<sup>+</sup> se incrementa significativamente a 7 los dpi, alcanzando un máximo a los 14 dpi, y disminuyendo paulatinamente hasta retornar a los valores basales a tiempos tardíos (Figura 6). Teniendo en cuenta la cinética de eliminación bacteriana en este tejido, se observó que el infiltrado inflamatorio en próstata presenta un perfil similar: a mayor carga bacteriana en el tejido, mayor infiltrado inflamatorio.



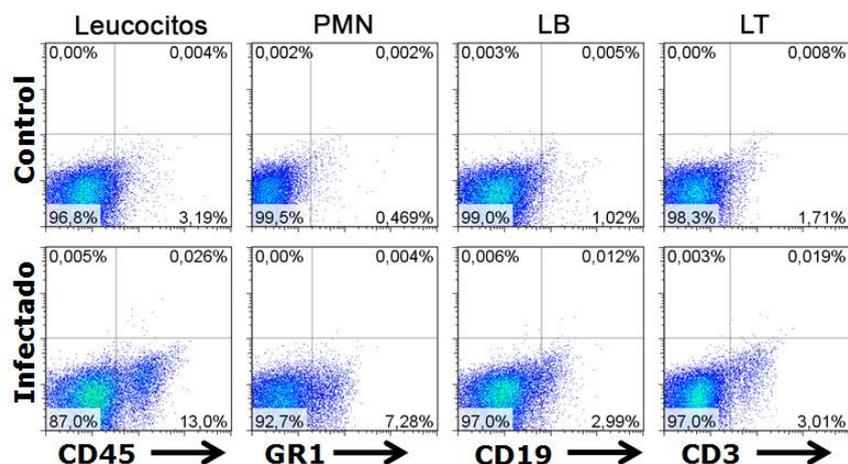
**Figura 6:** Leucocitos infiltrantes del tejido prostático luego de la infección de ratones NOD por *C. muridarum*. En el gráfico está representado el número absoluto de células CD45<sup>+</sup> cada 100 ug de tejido prostático. La detección de células CD45<sup>+</sup> fue realizada mediante citometría de flujo. Las barras negras corresponden al grupo de ratones infectados por *C. muridarum* y las blancas al grupo control. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM, n = 4, el gráfico es representativo de dos experimentos independientes con resultados muy similares. Valores de \* p<0,05; \*\* p<0,01 fueron considerados estadísticamente significativos. Cada comparación fue realizada entre el grupo control y el infectado para cada tiempo analizado.

Para conocer las poblaciones celulares que formaban parte de ese infiltrado inflamatorio, se realizaron tinciones utilizando anticuerpos marcadores de poblaciones inmunes características, seguidos de análisis por citometría de flujo. Los resultados mostraron que las poblaciones celulares que lo componían estaban formadas principalmente por células PMN ( $GR1^+$ ), siendo estas células aproximadamente la mitad de los leucocitos que infiltraban tejido prostático. Las poblaciones celulares que seguían en importancia fueron los linfocitos T ( $CD3^+$ ) y los linfocitos B ( $CD19^+$ ). Estas dos poblaciones fueron encontradas en cantidades comparables a lo largo de la cinética de la infección. También se encontraron células  $CD11c^+$  y células  $CD56^+$  en menor proporción, mostrando una cinética similar al resto de las poblaciones analizadas (Figura 7).



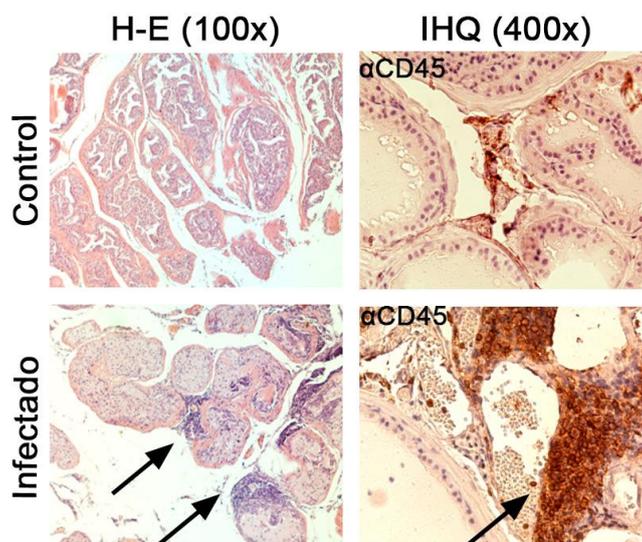
**Figura 7:** *Poblaciones celulares que infiltran la próstata en ratones infectados por C. muridarum.* La detección de células leucocitos ( $GR1^+$ ,  $CD3^+$ ,  $CD19^+$ ,  $CD56^+$ ,  $CD11c^+$ ) fue realizada mediante citometría de flujo. Se usaron distintos anticuerpos para poder discriminar las diferentes poblaciones que componen el infiltrado. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM,  $n = 4$ , el gráfico es representativo de dos experimentos independientes con resultados muy similares. Valores de \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  fueron considerados estadísticamente significativos.

En la Figura 8 se muestran gráficos representativos de densidad de puntos (*Dot-Plot*) de las poblaciones leucocitarias presentes en próstata de ratones controles e infectados en el día 14 pi. Los gráficos muestran la presencia de mayor proporción de células  $GR1^+$  (marcador de PMN),  $CD19^+$  (marcador de LB) y células  $CD3^+$  (marcador de LT) en próstata de ratones infectados.



**Figura 8:** Principales poblaciones que infiltran la próstata en ratones infectados por *C. muridarum* en el día 14 *pi*. En la figura, se muestran gráficos de *Dot-Plot* de un análisis de citometría del tejido prostático a 14 dpi. Los valores en porcentaje representan la frecuencia de células para los marcadores evaluados. Este análisis es representativo de tres experimentos independientes con resultados muy similares,  $n = 5$ .

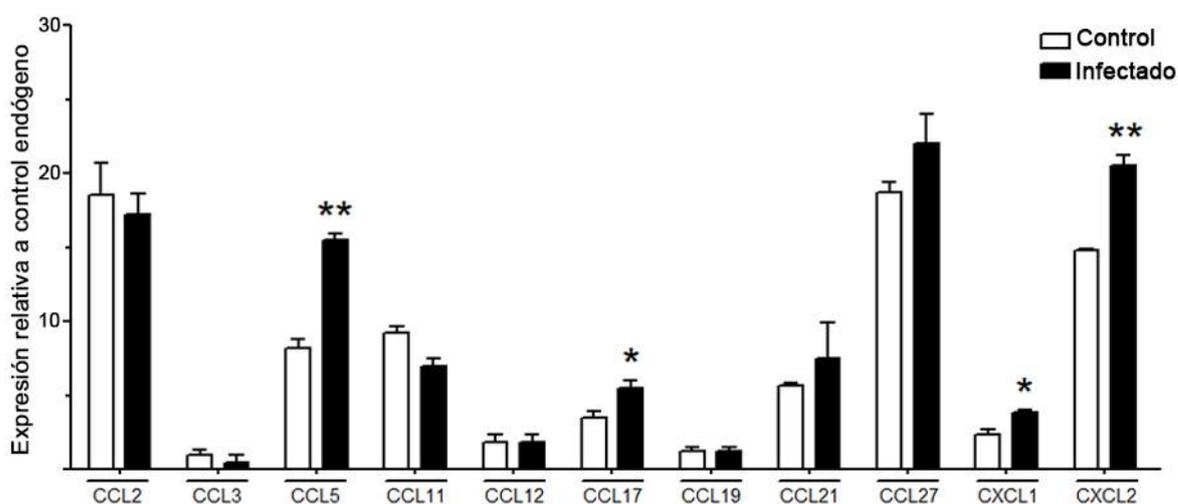
Análisis realizados en cortes histológicos de próstata de ratones de los dos grupos corroboraron los resultados anteriores (Figura 9). Cortes histológicos prostáticos coloreados con Hematoxilina-Eosina mostraron agrupaciones de CMN principalmente cercanas a vasos sanguíneos. Estudios realizados mediante inmuno-histoquímica utilizando anticuerpos contra la molécula CD45, revelaron los mismos resultados: mayores cantidades de células leucocitarias CD45<sup>+</sup> en próstata de ratones infectados (Figura 9).



**Figura 9:** Histología del tejido Prostático de ratones NOD infectados por *C. muridarum*. Los cortes histológicos fueron realizados a partir de las próstatas de animales infectados a 14 dpi y de animales controles. Las flechas indican la presencia del infiltrado inflamatorio perivascular. En el margen izquierdo se muestran cortes coloreados con Hematoxilina-Eosina (H-E), a la derecha cortes en los que se ha realizado una Inmuno-histoquímica (IHQ), utilizando el anticuerpo anti CD45 para evaluar presencia de leucocitos. Las imágenes son representativas de dos experimentos independientes con resultados similares,  $n = 6$ .

Estos resultados demostraron, por distintas metodologías, que la infección del TUGM por *C. muridarum* induce el reclutamiento de células inmunes que infiltran las glándulas prostáticas de ratones NOD.

En distintos modelos experimentales, se ha demostrado que las células leucocitarias migran a los tejidos infectados guiadas por gradientes de quimiocinas secretadas en los mismos tejidos. Hasta este momento, se han reportado aproximadamente 50 quimiocinas y se conoce que las células epiteliales del TUGM son fuente de quimiocinas luego de la infección por distintos patógenos. Debido a que observamos el reclutamiento de células leucocitarias en próstata de ratones infectados con *C. muridarum*, analizamos la expresión de distintas quimiocinas a tiempos tempranos pi (7 dpi).



**Figura 10: Quimiocinas expresadas en el tejido prostático de ratones NOD infectados por *C. muridarum*.**

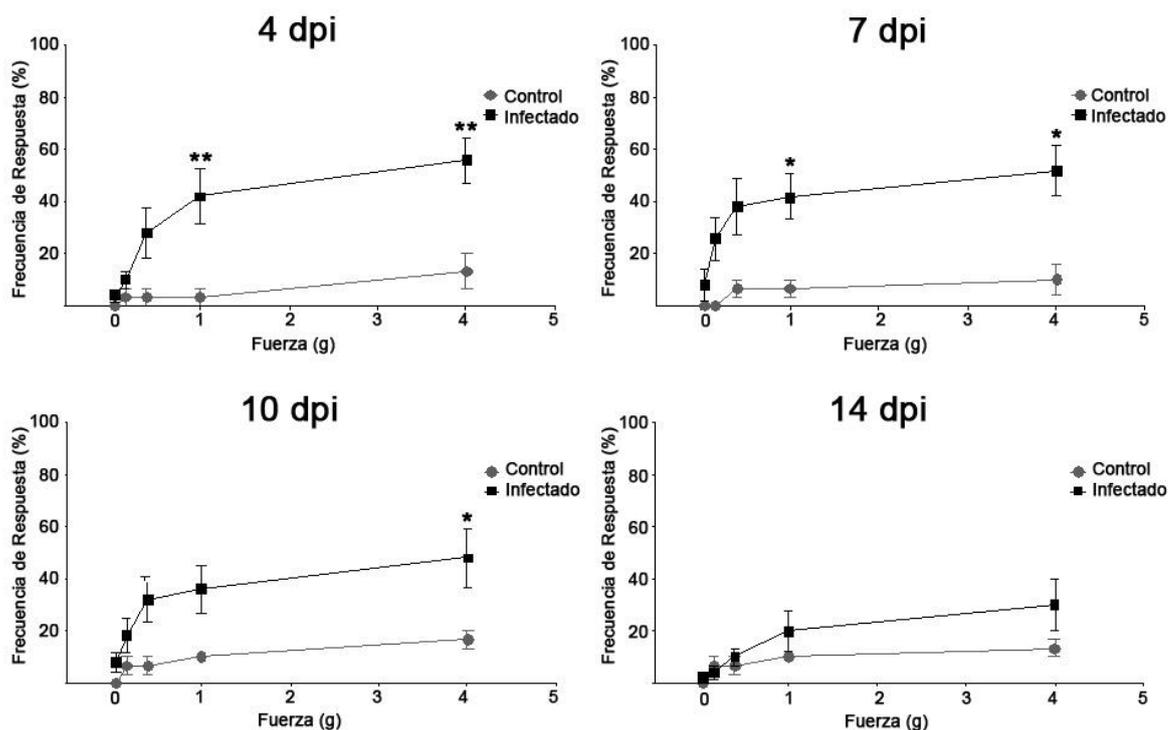
Tejido prostático obtenido en el día 7 pi de animales infectados (barras negras) y de ratones del grupo control (barras blancas) fue sometido a disgregación según se indica en la sección de materiales y métodos. Las determinaciones fueron realizadas mediante un *array* de proteínas. Cada membrana del *array* fue incubada con 300 ug de un pool de 5 próstatas de cada grupo experimental. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM. Valores de \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  fueron consideradas estadísticamente significativos.

En la Figura 10, se muestra la expresión de quimiocinas en próstata de ratones controles e infectados, en muestras de tejido obtenidas a los 7 dpi. Se observó que quimiocinas como CCL2, CCL3, CCL12 y CCL19 no mostraban diferencias cuando se comparó con los valores hallados en próstata de ratones controles. Para las quimiocinas CCL5 (RANTES), CCL17 (TARC), CXCL1 (KC) y CXCL2 (MIP-2) se observaron valores significativamente mayores en comparación con niveles presentes en próstata de ratones controles. Finalmente, las quimiocinas CCL21 y CCL27 mostraron una tendencia a valores mayores, pero los mismos no fueron estadísticamente significativos. Es importante aclarar

que se ha reportado que algunas de estas quimiocinas, como CXCL1 y CXCL2, están implicadas en el reclutamiento de células PMN, por lo que su incremento podría explicar, en parte, el infiltrado de células GR1<sup>+</sup> observado en próstata de ratones infectados.

### 1.3 Sintomatología asociada a la inflamación durante la infección por *C. muridarum*

La bibliografía indica que la presencia de inflamación en próstata se acompaña de diversa sintomatología, entre las que el dolor pélvico es uno de los signos más característicos. En modelos de inflamación prostática debido a la autoinmunidad, se han utilizado métodos que permiten evaluar la presencia y el grado de dolor pélvico asociado a la inflamación prostática (Rudick y col. 2008). Teniendo en cuenta el infiltrado inflamatorio observado durante la infección del TUGM por *C. muridarum*, nos propusimos evaluar la presencia de dolor pélvico durante la infección por este patógeno. Para ello, se realizó una prueba de comportamiento en ratones NOD infectados y controles en la cual se evalúa la alodinia táctil mediante la estimulación mecánica con filamentos de von Frey en la región pelviana.

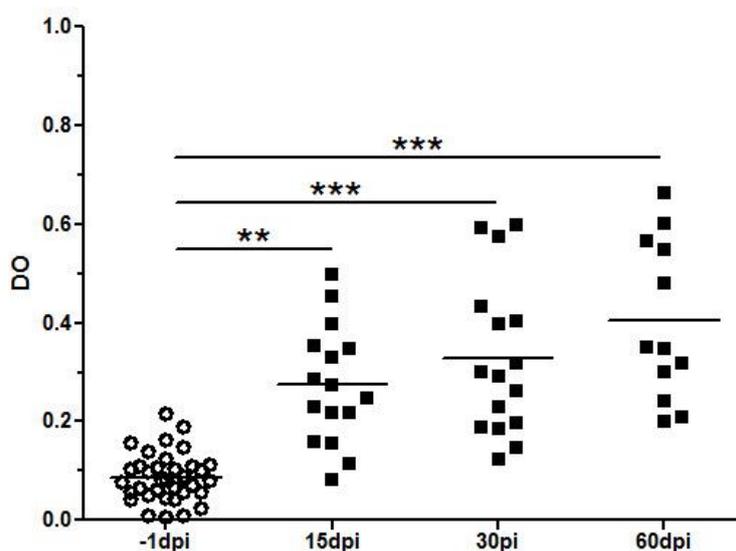


**Figura 11: Dolor pélvico durante el curso de la infección de ratones NOD por *C. muridarum*.** Como medida del dolor pélvico se evaluó la alodinia táctil a partir de la estimulación mecánica de la región pélvica usando los filamentos de von Frey, aplicando 5 fuerzas calibradas. Esta estimulación mecánica fue aplicada tanto al grupo control como al grupo infectado a distintos dpi. Los datos se muestran como la media del porcentaje de frecuencia de respuesta  $\pm$  SEM (por ejemplo, 5 respuestas de 10 = 50%),  $n = 6$ , el gráfico es representativo de dos experimentos independientes con resultados muy similares. Valores de \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  fueron considerados estadísticamente significativos.

Los resultados indicaron que en el día 4 pi los animales infectados evidenciaron mayor intensidad de dolor pélvico cuando se comparó con la respuesta observada en ratones controles (Figura 11). A medida que transcurrió la cinética de infección, el dolor se hizo menos aparente, llegando a no presentar diferencias estadísticamente significativas con el grupo de animales control a los 14 dpi. Estos resultados evidenciaron la presencia de dolor a tiempos tempranos pi.

#### ***1.4 Respuesta inmune específica durante el curso de la infección del TUGM por *C. muridarum****

Es conocido que la respuesta inmune humoral es importante para controlar distintos tipos de infecciones generadas por bacterias. En la infección del tracto femenino se ha demostrado que se induce una respuesta de anticuerpos específicos luego del primer contacto con *Chlamydia*, aunque estos anticuerpos no parecen tener rol protector en la infección primaria. Además de analizar la participación de células leucocitarias infiltrantes durante la infección del TUGM por *C. muridarum*, se evaluó la presencia o generación de anticuerpos específicos para antígenos de *Chlamydia*. Para ello, se obtuvieron muestras de suero de ratones infectados y controles a diferentes tiempos pi, y se analizaron por ELISA e Inmunofluorescencia indirecta (IFI) para evaluar la presencia de anticuerpos específicos dirigidos contra antígenos de esta bacteria.

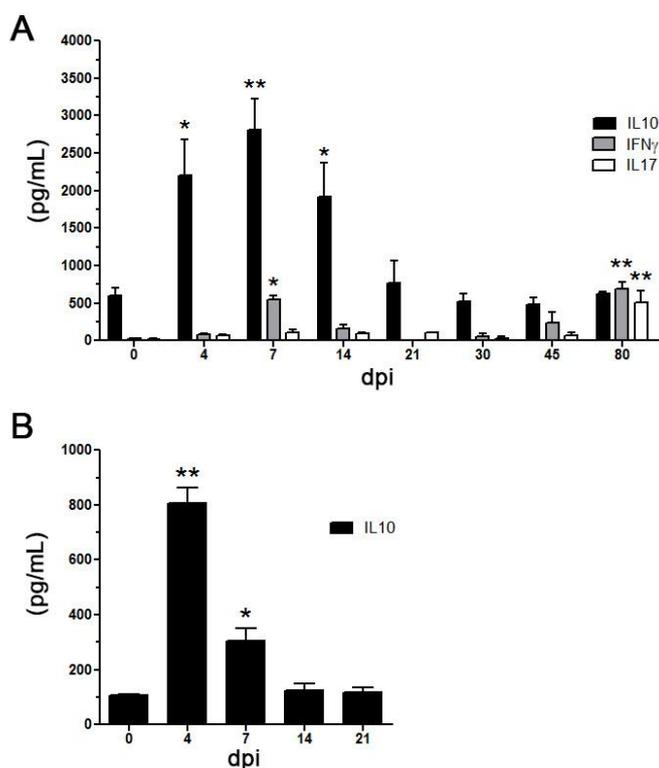


**Figura 12: Cinética de anticuerpos IgG específicos para HSP60 en suero de ratones NOD infectados por *C. muridarum*.** Los anticuerpos fueron medidos en el suero (dilución 1/100) de los ratones del grupo control e infectado a distintos dpi con la técnica de ELISA indirecto. Los valores son representados como densidad óptica de la lectura (DO) leídos a 450 nm. Cada punto corresponde a una variable individual y la línea corresponde a la media de esos valores. El gráfico es representativo de cuatro experimentos independientes con resultados muy similares. Valores de \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  fueron considerados estadísticamente significativos.



humoral incrementando los títulos de anticuerpos específicos contra la bacteria. Sin embargo creemos que esta respuesta humoral puede encontrarse demorada o reducida en función a los resultados obtenidos.

Debido a que numerosas publicaciones han indicado que la respuesta celular mediada por linfocitos T cooperadores es fundamental para inducir inmunidad protectora contra la infección del tracto femenino por *C. muridarum* (Morrison and Morrison, 2000; Rank y col. 2000), se decidió evaluar si la infección del TUGM producía la generación de LT específicos de antígeno. Para ello, realizamos ensayos de activación de células CMN de bazo y de nódulos drenantes de próstata que fueron expuestas *in vitro* a *C. muridarum* inactivada. Las CMN de bazo se componen principalmente por LT y LB, que de ser específicas y al ser estimuladas con antígenos de *C. muridarum*, proliferan y/o secretan citocinas. De esta forma se puede evaluar no solo su activación, sino que además, se puede determinar el subtipo o patrón de respuesta que se ha generado. En nuestros experimentos, se realizaron cultivos de CMN de bazo y de nódulos drenantes de próstata de ratones infectados estimulando con CE de *C. muridarum* inactivada. A las 72 hs evaluamos los niveles de IFN $\gamma$ , IL17 e IL10 en los sobrenadantes de cultivo.



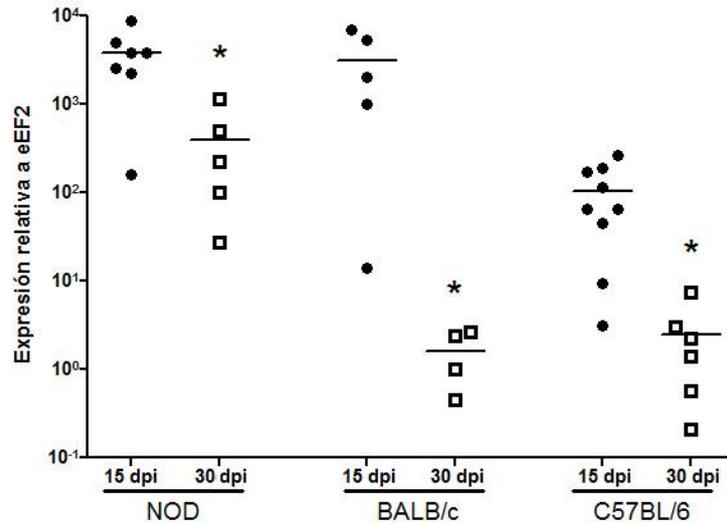
**Figura 14: Cinética de producción de citocinas por CMN de bazo y de nódulos drenantes de próstata de ratones NOD infectados luego del estímulo por *C. muridarum*.** Las CMN de animales infectados fueron cultivadas durante 72 hs en presencia de *C. muridarum* inactivada. Mediante ELISA sandwich, se determinó la concentración de citocinas en sobrenadantes de cultivos de CMN de bazo (A) y de nódulos drenantes de la próstata (B). Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM, n = 4, el gráfico es representativo de dos experimentos independientes con resultados muy similares. Valores de \* p<0,05; \*\* p<0,01 fueron considerados estadísticamente significativos.

Fue interesante observar una elevada producción de IL10 por parte de las CMN de bazo y nódulos drenantes de próstata de ratones infectados a tiempos tempranos pi. En CMN de bazo, la cinética de esta citocina reveló incrementos significativos a los 4, 7 y 14 dpi, con un máximo a los 7 dpi, seguido de una disminución paulatina hasta alcanzar los valores observados en células de animales no infectados. Por otro lado, se observó que la citocina INF $\gamma$  mostraba un incremento significativo a los 7 dpi, no evidenciándose diferencias en el resto de los días analizados, y finalmente mostrando otra vez un aumento significativo en el día 80 pi. Por último, se evaluó la producción de IL17, la cual prácticamente no modificó sus concentraciones a lo largo de la cinética de la infección, sólo mostrando un aumento significativo a los 80 dpi (Figura 14A). En las CMN de nódulos drenantes se observó un incremento marcado de IL10 a los 4 dpi y 7 dpi, y luego la concentración de esta citocina fue decayendo hasta retornar a los valores basales (Figura 14B). De esta manera, si bien se observó que se produce una liberación en los nódulos regionales de IL10 en respuesta a la infección con esta bacteria, se determinó que la gran producción de IL10 es principalmente aportada por las CMN de bazo.

### ***1.5 Infección por C. muridarum del TUGM en otras cepas de ratones***

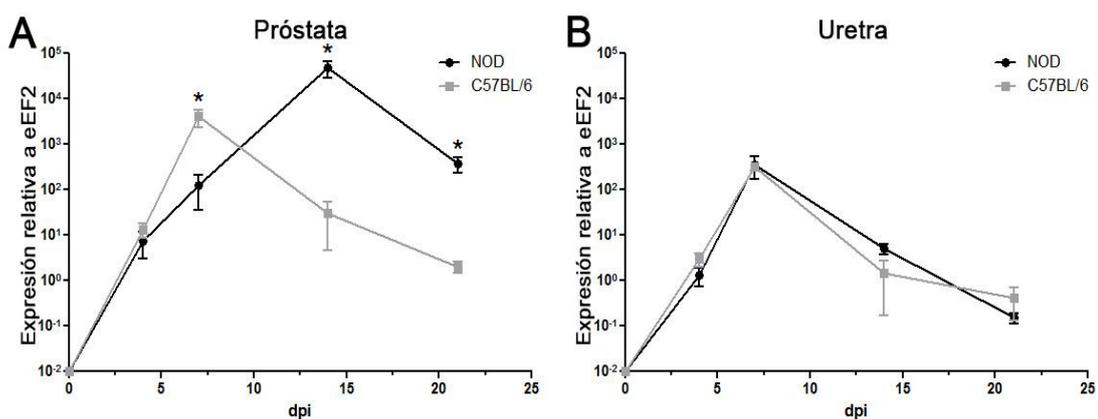
Para evaluar si la distribución de *C. muridarum* en el TUGM y la eliminación demorada de próstata era una característica propia de la cepa de ratones NOD o era un rasgo común a otras cepas, se exploró como se desarrolló esta infección en otras cepas de ratones con *background* genéticos diferentes. Con este objetivo, ratones machos de tres cepas distintas (NOD, C57BL/6 y BALB/c) fueron infectados en meato urinario y se analizó la presencia de ADN bacteriano a distintos tiempos pi mediante PCR en tiempo real (Figura 15).

La evaluación de carga bacteriana a dos tiempos pi demostró que las tres cepas reducen significativamente la carga bacteriana en próstata a los 30 dpi. Sin embargo, los ratones de las cepas BALB/c y C57BL/6 lo hacen de una forma más marcada que lo que se observa en la cepa NOD. Por otro lado también se pudo ver que los ratones C57BL/6 eran los que lograban una mejor eliminación de *C. muridarum*, con valores significativamente menores a los 15 dpi cuando se los comparó con las cargas bacterianas en las otras dos cepas (Figura 15).



**Figura 15: Carga bacteriana en próstata de ratones NOD, C57BL6 y BALB/c infectados por *C. muridarum*.** Las próstatas fueron obtenidas a partir de animales infectados de las tres cepas de ratones. Los valores representan la expresión relativa de OMP1 en función a eEF2. Cada punto corresponde a una determinación individual y la línea corresponde a la media de esos valores. El gráfico es representativo de dos experimentos independientes con resultados muy similares. Valores de \*  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos. OMP1, gen estructural de *Chlamydia*; eEF2, control endógeno.

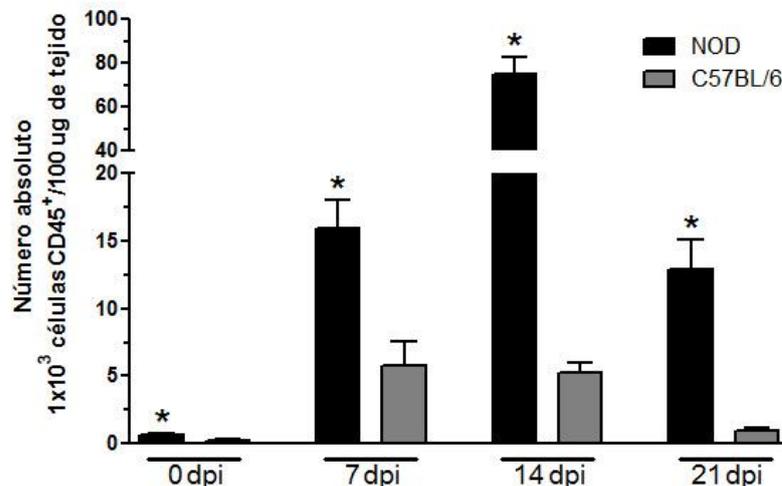
Con el objetivo de analizar si ratones de otras cepas también eliminan más rápida y eficientemente a la bacteria del tracto genital inferior, y de manera demorada en tracto genital superior, se analizaron las cargas bacterianas en uretra y próstata en ratones de las cepas NOD y C57BL/6 (Figura 16).



**Figura 16: Carga bacteriana en tracto genital superior e inferior en ratones NOD y C57BL6 infectados por *C. muridarum*.** Las próstatas (A) y las uretras (B) fueron obtenidas a partir de animales infectados de las cepas NOD y C57BL/6. La carga bacteriana fue determinada mediante PCR en tiempo real. Los valores representan la expresión relativa de OMP1 en función a eEF2. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM,  $n = 5$ , el gráfico es representativo de dos experimentos independientes con resultados similares. Valores de \*  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos. OMP1, gen estructural de *Chlamydia*; eEF2, control endógeno.

Los resultados indicaron que ratones de la cepa C57BL/6 eliminan de uretra a la bacteria de manera similar a lo observado en la cepa NOD. Cuando se comparó la carga bacteriana en próstata de las dos cepas, se observó que los ratones C57BL/6 presentaban valores menores de ADN bacteriano a los observados en la cepa NOD (Figura 16), indicando que la eliminación bacteriana ocurre con mayor rapidez y eficiencia en los ratones C57BL/6.

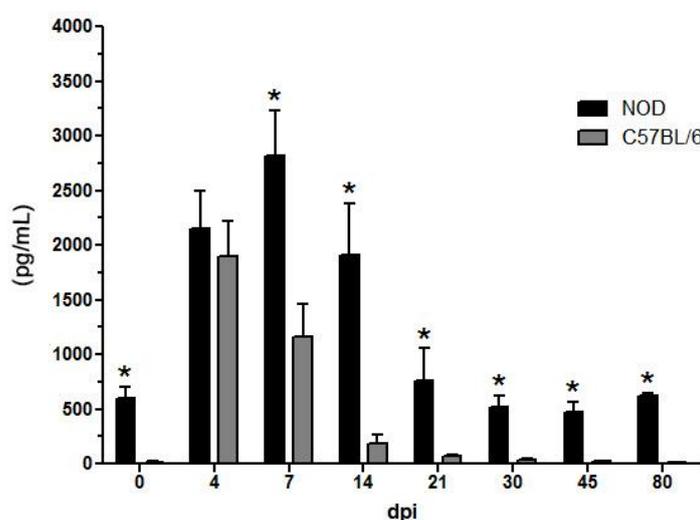
A continuación, se analizó si la infección del TUGM en ratones de la cepa C57BL/6 también se acompañaba de infiltración leucocitaria de próstata. Como se muestra en la Figura 17, los ratones C57BL/6 también presentaron células CD45<sup>+</sup> infiltrando próstata durante el curso de la infección, con los mayores niveles detectados en el día 7 pi y valores significativamente elevados también en el día 14 pi. Sin embargo al comparar los valores de células CD45<sup>+</sup> en próstata de ratones NOD y C57BL/6 se encontraron valores significativamente menores en tejido prostático de ratones C57BL/6 (Figura 17). Cabe mencionar que las próstatas de ratones NOD controles no infectados (día 0 pi) presentaron niveles significativamente mayores de células CD45<sup>+</sup> que los observados en los ratones C57BL/6 controles no infectados.



**Figura 17: Infiltrado leucocitario en próstata de ratones C57BL/6 y NOD infectados por *C. muridarum*.** En el gráfico está representado el número absoluto de células CD45<sup>+</sup> cada 100 ug de tejido prostático. La detección de células CD45<sup>+</sup> fue realizada mediante citometría de flujo. Las barras negras corresponden a ratones de la cepa NOD y las barras grises corresponden a ratones de la cepa C57BL/6. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM, n = 6, el gráfico es representativo de tres experimentos con resultados muy similares. Valores de \* p<0,05 fueron considerados estadísticamente significativos. Cada comparación estadística fue realizada entre la cepa NOD y C57BL/6 para cada tiempo analizado.

De manera similar a lo realizado en los experimentos de infección de ratones de la cepa NOD, se evaluó la producción de citocinas por parte de CMN de bazo de ratones

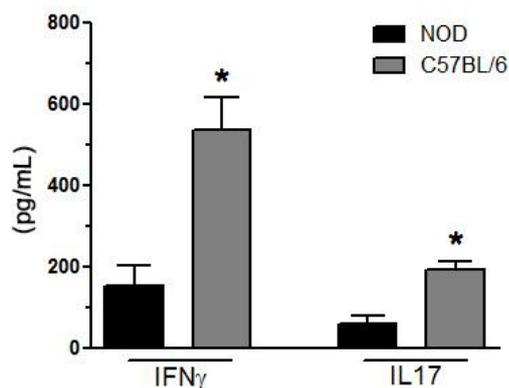
C57BL/6 estimuladas con *C. muridarum* inactivada. Nuevamente, se detectó una importante producción de IL10 por parte de las CMN de bazo de ratones C57BL/6 infectados (Figura 18). A los 4 dpi las CMN de ambas cepas produjeron cantidades similares de IL10. En el día 4 pi las CMN de la cepa C57BL/6 produjeron el máximo valor de IL10, disminuyendo hacia el día 7 pi. En el caso de la cepa NOD, se observaron valores similares de IL10 en el día 4 pi cuando se comparó con los niveles producidos por la cepa C57BL/6, evidenciándose el máximo valor en el día 7 pi para esta cepa. A partir del día 7 en adelante, las CMN de ratones NOD produjeron IL10 en cantidades significativamente superiores comparado con lo que producían las CMN de los ratones C57BL/6. En los últimos días analizados, se observó que ambas cepas mostraron niveles de IL10 similares a los observados en ratones no infectados de su propia cepa (Figura 18).



**Figura 18: Producción de IL10 por CMN de bazo de ratones NOD y C57BL/6 infectados por *C. muridarum*.**

Las CMN purificadas del bazo de animales infectados (NOD, barras negras; C57BL/6, barras grises) fueron cultivadas durante 72 hs, expuestas a *C. muridarum* inactivada. Mediante ELISA sandwich, se determinó la concentración de IL10 en el sobrenadante de esos cultivos. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM,  $n = 4$ , el gráfico es representativo de dos experimentos independientes con resultados muy similares. Valores de \*  $p < 0,05$ ; fueron considerados estadísticamente significativos.

Por otra parte, también se evaluó la producción de IFN $\gamma$  e IL17 en sobrenadantes de cultivo de CMN de bazo de ratones C57BL/6 estimuladas con *C. muridarum*. Como se muestra en la Figura 19, las CMN de bazo de ratones C57BL/6 infectados produjeron mayores niveles de IFN $\gamma$  e IL17 al ser estimuladas *in vitro* con *C. muridarum* inactivada.



**Figura 19: Producción de IFN $\gamma$  e IL17 por CMN de bazo de ratones C57BL/6 infectados por *C. muridarum*.**

Las CMN purificadas del bazo de animales infectados sacrificados a 7 dpi (NOD, barras negras; C57BL/6, barras grises) fueron cultivadas durante 72 hs, expuestas a *C. muridarum* inactivada. Mediante ELISA sandwich, se determinó la concentración de IFN $\gamma$  e IL17 en el sobrenadante de esos cultivos. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM, n = 4, el gráfico es representativo de dos experimentos independientes con resultados muy similares. Valores de \* p<0,05; fueron considerados estadísticamente significativos.

Los resultados obtenidos en la primera parte de este trabajo de tesis doctoral demuestran que ratones de la cepa NOD inoculados con *C. muridarum* presentan una infección ascendente en el TUGM. Esta bacteria estuvo presente en distintos órganos del TUGM a tiempos tempranos, mientras que *C. muridarum* persistió sólo en tejido prostático a tiempos tardíos. *C. muridarum* es eliminada más rápida y eficientemente por ratones de las cepas BALB/c y C57BL/6 que en ratones de la cepa NOD. Durante el curso de la infección, se detecta infiltración leucocitaria en distintos órganos del TUGM, con una importante infiltración a 14 dpi, la cual está compuesta principalmente por células GR1<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> y CD19<sup>+</sup>. La infiltración prostática es mayor en ratones de la cepa NOD, a pesar de que es en esta cepa donde la bacteria se elimina más lentamente.

Durante el curso de la infección de los ratones por *C. muridarum* se detectaron anticuerpos IgG séricos específicos y además una importante secreción de IL-10 por CMN estimuladas con *C. muridarum*. Los ratones de la cepa NOD fueron los menos eficientes en eliminar la bacteria del TUGM y los mejores productores de IL10, en comparación con las cepas de ratones C57BL/6 y BALB/c.

Debido a que la población de CMN de bazo está compuesta por LT, pero también LB, entre otras poblaciones celulares, muchos interrogantes surgieron con estos resultados:

¿Qué fuente celular podría ser la responsable de los elevados niveles de IL10 detectados en los sobrenadantes?

La liberación temprana de IL10 en los ratones NOD, ¿podría estar vinculada con la baja producción de INF $\gamma$  e IL17?

La escasa cantidad de células secretoras de INF $\gamma$  observada en animales durante el curso de la infección, ¿podría relacionarse con bajos niveles de células Th1 y ello con la eliminación demorada de *C. muridarum* del TUGM?

# RESULTADOS: Parte II

---

*Rol de la citocina anti-inflamatoria IL10 en el curso de la infección del TUGM por C. muridarum, fuente celular de la misma, posible rol modulador de la respuesta inmune, y su participación sobre la eliminación bacteriana.*

## **II.1 Participación de la citocina anti-inflamatoria IL10 en el curso de la infección del TUGM por *C. muridarum***

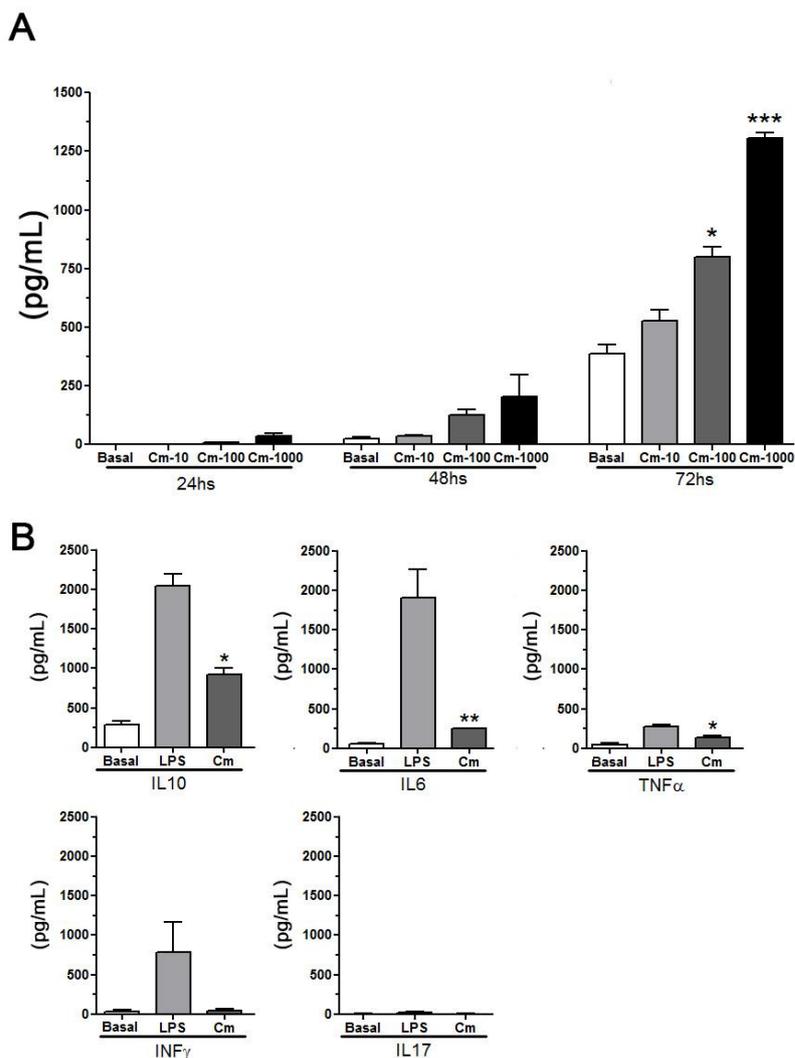
### ***II.1.1 Citocinas producidas por CMN de bazo luego del estímulo por *C. muridarum* inactivada***

Como se describió en la primer parte de los resultados de esta tesis, durante el curso de la infección por *C. muridarum*, las CMN de bazo de ratones infectados fueron muy buenas productoras de IL10. Al realizar ensayos utilizando CMN de ratones no infectados, se observó que también *C. muridarum* inducía la secreción de IL10. Con esta información se decidió investigar ¿qué otras citocinas producían las CMN de bazo al ser estimuladas con *C. muridarum*? ¿de qué población celular provenía principalmente la secreción de IL10? ¿y qué componente de *C. muridarum* es el responsable de inducir esta secreción de IL10?

Como se muestra en la Figura 20, al analizar a que tiempo post estimulación con *C. muridarum* las CMN de bazo de ratones controles sin infectar liberaban IL10, se observó que a las 48 hs ya era posible detectar IL10, pero que los máximos niveles se observaban a las 72 hs de estimulación (Figura 20A). Por otro lado, también se pudo apreciar que la secreción de IL10 era dosis dependiente, a mayor dosis de *C. muridarum* inactivada utilizada para estimular el cultivo, se observó mayor concentración de IL10 en el sobrenadante

En la Figura 20B se puede observar que las CMN de bazo de ratones controles al ser estimuladas con *C. muridarum* durante 72 hs secretan, además de IL10, IL6 y TNF $\alpha$ , siendo los niveles de IL10 los más elevados. Mientras que no se detectaron aumentos significativos de los valores de IFN $\gamma$  e IL17 en estos sobrenadantes.

Al introducir un estímulo control positivo como LPS de *E. coli* a los cultivos de CMN de bazo de ratones NOD, se observó secreción de IL10, IL6, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ . Estos resultados sugirieron que algunos componentes de la bacteria, probablemente distintos PAMPs, son capaces de estimular a las células presentes en CMN de bazo (LT, LB, CD o Macrófagos) para que ellas secreten tanto citocinas inflamatorias, como anti-inflamatorias.



**Figura 20: Producción de citocinas por CMN de bazo estimuladas con *C. muridarum* inactivada.** Las CMN purificadas del bazo de animales del grupo control fueron cultivadas durante 72 hs, expuestas a medio solamente (basal), a un estímulo positivo (LPS de *E. coli*) y a *C. muridarum* inactivada. **A)** Mediante ELISA sandwich se determinó la concentración de IL10 a distintos tiempos (24, 48, 72 hs). **B)** Mediante ELISA sandwich se determinó también la concentración de IL10, IL6, TNF $\alpha$ , INF $\gamma$  e IL17 en los sobrenadantes de estos cultivos a las 72 hs de cultivo. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM, n = 5, el gráfico es representativo de dos experimentos independientes con resultados muy similares. Cm = *C. muridarum*, Cm-10 = 10 CE de *C. muridarum* por cada célula en el cultivo, Cm-100 = 100 CE de *C. muridarum* por cada célula en el cultivo y Cm-1000 = 1000 CE de *C. muridarum* por cada célula en el cultivo. Valores de \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001 fueron considerados estadísticamente significativos.

Para dilucidar si este patrón de producción de citocinas es característico de CMN de ratones NOD, se procedió nuevamente a realizar los mismos experimentos con CMN de bazo de ratones C57BL/6 y BALB/c (Figura 21). La producción de IL10 fue más elevada en sobrenadantes de cultivo de las CMN de animales NOD expuestas a *C. muridarum*, en comparación con lo que ocurrió en los cultivos correspondientes a las otras dos cepas de ratones (Figura 21). Es importante destacar que las CMN de bazo de ratones NOD sin estímulo produjeron también elevadas concentraciones de IL10, más del doble de lo

observado en las otras dos cepas de ratones. Los niveles de IL6 y TNF $\alpha$  en los sobrenadantes de cultivo, luego de la estimulación con *C. muridarum*, fueron comparables en las tres cepas.

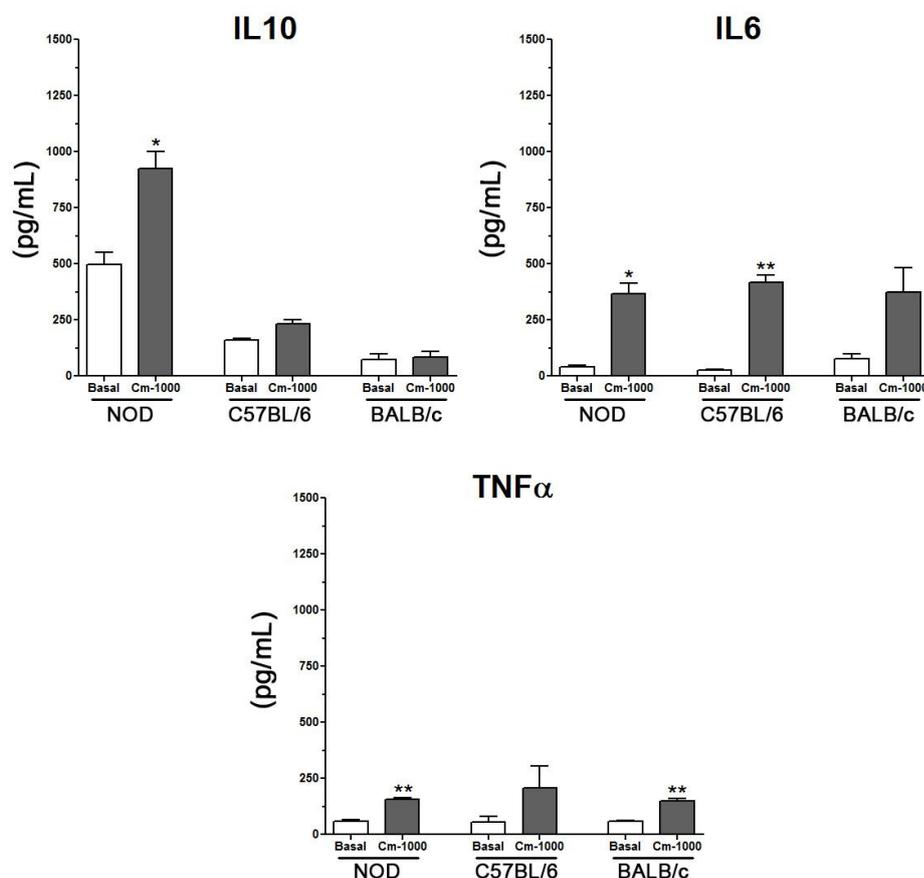


Figura 21: **Citocinas producidas por CMN de bazo de ratones NOD, C57BL/6 y BALB/c, estimuladas con *C. muridarum*.** Las CMN purificadas del bazo de animales no infectados de estas tres cepas (NOD, C57BL/6 y BALB/c) fueron cultivadas durante 72 hs, expuestas a condiciones basales o a *C. muridarum* inactivada. Mediante ELISA sandwich, se determinó la concentración de IL10, IL6 y TNF $\alpha$  en los sobrenadantes de estos cultivos. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM, n = 4, el gráfico es representativo de dos experimentos independientes con resultados muy similares. Cm-1000 = 1000 CE de *C. muridarum* por cada célula en el cultivo. Valores de \* p<0,05; \*\* p<0,01 fueron considerados estadísticamente significativos.

### II.1.2 Principal población celular productora de IL10 en la infección por *C. muridarum*

Experimentos anteriores demostraron que las CMN de bazo producen grandes cantidades de IL10 en respuesta al estímulo con *C. muridarum*. Debido a que el cultivo de CMN está compuesto por varios tipos celulares, se planteó distinguir qué población leucocitaria era la responsable de la producción de IL10. Con este fin se cultivaron inicialmente CMN de bazo de ratones NOD, C57BL/6 y BALB/c en con medio de cultivo, para identificar la población celular que basalmente produce IL10. Luego de transcurridas

72 hs se realizó una marcación de superficie e intracelular y un posterior análisis mediante citometría de flujo (Figura 22). En experimentos previos de comparación de producción de IL10 por CMN de bazo de las tres cepas, se habían observado niveles elevados de IL10 en sobrenadantes de cultivos de CMN de bazo de ratones NOD en condiciones basales (Figuras 20A y 21). Los LB ( $CD19^+$ ) y los LT ( $CD3^+$ ) fueron las poblaciones celulares en las que se analizó la frecuencia de células productoras de IL10 luego del estímulo con *C. muridarum*, dado que son preponderantes entre las CMN de bazo.

Surge de la Figura 22, que los LB fueron los principales productores de IL10 en condiciones basales, en las tres cepas analizadas. Además, se pudo apreciar que en las CMN de bazo de la cepa NOD se encontró la mayor frecuencia de células  $CD19^+IL10^+$  comparando con lo que ocurre en el resto de las cepas. Al analizar la producción de IL10 por linfocitos T, se observó una frecuencia muy baja de células  $CD3^+IL10^+$ , confirmando que esta población no sería la principal fuente de IL10 en condiciones basales.

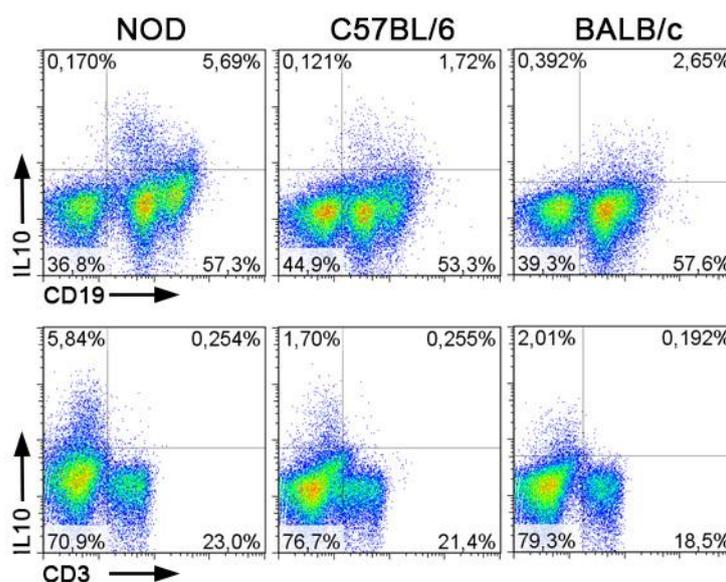


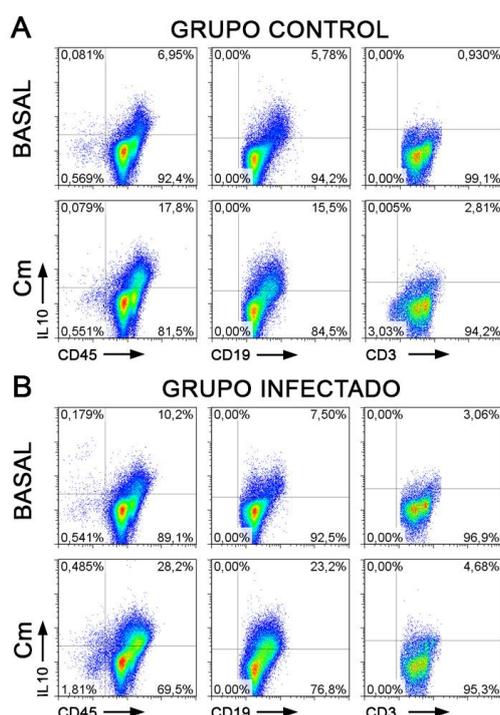
Figura 22: **Células productoras de IL10 en bazo de ratones NOD, C57BL/6 y BALB/c en condiciones basales.**

En la figura se muestra el análisis de citometría del cultivo de CMN de bazo de NOD, C57BL/6 y BALB/c. Estas CMN fueron cultivadas durante 72 hs en condiciones basales, solamente con medio de cultivo. Luego mediante citometría de flujo se determinó la frecuencia de células  $IL10^+$ . Los valores en porcentaje representan la frecuencia de células para los marcadores evaluados. El análisis es representativo de dos experimentos independientes con resultados muy similares,  $n = 5$ .

Además, se evaluaron las principales células productoras de IL10 luego del estímulo con *C. muridarum* tanto en ratones controles como en ratones infectados a distintos tiempos durante el curso de la infección con *C. muridarum*. En el grupo control (Figura 23A), se observa que las células  $CD19^+$  fueron las principales productoras de IL10

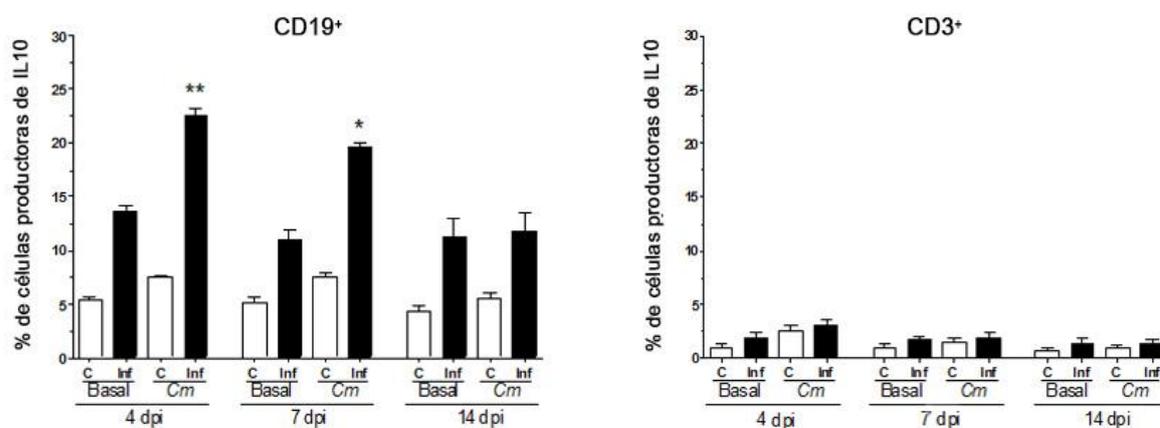
en condiciones basales, no habiendo células  $CD45^+IL10^+$  que fueran  $CD19^-$ . En los cultivos de CMN de bazo de ratones controles expuestos a *C. muridarum* durante 72 hs se observó un incremento a más del doble de la frecuencia de  $CD19^+IL10^+$  con valores que fueron de 6,95% a 17,8%. Como se mencionó anteriormente, en estas condiciones de cultivo nuevamente la principal frecuencia de células productoras de IL10 se observó en células  $CD19^+$ .

Por otra parte, se obtuvieron bazos de ratones infectados en el día 4 pi y se obtuvieron las CMN de bazo para determinar la principal población productora de IL10 en ratones infectados. En la figura 23B, podemos observar que las CMN de bazo de ratones infectados cultivadas en condiciones basales (solamente con medio suplementado) mostraron una mayor frecuencia de células  $CD19^+IL10^+$  cuando se comparó con la frecuencia de células  $IL10^+$  en condiciones basales de ratones no infectados. De manera interesante, al estimular *in vitro* a CMN de bazo de ratones infectados con *C. muridarum*, la frecuencia de LB productores de IL10 se incrementó considerablemente. Nuevamente, en todos estos cultivos realizados, sea en condiciones basales o frente a *C. muridarum*, la principal población productora de IL10 se pudo atribuir a células  $CD19^+$ , es decir LB.



**Figura 23: Caracterización fenotípica de las células productoras de IL10 de bazo de ratones controles e infectados por *C. muridarum*.** En la figura se muestra el análisis de citometría del cultivo de CMN de bazo de NOD. En (A), se muestra la frecuencia de células productoras de IL10 en CMN obtenidas de ratones del grupo control y en (B), CMN purificadas a partir de ratones del grupo infectado a 4 dpi. Estas CMN fueron cultivadas con medio de cultivo solamente o con *C. muridarum* inactivada durante 72 hs. Luego, mediante citometría de flujo intracelular, se determinó la frecuencia de células  $IL10^+$ . Los valores en porcentaje representan la frecuencia de células para los marcadores evaluados. El análisis es representativo de dos experimentos independientes con resultados similares,  $n = 4$ , Cm = *C. muridarum*.

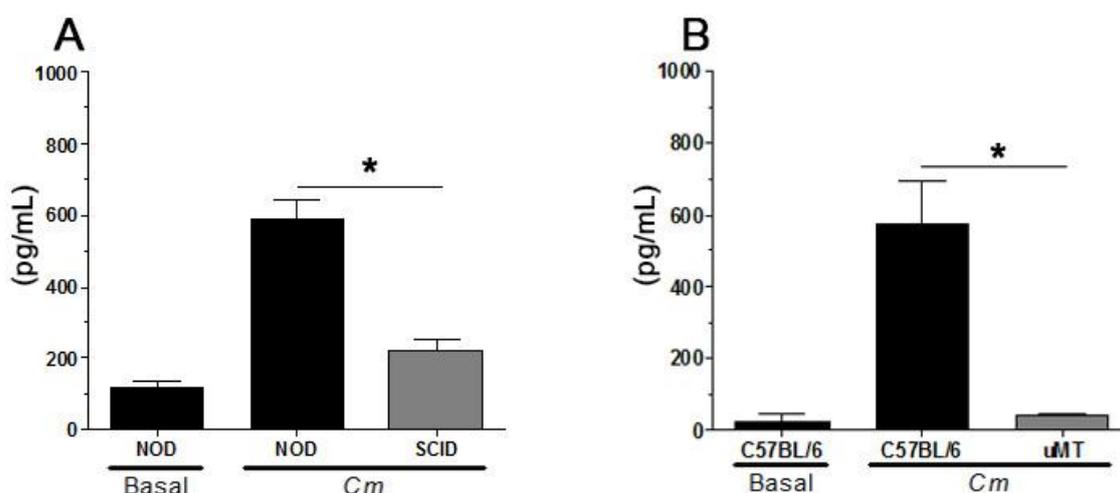
Con el propósito de evaluar la cinética de la frecuencia de células productoras de IL10 durante el curso de la infección con *C. muridarum*, se purificaron CMN de ratones infectados a diferentes tiempos pi y se realizaron cultivos y marcaciones como se explicó anteriormente (Figura 24). Los resultados demostraron que la población de LB fue la mayor fuente de IL10 que se había cuantificado anteriormente mediante ELISA en el sobrenadante de estos cultivos. Se puede apreciar en la Figura 24, que a todos los tiempos evaluados, la frecuencia de LB IL10<sup>+</sup> fue similar en los animales controles. Para los ratones infectados se observaron mayores frecuencias de LB IL10<sup>+</sup> en condiciones basales en todos los puntos del esquema analizados. Sin embargo, en CMN de bazo de ratones infectados y estimulados con *C. muridarum* se detectaron incrementos significativos de LB IL10<sup>+</sup> en los días 4 y 7 pi, es decir a tiempos tempranos pi. La frecuencia de células CD3<sup>+</sup>IL10<sup>+</sup> no mostró cambios significativos durante el curso de la infección, observándose frecuencias bajas en comparación con los valores de LB IL10<sup>+</sup>. Los resultados de este experimento demuestran que los LB son la principal fuente de IL10 durante la infección del TUGM por *C. muridarum* y que estas células están incrementadas en los primeros días pi.



**Figura 24: Frecuencia de células productoras de IL10 durante el curso de la Infección por *C. muridarum*.**

CMN obtenidas de bazo de ratones NOD controles (barras blancas) o infectados (barras negras) fueron incubadas con medio de cultivo solamente (basal) o con *C. muridarum* inactivada durante 72 hs. Un posterior análisis de citometría de flujo intracelular reveló la frecuencia de células CD19<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup> productoras de IL10. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM, n = 4, el gráfico es representativo de dos experimentos independientes con resultados similares. El test estadístico usado comparó la frecuencia de células productoras de IL10 obtenidas de los animales infectados sacrificados a distintos dpi, en la condición basal vs *C. muridarum* (Cm). C= grupo control. Inf = grupo infectado. Valores de \* p<0,05;\*\* p<0,01 fueron considerados estadísticamente significativos.

Con el fin de analizar la contribución fundamental de los LB en la producción de IL10 frente a estímulos con *C. muridarum* en cultivo, se decidió evaluar este fenómeno utilizando CMN de cepas de ratones deficientes en esta población celular. Para ello se comparó, por un lado, la producción de IL10 en la cepa de ratones NOD-SCID que no posee LB ni LT, y por el otro, la producción de IL10 de la cepa NOD *wt*. Además, se analizó la producción de IL10 en ratones  $\mu$ MT (que no tienen LB), comparando con ratones C57BL/6 *wt*. Con estos diseños experimentales, se evaluó lo que sucedió al determinar la producción de IL10 en ausencia de LB y LT para el *background* NOD y en ausencia de sólo LB en el *background* C57BL/6. En ambos casos (Figura 25A y 25B), los ratones fueron sacrificados a 4 dpi, correspondiente al día del esquema experimental en el que se detectaron las mayores proporciones de LB IL10<sup>+</sup>.

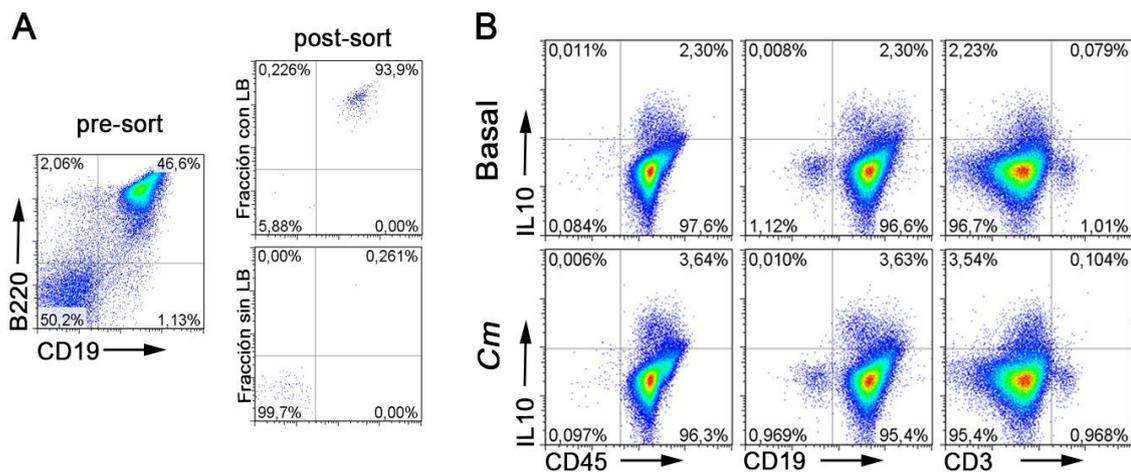


**Figura 25: Producción de IL10 en ratones deficientes en LB y LT infectados con *C. muridarum*.** CMN obtenidas de bazo de ratones infectados y sacrificados a 4 dpi. En (A) las CMN fueron purificadas de ratones NOD y NOD-SCID y en (B) las CMN fueron obtenidas de ratones de la cepa C57BL/6 y  $\mu$ MT. Estas células fueron estimuladas con medio de cultivo solamente (basal) o con *C. muridarum* (Cm) inactivada durante 72 hs. En el sobrenadante de estos cultivos se determinó la concentración de IL10 mediante ELISA sandwich. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM, n = 6, el gráfico es representativo de dos experimentos independientes con resultados muy similares. Valores de \* p < 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos. SCID= NOD-SCID.

Los resultados presentados en la Figura 25A, mostraron que las CMN de ratones NOD-SCID infectados y estimuladas en cultivo con *C. muridarum*, produjeron menores cantidades de IL10 cuando se las comparó con la producción de IL10 de CMN de ratones NOD *wt* (Figura 25A). En el caso de la producción de IL10 por ratones deficientes en LB, se vio que los niveles de esta citocina también disminuyeron significativamente en los sobrenadantes provenientes de CMN estimuladas con *C. muridarum* de ratones  $\mu$ MT infectados, evidenciando valores similares a los que se observaron en el sobrenadante de

cultivo de CMN de ratones C57BL/6 *wt* en condiciones basales (Figura 25B). Estos resultados permitieron comprobar que la producción de IL10 era dependiente de la presencia de LB, ya que la ausencia de esta población celular genera una profunda reducción en la concentración la misma.

En muchos casos, la activación y posterior producción de citocinas por parte de los LB depende de la presencia de otras poblaciones leucocitarias en el medio que colaboran con los LB para alcanzar tal propósito. Resultó de interés analizar si estos LB necesitan de la colaboración de otros linajes celulares para poder producir IL10 o si son capaces de producirla por sí mismos, luego de la activación con *C. muridarum*. La estrategia utilizada para responder a esta pregunta fue purificar LB de CMN de bazo de ratones NOD mediante *cell-sorting*, obteniendo de esta forma LB con alto grado de pureza. Estos LB fueron cultivados en condiciones basales o con *C. muridarum* durante 72 hs (Figura 26) y mediante citometría intracelular se determinó la frecuencia de células IL10<sup>+</sup> en estos cultivos.

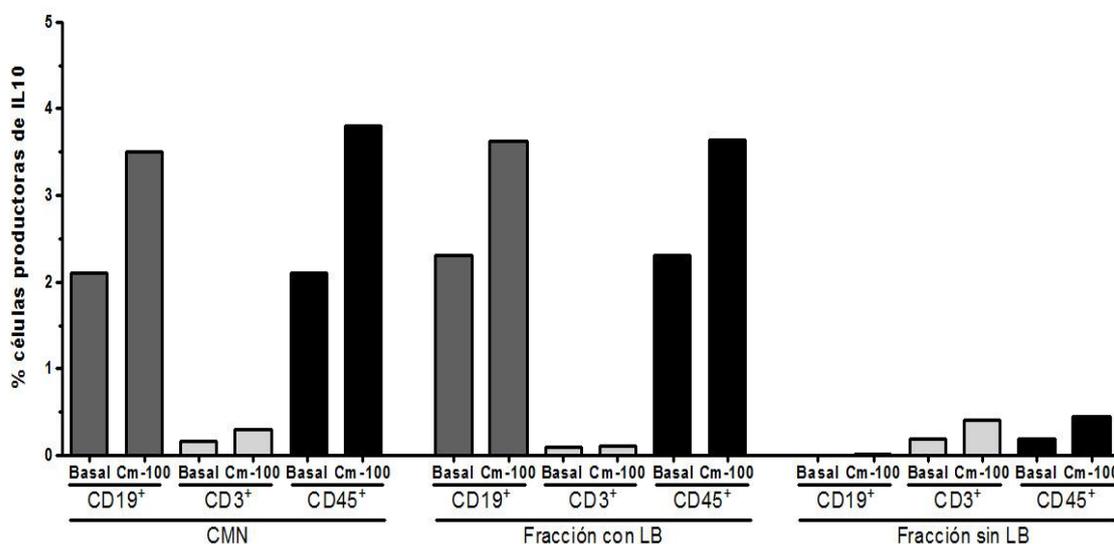


**Figura 26: Producción de IL10 por LB purificados estimulados por *C. muridarum*.** LB fueron purificados mediante *cell-sorting* utilizando anticuerpos dirigidos hacia marcadores poblacionales característicos de estas poblaciones celulares ( $\alpha$ CD19 y  $\alpha$ B220). **A)** En este gráfico se representa el análisis del rendimiento de esta técnica de purificación. **B)** El gráfico es representativo del análisis de la frecuencia de células productoras de IL10 en la fracción enriquecida en LB. Se utilizó citometría de flujo intracelular para determinar la frecuencia de células IL10<sup>+</sup>. Los LB purificados fueron estimulados en cultivo con medio de cultivo solamente, o con *C. muridarum* (*Cm*) inactivada durante 72 hs. Los valores en porcentaje representan la frecuencia de células para los marcadores evaluados. El análisis es representativo de tres experimentos independientes con resultados similares, n = 4.

Como se puede apreciar en la Figura 26A la marcación con una combinación de anticuerpos B220 y CD19 permitió separar LB de las demás poblaciones celulares presentes en las CMN de bazo, obteniendo una fracción enriquecida que presentó una

pureza del 94%. En la Figura 26B, se observa la presencia de células CD19<sup>+</sup> productoras de IL10 en condiciones basales y mayores porcentajes de células CD19<sup>+</sup>IL10<sup>+</sup> en células purificadas estimuladas *C. muridarum* en cultivo.

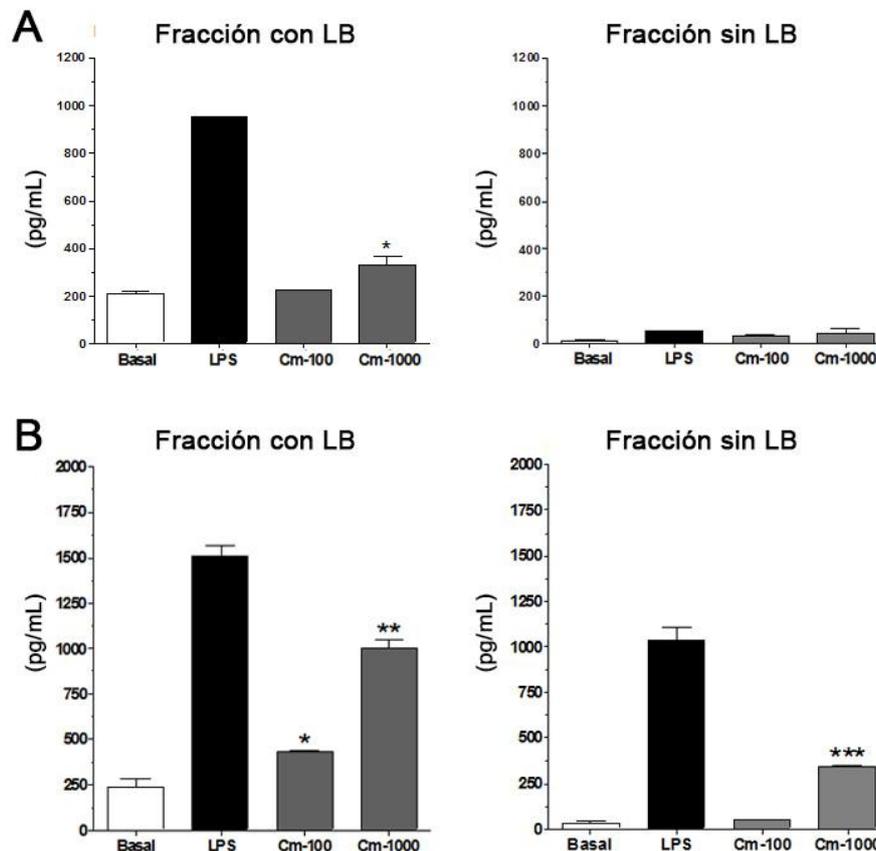
Además, analizamos la frecuencia de células productoras de IL10 en la fracción no B obtenida por *cell-sorting* y en las CMN totales. Los resultados que se presentan en Figura 27 evidenciaron, nuevamente, que la fracción sin LB presentaba una frecuencia de células productoras de IL10 muy baja, mientras que en la fracción con LB la presencia de células IL10<sup>+</sup> era comparable a lo observado en la fracción completa de CMN. Estos resultados permitieron confirmar que la IL10 fue producida principalmente por los LB estimulados con *C. muridarum*, y que esta producción fue independiente de la cooperación de otras poblaciones dentro de las poblaciones celulares presentes en las CMN de bazo.



**Figura 27: Células productoras de IL10 en las poblaciones celulares enriquecidas en LB.** El gráfico es representativo del análisis de la frecuencia de células productoras de IL10 en las tres fracciones celulares (CMN, fracción con LB y fracción sin LB). Se utilizó citometría de flujo intracelular para determinar la frecuencia de células IL10<sup>+</sup>. Los valores en porcentaje representan la frecuencia de células para los marcadores evaluados. El análisis es representativo de dos experimentos independientes con resultados similares, n = 4. Cm-100 = 100 CE de *C. muridarum* por cada célula en el cultivo.

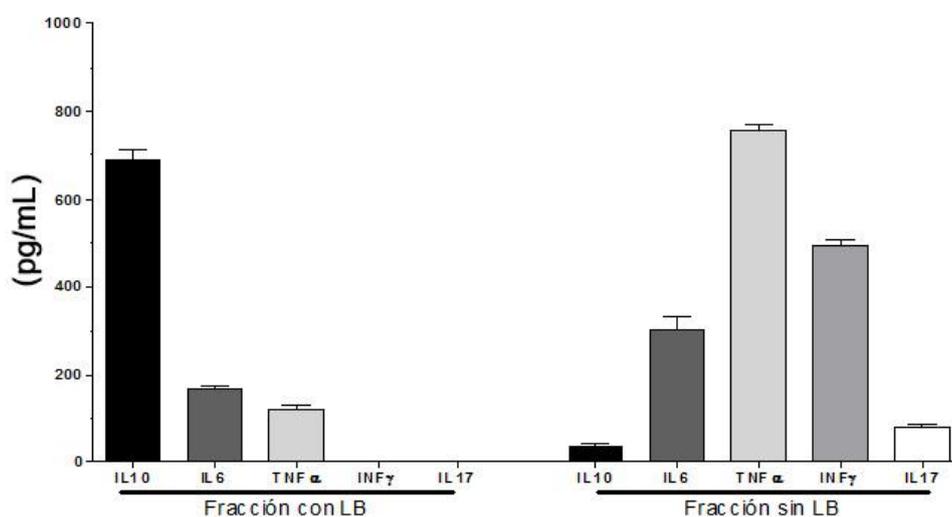
También se purificaron los LB mediante la metodología de perlas magnéticas (selección negativa). Las fracciones celulares obtenidas fueron cultivadas durante 72 hs frente a diferentes estímulos y en el sobrenadante de estos cultivos se midió la concentración de IL10. En la figura 28, se muestran los resultados obtenidos al analizar los niveles de IL10 en sobrenadantes de LB purificados mediante *cell-sorting* y con perlas magnéticas. Los mayores niveles de IL10 se encontraron en las fracciones con LB estimulados con un control positivo como LPS de *E. coli* y con *C. muridarum* inactivada. Al

estimar las fracciones con LB con dosis crecientes de *C. muridarum* se observó un efecto dosis-dependiente. En las fracciones sin LB se detectaron valores inferiores de IL10 bajo los estímulos ensayados. En los cultivos provenientes de purificación con perlas magnéticas, la cantidad de IL10 encontrada fue mayor que la encontrada en los cultivos de células purificadas mediante *cell-sorting*. Esto podría responder a que la purificación por perlas magnéticas mantiene mejor la viabilidad de las células en comparación con lo que ocurre al purificar mediante *cell-sorting*. Además, se observó que en la fracción sin LB purificada con perlas magnéticas se detectaron mayores cantidades de IL10 en comparación a lo que ocurría en la misma fracción sin LB purificada mediante *cell-sorting*. Esto podría estar relacionado al porcentaje de pureza obtenido con perlas magnéticas que es más bajo y la IL10 detectada podría corresponder a LB contaminando la fracción teóricamente libre de ellos.



**Figura 28: Producción de IL10 por parte de LB purificados mediante *cell-sorting* o perlas magnéticas y estimulados con *C. muridarum*.** LB fueron purificados a partir de CMN del bazo de ratones NOD del grupo control, mediante *cell-sorting* (A) o con el uso de perlas magnéticas (B). Las fracciones con LB o sin LB fueron estimuladas con medio de cultivo solamente (basal), LPS de *E. coli* y con dos dosis crecientes de *C. muridarum* inactivada durante 72 hs. En el sobrenadante de estos cultivos se determinó la concentración de IL10 mediante ELISA sandwich. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM, n = 5, el gráfico es representativo de dos experimentos independientes con resultados muy similares. Valores de \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$  fueron considerados estadísticamente significativos. Cm-100 = 100 CE de *C. muridarum* por cada célula en el cultivo, Cm-1000 = 100 CE de *C. muridarum* por cada célula en el cultivo.

Se evaluó, además, la producción de otras citocinas en los cultivos de LB purificados y estimulados con *C. muridarum*. En la fracción de LB purificados por *cell-sorting* se detectaron, cantidades bajas de IL6 y TNF $\alpha$  (Figura 29). Por otro lado, en la fracción donde los LB estaban ausentes se observaron elevadas concentraciones de IL6, TNF $\alpha$ , INF $\gamma$  e IL17. Estos resultados sugieren que, en los cultivos en los que todas las poblaciones celulares están presentes, los altos niveles de IL10 podrían condicionar la producción de otras citocinas. Al cultivar la población sin LB, y al haber bajos niveles de IL10, las demás poblaciones celulares responden al estímulo de *C. muridarum* inactivada produciendo citocinas inflamatorias.



**Figura 29: Perfil de citocinas producidas por fracciones celulares enriquecidas o no en LB, luego de la estimulación con *C. muridarum*.** LB fueron purificados de a partir de CMN del bazo de ratones NOD del grupo control, mediante *cell-sorting*. Las fracciones con LB o sin LB fueron estimuladas con *C. muridarum* inactivada durante 72 hs. En el sobrenadante de estos cultivos se determinó la concentración de IL10, IL6, TNF $\alpha$ , INF $\gamma$  e IL17 mediante ELISA sandwich. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM, n = 5, el gráfico es representativo de dos experimentos independientes con resultados muy similares.

Los resultados hasta aquí presentados indican que en los cultivos de CMN de bazo, el estímulo con *C. muridarum* induce a los LB a producir grandes cantidades de IL10 y esto podría condicionar o reprimir la producción de las demás citocinas evaluadas.

### II.1.3 Participación de PAMPs y Receptores de la inmunidad innata (PRRs) en la producción de IL10 por LB

Con el antecedente de que LB de ratones controles no infectados estimulados con *C. muridarum* inactivada producían grandes cantidades de IL10, se investigó si algún PAMPs de *Chlamydia* podría ser reconocido por los LB a través de PRRs e inducir así la producción de IL10. La bibliografía indica que uno de los PAMPs más importantes de *Chlamydia* es su LPS (Vabulas y col. 2001). El cLPS es un componente estructural de *C. muridarum*, presente en todos los estadios del ciclo de vida de esta bacteria y, además, ha sido demostrada su capacidad inmunogénica. Se investigó si el mismo inducía la producción de IL10 en LB y en la fracción sin LB. Se realizaron cultivos con las fracciones purificadas mediante *cell-sorting* estimulando con cLPS durante 72 hs y se evaluaron las concentraciones de las citocinas IL10, IL6, TNF $\alpha$ , INF $\gamma$  e IL17 en los sobrenadantes de dichos cultivos (Figura 30).

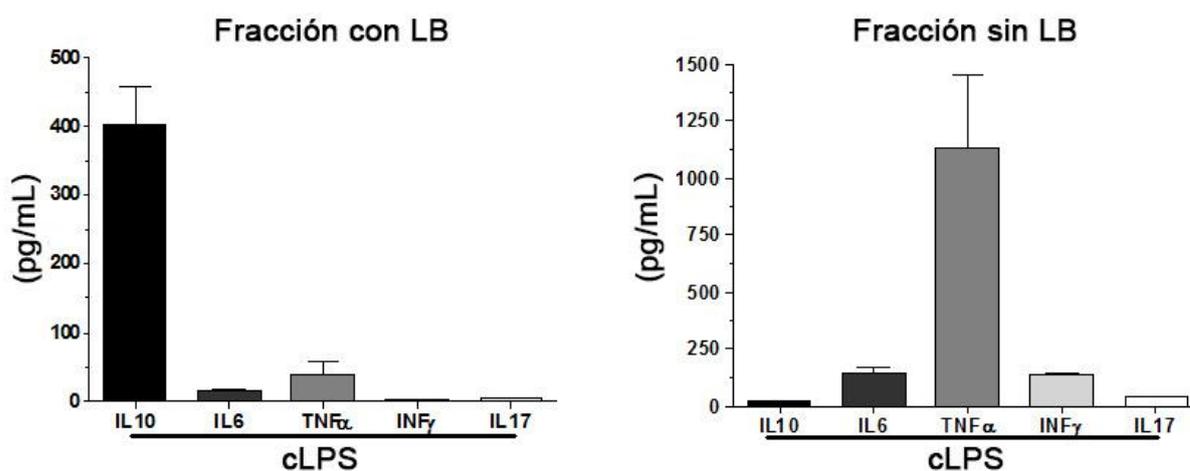


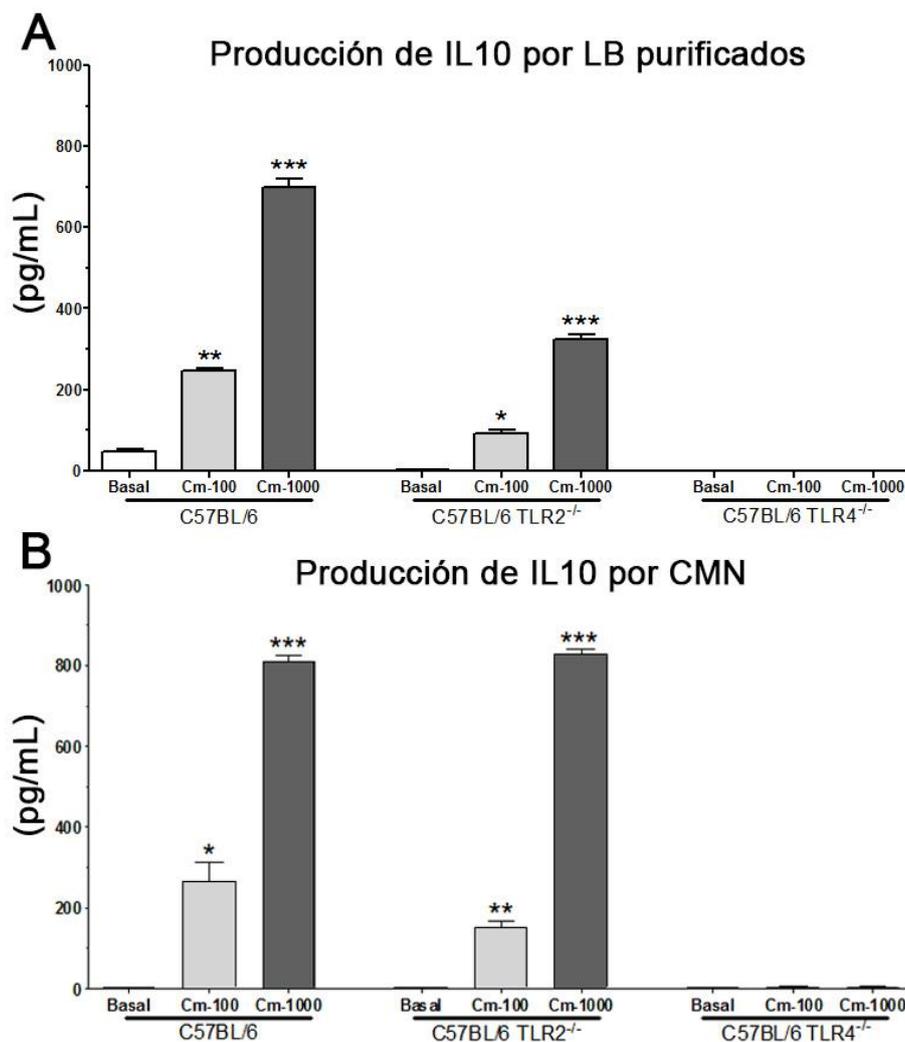
Figura 30: **Producción de citocinas por LB y demás poblaciones celulares luego del estímulo con cLPS.** LB fueron purificados de a partir de CMN del bazo de ratones NOD del grupo control, mediante *cell-sorting*. Las fracciones con LB o sin LB fueron estimuladas con cLPS (purificado a partir de *Chlamydia trachomatis*) durante 72 hs. En el sobrenadante de estos cultivos se determinó la concentración de IL10, IL6, TNF $\alpha$ , INF $\gamma$  e IL17 mediante ELISA sandwich. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM, n = 5, el gráfico es representativo de dos experimentos independientes con resultados similares.

La fracción de LB estimulada con cLPS produjo importantes cantidades de IL10, y una leve producción de TNF $\alpha$ . Los niveles de IL10 fueron menores a los secretados con el estímulo de *C. muridarum* completa, por lo que se podría suponer que otros componentes, además del cLPS, serían capaces de inducir a los LB a secretar IL10. Sobrenadantes de

los cultivos provenientes de la fracción sin LB produjeron altos niveles de TNF $\alpha$ , y en menor proporción IL6 e INF $\gamma$  (Figura 30).

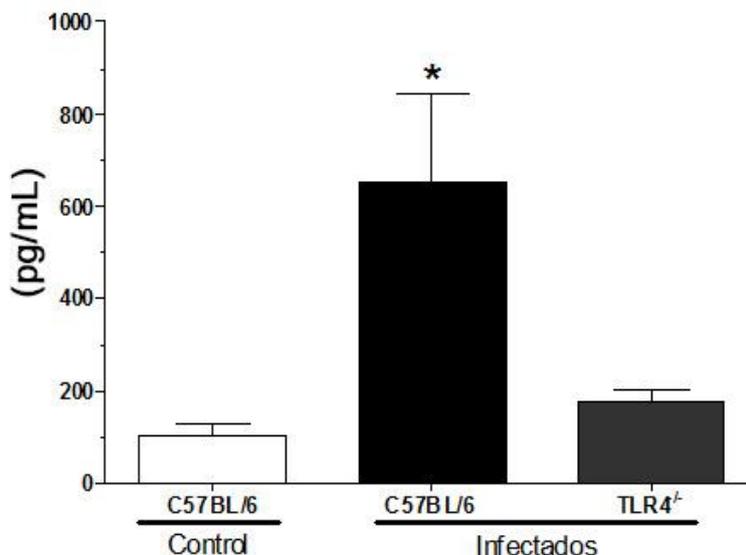
Como se mencionó previamente, algunos de los receptores de la inmunidad innata son capaces de reconocer a PAMPs de *Chlamydia*, dentro de los cuales los más estudiados han sido el TLR2 y el TLR4. Con el fin de identificar si alguno de estos receptores de la inmunidad innata participaría en la inducción de la producción de IL10 por parte de células estimuladas con *C. muridarum*, se purificaron mediante *cell-sorting* LB de ratones C57BL/6 *wt*, C57BL/6 TLR2<sup>-/-</sup> y C57BL/6 TLR4<sup>-/-</sup>. Las células purificadas fueron estimuladas con *C. muridarum* durante 72 hs y se evaluaron las concentraciones de IL10 en el sobrenadante de estos cultivos. Se realizaron también cultivos de las CMN completas, en las mismas condiciones, a fines comparativos. Se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 en vez de ratones NOD debido a la disponibilidad de animales deficientes para TLR2 y TLR4 en dicho *background* genético.

En LB purificados de animales C57BL/6 *wt* (fracción purificada en LB) estimulados con distintas dosis de *C. muridarum*, se detectaron niveles crecientes de IL10 (Figura 31A). Se realizaron los mismos ensayos utilizando LB purificados de animales deficientes en TLR2, en los que se observó secreción de IL10 en cantidades menores. Sin embargo, en los sobrenadantes de los cultivos correspondientes a los animales deficientes en TLR4, no se detectaron niveles medibles de IL10 (Figura 31A). El mismo análisis de sobrenadantes de cultivo de las CMN estimuladas con *C. muridarum* para las tres cepas mostró que las CMN de animales TLR4<sup>-/-</sup> no secretaron IL10 en respuesta a *C. muridarum* (Figura 31B). Estos resultados demostraron que el receptor TLR4 de la inmunidad innata participa en el reconocimiento de PAMPs de *C. muridarum* que inducen la producción de IL10 por LB.



**Figura 31: Participación de TLR2 y TLR4 en la producción de IL10 por LB estimulados con *C. muridarum*.** LB fueron purificados mediante *cell-sorting* a partir de CMN del bazo de ratones C57BL/6 *wild type*, C57BL/6 TLR2<sup>-/-</sup> y C57BL/6 TR4<sup>-/-</sup>. Estos LB purificados (A) y CMN (B) obtenidas de estas cepas fueron estimuladas con medio de cultivo solamente o con *C. muridarum* inactivada en distintas concentraciones durante 72 hs. En el sobrenadante de estos cultivos se determinó la concentración de IL10 mediante ELISA sandwich. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM, n = 5, el gráfico es representativo de dos experimentos independientes con resultados muy similares. Valores de \* p<0,05; \*\* p<0,01 y \*\*\* p<0,001 fueron considerados estadísticamente significativos. Cm-100 = 100 CE de *C. muridarum* por cada célula en el cultivo, Cm-1000 = 1000 CE de *C. muridarum* por cada célula en el cultivo.

Se realizaron, además, infecciones en ratones C57BL/6 *wt* y C57BL/6 TLR4<sup>-/-</sup> para analizar si la deficiencia de este receptor de la inmunidad innata afecta la inducción de LB productores de IL10. Los animales fueron infectados por *C. muridarum*, y en el día 4 pi fueron sacrificados para evaluar la producción de IL10 por CMN de bazo estimuladas con este patógeno.

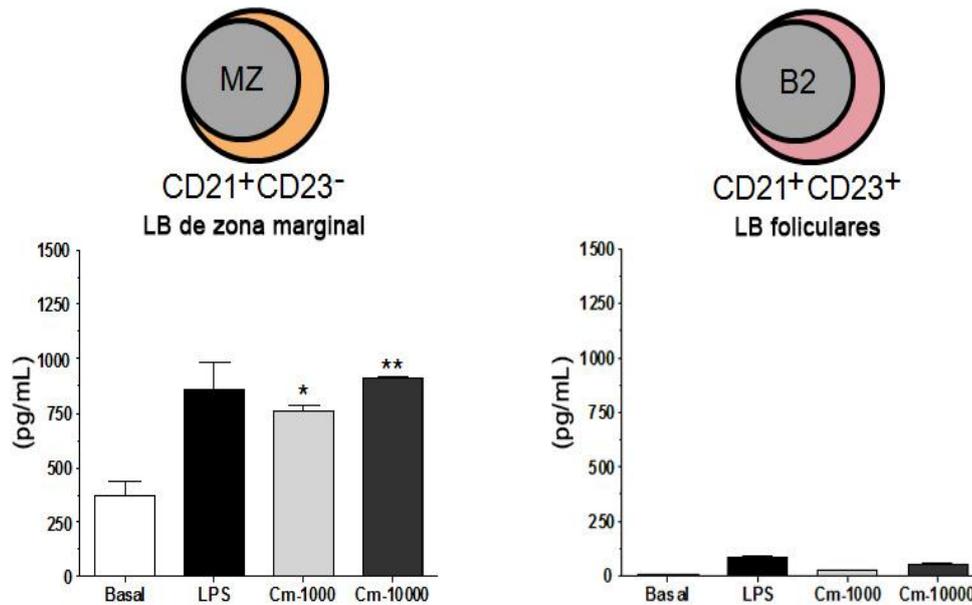


**Figura 32: Producción de IL10 por CMN de bazo de ratones TLR4<sup>-/-</sup> infectados por *C. muridarum*.** CMN de bazo de ratones del grupo control e infectado (4 dpi) fueron estimuladas con *C. muridarum* durante 72 hs. Estas células se obtuvieron de de ratones C57BL/6 *wt* o C57BL/6 TLR4<sup>-/-</sup>. En el sobrenadante de estos cultivos se determinó la concentración de IL10 mediante ELISA sandwich. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM, n = 5, el gráfico es representativo de dos experimentos independientes con resultados similares. Valores de \* p<0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

Se observaron menores concentraciones de IL10 en los sobrenadantes de CMN de bazo de ratones TLR4<sup>-/-</sup> infectados en el día 4 dpi. La concentración de IL10 producida por las CMN de los animales deficientes en TLR4 infectados fue comparable a la producida por las CMN la cepa *wt* no infectada (Figura 32).

#### **II.1.4 Caracterización de LB productores de IL10 en la infección del TUGM por *C. muridarum***

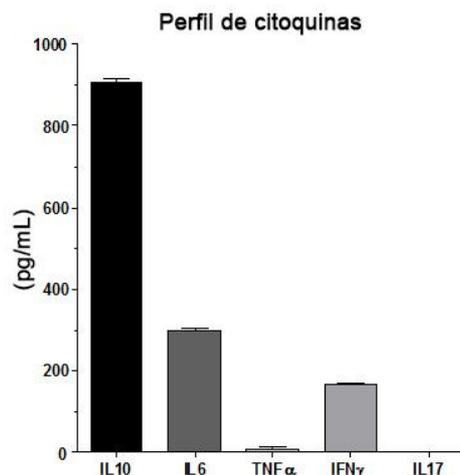
Para analizar la producción de IL10 en respuesta a *C. muridarum* en LB de ZM o LB2, se purificaron estas poblaciones a través de *cell-sorting* con los marcadores fenotipos característicos: CD19<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup>CD23<sup>-</sup> para LB de ZM y CD19<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup> para LB2. Estas células purificadas fueron cultivadas con medio de cultivo, con LPS de *E. coli* o con *C. muridarum* durante 72 hs, y se analizó la producción de IL10 en los sobrenadantes (Figura 34).



**Figura 34: Secreción de IL10 por LB de zona marginal y LB foliculares luego del estímulo con *C. muridarum*.** Se purificaron LB de zona marginal (CD19<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup>CD23<sup>-</sup>) y LB foliculares (CD19<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>) de un pool de CMN de bazo de ratones NOD, mediante *cell-sorting* con el uso de anticuerpos específicos para los marcadores fenotípicos de superficie mencionados. Estas células purificadas fueron cultivadas con distintos estímulos durante 72 hs. En el sobrenadante de estos cultivos se determinó la concentración de IL10 mediante ELISA sandwich. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM, n = 5, el gráfico es representativo de dos experimentos independientes. Cm-1000 = 1000 CE de *C. muridarum* por cada célula en el cultivo, Cm-10000 = 10000 CE de *C. muridarum* por cada célula en el cultivo. Valores de \* p<0,05; \*\* p<0,01 fueron considerados estadísticamente significativos. MZ = LB de ZM, B2 = LB2.

Los resultados mostraron que los LB de ZM produjeron cantidades significativas de IL10 al ser estimulados solamente con medio. Estas células secretaron niveles significativamente mayores de IL10 cuando fueron estimuladas con LPS de *E. coli* o con dosis crecientes de *C. muridarum*. En los sobrenadantes de los cultivos de los LB foliculares se detectaron niveles muy bajos de IL10 en condiciones basales y luego del estímulo con *C. muridarum*.

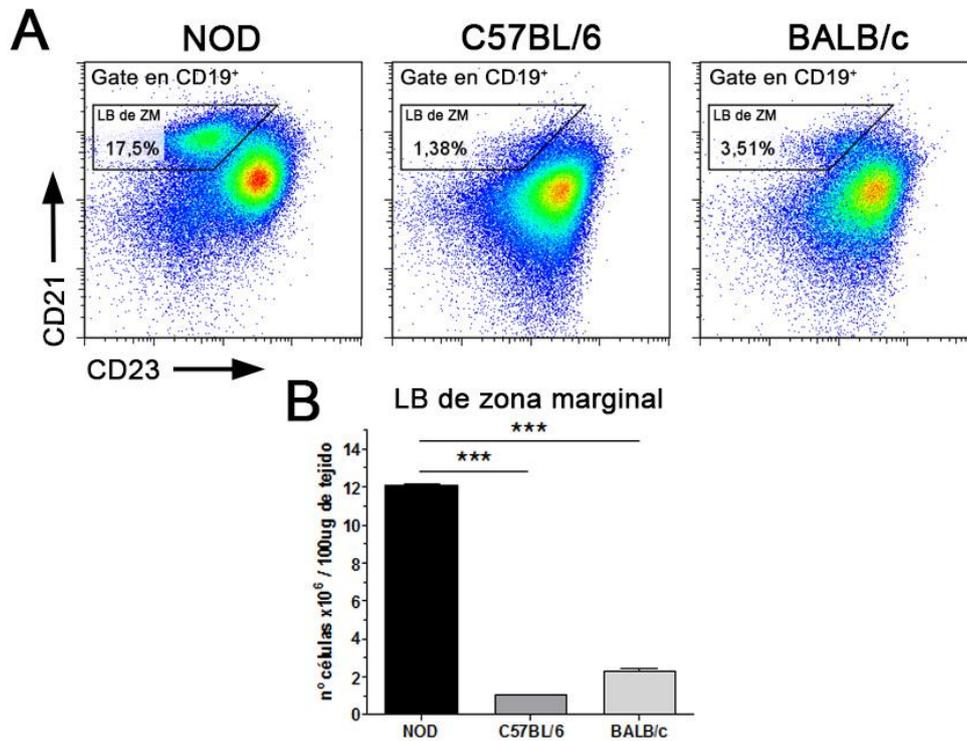
En los sobrenadantes de cultivo de los LB de ZM estimulados con *C. muridarum*, se observó que los mismos produjeron también citocinas inflamatorias como IL6, INF $\gamma$  y despreciables cantidades de TNF $\alpha$  (Figura 35).



**Figura 35: Secreción de citoquinas por LB de zona marginal estimulados por *C. muridarum*.** Se purificaron LB de zona marginal (CD19<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup>CD23<sup>-</sup>) de un pool de CMN de bazo de ratones NOD, mediante *cell-sorting* con el uso de anticuerpos específicos para los marcadores fenotípicos de superficie mencionados. Estas células purificadas fueron estimuladas en cultivo con *C. muridarum* durante 72 hs. En el sobrenadante de estos cultivos se determinó la concentración de IL10, IL6, IL17, IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  mediante ELISA sandwich. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM, n = 5, el gráfico es representativo de dos experimentos independientes con resultados muy similares.

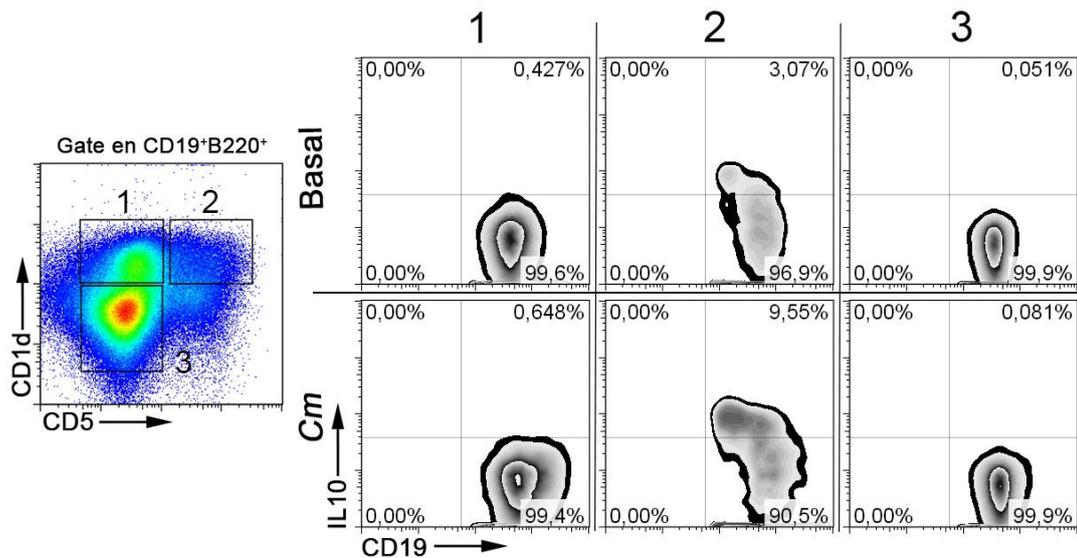
Datos de bibliografía indican que los LB de ZM son una de las principales células B productoras de IL10 (Zhang, 2013). Los resultados hasta aquí presentados sugieren que esta población responde al estímulo con *C. muridarum* produciendo elevados niveles de IL10. Por ello se analizaron las proporciones y cantidades de LB con fenotipo de LB de ZM en las tres cepas bajo estudio, es decir en bazo de ratones NOD, C57BL/6 y BALB/c.

Los resultados presentados en la Figura 36 mostraron que la proporción de LB de ZM se encontraba aumentada en bazo de los ratones NOD en comparación con lo que ocurría en las otras dos cepas. De la misma manera, al analizar los números absolutos se observó que la cantidad de LB de ZM estaba incrementada estadísticamente en bazo de ratones NOD. Similares resultados han sido reportados, señalando que esta elevada frecuencia de LB de ZM podría estar asociada al desarrollo de patologías autoinmunes en los ratones NOD (Rolf y col. 2005). Por otra parte los LB1a, otra sub-población de LB maduros también implicados en la producción de IL10, se encontraron en muy baja frecuencia en los bazos de las tres cepas de ratones analizadas anteriormente, es por ello que suponemos que la posible participación en la secreción de esta citocina sería despreciable (datos no mostrados).



**Figura 36:** Frecuencia y número absoluto de LB de zona marginal en bazo de ratones NOD, C57BL/6 y BALB/c. Se determinó el porcentaje de LB de zona marginal de bazo de ratones NOD, C57BL/6 y BALB/c mediante citometría de flujo utilizando marcadores fenotípicos para esta población. **A)** El gráfico es representativo del análisis de la frecuencia de células positivas para los marcadores analizados. **B)** Cuantificación en número absoluto por cada 100 µg de tejido. Los datos se muestran como la media ± SEM, n = 5, el gráfico es representativo de dos experimentos independientes con valores similares. Valores de \*\*\* p<0,001 fueron considerados estadísticamente significativos.

Teniendo en cuenta nuestros resultados, nos interesó identificar que marcadores fenotípicos podrían estar expresando los LB productores de IL10 al ser estimulados con *C. muridarum*. Para ello, CMN de bazo de ratones NOD fueron estimuladas con medio de cultivo solamente, o con *C. muridarum* durante 48 hs y luego analizamos el fenotipo de los LB productores o no de IL10 mediante citometría de flujo intracelular.



**Figura 33: Expresión de marcadores fenotípicos en células productoras de IL10 estimuladas con *C. muridarum*.** CMN de bazo de ratón NOD fueron estimuladas *in vitro* con medio solamente o con *C. muridarum* inactivada durante 48 hs. Las marcas de superficie (CD1d y CD5) permitieron identificar la expresión de las mismas en la superficie de estas CMN. Se utilizó citometría de flujo intracelular para determinar la frecuencia de células IL10<sup>+</sup>. Los valores en porcentaje representan la frecuencia de células para los marcadores evaluados. Este análisis es representativo de dos experimentos independientes con resultados similares, n = 4. Cm = *C. muridarum*.

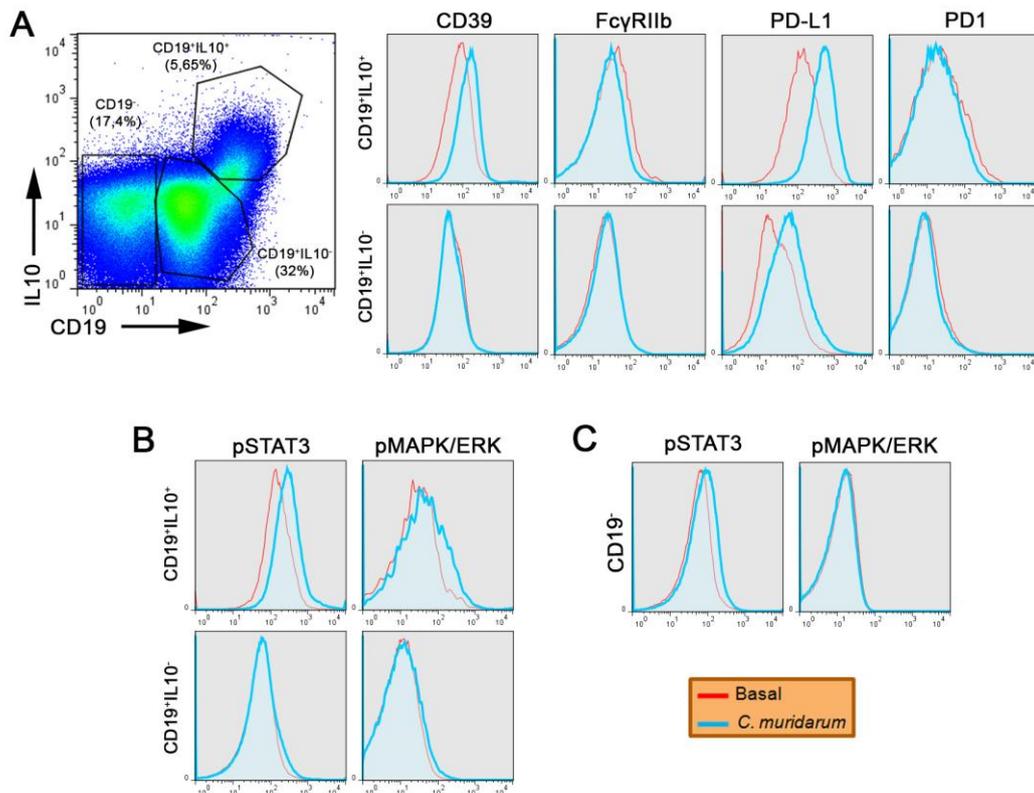
Al realizar marcaciones con anticuerpos anti CD1d, CD5 y CD19, pudimos determinar que las células productoras de IL10 expresaban en su superficie CD19<sup>+</sup>CD1d<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>. Dentro de esta población celular, la frecuencia de células IL10<sup>+</sup> se incrementó en aquellos cultivos estimulados con *C. muridarum* (Figura 33).

Además de los marcadores característicos de sub-poblaciones de LB maduras, se evaluaron otros marcadores de superficie como CD39, FcγRIIb, PD-L1 y PD1 en LB luego de la estimulación con *C. muridarum*. También fue de nuestro interés estudiar algunos factores de transcripción en los mismos, como el pSTAT3 (transductor de señal y activador de la transcripción 3 fosforilado) y el pMAPK-ERK (proteína quinasas activadas por mitógenos fosforiladas). Para poder llevar a cabo estos estudios, se purificaron CMN de bazo de ratones NOD y se las estimuló con *C. muridarum* durante 48 hs. Luego de este tiempo, las células fueron cosechadas y mediante marcación para citometría de flujo de superficie e intracelular se determinó la expresión de los marcadores mencionados (Figura 37).

En la Figura 37 se muestra la estrategia aplicada para analizar el fenotipo de LB luego del estímulo con *C. muridarum*. En la parte A se muestran las poblaciones seleccionadas para el análisis, siendo la primera LB IL10<sup>+</sup> y la segunda LB IL10<sup>-</sup>. Se realizaron análisis en las dos poblaciones estimuladas o no con *C. muridarum*. En relación a LB IL10<sup>+</sup>, se observaron diferencias en la expresión de CD39 con un leve incremento en

LB IL10<sup>+</sup> estimulados con *C. muridarum*. En relación al marcador PD-L1, se observó un incremento más marcado en la población CD19<sup>+</sup>IL10<sup>+</sup> estimulada con *C. muridarum*. Para los marcadores FcγRIIb y PD1, no se observaron variaciones en la expresión cuando se comparó la expresión en LB IL10<sup>+</sup> estimulados o no con esta bacteria. Los LB no productores de IL10 (CD19<sup>+</sup>IL10<sup>-</sup>) solo mostraron incrementos en PD-L1 luego del estímulo con *C. muridarum*. En el resto de las moléculas evaluadas no se observó variación alguna (Figura 37A).

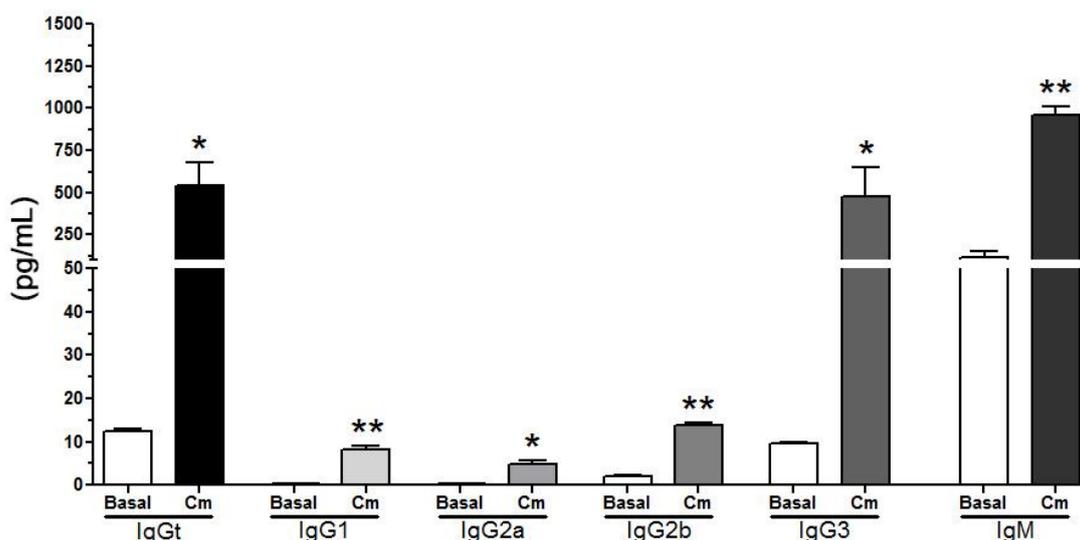
Con respecto a los marcadores intracelulares, se observó un incremento en la expresión de pSTAT3 sólo en los LB productores de IL10, mientras que pMAPK/ERK mostró un pequeño incremento en esta misma población celular. No se observaron variaciones en la expresión de pSTAT3 y pMAPK/ERK en las poblaciones de LB no productoras de IL10, (Figura 37B)



**Figura 37: Fenotipo de LB productoras de IL10 luego del estímulo con *C. muridarum*.** CMN de ratones NOD fueron estimuladas en cultivo con medio o con *C. muridarum* durante 48 hs. El gráfico de *dot-plot* en (A) representa el análisis de un cultivo de CMN estimuladas con *C. muridarum*, en el mismo se indica la selección de los LB productores de IL10 (CD19<sup>+</sup>IL10<sup>+</sup>), de los LB no productores de IL10 (CD19<sup>+</sup>IL10<sup>-</sup>), así como también de los linfocitos no B (CD19<sup>-</sup>). Se muestran, además, histogramas representativos del análisis de citometría de flujo de la expresión de marcadores de superficie (A) y de marcadores intracelulares (B) en la fracción de LB productores o no de IL10. En (C) se muestran histogramas representativos del análisis de la expresión de marcadores intracelulares en células CD19<sup>-</sup>. La línea roja corresponde a los cultivos estimulados solamente con medio y la línea celeste corresponde a los cultivos estimulados con *C. muridarum*. N = 5, el gráfico es representativo de dos experimentos independientes con resultados similares.

En la Figura 37C podemos ver como incrementó levemente la producción de pSTAT3 en linfocitos no B en los cultivos estimulados con *C. muridarum*, sin observarse cambios aparentes para el marcador pMAPK/ERK en estas mismas células en las condiciones evaluadas.

Como se mencionó en la introducción, la bibliografía indica que los LB regulatorios secretan grandes cantidades de anticuerpos naturales, principalmente de isotipo IgM, además de secretar IL10. Para analizar si la estimulación con *C. muridarum* inducía a los LB a secretar anticuerpos, purificamos LB de bazo de ratones NOD mediante *cell-sorting* y los estimulamos con medio o con *C. muridarum* durante 72 hs. En el sobrenadante de estos cultivos estimulados se determinó la concentración de varios isotipos de anticuerpos mediante ELISA.



**Figura 38: Secreción de anticuerpos por LB purificados de bazo de ratones NOD y estimulados con *C. muridarum*.** LB purificados de bazo fueron cultivados con *C. muridarum* o medio durante 72 hs. En el sobrenadante de estos cultivos se determinaron las concentraciones de IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgM mediante ELISA sandwich. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM,  $n = 5$ , el gráfico es representativo de dos experimentos independientes con resultados similares. Valores de \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  fueron considerados estadísticamente significativos. Cm = *C. muridarum*.

Los resultados presentados en la Figura 38 muestran que los LB purificados y estimulados con *C. muridarum* secretaron elevados niveles de IgM e IgG. Este aumento en IgG fue debido principalmente al isotipo IgG3. Aunque en menor proporción, los niveles de IgG1, IgG2a e IgG2b también mostraron incrementos significativos en sobrenadantes de cultivo de LB purificados y estimulados con *C. muridarum*.

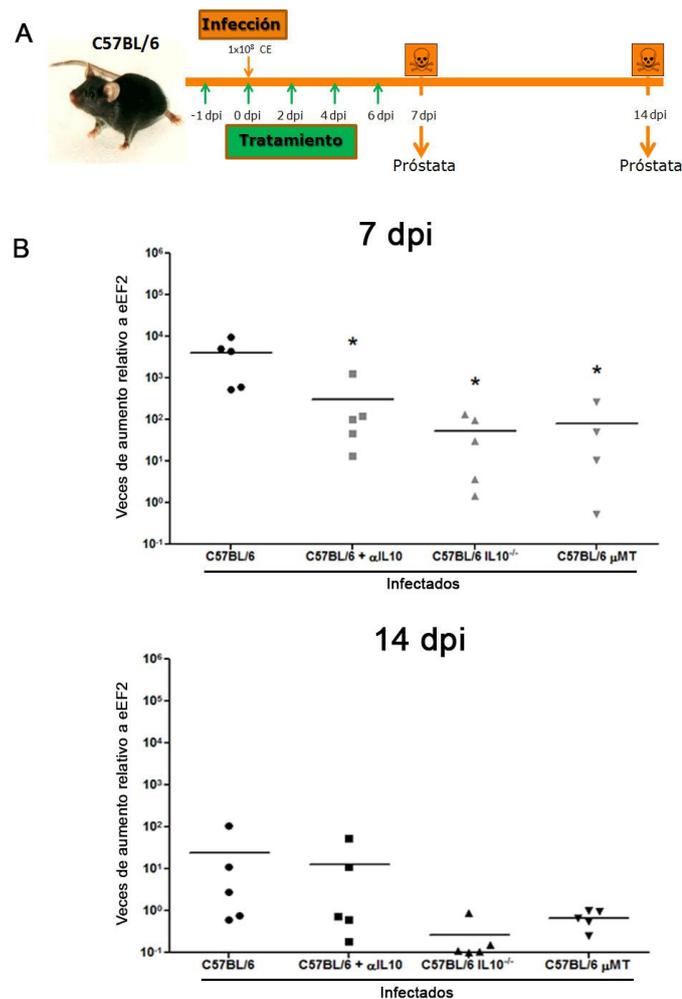
Los resultados obtenidos en esta parte de la tesis doctoral demostraron que la población de LB es la principal productora de IL10, tanto en los cultivos *in vitro* como en el

modelo de infección por *C. muridarum*. Los LB se activarían mediante la interacción de PAMPs y PRRs: siendo el cLPS uno de los componentes de la bacteria capaz de inducir la producción de IL10, y TLR4 uno de los PRR involucrados en este proceso. Se demostró que los LB de MZ purificados fueron muy buenos productores de IL10 luego del estímulo con *C. muridarum*. Además se observó que los LB productores de IL10 en estos cultivos de CMN de bazo fueron CD1d<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> y que, al estimularlos con *C. muridarum*, se incrementó la frecuencia de células productoras de IL10. La estimulación de CMN con esta bacteria también generó que los LB IL10<sup>+</sup> adquirieran la expresión de ciertos marcadores como PD-L1, CD39, pSTAT3 y pMAPK/ERk. Por otra parte, se pudo determinar que los LB fueron muy buenos productores de IgM e IgG3, cuando fueron estimulados con *C. muridarum*.

En conjunto, estos resultados sugieren que, durante la infección por *C. muridarum*, se activarían LBI que cumplirían su función en etapas tempranas de la infección. La mayor proporción de estos LBI IL10<sup>+</sup> y la eliminación demorada de la bacteria en ratones de la cepa NOD nos permiten postular la hipótesis de que la infección con *C. muridarum* activaría a LBI a producir elevados niveles de IL10 y esta citocina anti-inflamatoria podría modular la inducción de respuesta protectora Th1 y con ello evitar la respuesta inmune del hospedador, permaneciendo la bacteria por más tiempo.

## II.2 IL10 y LB regulatorios como moduladores de la respuesta inmune en la infección del TUGM por *C. muridarum*

Para poder evaluar el rol que cumple la IL10 durante el curso de la infección se planteó como primer estrategia disminuir o atenuar la acción de la misma mediante el empleo de un anticuerpo monoclonal (JES5-2A5) que tiene la capacidad de unirse y bloquear la actividad de esta citocina.



**Figura 39: Carga bacteriana en ratones C57BL/6 wild type tratados con  $\alpha$ IL10, en ratones deficientes en IL10 o deficientes en LB.** Ratones C57BL/6 wild type (sin tratar y tratados con el anticuerpo bloqueante), C57BL/6 IL10<sup>-/-</sup> y C57BL/6  $\mu$ MT fueron infectados por *C. muridarum*. **A)** El esquema de tratamiento con el anticuerpo bloqueante de IL10 (JES5-2A5) aplicado sólo en un grupo de ratones C57BL/6 wild type. Las flechas verdes indican los días en los que se inyectó intra-peritonealmente este anticuerpo. Se sacrificaron los animales de estos cuatro grupos experimentales a 7 y 14 dpi. **B)** Mediante PCR en tiempo real se determinó las veces de aumento de ADN de *Chlamydia* (OMP1) en función al control endógeno (eEF2) en el tejido prostático de los grupos experimentales. Cada punto corresponde a una variable individual y la línea corresponde a la media de esos valores. El gráfico es representativo de dos experimentos independientes con resultados similares. Valores de \*  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos. OMP1, gen estructural de *Chlamydia*; eEF2, control endógeno.

Como se expresó anteriormente, *C. muridarum* induce a los LB del hospedador a secretar cantidades importantes de IL10 a tiempos tempranos pos-infección. Teniendo en cuenta estos datos, se realizó un esquema experimental como el detallado en la Figura 39A, administrando intra-peritonealmente en los días -1, 0, 2, 4 y 6 pi una dosis del anticuerpo bloqueante de IL10 ( $\alpha$ IL10). En el día 0, ratones C57BL/6 fueron inoculados en meato urinario con esta bacteria y sacrificados a los 7 o 14 dpi. En muestras de próstata de ratones tratados o no con  $\alpha$ IL10, se analizó la carga bacteriana mediante PCR en tiempo real. Estos estudios fueron realizados en primera instancia en la cepa C57BL/6, debido a que contamos con los animales deficientes en IL10 en este background genético.

Al determinar la carga bacteriana en próstata en el día 7 pi, se observó una disminución estadísticamente significativa en los ratones C57BL/6 tratados con el anticuerpo el  $\alpha$ IL10 comparados con la carga bacteriana presente en ratones C57BL/6 no tratados (Figura 39B).

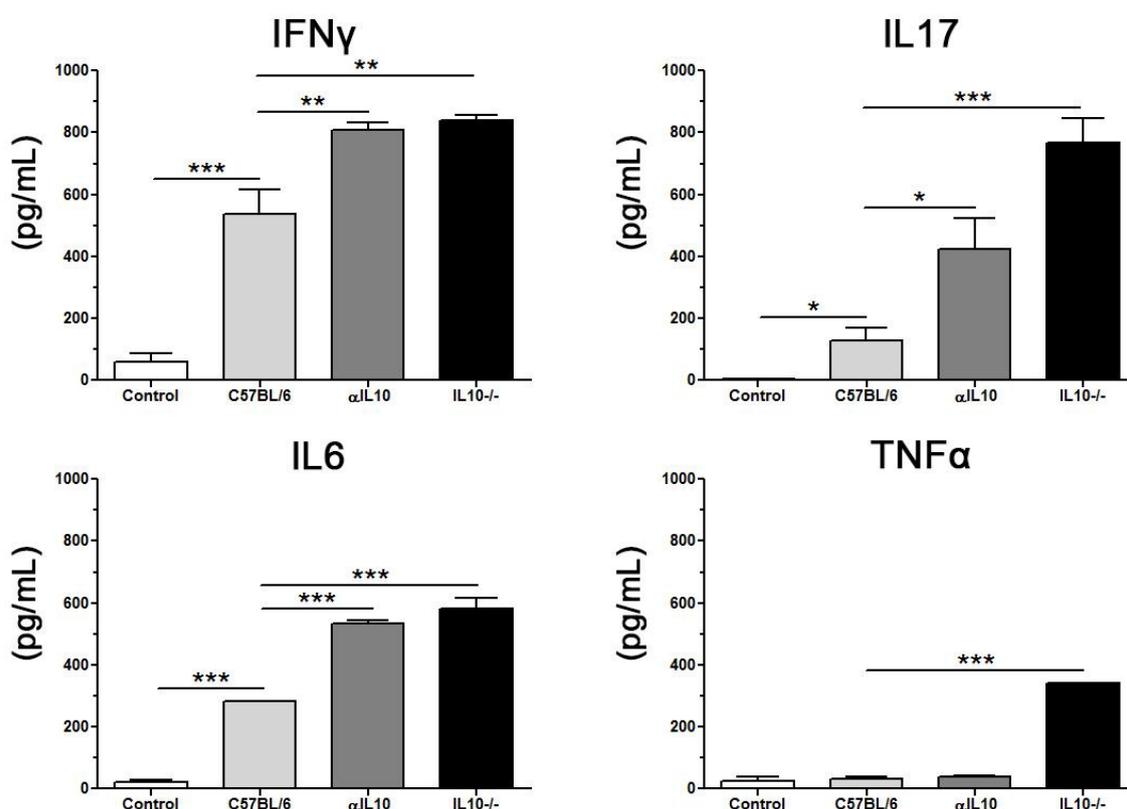
Experimentos realizados utilizando ratones deficientes en IL10 (C57BL/6 IL10<sup>-/-</sup>), mostraron una reducción en la carga bacteriana más acentuada que la observada en ratones *wt* tratados con el anticuerpo bloqueante.

En la Figura 39B, también se muestran los resultados obtenidos al trabajar con ratones C57BL/6  $\mu$ MT, los cuales no poseen LB. Al analizar la carga bacteriana en el día 7 pi en estos ratones deficientes en LB, se observaron valores significativamente menores a los de ratones C57BL/6 *wt*.

En los mismos grupos experimentales tratados con anticuerpo bloqueante de IL10, deficientes en IL10 o deficientes en LB se analizó la carga bacteriana a tiempos más avanzados del esquema experimental. No se encontraron diferencias significativas en la cantidad relativa de ADN de *C. muridarum* en estos grupos experimentales evaluados en el día 14 pi, aunque se observó una tendencia a presentar valores menores en ratones C57BL/6 IL10<sup>-/-</sup> y C57BL/6  $\mu$ MT. Estos resultados indican que tanto el bloqueo/ausencia de IL10 como la ausencia de LB contribuyen a una mejor eliminación de la bacteria en el TUGM.

Para evaluar si la disminución de carga bacteriana se asociaba a diferencias en la respuesta inmune celular, se realizaron cultivos de CMN de bazo de los distintos grupos experimentales estimulados con *C. muridarum* inactivada y se evaluó la producción de citocinas en los sobrenadantes de cultivo. En la Figura 40, se muestran los resultados obtenidos en los cultivos de CMN de bazo de ratones infectados tratados o no, sacrificados en el día 7 del esquema experimental. Los sobrenadantes de cultivo de CMN de bazo de ratones C57BL/6 infectados presentaron niveles elevados de IFN $\gamma$ , IL17 e IL6 comparados

con los valores presentes en ratones C57BL/6 sin infectar. Las CMN de bazo de C57BL/6 infectados y tratados con el  $\alpha$ IL10, presentaron mayores concentraciones de IFN $\gamma$ , IL17 e IL6 que los observados en sobrenadantes de ratones C57BL/6 sin tratar. Las CMN de bazo de ratones C57BL/6 IL10<sup>-/-</sup> produjeron aún mayores cantidades de IFN $\gamma$ , IL17 e IL6 que las observadas en ratones C57BL/6 infectados y C57BL/6 infectados y tratados con  $\alpha$ IL10. Los niveles de TNF $\alpha$  sólo mostraron incrementos significativos en sobrenadantes de ratones C57BL/6 IL10<sup>-/-</sup> infectados.



**Figura 40: Niveles de IFN $\gamma$ , IL17, IL6 y TNF $\alpha$  producidos por CMN de bazo de ratones C57BL/6, C57BL/6  $\alpha$ IL10 y C57BL/6 IL10<sup>-/-</sup> en respuesta a *C. muridarum*.** Se purificaron CMN de bazo de ratones C57BL/6 tratados y no tratados (C57BL/6) con el anticuerpo recombinante  $\alpha$ IL10 (clon JES5-2A5) y de animales deficientes en IL10 (IL10<sup>-/-</sup>). Estos animales fueron infectados con *C. muridarum* vía meato urinario y sacrificados a 7 dpi. Las CMN purificadas fueron cultivadas con medio solamente o con *C. muridarum* durante 72 hs. En el sobrenadante de estos cultivos se determinó la concentración de IFN $\gamma$ , IL17, IL6 y TNF $\alpha$  mediante ELISA sandwich. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM, n = 5, el gráfico es representativo de dos experimentos independientes con resultados similares. Valores de \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001 fueron considerados estadísticamente significativos.

Estos resultados sugieren que en los cultivos de CMN de bazo de los ratones C57BL/6 *wt* infectados existirían linfocitos productores de IFN $\gamma$  IL17 específicos para *C. muridarum*, y que el bloqueo de IL10 en etapas tempranas de la infección permitiría una

generación de mayores cantidades de linfocitos productores de estas citocinas. De manera similar, en ratones C57BL/6  $IL10^{-/-}$ , la deficiencia en esta citocina permitiría la generación de mayores cantidades de linfocitos productores de INF $\gamma$ , IL17 y TNF $\alpha$ . Debido a que numerosa bibliografía indica que las células Th1 son las principales células efectoras protectoras en la infección de tracto genital femenino por *C. muridarum*, creemos que el incremento en INF $\gamma$  observado en estos sobrenadantes podría revelar mayores niveles de linfocitos Th1 específicos en los ratones C57BL/6 tratados con  $\alpha IL10$  y en los ratones C57BL/6  $IL10^{-/-}$ . Estos mayores niveles de linfocitos Th1 podrían asociarse, o explicar en parte, el *clearance* o la eliminación acelerada de *C. muridarum* en la próstata de los ratones pertenecientes a estos grupos experimentales.

Para conocer si el incremento en INF $\gamma$  observado en sobrenadantes de cultivos era debido a un incremento en linfocitos Th1, se realizaron ensayos de marcación y citometría intracelular en CMN provenientes de bazo o de nódulos drenantes de próstata estimuladas con *C. muridarum* y se determinó la frecuencia de LT productores de INF $\gamma$  (Figura 41).

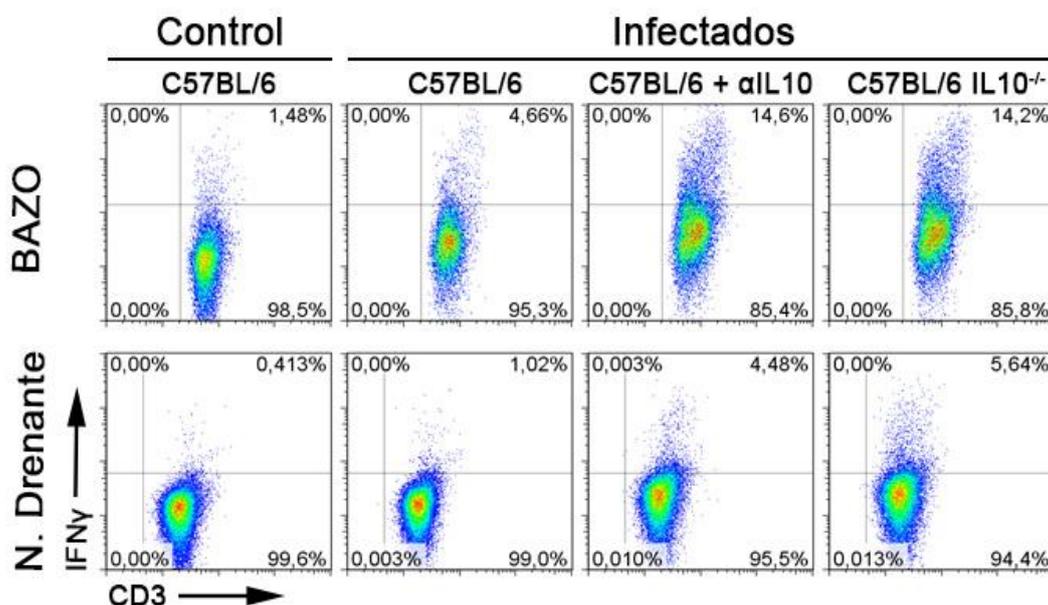


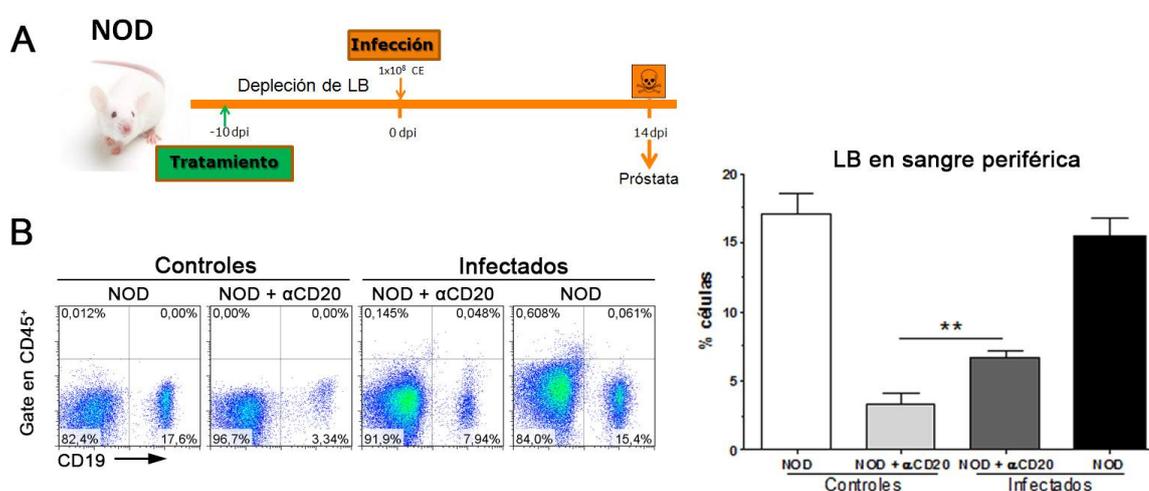
Figura 41: Frecuencia de LT productores de INF $\gamma$  en órganos linfoides de ratones C57BL/6 tratados con  $\alpha IL10$  y en ratones C57BL/6  $IL10^{-/-}$  infectados por *C. muridarum*. Las CMN purificadas de bazo y de nódulos drenantes de próstata fueron cultivadas con medio solamente o con *C. muridarum* durante 72 hs. El gráfico representa el análisis de citometría de la frecuencia de células positivas para los marcadores analizados. Representativo de dos experimentos independientes con resultados similares, n = 4.

Los resultados evidenciaron una frecuencia moderadamente aumentada de LT productores de INF $\gamma$  ( $CD3^{+}INF\gamma^{+}$ ) en los cultivos de los animales C57BL/6 *wt* infectados con *C. muridarum*, en comparación con lo observado en ratones C57BL/6 sin infectar. No



Los ratones NOD tratados con  $\alpha$ IL10 presentaron una menor carga bacteriana en próstata, demostrando que el bloqueo de IL10 en tiempos tempranos también permitió la eliminación más rápida de la bacteria en esta cepa de ratones (Figura 42).

Previamente, se demostró que los LB son la población celular principalmente relacionada con la producción de IL10 durante la infección del TUGM con *C. muridarum*. Para evaluar la participación de los LB en el *clearance* de *C. muridarum* en ratones NOD, se trataron ratones de esta cepa con un anticuerpo específico  $\alpha$ CD20 (clon 5D2) para eliminar y reducir de manera significativa a los LB. El tratamiento se realizó por vía intra-peritoneal 10 días previos a la infección (Figura 43A).

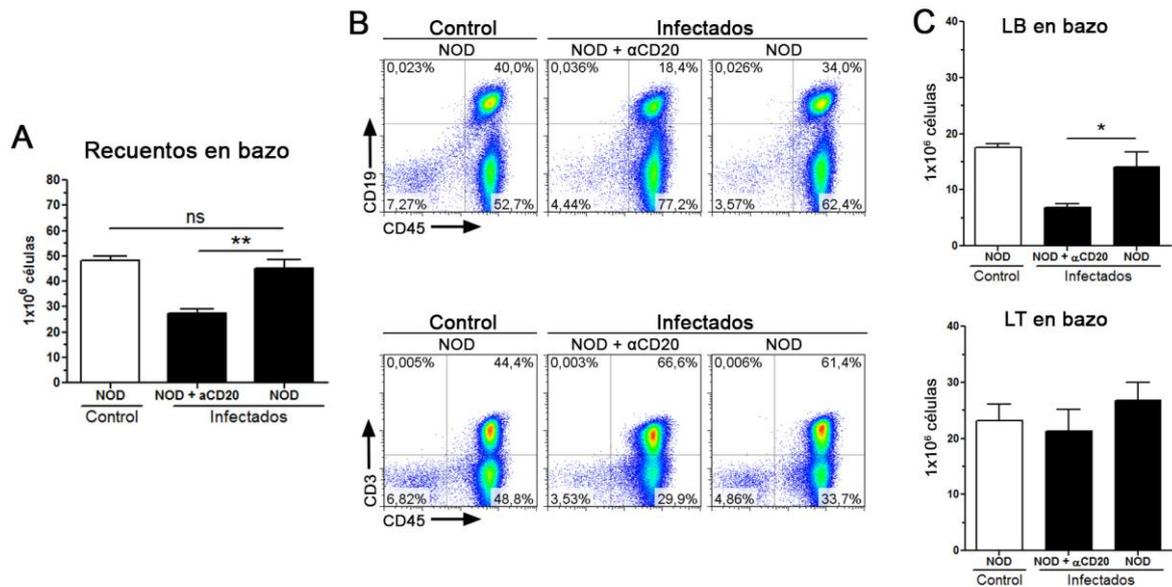


**Figura 43: Niveles de LB en sangre periférica de ratones NOD tratados con  $\alpha$ CD20.** A) Esquema de tratamiento con el anticuerpo específico para CD20 (clon 5D2). La flecha verde indica el momento en que se inyectó intra-peritonealmente este anticuerpo en los ratones NOD. La infección fue realizada vía meato urinario, de la misma forma que en experimentos previos. Se sacrificaron los animales tratados y no tratados a 14 dpi. B) Gráficos representativos de análisis de citometría de flujo de la sangre periférica de estos animales. En el gráfico de barras contiguo se muestra el porcentaje de LB en sangre periférica correspondiente a la citometría realizada en este tejido. El gráfico es representativo de dos experimentos independientes con resultados muy similares. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM, n = 5. Valores de \*\* p<0,01 fueron considerados estadísticamente significativos.

Para analizar si el tratamiento reduce de manera significativa las poblaciones con fenotipo de LB, se realizaron análisis de las proporciones de células CD19<sup>+</sup> en sangre periférica en ratones tratados con  $\alpha$ CD20 y controles. Como se muestra en la Figura 43B, los niveles de células CD19<sup>+</sup> se encontraron significativamente disminuidos en el día 0 del esquema en los dos grupos de ratones tratados. Un análisis similar realizado en el día 14, es decir a los 24 post tratamiento con el  $\alpha$ CD20, demostró que los porcentajes de células CD19<sup>+</sup> se incrementaron en comparación a los valores observados en el día 0 dpi, sin embargo se mantuvieron disminuidos en relación al porcentaje de LB presentes en los

ratones no tratados. Estos resultados demostraron que el grupo tratado con  $\alpha$ CD20, al menos en circulación periférica, presentaba una disminución de LB, más marcada en los primeros días de la infección.

El análisis de la celularidad y los niveles de linfocitos T y B en bazo de ratones tratados con  $\alpha$ CD20 mostró valores reducidos y menores niveles de células CD19<sup>+</sup> en bazo de ratones NOD tratados con  $\alpha$ CD20 (Figura 44). Sin embargo, los niveles de linfocitos CD3<sup>+</sup> no mostraron diferencias significativas entre ratones tratados o no con  $\alpha$ CD20.



**Figura 44: Niveles de LB en bazo de ratones NOD tratados con  $\alpha$ CD20.** Ratones de la cepa NOD fueron tratados con  $\alpha$ CD20, infectados y sacrificados a los 14 dpi. **A)** Recuento celular en bazo de ratones de los tres grupos experimentales (NOD control, NOD infectado y NOD infectado +  $\alpha$ CD20). **B)** Imágenes representativas del análisis de citometría de flujo del bazo de estos grupos experimentales. **C)** Valores absolutos de LB y LT en bazo de los tres grupos experimentales. El gráfico es representativo de dos experimentos independientes con resultados similares. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM, n = 5. Valores de \* p<0,05; \*\* p<0,01 fueron considerados estadísticamente significativos.

Al analizar la celularidad en nódulos drenantes de ratones NOD tratados con  $\alpha$ CD20 se observaron mayores recuentos celulares en ratones infectados, que en ratones NOD controles. Al comparar la celularidad en nódulos de ratones NOD tratados con  $\alpha$ CD20 e infectados, o infectados sin tratamiento, se observó nuevamente una menor celularidad en ratones tratados con  $\alpha$ CD20 (Figura 45). El análisis de LB y LT en nódulos drenantes demostró menores valores para células CD19<sup>+</sup> y un aumento significativo para la población de células CD3<sup>+</sup> (Figura 45).

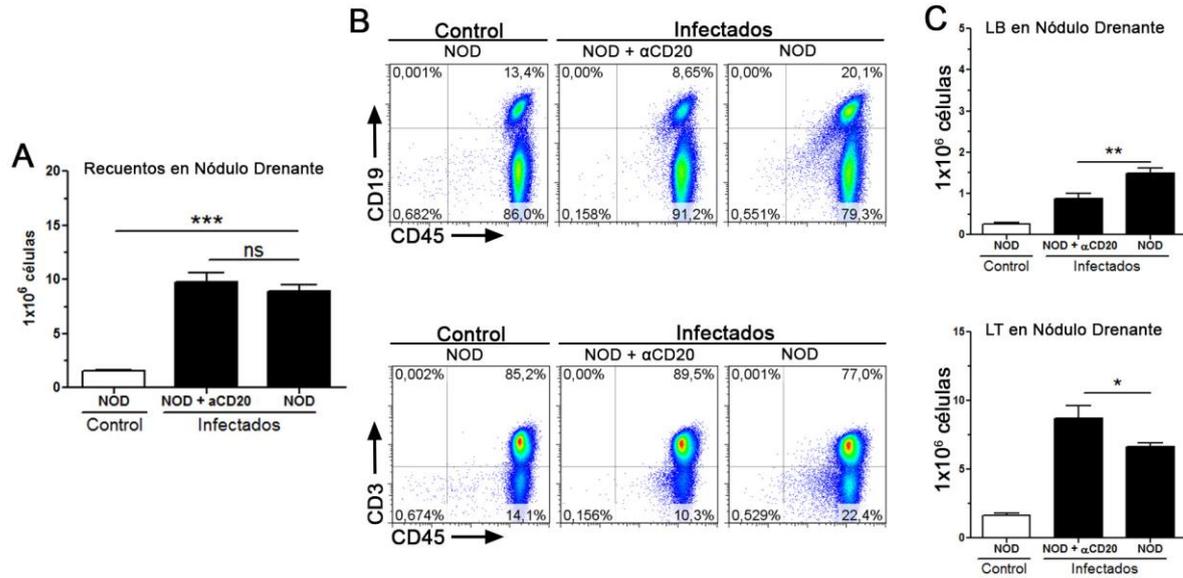
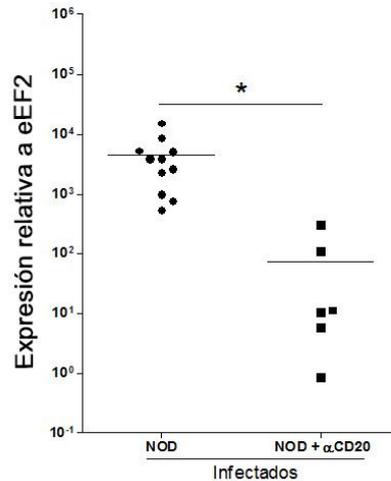


Figura 45: **Niveles de LB en nódulos drenantes de próstata de ratones NOD tratados con αCD20.** Ratones de la cepa NOD fueron tratados con αCD20, infectados y sacrificados a los 14 dpi **A**) Recuento celular en el nódulo drenante de próstata de ratones de los tres grupos experimentales (NOD control, NOD infectado y NOD infectado + αCD20). **B**) Imágenes representativas del análisis de citometría de flujo de nódulos drenantes de estos grupos experimentales. En ellas se representa la frecuencia de células positivas para los marcadores utilizados. **C**) En estos gráficos de barras se muestran el número absoluto de LB y LT en nódulos drenantes de los tres grupos experimentales correspondientes a la citometría realizada en este tejido. El gráfico es representativo de dos experimentos independientes con resultados similares. Los datos se muestran como la media ± SEM, n = 5. Valores de \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 fueron considerados estadísticamente significativos.

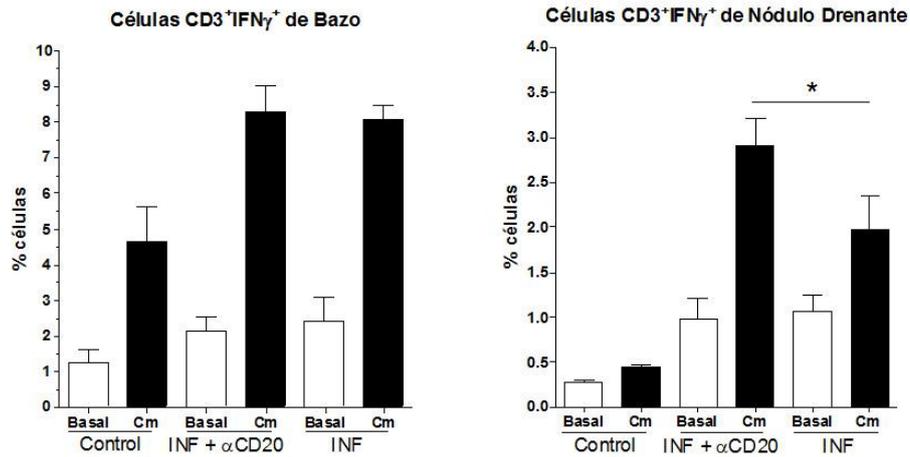
Se observó una reducción estadísticamente significativa en la carga bacteriana en la próstata de los ratones tratados con αCD20, demostrando que los ratones que poseen bajos niveles de LB eliminan más eficientemente a *C. muridarum* del TUGM (Figura 46). De manera similar a lo demostrado en ratones μMT C57BL/6, la falta de LB en ratones C57BL/6, o niveles muy disminuidos de LB (uso del αCD20) en ratones NOD, se relacionó con una mejor eliminación bacteriana.



**Figura 46: Carga bacteriana en próstata de ratones NOD tratados con  $\alpha$ CD20.** Mediante PCR en tiempo real se determinó las veces de aumento de ADN de chlamydia (OMP1) en función al control endógeno (eEF2) en el tejido prostático de estos grupos experimentales. Cada punto corresponde a una variable individual y la línea corresponde a la media de esos valores. El gráfico es representativo de dos experimentos independientes con resultados similares. Valores de \*  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos. OMP1, gen estructural de *Chlamydia*; eEF2, control endógeno.

Para conocer si la menor carga bacteriana observada en ratones NOD tratados con  $\alpha$ CD20 se relacionaba con mayores niveles de LT productores de IFN $\gamma$ , se midieron las proporciones de estas poblaciones en bazo y nódulos drenantes de próstata de ratones sin infectar y ratones infectados tratados o no tratados con  $\alpha$ CD20 (Figura 47). La frecuencia de células CD3<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> fue mayor en bazo y nódulos de ratones infectados cuando se los comparó con los valores presentes en ratones no infectados. Se compararon los niveles de células CD3<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> en bazo de ratones infectados tratados o no con  $\alpha$ CD20, no se detectaron diferencias. Sin embargo, en los cultivos de nódulos drenantes de próstata de ratones infectados y tratados con  $\alpha$ CD20, se observó un incremento significativo en el porcentaje de células CD3<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> en comparación con los valores presentes en ratones NOD infectados no tratados con el anticuerpo.

Estos resultados demuestran que la reducción en los niveles de LB en el momento de la infección se acompaña con una mejor eliminación bacteriana y mayores frecuencias de linfocitos T productores de IFN $\gamma$ . En base a estos resultados, se postula que el tratamiento con el anticuerpo  $\alpha$ CD20 redujo la cantidad de LB en los tejidos y, a consecuencia de esto, disminuyeron los niveles de IL10 a tiempos tempranos de la infección. Esto se asoció con un aumento en la generación de LT productores de IFN $\gamma$ , población relacionada con una mejor eliminación bacteriana.



**Figura 47: Frecuencia de LT productores de IFN $\gamma$  en bazo y nódulos drenantes de ratones NOD tratados con  $\alpha$ CD20.** Las CMN purificadas de bazo y de nódulos drenantes de la próstata fueron cultivadas solamente con medio de cultivo o con *C. muridarum* durante 72 hs. El gráfico representa el porcentaje de LT productores de IFN $\gamma$  (CD3<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>), correspondiente al análisis de citometría de flujo en estos tejidos para los marcadores analizados. El gráfico es representativo de dos experimentos independientes con resultados similares. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM, n = 5. Valores de \* p<0,05; fueron considerados estadísticamente significativos. Cm= *C. muridarum*, INF= Infectado.

Los resultados obtenidos en esta última parte de este trabajo de tesis doctoral, demostraron que el bloqueo de IL10 en ratones C57BL/6 y NOD se asoció con una capacidad de eliminación bacteriana más eficiente. De la misma manera, ratones IL10<sup>-/-</sup> eliminaron más eficientemente a *C. muridarum* del TUGM. Por otro lado los resultados presentados en esta tesis demostraron que la producción de IL10 fue realizada por LB. En concordancia con estos resultados, ratones deficientes en LB y ratones tratados con un anticuerpo que eliminó las poblaciones de LB, también eliminaron más eficientemente a la bacteria del TUGM. Nuestros resultados demuestran el importante rol de los LB regulatorios secretores de IL10 en el modelo de infección por *Chlamydia* y sugieren que la inducción de esta citocina, mediada por componentes de la bacteria, sería un mecanismo que la misma desarrolla para modular negativamente la respuesta inmune protectora del hospedador logrando así permanecer como una infección crónica.

# DISCUSIÓN

---

En el presente trabajo de tesis, se desarrolló un modelo de infección del TUGM por *C. muridarum* en ratones NOD, que simuló algunas características típicas de la infección de tracto genital humano por *C. trachomatis*. El uso de este modelo experimental permitió analizar aspectos que en la infección humana serían difíciles de abordar, debido principalmente a que al tratarse de una infección asintomática en la mayoría de los casos, no se conoce con certeza cuando se produjo la exposición del individuo a este patógeno. Es por ello, que en gran parte de los casos no se puede determinar si se trata de una primera exposición o una re-exposición a la bacteria y, además, si en el momento de realizar los estudios el paciente se encuentra en una etapa aguda o crónica de la infección.

Los resultados obtenidos, utilizando el modelo de infección en ratones NOD, demostraron que los mismos, luego de ser inoculados en meato urinario con *C. muridarum*, presentaron una infección ascendente del TUGM. Se detectó ADN bacteriano en distintos órganos que componen el TUGM a tiempos tempranos. La bacteria fue detectada en un sitio distante a uretra, como es testículo, y también en la glándula prostática. De manera interesante, se observó que *C. muridarum* persistió a tiempos tardíos solamente en el tejido prostático. No sólo presencia, sino también mayores cargas bacterianas fueron detectadas en próstata, sugiriendo que este tejido favorece la infección por esta bacteria. Al realizar experimentos similares en ratones de otras cepas, como C57BL/6, se observó un perfil de eliminación idéntico en uretra, mientras que en la próstata la carga bacteriana resultó menor que la determinada en este mismo tejido de los ratones NOD y con una cinética de eliminación más rápida. Observaciones similares fueron también descritas en el modelo de infección en ratas Wistar realizado en nuestro grupo, donde también la bacteria mostró una eliminación demorada y mayores cargas bacterianas en próstata (MacKern-Oberti y col. 2011c; Motrich y col. 2012).

La elección del tipo de muestra y la metodología a utilizar en pruebas de *screening*, diagnóstico y pos-tratamiento de infección por *C. trachomatis* en humanos, deberían tener en cuenta los resultados presentados en este trabajo de tesis. En este sentido, se han reportado diferencias en las tasas de prevalencia para esta infección en estudios poblacionales. Estas diferencias estuvieron relacionadas con el tipo de muestra utilizada (hisopados uretrales, primer chorro de orina, semen y/o expresión prostática) y las metodologías empleadas para realizar dichos estudios (Krause y Bohring 2003). De manera interesante, algunos estudios demostraron la presencia de *C. trachomatis* en semen o en expresión prostática en pacientes cuyos hisopados uretrales habían sido negativos para esta bacteria (Gdoura y col. 2001). También fue posible detectar *C. trachomatis* en biopsias de próstata en pacientes con hisopados uretrales negativos (Mackern-Oberti y col. 2013). Estos resultados sugieren que lo observado en el modelo de

infección por *C. muridarum* en ratones podría estar también sucediendo en la infección del TUGM en pacientes, y que la muestra de hisopado uretral no sería la más adecuada, ya que la misma podría dar resultados falsos negativos, pudiendo estar presente la infección en vías altas del tracto. Nuestros resultados sugieren que, para un diagnóstico adecuado, es importante seleccionar una muestra biológica que represente a todo el TUGM. Las muestras de semen serían una opción adecuada ya que estas se componen tanto de espermatozoides como de las secreciones de todas las glándulas accesorias (Corradi y col. 1995). Estudios realizados con muestras de semen de ratas infectadas con *C. muridarum* demostraron que este tipo de muestra permite detectar la presencia de la bacteria a tiempos tempranos y tardíos pi, cuando la misma se encuentra tanto diseminada en vías altas y bajas del TUGM, como cuando la misma está preferencialmente en próstata (Motrich y col. 2012). Durante el trabajo experimental de esta tesis, se intentó obtener semen de ratones NOD utilizando la misma estrategia que para ratas Wistar, sin embargo la metodología empleada no fue exitosa.

La detección de la *Chlamydia* mediante cultivo celular es ampliamente aceptada y considerada la técnica “*gold standard*” para demostrar no solamente la presencia de *Chlamydia* en la muestra analizada, sino también para evaluar la viabilidad de la misma. En el caso de muestras del TUGM, como semen, orina, expresión prostática, biopsias prostáticas y otras, la realización de cultivos exitosos es dificultosa y la sensibilidad de la técnica es cuestionable, principalmente debido a factores como la presencia de inhibidores del crecimiento bacteriano en las mismas (Krause y Bohring 2003). En este trabajo de tesis, se realizaron cultivos de tejidos del TUGM de ratones NOD observando sólo la presencia de *C. muridarum* viable a tiempos tempranos (datos no mostrados). Al realizar este tipo de ensayos en muestras obtenidas a tiempos tardíos los cultivos fueron negativos, aún en muestras en las que la carga bacteriana evaluada por PCR era positiva. Es posible que la discordancia en estos resultados obtenidos por cultivo y PCR se deba a la baja sensibilidad de los cultivos, sumados a menores cantidades de bacteria en tiempos avanzados del esquema experimental. Debido a estos problemas metodológicos, todos los resultados presentados en esta tesis doctoral se realizaron evaluando la presencia de ADN de *C. muridarum* en los tejidos del TUGM mediante biología molecular. Mediante esta técnica, se encontró que el tejido prostático presentó un máximo de carga bacteriana a 14 dpi y luego la misma se redujo sin llegar a ser negativa, por lo menos en los tiempos evaluados, hasta el día 80 pi. Sin embargo, la limitación de esta técnica es que solo se pudo detectar la presencia de ADN de la bacteria sin poder determinar si la misma se encontraba viable. Se ha reportado que pacientes bajo tratamiento con antibióticos específicos para *C. trachomatis*, resuelven la infección, pero al quedar restos de ADN

bacteriano las técnicas de biología molecular arrojan resultados positivos, aunque no se conoce durante cuánto tiempo se puede dar esta situación (Singh y Marrazzo 2013). En nuestros experimentos, se observaron cargas bacterianas similares desde el día 45 hasta el día 80 pi, sin descenso de los valores, por lo que se podría pensar que la bacteria sigue presente, replicándose lentamente o en un estado de persistencia en próstata.

De todas formas, para responder estos interrogantes adecuadamente se debería realizar otro tipo de análisis. La evaluación de una posible persistencia bacteriana podría abordarse mediante estudios de microscopía electrónica y análisis ultra-estructural de las inclusiones *clamidiales*. La persistencia bacteriana podría abordarse también analizando la expresión de genes asociados a persistencia. Aunque la mayoría de los estudios que analizan genes relacionados a persistencia se han realizado *in vitro* y con *C. trachomatis*, (Carey y col. 2013) en un trabajo se ha demostrado que la expresión de genes relacionados a persistencia de *C. muridarum* en ensayos *in vitro* se asemeja a lo demostrado en otros modelos de persistencia *clamidial*. Estos autores evaluaron los mismos genes y reportaron persistencia de *C. muridarum* en oviductos en modelos *in vivo* de infección de tracto femenino por esta bacteria. Sería interesante realizar estudios similares en el modelo de infección del TUGM para evaluar una posible persistencia de *C. muridarum* en próstata a tiempos tardíos de infección.

Nuestros resultados sugieren que el tejido prostático podría ofrecer a *C. muridarum* un nicho biológico óptimo para favorecer su permanencia/persistencia y el desarrollo de infecciones prolongadas en el TUGM, pudiendo ésta no ser detectada en la uretra a tiempos tardíos pi, pero permanecer en este tracto crónicamente. Nuestras observaciones apoyan los estudios realizados en pacientes que indican que *C. trachomatis* es uno de los agentes más frecuentemente asociados a prostatitis crónicas bacterianas (Wagenlehner y col. 2006).

Se ha reportado que la infección del tracto genital por *C. trachomatis*, tanto en hombres como en mujeres, se asocia con el desarrollo de una inflamación moderada en varios de los tejidos que componen este tracto (Redgrove y McLaughlin 2014; Meara y col. 2014). Sin embargo, el análisis de las poblaciones celulares que infiltran esos tejidos no ha sido aún muy explorado. En este sentido, los modelos experimentales son importantes para abordar estos procesos y la bibliografía cuenta con datos únicamente relacionados a inflamación e infiltración de tracto genital femenino (Mackern-Oberti y col. 2013).

En este trabajo doctoral se demostró que, durante el curso de la infección, se detecta la presencia de infiltración leucocitaria en distintos tejidos del TUGM. El grado de esta infiltración leucocitaria, determinada por la presencia y cantidad de células CD45<sup>+</sup>

(marcador leucocitario), acompañó en cierta medida a la presencia de *C. muridarum* en los tejidos analizados. A tiempos tempranos pos-infección el infiltrado fue mayor y luego, con el transcurso del tiempo, se redujo a valores basales. Nuestro blanco de estudio fue precisamente la próstata, en donde se evaluó en paralelo la carga bacteriana y la presencia de infiltrado inflamatorio, el cual fue máximo en el día 14 dpi y luego disminuyó hasta alcanzar valores similares a los animales sin infectar. Este infiltrado inflamatorio estuvo constituido principalmente por células GR1<sup>+</sup> (probablemente neutrófilos), y en segunda y tercer instancia por LT (CD3<sup>+</sup>) y LB (CD19<sup>+</sup>), respectivamente.

Como se mencionó anteriormente, los neutrófilos son las primeras células en llegar al sitio de infección, aunque en el caso de infecciones por *Chlamydia* todavía no se ha demostrado si tienen un rol positivo o negativo en el control inicial de la diseminación de la bacteria (Meara y col. 2014). En otros modelos desarrollados en ratones C57BL/6 infectados intra-peritonealmente con *Chlamydia abortus*, se ha visto que la ausencia de neutrófilos aumenta marcadamente la susceptibilidad a la infección (Buendía y col. 2002). Estudios realizados en muestras de hisopados uretrales y vaginales de pacientes con infección por *C. trachomatis* describieron la presencia de PMN (Cunningham y Beagley 2008). Como se observó en este trabajo de tesis, y también ha sido reportado en la bibliografía, diferentes cepas de ratones poseen susceptibilidades distintas a la infección por *Chlamydia*. Estas diferencias en susceptibilidad se deben a diversos factores que involucran tanto a la inmunidad innata como a la adaptativa (Darville y col. 2001). Nuestros resultados demostraron que ratones de la cepa NOD presentaban un mayor infiltrado inflamatorio en próstata, compuesto principalmente por células GR1<sup>+</sup>, y eran los animales en los que la eliminación de *C. muridarum* fue mucho más lenta. Para los ratones de la cepa C57BL/6, se observó menor cantidad de infiltración y eliminación más rápida de la bacteria. La presencia de la bacteria podría estar induciendo el reclutamiento de mayores cantidades de leucocitos al sitio de infección, pero si estos fueran funcionales deberían lograr eliminarla. Se podría decir que los leucocitos que infiltran el tejido prostático reciben algún tipo de condicionamiento que les impide eliminar eficientemente a *C. muridarum*. La caracterización solo mediante la expresión del marcador GR1 no nos permitió conocer si estas células fueron funcionales y si poseían buena capacidad de eliminar a *C. muridarum*. En los últimos años, la bibliografía se ha descrito una población GR1<sup>+</sup> con capacidades supresoras, denominadas células mieloides supresoras, que tienen funciones regulatorias y participan en diferentes procesos como en infecciones por *Mycobacterium tuberculosis* (Dorhoi y col. 2015). En el caso de la infección por *M. tuberculosis*, las células mieloides supresoras han sido identificadas en el sitio de la infección e interactúan con las células presentes contribuyendo a la inflamación. Para el caso de infecciones por *C. trachomatis* o

*C. muridarum*, no se ha reportado aun la participación de esta población particular. Sería interesante caracterizar fenotípicamente a los leucocitos GR1<sup>+</sup> que infiltran próstata en nuestro modelo para conocer si tienen fenotipo y funcionalidad compatible con estas poblaciones celulares descritas.

Las segundas poblaciones celulares en cantidad, observadas en los infiltrados prostáticos de los ratones NOD infectados fueron LT. La bibliografía ha descrito el reclutamiento tanto de linfocitos CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup> durante la infección de tracto genital femenino (Morrison and Morrison 2000; Rank y col. 2000; Redgrove y McLaughlin 2014). Se conoce que, para generar una respuesta eficiente que controle y elimine la infección por *Chlamydia*, es necesario que se induzca una robusta respuesta de linfocitos Th1, que llegue al tracto genital y provea la cooperación necesaria para eliminar a la bacteria. En modelos de infección de tracto femenino, se ha descrito que la llegada de células TCD4<sup>+</sup> específicas es dependiente de las integrinas  $\alpha\beta 1$ , ya que el bloqueo de estas integrinas resultó en el impedimento del tráfico a tracto femenino y la pérdida de la capacidad protectora frente a la infección. Estudios realizados en pacientes, demostraron que los números de células T y neutrófilos se encontraban muy elevados en endocervix de mujeres con infección por *C. trachomatis*, con aumentos tanto en sub-poblaciones CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>. Las células infiltrantes mostraban un fenotipo de LT de memoria, y no se encontró asociación entre los niveles de carga bacteriana y los niveles de células infiltrantes (Ficarra y col. 2008). En relación a antecedentes bibliográficos referidos a infiltración de tejidos del TUGM, y en especial de próstata, durante la infección por *Chlamydia* los datos disponibles son muy escasos. Sólo nuestro grupo había reportado la infiltración de células CD45<sup>+</sup> en próstata de ratas Wistar, pero no se había realizado un estudio de las distintas poblaciones que estaban infiltrando. Como se mencionó con anterioridad, se detectó un incremento significativo de células CD3<sup>+</sup> en próstata de ratones infectados. Es importante mencionar que dentro de esta población celular CD3<sup>+</sup> también podrían encontrarse linfocitos NKT. En modelos de infección de tracto femenino, se ha reportado la presencia de células NKT infiltrando endocervix y diferentes estudios indican que las mismas tienen un rol regulatorio positivo durante la infección (Shekhar y col. 2015).

Nuestros resultados revelaron, además, células CD19<sup>+</sup> infiltrando próstata de ratones NOD infectados con *C. muridarum*. La presencia de LB infiltrando tejidos del tracto genital femenino ha sido descrita. En un estudio realizado infectando hembras BALB/c con diferentes dosis de *C. muridarum*, observaron infiltración de células CD19<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup> y GR1<sup>+</sup>, aunque los niveles de linfocitos CD19 eran significativamente menores cuando se los comparó con los niveles de linfocitos CD4<sup>+</sup>. Estudios realizados en secreciones endocervicales de pacientes con infección por *C. trachomatis*, mostraron

incrementos en células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> pero sin diferencias para las poblaciones con fenotipo de LB cuando se las comparo con mujeres sanas (Mittal y col. 2004). La presencia de células CD19<sup>+</sup> infiltrando el tracto genital se relaciona con distintas funciones que se atribuyen a los LB: presentación antigénica, producción de anticuerpos y regulación de la respuesta inmune.

Otra población celular detectada en los infiltrados de animales infectados por *C. muridarum* fueron células NK. En la infección de tracto genital femenino, se ha descrito el reclutamiento y participación de esta población celular (Nagarajan y col. 2011). Trabajos realizados en modelos de infección de ratones deficientes en la molécula MyD88 demostraron que los mismos presentaban menores cantidades de células NK infiltrando tracto genital femenino, teniendo fundamentalmente alterada la producción de IFN $\gamma$  por parte de esta población celular y como consecuencia, esto resultó en una reducción significativa de la respuesta Th1 generada. Al igual que lo que se observa en la infección de tracto genital femenino, la infección del TUGM resultó en infiltración de células NK en próstata, aunque en nuestros ensayos sólo analizamos fenotipo CD56<sup>+</sup> sin un análisis de las citocinas producidas por estas células.

Moniz y col. identificaron un incremento de CD y pCD en el tracto genital y en nódulos drenantes de hembras BALB/c infectadas con *C. muridarum* (Moniz y col. 2009). Estos autores demostraron que las pCD producían IL10 en respuesta a estímulos *in vitro* con *C. muridarum*. En otro trabajo publicado por estos autores, demostraron que la depleción de pCD produjo cambios en los niveles de Treg, células CD8<sup>+</sup> y NK, sin alterar los niveles de células Th1, ni modificar la carga bacteriana de las hembras infectadas (Moniz y col. 2010). En nuestro modelo, también se detectó la presencia de células CD11c<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> en la próstata aunque en menor proporción a las otras poblaciones mencionadas. Al no completar la caracterización fenotípica de las mismas, no es posible asegurar que se trate de CD, pCD, o una combinación de ambas infiltrando el tejido prostático.

De esta manera, los resultados de la presente tesis doctoral son los primeros que analizan las poblaciones inmunes innatas y adaptativas que infiltran el TUGM en un modelo murino. En un futuro será interesante analizar no solo los tipos celulares infiltrantes, sino también abordar estudios fenotípicos y funcionales más detallados que permitan evaluar los posibles roles de estas poblaciones en la eliminación bacteriana y/o modulación de la respuesta inmune.

Es bien conocido que quimiocinas y citocinas producidas durante la respuesta inmune innata son las responsables del reclutamiento de células inflamatorias para intentar

controlar la infección, colaborando con el establecimiento de una respuesta inmune adaptativa óptima (Morrison y Caldwell 2002). En nuestro modelo experimental se evidenció el aumento de las quimiocinas CCL5, CCL17, CXCL1 y CXCL2 en tejido prostático de ratones infectados.

Estudios realizados con una línea de células epiteliales de cáncer de próstata (PC-3) infectadas con *C. trachomatis*, demostraron que las mismas eran capaces de incrementar significativamente los niveles del ARN mensajero de CCL5 durante la infección (Sellami y col. 2014). Se ha demostrado, además, que CCL3 y CCL5 son importantes en el reclutamiento de células CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> a tracto femenino en modelos de infección por *C. muridarum* (Deruaz y Luster 2015). Aunque la quimiocina CCL17 también participa en el reclutamiento de LT, no existen en la bibliografía reportes que vinculen a la infección por *Chlamydia* con incrementos en CCL17, como se demostró en nuestro modelo de infección.

Analizando muestras de semen de pacientes infectados con *C. trachomatis*, detectaron incrementos significativos de CXCL1 y CXCL9 comparados con valores hallados en semen de pacientes sanos (Hakimi y col. 2014a). En cultivos primarios de próstata, vesículas seminales y epidídimo/vasos deferentes de ratones C57BL/6 estimulados con *C. muridarum*, también se observaron incrementos significativos de CXCL1 (Mackern Oberti y col. 2011b). En otro modelo de infección con *E. coli* uropatogénica, donde se observa una gran infiltración de neutrófilos, los autores encontraron incrementos en el ARN mensajero de CXCL1 en el tejido infiltrado (Chan y col. 2013). Este aumento de CXCL1 también se observó en nuestro modelo experimental, y el mismo podría estar relacionado con el reclutamiento de neutrófilos al sitio donde se está generando la respuesta inmune.

Otra quimiocina que ha sido vinculada al reclutamiento de neutrófilos es CXCL2. Zaharik y col. demostraron que CD derivadas de médula ósea de ratones C57BL/6 expuestas a *C. muridarum* producían CXCL2; y además, ratones infectados con *C. muridarum* mostraban incrementos en CXCL2 (Zaharik y col. 2007). Cultivos primarios de células prostáticas estimulados con *Chlamydia* también evidenciaron aumentos en CXCL2 (Mackern Oberti y col. 2011b). De esta manera, es posible que los incrementos en CXCL1 y CXCL2 observados en próstata de ratones NOD infectados se asocien a los aumentos en células GR1<sup>+</sup> infiltrantes de próstata.

En nuestro estudio, las quimiocinas CCL2 y CCL3 no mostraron incrementos en próstata de los ratones infectados. Sin embargo, tanto CCL2 como CCL3 han sido vinculadas con el reclutamiento de macrófagos, CD y LT CD4<sup>+</sup> al tracto genital femenino durante la infección con *C. muridarum*. Es importante tener en cuenta que nuestros

estudios fueron realizados a un solo tiempo pi (7 dpi), una semana antes al mayor reclutamiento leucocitario observado en la próstata (14 dpi). Sería interesante hacer un análisis más amplio estudiando otros tiempos pi para poder describir mejor las quimiocinas mas incrementadas durante el curso de la infección.

Si bien en varios reportes se ha vinculado a la infección por *Chlamydia* con el desarrollo de infiltración e inflamación en tejidos del TUGM, estudios de pacientes con diferentes infecciones de tracto genital masculino muestran que la infección por *C. trachomatis* se asocia con menores niveles de leucocitos en semen comparada con infecciones por *Mycoplasma*, *E. coli* y otros microorganismos (Bravo y col. 2012). Es posible que la inflamación más moderada se asocie con la característica asintomática de esta infección y, quizás por ello, aún no se han podido encontrar efectos perjudiciales significativos sobre la fertilidad masculina en pacientes con infección por *C. trachomatis* (Krause y Bohring 2003; Motrich y col. 2012; Mackern-Oberti y col. 2013).

En modelos de Prostatitis Autoinmune Experimental, el aumento del infiltrado inflamatorio en el tejido prostático se asocia al dolor pélvico desarrollado por los animales (Rudick y col. 2008). De la misma manera, ratones infectados en el TUGM con una cepa de *E. coli* aislada de pacientes con Síndrome de dolor pélvico agudo, mostraron infiltración en próstata acompañada de dolor pélvico (Quick y col. 2013). En el presente trabajo se evaluó dolor pélvico en los ratones infectados con *C. muridarum*. Los ratones NOD infectados mostraron un máximo de dolor pélvico a los 4 dpi, cuya intensidad fue disminuyendo a medida que la cinética de la infección avanzó. Al analizar en conjunto la presencia de infiltración y el dolor pélvico en nuestro modelo se evidenció, que el dolor pélvico precede al infiltrado inflamatorio. Sin embargo, el dolor pélvico podría no solo asociarse a la infiltración del tejido prostático, sino también a otros mediadores no analizados. En la actualidad se sugiere que los mastocitos participan en fenómenos de sensibilización (Sayed y col. 2008; Walker y col. 2012) y podrían contribuir a la sensibilización neuronal periférica mediada por el factor de crecimiento nervioso (NGF) (Thacker y col. 2007). Se ha demostrado que los mastocitos expresan en su membrana receptores TrkA y, por lo tanto, la unión del factor NGF puede provocar la degranulación de estas células y establecer un mecanismo de retroalimentación que favorezca la sensibilización (Murphy y col. 2014). Entonces, tanto el factor NGF, como los productos de secreción de los mastocitos, podrían estar actuando y teniendo un rol importante en el desarrollo del dolor pélvico. En nuestros estudios no se analizó la población de mastocitos, ni los niveles de NGF durante el proceso infeccioso, por lo que si bien se puede concluir que durante el proceso infeccioso los animales experimentan dolor, aún no es imposible inferir el mecanismo implicado.

En la infección con *Chlamydia* es necesario que la respuesta inmune adaptativa del hospedador se active para eliminar al microorganismo. La generación de anticuerpos específicos secretados por LB ha sido descrita y la transferencia de anticuerpos de animales infectados genera protección, por lo que la participación de la inmunidad humoral es importante (Li y McSorley 2015). Durante el curso de la infección del TUGM por *C. muridarum*, nos interesó también evaluar la presencia de respuesta inmune humoral contra el patógeno. Se detectaron anticuerpos IgG específicos para HSP60 de *Chlamydia* y anticuerpos IgG específicos contra la bacteria completa mediante IFI; sin embargo, no realizamos ningún estudio para analizar si los mismos tenían algún papel importante en la protección.

Diversos autores han demostrado que durante el desarrollo de la respuesta inmune frente a *Chlamydia spp.*, se genera, además de inmunidad humoral, inmunidad celular contra la bacteria (Hakimi y col. 2014b). En nuestros estudios se evaluó la presencia de CMN secretoras de citocinas en respuesta a *C. muridarum* en distintos tiempos de la infección del TUGM. Al agregar como estímulo *C. muridarum* muerta por calor, nuestra estrategia era activar, hacer proliferar, e inducir la secreción de citocinas en aquellas poblaciones de LT cuyos TCRs fueran específicos para antígenos de *C. muridarum*. Sin embargo, para nuestra sorpresa encontramos altos niveles de IL10 en los sobrenadantes de cultivo en tiempos del esquema en los que la inmunidad adaptativa específica no podría haberse inducido aún. Solo se encontró IFN $\gamma$  e IL17 a tiempos tardíos del esquema experimental, y también IFN $\gamma$  en el día 7 pi. Estos resultados, junto con la producción de IL10 observada en CMN de ratones controles estimuladas con *C. muridarum*, condujeron a analizar con detenimiento las poblaciones celulares que eran responsables de la producción de estas citocinas.

En otros modelos de infección, también se han demostrado producciones altas de IL10. Este es el caso de infecciones con *Neisseria gonorrhoeae*, donde se han observado elevadas concentraciones de IL10 producidas por células CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup> y CD11b<sup>+</sup> (Liu y col. 2014). En el trabajo citado, se demostró también la presencia de células CD4<sup>+</sup>, IL10<sup>+</sup>, Foxp3<sup>-</sup>, es decir LT regulatorios (Tr1) productores de IL10. La producción de IL10 en modelos de infección también ha sido descrita durante la infección con *E. coli* uropatogénica, donde la población responsable de la producción de IL10 eran células con fenotipo de mastocitos, es decir células c-KIT<sup>+</sup>. En modelos de infección por *Streptococcus pyogenes*, se ha observado producción de IL10 por Tr1, los cuales demoran la generación de respuesta celular y le permiten a la bacteria colonizar más efectivamente al hospedador. En modelos de infección por *Staphylococcus aureus*, se ha reportado producción de IL10 por macrófagos, los cuales producen esta citocina luego del reconocimiento de

peptidoglicanos de la pared bacteriana (Chau y col. 2009; Frodermann y col. 2011; Duell y col. 2012).

En relación a la infección por *Chlamydia*, la producción de IL10 también fue reportada en un modelo de hembras BALB/c infectadas con *C. muridarum* (Moniz y col. 2009) y, además, en estudios realizados con pacientes. Un artículo reveló que PBMC de mujeres infectadas con *C. trachomatis* estimuladas con antígenos *clamidiales* producían altos niveles de IL10, en comparación con la producción de PBMCs de mujeres sanas (Vats y col. 2007). Respecto a qué población es la responsable de producir IL10 en modelos de infección por *Chlamydia*, sólo un trabajo realizado en ratones C57BL/6 infectados con *C. trachomatis*, reportó que en tracto genital inferior había aumentos de CD productoras de IL10. Los demás trabajos que demostraban producción de IL10, no analizaron la población responsable de producirla. Más recientemente, durante la última etapa de esta tesis doctoral, Moore-Connors y col. reportaron la presencia de células CD1d<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup> y CD43<sup>+</sup>, productoras de IL10 en un modelo de infección de tracto genital femenino por *C. muridarum* (Moore-Connors y col. 2014).

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral demostraron que, en el modelo de infección del TUGM, las principales células productoras de IL10 eran LB. En todos los puntos de la cinética de infección estudiados se observó una mayor frecuencia de células CD19<sup>+</sup> e IL10<sup>+</sup>. Purificando LB mediante *cell-sorting* o perlas magnéticas, y luego cultivando estas células con *C. muridarum*, se corroboró que esta población celular era capaz de producir la IL10 sin la colaboración de otros tipos celulares. De manera interesante, al estimular con *C. muridarum* la fracción de CMN sin LB, se observaron incrementos significativos de varias citocinas inflamatorias como IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL6. Estos resultados hacen suponer que la secreción de IL10 por LB en estos cultivos, regula negativamente la secreción de citocinas inflamatorias como las evaluadas. Se conoce que IL10 inhibe la inflamación, la actividad de macrófagos y la producción de citocinas como IFN $\gamma$ , IL12 y TNF $\alpha$  (Duell y col. 2012). Esto es lo que podría estar ocurriendo en los cultivos de CMN, donde la presencia de LB estimulados por *C. muridarum* secretan elevados niveles de IL10, la cual inhibe en las demás células la producción de citocinas inflamatorias. Sin embargo, para demostrar esto se debería bloquear la acción de la IL10 en estos cultivos (por ejemplo con el agregado de un anticuerpo bloqueante) y, posteriormente, evaluar el efecto sobre la secreción de citocinas pro-inflamatorias. Resultados preliminares revelan que LB humanos de sangre periférica estimulados con *C. trachomatis* inactivada con calor, también secretan IL10 (datos no mostrados). Estos resultados estimulan a continuar realizando estudios con muestras humanas y evaluando así la participación de LB regulatorios en la infección en humanos.

Debido a que se encontraron LB productores de IL10 en etapas tempranas de la infección, y que LB de animales controles producían IL10 en respuesta a *C. muridarum*, se analizó la posibilidad de que algún receptor de la inmunidad innata pudiera estar participando en el reconocimiento de la bacteria y la posterior producción de IL10. Luego de evaluar la producción de IL10 de LB provenientes de ratones C57BL/6 *wt*, C57BL/6 TLR2<sup>-/-</sup> y C57BL/6 TLR4<sup>-/-</sup>, se demostró que la presencia de TLR4 en estas células resultó fundamental para la producción de IL10.

Se ha postulado que algunos de los PAMPs presentes en *C. muridarum* serían reconocidos por receptores del tipo Toll y este reconocimiento podría estar asociado a la producción de determinadas citocinas (Vabulas y col. 2001; Heine y col. 2003; Da Costa y col. 2004). Nuestros resultados demostraron que cLPS induce la producción de IL10 en LB purificados. Si bien se producen considerables cantidades de IL10 en estos cultivos, al estimular solamente con cLPS no se pueden explicar los mayores niveles de IL10 observados en los cultivos estimulados con *C. muridarum* entera. Es muy difícil conocer las concentraciones de cLPS que corresponderían a las mismas cantidades de CE usados para estimular LB purificados; pero por las diferencias en los niveles de IL10 en los sobrenadantes, es posible que otros PAMPs presentes en *C. muridarum* también estén involucrados en la inducción de esta citocina.

Datos bibliográficos indican que los LB1 y los LB de ZM responden rápidamente a antígenos timo-independientes y, por estas y otras características se los ha llamado LBI. Los LBI se activan a través de receptores PRRs como los TLR, los cuales reconocen a diferentes patógenos microbianos y producen grandes cantidades de IL10 y de anticuerpos naturales, principalmente del tipo IgM, generando de esta forma una defensa temprana crítica contra infecciones (Zhang y col. 2013). En los cultivos de LB purificados estimulados con *C. muridarum*, se observó la producción de grandes cantidades de IgM y también de IgG (IgG3 principalmente), aunque esta última en menor proporción. Los resultados demuestran que los linfocitos productores de IL10 en nuestro modelo se comportan como LBI.

Como se mencionó anteriormente, las funciones regulatorias de LB productores de IL10, en ratones, han sido asignadas principalmente a las LBI (B1 y LB de ZM) (Zhang y col. 2013). De esta forma, se pudo evaluar si, células purificadas que expresaban marcadores clásicos de LB de ZM o LB2, respondían a *C. muridarum* produciendo IL10. Nuestros resultados demostraron que LB de ZM fueron los principales productores de IL10. Debido a las bajas proporciones de LB1 en bazo, no fue posible analizar, mediante la misma estrategia, si LB1 purificados responden frente al estímulo con *C. muridarum* produciendo IL10. Los resultados sugieren que LB de ZM serían los principales

productores de IL10 en nuestro modelo. El análisis de las proporciones de esta subpoblación en ratones NOD, C57BL/6 y BALB/c mostró mayores cantidades de LB de ZM en bazo de ratones NOD. Esta mayor proporción de LB de ZM podría relacionarse a la elevada capacidad de las CMN de bazo de ratones NOD de producir IL10 en respuesta a *C. muridarum*.

También nos interesó analizar si, luego de la activación con *C. muridarum*, los LB productores de IL10 expresaban marcadores asociados a activación o relacionados con alguna determinada función. Al estimularon CMN de bazo de ratones NOD con *C. muridarum*, se pudo determinar que los LB que producían IL10 expresaron en su superficie los marcadores CD1d<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>. Estos marcadores fenotípicos pueden ser expresados tanto por los LB1a, como también por los LB de ZM activados. Teniendo en cuenta que los LB de ZM están en mayor proporción que los LB1a en el bazo de los ratones NOD, y que por otro lado, los LB de ZM fueron, en comparación, los principales productores de IL10 cuando purificamos estas poblaciones celulares, podemos decir que en estos cultivos las células responsables de la producción de IL10 serían los LB de ZM. A pesar de esto, no podemos descartar completamente la posibilidad de que los LB1a puedan contribuir, en alguna proporción, a la producción de la IL10 durante el curso de la infección. La población LB1a ha sido descrita como productora de esta citocina anti-inflamatoria en otros modelos experimentales (Yoshizaki y col. 2012). Se ha reportado que los LB1 en la cavidad peritoneal son la principal fuente de IL10 producida por LB (Yang y col. 2013). Al analizar la producción de IL10 por células peritoneales de animales NOD estimuladas con *C. muridarum*, se observaron elevadas concentraciones (datos no mostrados). Los resultados antes mencionados nos sugieren que las células productoras de IL10 en el peritoneo podrían ser los LB1. Sin embargo, la fenotipificación de las células no fue incluida en nuestros ensayos. Es importante tener en cuenta además que los LB activados *in vitro* cambian la expresión de marcadores clásicos de sub-poblaciones (LB1, LB2, LB de ZM), por lo que el análisis de estos marcadores post estimulación no sería el adecuado para identificar la sub-población responsable de la secreción de IL10 en nuestro modelo.

También se pudo demostrar en nuestros experimentos que LB IL10<sup>+</sup> expresaron CD39 y PD-L1. Se conoce que estas moléculas cumplen funciones regulatorias: CD39 cataliza la descomposición de ATP extracelular a ADP y AMP, mientras que CD73 cataliza la conversión de AMP a la adenosina (Antonlioli y col. 2013). El ATP extracelular desempeña un papel pro-inflamatorio, mientras que la adenosina, por el contrario, tiene un rol más bien anti-inflamatorio. Por lo tanto, la regulación del equilibrio entre el ATP extracelular y la concentración de adenosina es importante para mantener la homeostasis (Kaku y col. 2014). En cuanto al ligando PD-L1, se ha demostrado que esta molécula

cumple funciones regulatorias en modelos de cáncer e infecciones virales (Yao y col. 2013). Al unirse PD-L1a su receptor, PD1, genera fenómenos de inmunosupresión en la célula que expresa este receptor. Es posible entonces, que la activación de LB con *C. muridarum* induzca, además de la secreción de IL10, la regulación también vía PD-L1/PD1.

La interacción de IL10 con su receptor conduce a la fosforilación de STAT3 así como también a la activación de MAPK/ERK. El STAT3 activado transloca y se une a una región específica del núcleo resultando en la transcripción de SOCS3 (supresor de la señalización de citocinas 3) que tiene como función inhibir señales pro-inflamatorias (Hakimi y col. 2014b). Nuestros resultados demostraron que los LB productores de IL10 presentaban activación de STAT3 y MAPK/ERK. La activación de STAT3 se observó también en células CD45<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup> en estos cultivos, indicando que la IL10 presente en dichos cultivos también ejerce efectos sobre estas poblaciones celulares. Esto corrobora, además de la secreción de IL10, la activación de señales intracelulares involucradas en la misma. Sería también interesante analizar SOCS3 en estos cultivos. Nuestros resultados evidenciaron la inducción de LB regulatorios durante la infección del TUGM por *C. muridarum*. Estos LB se inducen a tiempos tempranos de la infección, posiblemente a través de la interacción de PAMPs de *C. muridarum* que interaccionarían con receptores de la inmunidad innata en LB. Los LB regulatorios inducidos, además de secretar IL10 en respuesta al estímulo bacteriano, producen IgM e IgG3 y, también, podrían mediar sus acciones a través de otros mecanismos como los que involucran PD-L1 y CD39.

La IL10 producida por LB durante la etapa temprana de la infección, en la que la respuesta inmune adaptativa se está induciendo, podría tener una consecuencia negativa fundamentalmente sobre la generación de LTh1, la principal población que participa en el control y eliminación de esta bacteria. En otros modelos experimentales de infección se ha reportado que concentraciones altas de IL10 en las etapas tempranas de la infección atenúan la efectividad del sistema inmune para controlar al microorganismo. Este es el caso de infecciones por patógenos como *N. gonorrhoeae*, *E. coli* uropatógena, *L. monocytogenes* (Chan y col. 2013; Horikawa y col. 2013; Liu y col. 2014), en las que se ha observado secreción de IL10 y atenuación de diferentes mecanismos inmunológicos de defensa.

Como se mencionó anteriormente, en nuestro modelo observamos producción temprana de IL10, tanto para la cepa NOD como para la cepa de ratones C57BL/6. Como se evidenció mayor producción y más sostenida de IL10 en la infección en ratones NOD, se postula que los mayores niveles producidos en esta cepa podrían contribuir a la mayor susceptibilidad y a la eliminación más demorada de *C. muridarum* en la cepa NOD. Para determinar si la secreción IL10 y sus efectos se relacionan con la eliminación demorada de

esta bacteria en los tejidos de interés, procedimos a realizar tratamientos con anticuerpos bloqueantes de la IL10. El bloqueo de IL10 en ratones infectados NOD y C57BL/6 aceleró el *clearance* de la bacteria. Para confirmar estos hallazgos, se infectaron ratones C57BL/6 IL10<sup>-/-</sup>, en los cuales se determinó que la ausencia de la citocina acelera la eliminación de la misma de la próstata. En el modelo de infección con *C. trachomatis* en tracto genital femenino, se observó que animales C57BL/6 IL10<sup>-/-</sup> reducen más rápidamente la carga bacteriana de los lavados vaginales en comparación con los C57BL/6 *wt* (Igietseme y col. 2000; Marks y col. 2010). En un modelo de inoculación intra-nasal de *C. pneumoniae*, se observó que los animales deficientes en IL10 también eliminan más rápidamente a la bacteria que el correspondiente grupo control, pero el daño en el tejido es mayor (Penttilä y col. 2008). En nuestro modelo, sin embargo, no se evaluó aún si al bloquear IL10, y acelerar la eliminación de la bacteria, se observa daño en el tejido y/o consecuencias con alteraciones en la fertilidad masculina. Nuestros resultados sugieren que la liberación de IL10 se asocia con menor eliminación del patógeno, y además se apoyan en estudios realizados con otros microorganismos (Chan y col. 2013; Horikawa y col. 2013; Liu y col. 2014). También al trabajar con animales IL10<sup>-/-</sup> o administrar anticuerpos bloqueantes de IL10, se observó que la resolución de la infección se aceleró en comparación con los respectivos grupos controles.

Al demostrar que la fuente celular productora de IL10 en nuestro modelo son los LB, se eliminó o redujo esta población y se analizó si se producían modificaciones en el *clearance* bacteriano genital. Ratones tratados con  $\alpha$ CD20 evidenciaron una menor carga bacteriana. Los hallazgos se apoyan también en los resultados obtenidos al infectar ratones C57BL/6  $\mu$ MT, deficientes en LB, los cuales también exhibieron un *clearance* aumentado de la bacteria en el tejido prostático. Sin embargo, se ha reportado que ratones hembras C57BL/6  $\mu$ MT infectadas con *C. trachomatis* no mostraron diferencias en la cinética de eliminación bacteriana, en contraposición a lo observado en nuestro modelo (Johansson y col. 1997b; Johansson y Lycke 2001). Estas diferencias podrían responder a requerimientos diferentes entre ambos tractos (masculino vs. femenino) para combatir la infección, o también a las especies de bacterias utilizadas en estos modelos (*C. muridarum* vs. *C. trachomatis*).

Es ampliamente aceptado que la respuesta inmunológica Th1 es la encargada de la resolución de la infección por *Chlamydia* spp. (Johansson y col. 1997a). En los cultivos de CMN de animales NOD infectados, se observó una secreción incrementada de IL10 por parte de los LB. En ratones NOD, la producción de IFN $\gamma$  e IL17 sólo se encontró en cultivos correspondientes al día 80 pi. Estudios en ratones C57BL/6, mostraron mayor producción de IFN $\gamma$  e IL17. Es decir estos ratones producen menores niveles de IL10, mayores niveles

de IFN $\gamma$  e IL17 y lograban una mejor eliminación bacteriana. Al realizar experimentos de bloqueo con el anticuerpo anti IL10 y/o utilizar la cepa deficiente para esta citocina, se observó mayor producción de IFN $\gamma$  y una mejor eliminación bacteriana. Penttilä y col. encontraron incrementos significativos en la producción de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL6 al infectar intra-nasalmente con *C. pneumoniae* a ratones deficientes en IL10 (Penttilä y col. 2008), resultados asociados a un *clearance* aumentado del patógeno.

De manera interesante, se demostró que la población productora de IFN $\gamma$  eran LT. El incremento en la frecuencia de células CD3<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> fue más acentuado en los ratones IL10<sup>-/-</sup> que en los ratones bajo el tratamiento con el anticuerpo  $\alpha$ IL10. De la misma manera, se observaron mayores niveles de células CD3<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> en órganos linfoides de ratones NOD tratados con  $\alpha$ CD20. Nuestros resultados, en conjunto, demuestran que *C. muridarum* posee componentes estructurales capaces de inducir la producción de IL10 en LB. Esta citocina anti-inflamatoria, producida en los primeros días de la infección, modula negativamente la generación de la respuesta Th1 y con ello permite la permanencia por más tiempo de la bacteria en el TUGM.

La búsqueda de protección inmunológica contra *Chlamydia* spp. está enfocada, hoy en día, al estudio de vacunas a subunidades, en donde MOMP es uno de los candidatos más estudiados (Andrew y col. 2011; Cheng y col. 2011). Aunque por un lado se ha logrado generar protección en algunos modelos, la variabilidad que presenta esta proteína entre las distintas serovariantes generaría la formulación de vacunas polivalentes usando las serovariantes más frecuentes en la población a inmunizar (Meara y col. 2014). También se han postulado otros candidatos, como las proteínas polimórficas de membrana (Pmp), proteínas efectoras como Tarp (*Translocated actin recruiting phosphoprotein*) y CPAF entre otros, con resultados prometedores en el desarrollo de este tipo de vacunas (Brunham y Rappuoli 2013; Meara y col. 2014).

El principal desafío que hoy presentan las vacunas a subunidades es el uso de buenos adyuvantes para potenciar y prolongar en el tiempo la inmunización generada. Este tipo de adyuvantes puede ejercer su función aumentando la inflamación local o sirviendo de depósito, logrando una liberación controlada del antígeno en cuestión y sostenida en el tiempo. Ambos mecanismos pretenden reclutar CPAs al sitio de la inmunización e incrementar su capacidad para estimular LT vírgenes. Se ha reportado que la utilización de adyuvantes polarizantes hacia un perfil Th1 en conjunción con antígenos *clamidiales*, estimulan a CD a inducir LTh1 productores de IFN $\gamma$ . Sin embargo, en estos estudios se pudo determinar el desarrollo de una protección parcial (Meara y col. 2014). Debido a esto último consideramos que la posible producción de IL10 por LB, y/o diferentes sub-tipos

celulares durante el curso de la infección por *Chlamydia spp.*, debería ser tenida en cuenta a la hora del desarrollo de nuevas vacunas.

Finalmente, todos los datos obtenidos nos sugieren que la eliminación demorada de *C. muridarum* en los ratones de la cepa NOD podría deberse, en gran parte, a un condicionamiento de la respuesta inmune generada por la misma bacteria, que principalmente actuaría mediante la modificación del perfil de citocinas en las etapas iniciales de la infección.

Los resultados de esta tesis doctoral apoyan la hipótesis que plantea a la inducción de IL10 por esta bacteria como un mecanismo que la misma ha desarrollado para evadir la respuesta inmune del hospedador, aminorando así la respuesta inmune protectora del mismo.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

### **Microorganismo utilizado**

La cepa bacteriana de *C. muridarum* (*C. trachomatis* MoPn-WEISS) fue gentilmente obsequiada por el Dr. K. H. Ramsey (EEUU). A esta cepa se la creció y amplificó en células LLCMK2. Brevemente, los cultivos infectados se centrifugaron a 1800 rpm durante 45 min y se crecieron en medio RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Natocor), L-glutamina 2 mM y 1 µg/ml de cicloheximida (Sigma, EEUU) a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Luego de 48 hs, dichos cultivos se recolectaron y homogeneizaron con el uso de perlas de vidrio estériles para lisar las células hospedadoras y permitir la liberación de los CE. Los detritos celulares se removieron por centrifugación a 1000 rpm durante 15 min. Los CE enriquecidos se centrifugaron a 1800 rpm durante 5 min y se resuspendieron en una solución isotónica de sucrosa-fosfato-ácido glutámico (buffer SPG). El buffer SPG utilizado se preparó con Fosfato de sodio = 0,01 M; Sacarosa = 0,25 M; Acido glutámico = 5 mM; pH = 7,2. Las alícuotas se conservaron hasta su uso a -80°C. Para conocer que cantidad de CE tenían estas alícuotas, se realizaron diluciones seriadas y se infectaron cultivos de células LLCMK2 por 48 hs. Para revelar la presencia de *C. muridarum*, se agregó un anticuerpo anti cLPS conjugado con FITC (Biomérieux, Francia) y se observó mediante un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse).

### **Purificación de cuerpos elementales (CE) de *Chlamydia muridarum***

Cultivos celulares de células LLCMK2 se infectaron con *C. muridarum*, se cosecharon y homogeneizaron con el uso de perlas de vidrio estériles. Con el objetivo de eliminar los restos celulares que provenían de la línea LLCMK2, el homogeneizado se centrifugó a 1000 rpm por 5 min. Luego, se recolectó el sobrenadante y se lo centrifugó a 12000 rpm por 1 hs a 4 °C. El precipitado se resuspendió en medio RPMI1640 y se depositó sobre un gradiente preparado con 3,5 mL de urografín (Roche) al 30% en la fracción superior y 3,5 mL de solución de sacarosa 0,3 M en la parte inferior. Dicho gradiente se centrifugó a 12000 rpm por 1 h a 4 °C. El precipitado se disolvió en SPG y se centrifugó a 13000 rpm por 40 min a 4 °C. Luego el precipitado se disolvió otra vez en SPG, se alícuotó y almacenó a -80°C. Posteriormente, se cuantificó la cantidad de CE presentes en las alícuotas infectando con diluciones seriadas cultivos celulares de células LLCMK2 por 48 hs y revelando la presencia de *C. muridarum* por el agregado de anticuerpo anti LPS de *Chlamydia spp.* conjugado a FITC. La titulación del inóculo de *C. muridarum* se observó mediante un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse).

### **Obtención de HSP60 recombinante**

Debido a los requerimientos de crecimiento intracelular, el cultivo a gran escala de *Chlamydia spp.*, para la consecuente purificación de las proteínas, es sumamente laborioso y difícil. Para superar esta dificultad, se obtuvieron proteínas recombinantes de *Chlamydia spp.* a partir de *E. coli* transformadas. Las cuales, en condiciones de cultivo apropiadas, produjeron HSP60 de *Chlamydia spp.* con una secuencia carboxi-terminal de 6 residuos histidina. Estas bacterias se transformaron con plásmidos obsequiados por el Dr. J. S. H. Gaston (Inglaterra). La expresión de proteínas recombinantes se indujo por la adición de isopropyl- $\beta$ -D-tiogalactopiranosódico a los cultivos de *E. coli* crecidos en medio Luria-Betari. Luego de 8 hs, los cultivos se centrifugaron, se lavaron con PBS y se resuspendieron en PBS. A continuación, se sonicaron en hielo cuatro veces con ciclos de 30 seg de sonicado y 1 min de reposo. Después de centrifugar a 8500 rpm a 4 °C, el precipitado se solubilizó en buffer PBS conteniendo urea 8 M. La proteína se purificó mediante cromatografía de afinidad utilizando columnas de Sepharosa cargadas con NiSO<sub>4</sub>, las cuales son capaces de unir la secuencia final de 6 residuos Histidina presentes en la proteína HSP60 recombinante. Luego, la proteína se eluyó mediante un gradiente de concentración de Imidazol. Las diferentes fracciones se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida para recolectar las fracciones de interés (aquellas fracciones donde se detectó la máxima elución de la proteína). Posteriormente, se dializó en PBS por 24 hs a 4 °C y a continuación se determinó la concentración proteica de HSP60 en las fracciones mediante el método de Bradford.

### **Cepas de ratones utilizadas**

Los ratones de las cepas BALB/c y C57BL/6 se adquirieron en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de la Plata, Argentina. Los ratones C57BL/6 TLR2<sup>-/-</sup> (B6.129-Tlr2tm1Kir/J), C57BL/6 TLR4<sup>-/-</sup> (C57BL/10ScNJ), C57BL/6 IL10<sup>-/-</sup> (B6.129P2-II10<sup>tm1Cgn</sup>/J) y C57BL/6  $\mu$ MT (B6.129S2-Ighm<sup>tm1Cgn</sup>/J), se adquirieron en EE.UU (The Jackson Laboratory). Los animales NOD (NOD/ShiLtJ) y NOD-SCID (NOD.CB17-Prkdc<sup>scid</sup>/J), los cedieron los Dres. Diane Mathis y Cristoph Benoist. Los animales se mantuvieron y endocriaron en el bioterio del Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-CONICET) bajo condiciones libres de patógenos específicos y de acuerdo con los requisitos del comité de ética institucional. Los animales se mantuvieron con agua y alimento *ad-libitum*, con ciclos de 12 hs de luz/oscuridad a 20 °C bajo humedad controlada.

### **Protocolo de infección por *C. muridarum***

**Grupo Infectado:** Ratones machos de 8 semanas de edad de las cepas NOD, NOD-SCID, BALB/c, C57BL/6, C57BL/6 TLR2<sup>-/-</sup> (B6.129-Tlr2tm1Kir/J), C57BL/6 TLR4<sup>-/-</sup> (C57BL/10ScNJ), C57BL/6 IL10<sup>-/-</sup> (B6.129P2-Il10<sup>tm1Cgn</sup>/J) y C57BL/6  $\mu$ MT, se anestesiaron con 27,4  $\mu$ L de ketamina (Ketonal 50 mg/mL Richmond Veterinaria, Argentina) y 13,5  $\mu$ L de xilacina al 2% (20 mg/mL Alfasan, Holanda), llevado a volumen final de 200  $\mu$ L por inyección con solución fisiológica. Luego, se recostaron sobre sus espaldas, se les retrajo el prepucio y se inoculó  $1 \times 10^8$  CE de *C. muridarum* en 20  $\mu$ L de SPG a través del meato urinario, simulando la vía natural de acceso al tracto genital. A partir de este momento, se consideró el día 0 de la infección y, en función a los parámetros que se quisieron determinar, los animales se sacrificaron a distintos tiempos pos-infección (pi).

**Grupo Control:** Como grupo control, se utilizaron Las mismas cepas de ratones, en donde, en lugar de infectarlos con la bacteria, estos solamente se los inoculó con 20  $\mu$ L de SPG vía meato urinario.

### **Purificación de ADN de *C. muridarum* del tejido**

Los tejidos del TUGM se obtuvieron a diferentes tiempos pos-infección. La disgregación de los mismos y la purificación del ADN bacteriano, se realizó según las especificaciones provistas por el fabricante del kit comercial usado (*AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit, Bioneer*).

### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

El ADN total obtenido se lo utilizó para la amplificación del gen específico de *C. muridarum* OMP1, usando *primers* específicos diseñados en nuestro laboratorio (sentido 5'-GCC GTT TTG GGT TCT GCT T-3' y anti-sentido 5'-CGT CAA TCA TAA GGC TTG GTT CA-3'). Como control endógeno, se utilizaron *primers* específicos para el gen eEF2 (sentido 5'-AGC TGA TGC AGA AGC TGG A-3' y anti-sentido 5'- CCC CTC GTC TAG CAG CTC AC-3'). Se incubaron 2  $\mu$ g de ADN con 1,25 U de Taq ADN polimerasa, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, deoxinucleótidos trifosfatos 1 mM (Invitrogen, Life Technologies) y de los oligonucleótidos sentido y anti-sentido 1  $\mu$ M, de ambos genes de interés. Cada muestra se incubó en un termociclador (MyCycler Thermal Cycles, BioRad) con el siguiente programa: un ciclo inicial de desnaturalización de 5 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos (desnaturalización 94 °C, hibridación 58 °C y elongación 72 °C) y un ciclo final de elongación de 5 min a 72 °C. Los productos de amplificación, de 100 y 186 pares de bases respectivamente, se visualizaron en geles de agarosa teñidos con SYBR Safe, según las indicaciones del fabricante (SYBR® Safe ADN Gel Stain, Life technologies). Se utilizó el

control endógeno (eEF2) para normalizar tanto la PCR semi-cuantitativa, como la PCR en tiempo real (qPCR).

### **PCR en tiempo real**

El ADN obtenido a partir de los tejidos disgregados, se lo amplificó también usando los mismos *primers* ya mencionados (MOMP y eEF2) con el termociclador StepOne™ System (Life technologies). Se incubaron 2 µg de ADN extraído con el *primer* sentido (1 µM), el *primer* anti-sentido (1 µM), SYBR® Select Master Mix (Life technologies) (7,5 µl) y agua para llevar a 15 µL de volumen final. Programa de PCR: 95 °C, 15 min, 1 ciclo; 95 °C, 15 seg; 60 °C, 30 seg; 72 °C, 30 seg, 40 ciclos. Para la obtención de la curva de disociación: 95 °C, 60 seg; 65 °C, 60 seg. Los resultados se analizaron con el software StepOne 2.2.2.

### **Detección de leucocitos infiltrantes de tejidos por Citometría de Flujo**

Se obtuvieron los tejidos del TUGM provenientes de ratones de las diferentes cepas y en diferentes situaciones experimentales, mediante extracción directa, luego de eutanizar a los animales. Una vez extraídos, los tejidos se pesaron y disgregaron en medio RPMI 1640 de manera mecánica y enzimática, a través del agregado de 0,05 mg/mL de Colagenasa tipo IV (Roche Diagnostic, Basilea, Switzerland) y 0,02 mg/mL de ADNsa I (Sigma-Aldrich) durante 45 min a 37°C. Las suspensiones celulares generadas, se lavaron con medio suplementado con SFB al 10%, para inactivar a las enzimas, y luego se filtraron a través de filtros Aylan de diferente tamaño de poro (70 y 40 µm) para obtener una suspensión libre de detritos tisulares (BD Bioscience). Los leucocitos vivos se contaron en Cámara de Neubauer mediante tinción con Azul de Tripán. A posterior, se marcó a las células con los diferentes anticuerpos monoclonales (CD3, CD19, GR1, CD56, CD11c, CD45) conjugados con diferentes fluorocromos y luego se las analizó utilizando el citómetro de flujo FACS Canto II (BD Bioscience). Para el análisis de los datos se utilizó el programa FlowJo (Versión 7.6.2).

### **Estudios histológicos**

Luego de extraer los tejidos prostáticos de los grupos experimentales de interés, éstos se los fijó en formaldehído al 4% en PBS durante 24 hs y posteriormente lavados y embebidos en etanol al 70%. Las muestras fijadas se las embebió en parafina, siguiendo protocolos estándares, seccionadas en cortes de 6 µm de espesor y se las tiñó con hematoxilina y eosina para su posterior observación.

### **Estudios de inmunohistoquímicos**

La técnica de IHQ también se realizó sobre cortes de tejidos prostáticos provenientes de los mismos grupos experimentales. Las secciones de tejido se las hidrató, trató con un recuperador antigénico (Dako) y bloqueó para eliminar la actividad peroxidasa endógena con un buffer bloqueante (Dako cytomation, Glostrup, Dinamarca), según recomendaciones del fabricante. Para determinar la presencia del infiltrado leucocitario dentro de los tejidos, éstos se los incubó con un anticuerpo  $\alpha$ CD45 pan-leucocitario (clon 30-F11). Luego, los vidrios se lavaron e incubaron con un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa (BD, Bioscience; San Diego, CA, Estados Unidos). La detección colorimétrica se realizó utilizando el kit de detección DAB para esta técnica (BD, Bioscience). Los vidrios se lavaron y contra-tiñeron con hematoxilina. Luego se analizaron los cortes en un microscopio óptico (Axiolab, Zeiss, Jena, Alemania) a una magnificación de 400X.

### **Secreción de citocinas por Células CMN de bazo y células de nódulos linfáticos drenantes de próstata**

Las CMN de bazo y de nódulos que drenan la glándula prostática (paravertebrales), se las obtuvo a partir de una disgregación mecánica sobre una malla metálica para generar una suspensión celular homogénea. Luego se las separó por un gradiente de densidad Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich) con el fin de eliminar los eritrocitos, los leucocitos polimorfonucleares y las células muertas. Las células obtenidas se las resuspendió en RPMI 1640, suplementado con L-glutamina 2 mM, Gentamicina 50  $\mu$ g/mL, 2 $\beta$  mercaptoetanol 50 mM y SFB 10%. Además, se las contó con el fin de determinar la cantidad de leucocitos viables para luego ser añadidos en placas de cultivo de 96 pocillos, en una densidad de  $1 \times 10^5$  células por cada pocillo. Dichas células se las incubó durante 72 hs en presencia de medio (condición basal), LPS 5  $\mu$ L/mL de *E. coli* (serotipo 055:B5, Sigma, EEUU), o en presencia de CE de *C. muridarum* inactivada por calor en diferentes relaciones indicadas en los ensayos realizados (Cm-10 = 10 CE por cada célula presente en el cultivo, Cm-100 = 100 CE por cada célula en cultivo, Cm-1000 = 1000 CE por cada célula en cultivo). Los sobrenadantes de los cultivos se los recolectó a las 24, 48 y 72 hs según fue indicado, para luego determinar la concentración de diferentes citocinas.

Las citocinas evaluadas en esta tesis fueron IFN $\gamma$  (BD), IL-17A (eBioscience), IL-10 (BD), IL6 (eBioscience) y TNF $\alpha$  (eBioscience), utilizando kits comerciales de ELISA y siguiendo las recomendaciones de los respectivos fabricantes.

### **Expresión de quimiocinas en el tejido prostático**

Las glándulas prostáticas provenientes de los grupos experimentales control e infectado, se las obtuvo en el día 7 pi del esquema experimental. A estas se las disgregó en un buffer de lisis conteniendo inhibidores de proteasas (RayBiotech, Norcross, GA) y se las homogeneizó con Ultra-Turrax hasta generar una suspensión homogénea, según las indicaciones del fabricante. Se cuantificó la concentración de proteínas utilizando el método de Bradford, y suspensiones de 300 µg de proteínas totales de las diferentes muestras se las incubó con las membranas comerciales del *Protein Array Kit* (RayBiotech). Todos los ensayos se realizaron de acuerdo a las estrictas instrucciones del fabricante y los datos se analizaron utilizando el programa específicamente recomendado por el fabricante.

### **Medición del dolor pélvico**

Para evaluar el dolor pélvico, los ratones de los grupos de interés se los sometió a un test de comportamiento (Rudick y col. 2008; Quick y col. 2013), mediante alodinia táctil en la región pélvica en diferentes días del esquema experimental. Estos ensayos se realizaron en cámaras individuales de plexiglás, las cuales poseen un piso con una rejilla del mismo material. Los ratones se los colocó dentro de la cámara y luego de un período de 20 min de aclimatación, se los sometió a pequeñas fuerzas en la zona pélvica, aplicadas con filamentos de von Frey en orden creciente de fuerza (0,04; 0,16; 0,4; 1,0 y 4,0 gr) (Bioseb, Chaville, Francia). Cada filamento fue aplicado 10 veces durante un corto período (1-2 seg) con un intervalo entre los estímulos de 5 seg. La estimulación se limitó a la zona baja del abdomen, donde se encuentra la próstata, y se la realizó en diferentes sectores de esta área para evitar el fenómeno de desensibilización.

Se consideraron como respuestas positivas a tres tipos de comportamientos: 1) la retracción brusca del abdomen; 2) lamer o arañar la zona donde se realizó el estímulo con el filamento; y 3) saltar luego de recibir el estímulo. La frecuencia de la respuesta se calculó como el porcentaje de respuesta positiva, y los datos se informaron como la media del porcentaje de frecuencia de respuesta.

### **Obtención de muestras de suero sanguíneo**

Las muestras de sangre de ratón se obtuvieron mediante punción cardíaca y por sangrado de la cola de estos animales. Estas muestras se recolectaron en tubos sin anticoagulante, se dejaron coagular durante 10 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 4000 rpm durante 4 min. De esta forma se obtuvieron las muestras de suero, las cuales se mantuvieron a -20 °C hasta su uso.

### **ELISA indirecto para detección de IgG anti HSP60**

Para evaluar la cantidad de anticuerpos específicos para HSP60 de *C. muridarum*, en primer lugar se sensibilizaron placas de 96 reservorios con 50 µL de una solución 20 µg/mL de la proteína recombinante HSP60 de *Chlamydia* en buffer carbonato (pH= 9,5). Luego de una incubación a 4° C durante la noche, se lavó las placas con PBS-Tween (0,05%) tres veces y bloqueadas con PBS-SFB 10% durante 2 hs a 37°C. Al finalizar la incubación, las placas otra vez se lavaron con PBS-Tween tres veces más y se agregó 50 µL de diluciones seriadas de los sueros de los ratones de los diferentes grupos experimentales (primer dilución 1/50). Los sueros se los diluyó en PBS-SFB al 5%. Las muestras se las incubó durante 2 hs a 37 °C y se realizaron nuevamente los lavados. Se agregó un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (cat. A 9044 Sigma-Aldrich, USA) y se incubó durante 1 hs a 37 °C. Luego, se lavaron las placas 5 veces con PBS-Tween para eliminar el anticuerpo no unido y se reveló la reacción con el agregado de 50 µL de 3,3',5,5' tetrametilbencidina (cat. 555214, TMB *Substrate Reagent Set*, BD OptEIA™, USA). La reacción se frenó con el agregado de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 M). A las absorbancias se las cuantificó a 450 nm (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) y los resultados se los expresó como valores de densidad óptica (DO).

### **Inmunofluorescencia indirecta para la detección de IgG anti *C. muridarum***

Se realizaron cultivos de células LLCMK2 y se infectaron con *C. muridarum*. Luego de 24 hs pi, a los cultivos se los fijó, se los lavó y se les agregó muestras séricas diluidas de los diferentes grupos de animales incubando por 1 hs a temperatura ambiente. A continuación, estos cultivos se lavaron nuevamente y se incubaron con un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con FITC durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó una co-tinción con DAPI durante 2 min, para poder visualizar las inclusiones *clamidiales* y los núcleos celulares. Las muestras se las observó en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse). La presencia de IgG específica para las inclusiones *clamidiales* se observó como una marca fluorescente en el canal FITC que co-localizó con la tinción con DAPI.

### **Citometría de flujo de moléculas de superficie e intracelular**

#### ***Citometría de flujo de moléculas de superficie***

Se realizaron marcaciones de superficie *ex vivo* en suspensiones de CMN de bazo y nódulos drenantes de próstata. En algunos ensayos se realizó este tipo de marcación en muestras de sangre periférica. A las células se las contó y posteriormente incubó durante 30 min con los anticuerpos anti CD19, CD3, CD21, CD23, CD11c, CD56 y CD45

conjugados a diferentes fluorocromos. Luego de los lavados correspondientes, las células marcadas se las resuspendió en líquido diluyente de citometría Facs-flow (BD Bioscience) y se las adquirió por el citómetro FACS Canto II (BD Bioscience). Se analizaron los datos a través del programa FlowJo (Versión 7.6.2). De esta forma, se pudo evaluar la proporción y cantidad de ciertas poblaciones celulares presentes en los tejidos analizados.

También se realizaron otras marcaciones de superficie a partir de CMN cultivadas en presencia y ausencia de *C. muridarum*, durante 72 hs. Para este ensayo, se recolectó las células y se las marcó durante 30 min con anticuerpos específicos para las siguientes moléculas CD3, CD19, B220, CD1d, CD5, CD23, CD21, CD39, PDL1, PD1 y FcγRIIb, conjugados con diferentes fluorocromos. Posteriormente, las células se las adquirió como se mencionó anteriormente. Estos estudios formaron parte de la fenotipificación de LB productores de IL10.

### ***Citometría de flujo de moléculas intracelulares***

Las células cultivadas, durante 72 hs con estímulos ya establecidos para cada diseño experimental, se las estimuló con 10 ng/mL de PMA y 1 µg/mL de Ionomicina (Sigma-Aldrich) durante 5 hs. Para evitar la secreción de las citocinas y poder detectarlas dentro de las células se agregó además, durante este tiempo de estimulación, 10 µg/mL de Brefeldina A (BD biosciences) o 10 µg/mL de Monensina (BD biosciences) según correspondía en función a las especificaciones del fabricante. Se recolectaron las células de los cultivos y se las tiñó con anticuerpos contra diferentes moléculas de superficie para luego ser fijadas y permeabilizadas con buffer de fijado y permeabilizado para citocinas (BD Bioscience). A continuación, se marcaron las células con anticuerpos específicos para IFNγ, IL-10, IL17, pSTAT3 y pMAPK/ERK, conjugados a diferentes fluorocromos convenientemente seleccionados. Estos anticuerpos se los diluyó en el buffer permeabilizante (BD Bioscience). La marcación de las citocinas intracelulares se la realizó durante 40 min a 4 °C. Luego de las marcaciones y lavados, se resuspendió a las células en Facs-flow (BD Bioscience). Las muestras se las adquirió en un citómetro de flujo FACS Canto II (BD Bioscience) para luego ser analizadas utilizando el programa FlowJo (Versión 7.6.2).

### **Purificación de LB**

Se obtuvo la suspensión celular de CMN a partir de un pool de bazos de animales de las diferentes cepas (NOD, C57BL/6 wt, C57BL/6 TLR2<sup>-/-</sup> y C57BL/6 TLR4<sup>-/-</sup>) mediante métodos ya descritos. Luego se procedió a realizar la purificación de LB a partir de esta suspensión de CMN mediante dos técnicas diferentes según fue indicado oportunamente para cada condición experimental:

### ***Purificación de LB por Cell-sorting***

Se realizó una marca de superficie de las CMN de la suspensión obtenida, para lo cual estas células se las incubó durante 20 min con anticuerpos específicos para B220 y CD19. Las CMN marcadas se las separó mediante *cell-sorting* utilizando el equipo FACS Canto II. Se corroboró la pureza realizando un análisis *post-sort* determinando una purificación de 94%. Las fracciones celulares obtenidas (fracción con LB, fracción sin LB y CMN enteras), se las resuspendió en RPMI 1640, suplementando con L-glutamina (2 mM), Gentamicina (50 µg/mL), 2β mercaptoetanol (50 mM) y SFB al 10%, y se las contó para luego ser añadidas a placas de cultivo de 96 pocillos en una densidad de  $1 \times 10^5$  células/pocillo. Dichas células se las incubó durante 72 hs en presencia de medio de cultivo (condición Basal), con el agregado de LPS (5 µL/mL) o con *C. muridarum* inactivada por calor, en diferentes relaciones indicadas en los ensayos realizados. También se agregó como estímulo cLPS que fue obsequiado gentilmente por el Dr. A. Eley (Inglaterra). En el sobrenadante de estos cultivos, se procedió a determinar la concentración de citocinas mediante ELISA sándwich. En estos cultivos, también se determinó la frecuencia de células productoras de IL10 a través de citometría de flujo intracelular.

### ***Purificación de LB por Perlas magnéticas***

Los LB se los aisló mediante selección negativa usando perlas magnéticas. Se incubaron las CMN con perlas magnéticas acopladas a anticuerpos αCD43, siguiendo las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec). Luego, se corroboró la pureza mediante citometría de flujo usando anticuerpos específicos para B220 y CD19, demostrando que la misma fue aproximadamente del 90%. Posteriormente, las fracciones celulares se las cultivó como se indicó para la purificación celular anterior. A los sobrenadantes de estos cultivos se los cosechó y se les determinó la concentración de citocinas mediante ELISA sandwich.

### ***Purificación de LB de zona marginal y LB foliculares***

A partir de un pool de bazos de ratones NOD se obtuvieron suspensiones celulares y se realizaron marcaciones de superficie con anticuerpos específicos para B220, CD19, CD23 y CD21, conjugados a diferentes fluorocromos seleccionados convenientemente. Posteriormente y mediante *cell-sorting*, se procedió a la separación y cuantificación de LB viables de estas poblaciones, para luego ser añadidas en placas de cultivo de 96 pocillos en una densidad de  $1 \times 10^5$  células/pocillo. Se cultivaron durante 72 hs con medio de cultivo suplementado solamente (estímulo basal), o con CE inactivados por calor (Cm-1000). Se recolectaron los sobrenadantes de estos cultivos y, mediante ELISA sandwich, se evaluó la

concentración de varias citocinas, tal como fue debidamente indicado y según las recomendaciones de los fabricantes.

### **Cuantificación de IgM, IgG e Isotipos de IgG en sobrenadantes de LB purificados estimulados con *C. muridarum***

En los sobrenadantes de los cultivos de LB purificados por *cell-sorting* y estimulados con *C. muridarum*, o medio, se analizó la concentración de diferentes isotipos de anticuerpos totales (IgM, IgGt, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3) utilizando la técnica de ELISA sandwich y siguiendo las indicaciones y recomendaciones del fabricante (Southernbiotech, Birmingham, USA).

### **Tratamientos de bloqueo de IL10 o depleción de células CD20<sup>+</sup>**

**Grupo Infectado +  $\alpha$ IL10:** Para realizar el bloqueo de la IL10 endógena, se inyectaron intra-peritonealmente 500  $\mu$ g de anticuerpo  $\alpha$ IL10 (IgG1 de rata, clon JES5-2A5; BD, USA) por animal. La primera inyección se la realizó el día previo a la infección del animal (-1 dpi). La segunda al día siguiente (0 dpi) y luego, cada dos días, se realizaron tres inyecciones más, completando un total de 5 en ratones C57BL/6 y NOD. La finalidad de este esquema experimental fue bloquear IL10 a tiempos tempranos pos-infección. Los animales de la cepa C57BL/6 se los sacrificó al día 7 y 14 dpi. Mientras que los ratones de la cepa NOD, solo se los sacrificó a los 14 dpi.

**Grupo Infectado +  $\alpha$ CD20:** La depleción de LB fue realizada en los ratones de la cepa NOD. Para ello, se inyectaron intra-peritonealmente 50  $\mu$ g/ratón del anticuerpo  $\alpha$ CD20 (IgG2a de ratón, clon 5D2; Genentech, USA), y se realizó un seguimiento de la cantidad de LB en sangre de estos animales tratados, a modo de determinar el momento en el cual se produjo la máxima reducción de LB en circulación (la molécula CD20 es expresada por los LB). La máxima reducción de células CD19<sup>+</sup> ocurrió a los 10 días posteriores al tratamiento con el  $\alpha$ CD20. De esta forma, se procedió a tratar a los animales de este grupo con una única inyección del anticuerpo  $\alpha$ CD20, 10 días antes de realizar la infección con *C. muridarum*, con el objeto de generar una reducción de LB en las etapas tempranas de la infección.

### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism (versión 5.00). Se utilizaron los siguientes test estadísticos: T-test, ANOVA de una o dos colas, según correspondía para cada situación experimental. Los resultados se presentaron como promedio  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Valores de \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$  se los consideró estadísticamente significativos.

# **BIBLIOGRAFÍA**

---

- AL-ZEER, M.A.;** Al-Younes, H.M.; Lauster, D.; Lubad, M.A. y Meyer, T.F. 2013. Autophagy restricts *Chlamydia trachomatis* growth in human macrophages via IFN $\gamma$ -inducible guanylate binding proteins. *Autophagy*, 9 (1): 50–62. doi:10.4161/auto.22482
- ANDERSEN, J.M.;** Al-Khairy, D. e Ingalls, R.R. 2006. Innate immunity at the mucosal surface: role of Toll-like Receptor 3 and Toll-like Receptor 9 in cervical epithelial cell responses to microbial pathogens. *Biol. Reprod.*, 74 (5): 824–831.
- ANDREW, D.W.;** Hafner, L.M.; Beagley, K.W. y Timms, P. 2011. Partial protection against chlamydial reproductive tract infection by a recombinant major outer membrane protein/CpG/cholera toxin intranasal vaccine in the guinea pig *Chlamydia caviae* model. *J. Reprod. Immunol.*, 91 (1-2): 9–16. doi:10.1016/j.jri.2011.06.100
- ANTONIOLI, L.;** Pacher, P.; Vizi, E.S. y Haskó, G. 2013. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol. Med.*, 19 (6): 355–367. doi:10.1016/j.molmed.2013.03.005
- BARTOLINI, E.;** Ianni, E.; Frigimelica, E.; Petracca, R.; Galli, G.; Berlanda Scorza, F.; Norais, N.; Laera, D.; Giusti, F.; Pierleoni, A.; Donati, M.; Cevenini, R.; Finco, O.; Grandi, G. y Grifantini, R. 2013. Recombinant outer membrane vesicles carrying *Chlamydia muridarum* HtrA induce antibodies that neutralize chlamydial infection in vitro. *J. Extracell. Vesicles.*, 2: 20181. doi:10.3402/jev.v2i0.20181
- BAS, S.;** Neff, L.; Vuillet, M.; Spenato, U.; Seya, T.; Matsumoto, M. y Gabay, C. 2008. The proinflammatory cytokine response to *Chlamydia trachomatis* elementary bodies in human macrophages is partly mediated by a lipoprotein, the macrophage infectivity potentiator, through Toll-like Receptor 2/Toll-like Receptor 1/Toll-like Receptor 6 and CD14. *J. Immunol.*, 180 (2): 1158–1168. doi:180/2/1158 [pii]
- BASTIDAS, R.J.;** Elwell, C.A.; Engel, J.N. y Valdivia, R.H. 2013. Chlamydial intracellular survival strategies. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 3 (5):a010256. doi:10.1101/cshperspect.a010256.
- BATTEIGER, B.E.;** Xu, F.; Johnson, R.E. y Rekart, M.L. 2010. Protective immunity to *Chlamydia trachomatis* genital infection: evidence from human studies. *J. Infect. Dis.*, 201 Suppl: S178–89. doi:10.1086/652400.Protective
- BELLAND, R.J.;** Nelson, D.E.; Virok, D.; Crane, D.D.; Hogan, D.; Sturdevant, D.; Beatty, W.L. y Caldwell, H.D. 2003. Transcriptome analysis of chlamydial growth during IFN $\gamma$ -mediated persistence and reactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100 (26): 15971–15976. doi:10.1073/pnas.2535394100
- BRAVO, M.A.;** Molina, R.; Demarchi, M.; Cuffini, C. y Rivero, V. 2012. Relación entre IL8 en semen y parámetros seminales en pacientes con infecciones en el tracto reproductor masculino *Revista Argentina de Andrología*, 21 (1): 15-25.
- BRUNHAM, R.C. y RAPPUOLI, R.** 2013. *Chlamydia trachomatis* control requires a vaccine. *Vaccine.*, 31 (15): 1892–1897. doi:10.1016/j.vaccine.2013.01.024
- BRUNHAM, R.C. y REY-LADINO, J.** 2005. Immunology of Chlamydia infection: implications for a *Chlamydia trachomatis* vaccine. *Nat. Rev. Immunol.*, 5 (2): 149–161. doi:10.1038/nri1551
- BUENDÍA, A.J.;** Del Río, L.; Ortega, N.; Sánchez, J.; Gallego, M.C.; Caro, M.R.; Navarro, J.A.; Cuello, F. y Salinas, J. 2002. B-cell-deficient mice show an exacerbated inflammatory response in a model of *Chlamydomphila abortus* infection. *Infect. Immun.*, 70(12): 6911–6918. doi:10.1128/IAI.70.12.6911-6918.2002

- CALDWELL, H.D.** y **PERRY, L.J.** 1982. Neutralization of *Chlamydia trachomatis* infectivity with antibodies to the major outer membrane protein. *Infect. Immun.*, 38 (2): 745–754.
- CAMPBELL, L.A.**; Yaraei, K.; Van Lenten, B.; Chait, A.; Blessing, E.; Kuo, C.C.; Nosaka, T.; Ricks, J. y Rosenfeld, M.E. 2010. The acute phase reactant response to respiratory infection with *Chlamydia pneumoniae*: implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *Microbes Infect.*, 12 (8-9): 598–606. doi:10.1016/j.micinf.2010.04.001
- CANDANDO, K.M.**; Lykken, J.M. y Tedder, T.F. 2014. B10 cell regulation of health and disease. *Immunol. Rev.*, 259 (1): 259–272. doi:10.1111/imr.12176
- CAREY, A.J.**; Huston, W.M.; Cunningham, K.A.; Hafner, L.M.; Timms, P. y Beagley, K.W. 2013. Characterization of in vitro *Chlamydia muridarum* persistence and utilization in an in vivo mouse model of chlamydia vaccine. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 69 (5): 475–485. doi:10.1111/aji.12093
- CHAN, C.Y.**; St. John, A.L. y Abraham, S.N. 2013. Mast cell interleukin-10 drives localized tolerance in chronic bladder infection. *Immunity*, 38 (2): 349–359. doi:10.1016/j.immuni.2012.10.019
- CHAU, T.A.**; McCully, M.L.; Brintnell, W.; An, G.; Kasper, K.J.; Vinés, E.D.; Kubes, P.; Haeryfar, S.M.M.; McCormick, J.K.; Cairns, E.; Heinrichs, D.E. y Madrenas, J. 2009. Toll-like Receptor 2 ligands on the staphylococcal cell wall downregulate superantigen-induced T cell activation and prevent toxic shock syndrome. *Nat. Med.*, 15 (6): 641–648. doi:10.1038/nm.1965
- CHEN, L.**; Lei, L.; Chang, X.; Li, Z.; Lu, C.; Zhang, X.; Wu, Y.; Yeh, I.T. y Zhong, G. 2010. Mice deficient in MyD88 Develop a Th2-dominant response and severe pathology in the upper genital tract following *Chlamydia muridarum* infection. *J. Immunol.*, 184 (5): 2602–2610. doi:10.4049/jimmunol.0901593
- CHENG, C.**, Pal, S., Bettahi, I., Oxford, K.L., Barry, P.A., De la Maza, L.M., 2011. Immunogenicity of a vaccine formulated with the *Chlamydia trachomatis* serovar F, native major outer membrane protein in a nonhuman primate model. *Vaccine* 29, 3456–3464. doi:10.1016/j.vaccine.2011.02.057
- CHRISTIAN, J.**; Vier, J.; Paschen, S.A. y Häcker, G. 2010. Cleavage of the NF- $\kappa$ B family protein p65/RelA by the chlamydial protease-like activity factor (CPAF) impairs proinflammatory signaling in cells infected with *Chlamydiae*. *J. Biol. Chem.*, 285 (53): 41320–41327. doi:10.1074/jbc.M110.152280
- CORRADI, G.**; Konkoly Thege, M.; Pánovics, J.; Molnár, G.; Bodó, A. y Frang, D. 1995. Is seminal fluid a suitable specimen for detecting chlamydial infection in men? *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, 42 (4): 389–394.
- COTTER, T.W.**; Meng, Q.; Shen, Z.L.; Zhang, Y.X.; Su, H. y Caldwell, H.D. 1995. Protective efficacy of major outer membrane protein-specific immunoglobulin A (IgA) and IgG monoclonal antibodies in a murine model of *Chlamydia trachomatis* genital tract infection. *Infect. Immun.*, 63 (12): 4704–4714.
- CRANE, D.D.**; Carlson, J.H.; Fischer, E.R.; Bavoil, P.; Hsia, R.; Tan, C.; Kuo, C. y Caldwell, H.D. 2006. *Chlamydia trachomatis* polymorphic membrane protein D is a species-common pan-neutralizing antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103 (6): 1894–1899. doi:10.1073/pnas.0508983103

- CUNNINGHAM, K.A.** y **BEAGLEY, K.W.** 2008. Male genital tract chlamydial infection: implications for pathology and infertility. *Biol. Reprod.*, 79 (2): 180–189. doi:10.1095/biolreprod.108.067835
- DA COSTA, C.U.**; Wantia, N.; Kirschning, C.J.; Busch, D.H.; Rodriguez, N.; Wagner, H. y Miethke, T. 2004. Heat shock protein 60 from *Chlamydia pneumoniae* elicits an unusual set of inflammatory responses via Toll-like Receptor 2 and 4 in vivo. *Eur. J. Immunol.*, 34 (10):2874–2884. doi:10.1002/eji.200425101
- DARVILLE, T.**; Andrews, C.W.; Sikes, J.D.; Fraley, P.L. y Rank, R.G. 2001. Early local cytokine profiles in strains of mice with different outcomes from chlamydial genital tract infection. *Infect. Immun.*, 69 (6):3556–3561.
- DARVILLE, T.**; O'Neill, J.M.; Andrews, C.W.; Nagarajan, U.M.; Stahl, L. y Ojcius, D.M. 2003. Toll-like Receptor-2, but not Toll-like Receptor-4, is essential for development of oviduct pathology in chlamydial genital tract infection. *J. Immunol.*, 171 (11): 6187–6197.
- DAVIS, C.H.** y **WYRICK, P.B.** 1997. Differences in the association of *Chlamydia trachomatis* serovar E and serovar L2 with epithelial cells in vitro may reflect biological differences in vivo. *Infect. Immun.*, 65 (7): 2914–2924.
- DEBATTISTA, J.**; Timms, P.; Allan, J. y Allan, J. 2003. Immunopathogenesis of *Chlamydia trachomatis* infections in women. *Fertil. Steril.*, 79 (6): 1273–1287. doi:10.1016/S0015-0282(03)00396-0
- DEL RIO, L.**; Barberá-Cremades, M.; Navarro, J. A.; Buendía, A.J.; Cuello, F.; Ortega, N.; Gallego, M.C.; Salinas, J. y Caro, M.R. 2013. IFN- $\gamma$  expression in placenta is associated to resistance to *Chlamydia abortus* after intragastric infection. *Microb. Pathog.*, 56: 1–7. doi:10.1016/j.micpath.2012.12.003
- DERUAZ, M.** y **LUSTER, A.D.** 2015. Chemokine-mediated immune responses in the female genital tract mucosa. *Immunol. Cell Biol.*, 93 (4): 347–354. doi: 10.1038/icb.2015.20
- DILILLO, D.J.**; Matsushita, T. y Tedder, T.F. 2010. B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1183: 38–57. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05137.x
- DORHOI, A.** y Kaufmann, SH. 2015. Versatile myeloid cell subsets contribute to tuberculosis-associated inflammation. *Eur. J. Immunol.*, 45 (8):2191–2202. doi: 10.1002/eji.201545493.
- DUELL, B.L.**; Tan, C.K.; Carey, A.J.; Wu, F.; Cripps, A.W. y Ulett, G.C. 2012. Recent insights into microbial triggers of interleukin-10 production in the host and the impact on infectious disease pathogenesis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 64 (3): 295–313. doi:10.1111/j.1574-695X.2012.00931.x
- ELCOMBE, S.E.**; Naqvi, S.; Van Den Bosch, M.W.; MacKenzie, K.F.; Cianfanelli, F.; Brown, G.D. y Arthur, J.S. 2013. Dectin-1 regulates IL-10 production via a MSK1/2 and CREB dependent pathway and promotes the induction of regulatory macrophage markers. *PLoS One*, 8 (3): e60086. doi: 10.1371/journal.pone.0060086.
- FANKHAUSER, S.C.** y Starnbach, M.N. 2014. PD-L1 limits the mucosal CD8+ T cell response to *Chlamydia trachomatis*. *J. Immunol.*, 192 (3): 1079–1090. doi:10.4049/jimmunol.1301657
- FICARRA, M.**; Ibana, J.S.; Poretta, C.; Ma, L.; Myers, L.; Taylor, S.N.; Greene, S.; Smith, B.; Hagensee, M.; Martin, D.H. y Quayle, A.J. 2008. A distinct cellular profile is seen in the human endocervix during *Chlamydia trachomatis* infection. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 60 (5): 415–425. doi:10.1111/j.1600-0897.2008.00639.x

- FILLATREAU, S.;** Sweenie, C.H.; McGeachy, M.J.; Gray, D. y Anderton, S.M. 2002. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat. Immunol.*, 3 (10): 944–950. doi:10.1038/ni833
- FRODERMANN, V.;** Chau, T.A.; Sayedyahosseini, S.; Toth, J.M.; Heinrichs, D.E. y Madrenas, J. 2011. A modulatory interleukin-10 response to staphylococcal peptidoglycan prevents Th1/Th17 adaptive immunity to *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.*, 204 (2): 253–262. doi:10.1093/infdis/jir276
- GAYDOS, C.A.;** Ferrero, D.V. y Papp, J. 2008. Laboratory aspects of screening men for *Chlamydia trachomatis* in the new millennium. *Sex. Transm. Dis.*, 35 (11- Suppl.): S45–S50. doi:10.1097/OLQ.0b013e31816d1f6d
- GDOURA, R.;** Daoudi, F.; Bouzid, F.; Ben Salah, F.; Chaigneau, C.; Sueur, J.M.; Eb, F.; Rekik, S.; Hammami, A. y Orfila, J. 2001. Detection of *Chlamydia trachomatis* in semen and urethral specimens from male members of infertile couples in Tunisia. *Eur. J. Contracept. Reprod. Health Care*, 6 (1): 14–20.
- GERMAIN, R.N.**, 1994. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: Providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell*, 76 (2): 287–299. doi:10.1016/0092-8674(94)90336-0
- GOLDEN, M.R.;** Schillinger, J.A.; Markowitz, L. y St Louis, M.E. 2000. Duration of untreated genital infections with *Chlamydia trachomatis*: a review of the literature. *Sex. Transm. Dis.*, 27 (2): 329–337.
- GUNN, K.E. y BREWER, J.W.** 2006. Evidence that marginal zone B cells possess an enhanced secretory apparatus and exhibit superior secretory activity. *J. Immunol.*, 177 (6): 3791–3798. doi:10.4049/jimmunol.177.6.3791
- GUPTA, R.;** Vardhan, H.; Srivastava, P.; Salhan, S. y Mittal, A. 2009. Modulation of cytokines and transcription factors (T-Bet and GATA3) in CD4 enriched cervical cells of *Chlamydia trachomatis* infected fertile and infertile women upon stimulation with chlamydial inclusion membrane proteins B and C. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 7: 84. doi:10.1186/1477-7827-7-84
- HA, S.;** Tsuji, M.; Suzuki, K.; Meek, B.; Yasuda, N.; Kaisho, T. y Fagarasan, S. 2006. Regulation of B1 cell migration by signals through Toll-like receptors. *J. Exp. Med.*, 203 (11): 2541–2550. doi:10.1084/jem.20061041
- HAKIMI, H.;** Akhondi, M.M.; Sadeghi, M.R.; Chamani, L.; Arababadi, M.K.; Ahmadabadi, B.N.; Hassanshahi, G. y Fathollahi, M.S. 2013. Seminal levels of IL-10, IL-12, and IL-17 in men with asymptomatic *Chlamydia* infection. *Inflammation*, 37 (1): 122–126. doi:10.1007/s10753-013-9719-7
- HAKIMI, H.;** Zainodini, N.; Khorramdelazad, H.; Kazemi Arababadi, M. y Hassanshahi, G. 2014a. Seminal levels of pro-inflammatory (CXCL1, CXCL9, CXCL10) and homeostatic (CXCL12) chemokines in men with asymptomatic *Chlamydia trachomatis* infection. *Jundishapur J. Microbiol.*, 7 (12): 10–13. doi:10.5812/jjm.11152
- HAKIMI, H.;** Zare-Bidaki, M.; Zainodini, N.; Assar, S. y Arababadi, M.K. 2014b. Significant roles played by IL-10 in *Chlamydia* infections. *Inflammation*, 37 (3): 818–823. doi:10.1007/s10753-013-9801-1
- HAWKINS, R.A.;** Rank, R.G. y Kelly, K.A. 2002. A *Chlamydia trachomatis*-specific Th2 clone does not provide protection against a genital infection and displays reduced trafficking to the

infected genital mucosa. *Infect. Immun.*, 70 (9): 5132–5139. doi:10.1128/IAI.70.9.5132-5139.2002

- HEINE, H.;** Müller-Loennies, S.; Brade, L.; Lindner, B. y Brade, H. 2003. Endotoxic activity and chemical structure of lipopolysaccharides from *Chlamydia trachomatis* serotypes E and L2 and *Chlamydophila psittaci* 6BC. *Eur. J. Biochem.*, 270 (3): 440–450. doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03392.x
- HOGAN, R.J.;** Mathews, S.A.; Mukhopadhyay, S.; Summersgill, J.T. y Timms, P. 2004. Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm. *Infect. Immun.*, 72 (4): 1843–1855. doi:10.1128/IAI.72.4.1843-1855.2004
- HORIKAWA, M.;** Weimer, E.T.; DiLillo, D.J.; Venturi, G.M.; Spolski, R.; Leonard, W.J.; Heise, M.T. y Tedder, T.F. 2013. Regulatory B cell (B10 Cell) expansion during *Listeria* infection governs innate and cellular immune responses in mice. *J. Immunol.*, 190 (3): 1158–68. doi:10.4049/jimmunol.1201427
- IGIETSEME, J.U.;** Ananaba, G.A.; Bolier, J.; Bowers, S.; Moore, T.; Belay, T.; Eko, F.O.; Lyn, D. y Black, C.M. 2000. Suppression of endogenous IL-10 gene expression in dendritic cells enhances antigen presentation for specific Th1 induction: potential for cellular vaccine development. *J. Immunol.*, 164 (8): 4212–4219. doi:10.1172/jci\_v164n8p4212 [pii]
- IGIETSEME, J.U.;** Eko, F.O.; He, Q. y Black, C.M. 2004. Antibody regulation of T cell immunity: implications for vaccine strategies against intracellular pathogens. *Expert Rev. Vaccines*, 3 (1): 23–34. doi:10.1586/14760584.3.1.23
- JANTOS, C.A.;** Augustin, J.; Durchfeld-Meyer, B.; Baumgärtner, W. y Schiefer, H.G. 1998. Experimental genital tract infection with *Chlamydia psittaci* (GPIC agent) in male rats. *Infection*, 26 (2): 126–130.
- JIANG, X.;** Shen, C.; Yu, H.; Karunakaran, K.P. y Brunham, R.C. 2010. Differences in innate immune responses correlate with differences in murine susceptibility to *Chlamydia muridarum* pulmonary infection. *Immunology*, 129 (4): 556–566. doi:10.1111/j.1365-2567.2009.03157.x
- JOHANSSON, M. y LYCKE, N.** 2001. Immunological memory in B-cell-deficient mice conveys long-lasting protection against genital tract infection with *Chlamydia trachomatis* by rapid recruitment of T cells. *Immunology*, 102 (2): 199–208. doi:10.1046/j.1365-2567.2001.01167.x
- JOHANSSON, M.;** Schön, K.; Ward, M. y Lycke, N. 1997a. Studies in knockout mice reveal that anti-chlamydial protection requires TH1 cells producing IFN-gamma: is this true for humans? *Scand. J. Immunol.*, 46 (6): 546–552.
- JOHANSSON, M.;** Ward, M. y Lycke, N. 1997b. B-cell-deficient mice develop complete immune protection against genital tract infection with *Chlamydia trachomatis*. *Immunology*, 92 (4): 422–428.
- JOHNSON, R.M.** 2004. Murine oviduct epithelial cell cytokine responses to *Chlamydia muridarum* infection include interleukin-12-p70 secretion. *Infect. Immun.*, 72 (7): 3951–3960. doi:10.1128/IAI.72.7.3951-3960.2004
- JORGENSEN, I.;** Bednar, M.M.; Amin, V.; Davis, B.K.; Ting, J.P.; McCafferty, D.G. y Valdivia, R.H. 2011. The *Chlamydia* protease CPAF regulates host and bacterial proteins to maintain pathogen vacuole integrity and promote virulence. *Cell Host Microbe.*, 10 (1): 21–32. doi:10.1016/j.chom.2011.06.008

- JOUNAI, N.;** Kobiyama, K.; Takeshita, F. y Ishii, K.J. 2012. Recognition of damage-associated molecular patterns related to nucleic acids during inflammation and vaccination. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2: 168. doi:10.3389/fcimb.2012.00168
- KAKU, H.;** Cheng, K.F.; Al-Abed, Y. y Rothstein, T.L. 2014. A novel mechanism of B cell-mediated immune suppression through CD73 expression and adenosine production. *J. Immunol.*, 193 (12): 5904–5913. doi:10.4049/jimmunol.1400336
- KAMALAKARAN, S.;** Chaganty, B.K.; Gupta, R.; Guentzel, M.N.; Chambers, J.P.; Murthy, A.K. y Arulanandam, B.P. 2013. Vaginal chlamydial clearance following primary or secondary infection in mice occurs independently of TNF- $\alpha$ . *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 3: 11. doi:10.3389/fcimb.2013.00011
- KARUNAKARAN, K.P.;** Rey-Ladino, J., Stoynov, N.; Berg, K.; Shen, C.; Jiang, X.; Gabel, B.R.; Yu, H.; Foster, L.J. y Brunham, R.C. 2008. Immunoproteomic discovery of novel T cell antigens from the obligate intracellular pathogen *Chlamydia*. *J. Immunol.*, 180 (4): 2459–2465. doi:10.1093/infdis/jin111
- KAWAI, T. y Akira, S.** 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.*, 11 (5): 373–384. doi:10.1038/ni.1863
- KAWAI, T. y AKIRA, S.** 2005. Pathogen recognition with Toll-Like Receptors. *Curr. Opin. Immunol.*, 17 (4): 338–344. doi:10.1016/j.coi.2005.02.007
- KAWANA, K.;** Matsumoto, J.; Miura, S.; Shen, L.; Kawana, Y.; Nagamatsu, T.; Yasugi, T.; Fujii, T.; Yang, H.; Quayle, A.J.; Taketani, Y. y Schust, D.J. 2008. Expression of CD1d and ligand-induced cytokine production are tissue specific in mucosal epithelia of the human lower reproductive tract. *Infect. Immun.*, 76 (7): 3011–3018. doi:10.1128/IAI.01672-07
- KAWANA, K.;** Quayle, A.J.; Ficarra, M.; Ibane, J.A.; Shen, L.; Kawana, Y.; Yang, H.; Marrero, L.; Yavagal, S.; Greene, S.J.; Zhang, Y.X.; Pyles, R.B.; Blumberg, R.S. y Schust, D.J. 2007. CD1d degradation in *Chlamydia trachomatis*-infected epithelial cells is the result of both cellular and chlamydial proteasomal activity. *J. Biol. Chem.*, 282 (10): 7368–7375. doi:10.1074/jbc.M610754200
- KINNUNEN, A.;** Surcel, H.M.; Halttunen, M.; Tiitinen, A.; Morrison, R.P.; Morrison, S.G.; Koskela, P.; Lehtinen, M. y Paavonen, J. 2003. *Chlamydia trachomatis* heat shock protein-60 induced interferon- $\gamma$  and interleukin-10 production in infertile women. *Clin. Exp. Immunol.*, 131 (2): 299–303. doi:10.1046/j.1365-2249.2003.02048.x
- KRAUSE, W. y BOHRING, C.** 2003. Male infertility and genital chlamydial infection: Victim or perpetrator? *Andrología*, 35 (4): 209–216. doi:10.1046/j.1439-0272.2003.00561.x
- KUMAR, Y. y VALDIVIA, R.H.,** 2008. Actin and intermediate filaments stabilize the *Chlamydia trachomatis* vacuole by forming dynamic structural scaffolds. *Cell Host Microbe.*, 4 (2): 159–169. doi:10.1016/j.chom.2008.05.018
- LEE, C.C. y KUNG, J.T.** 2012. Marginal zone B cell is a major source of IL-10 in listeria monocytogenes susceptibility. *J. Immunol.*, 189 (7): 3319–27. doi:10.4049/jimmunol.1201247
- LEE, C.H.;** Akin-Olugbade, O. y Kirschenbaum, A. 2011. Overview of prostate anatomy, histology, and pathology. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, 40 (3): 565-575, viii-ix. doi:10.1016/j.ecl.2011.05.012.
- LI, L.X. y McSORLEY, S.J.** 2015. A re-evaluation of the role of B cells in protective immunity to *Chlamydia* infection. *Immunol. Lett.*, 164 (2): 88–93. doi:10.1016/j.imlet.2015.02.004

- LIU, Y.;** Liu, W. y Russell, M.W. 2014. Suppression of host adaptive immune responses by *Neisseria gonorrhoeae*: role of interleukin 10 and type 1 regulatory T cells. *Mucosal Immunol.*, 7 (1): 165–176. doi:10.1038/mi.2013.36
- MACKERN OBERTI, J.P.;** Breser, M.L.; Nuñez, N.; Maccioni, M.; Rodríguez, N.; Wantia, N.; Ertl, T.; Miethke, T. y Rivero, V.E. 2011a. Chemokine response induced by *Chlamydia trachomatis* in prostate derived CD45+ and CD45- cells. *Reproduction*, 142 (3): 427–437. doi:10.1530/REP-11-0163
- MACKERN-OBERTI, J.P.;** Maccioni, M.; Breser, M.L.; Eley, A.; Miethke, T. y Rivero, V.E., 2011b. Innate immunity in the male genital tract: *Chlamydia trachomatis* induces keratinocyte-derived chemokine production in prostate, seminal vesicle and epididymis/vas deferens primary cultures. *J. Med. Microbiol.*, 60 (Pt 3): 307-316. doi:10.1099/jmm.0.024877-0
- MACKERN-OBERTI, J.P.;** Maccioni, M.; Cuffini, C.; Gatti, G. y Rivero, V.E. 2006. Susceptibility of prostate epithelial cells to *Chlamydia muridarum* infection and their role in innate immunity by recruitment of intracellular Toll-like Receptors 4 and 2 and MyD88 to the inclusion. *Infect. Immun.*, 74 (12): 6973–6981. doi:10.1128/IAI.00593-06
- MACKERN-OBERTI, J.P.;** Motrich, R.D.; Breser, M.L.; Cejas, H.; Cuffini, C.; MacCioni, M., Rivero, V.E., 2011c. Male rodent genital tract infection with *Chlamydia muridarum*: Persistence in the prostate gland that triggers self-immune reactions in genetically susceptible hosts. *J. Urol.* 186, 1100–1106. doi:10.1016/j.juro.2011.04.086
- MACKERN-OBERTI, J.P.;** Motrich, R.D.; Breser, M.L.; Sánchez, L.R.; Cuffini, C. y Rivero, V.E. 2013. *Chlamydia trachomatis* infection of the male genital tract: an update. *J. Reprod. Immunol.*, 100 (1): 37–53. doi:10.1016/j.jri.2013.05.002
- MARKS, E.;** Tam, M.A. y Lycke, N.Y. 2010. The female lower genital tract is a privileged compartment with IL-10 producing dendritic cells and poor Th1 immunity following *Chlamydia trachomatis* infection. *PLoS Pathog.*, 6 (11): e1001179. doi:10.1371/journal.ppat.1001179
- MARTIN, F.;** Oliver, A.M. y Kearney, J.F. 2001. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity*, 14 (5): 617–629. doi:10.1016/S1074-7613(01)00129-7
- MAURI, C.;** Gray, D.; Mushtaq, N. y Londei, M. 2003. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J. Exp. Med.*, 197 (4): 489–501. doi:10.1084/jem.20021293
- MISAGHI, S.;** Balsara, Z.R.; Catic, A.; Spooner, E.; Ploegh, H.L. y Starnbach, M.N. 2006. *Chlamydia trachomatis*-derived deubiquitinating enzymes in mammalian cells during infection. *Mol. Microbiol.*, 61 (1): 142–150. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05199.x
- MITCHELL, C. y PRABHU, M.** 2013. Pelvic inflammatory disease: Current concepts in pathogenesis, diagnosis and treatment. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, 27 (4): 793-809. doi:10.1016/j.idc.2013.08.004
- MITTAL, A.;** Rastogi, S.; Reddy, B.S.; Verma, S.; Salhan, S. y Gupta, E. 2004. Enhanced immunocompetent cells in chlamydial cervicitis. *J. Reprod. Med.*, 49 (8): 671–677.
- MIZOGUCHI, A. y BHAN, A.K.** 2006. A case for regulatory B cells. *J. Immunol.*, 176 (2): 705–710. doi:10.4049/jimmunol.176.2.705
- MIZOGUCHI, A.;** Mizoguchi, E.; Takedatsu, H.; Blumberg, R.S. y Bhan, A.K., 2002. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity*, 16 (2): 219–230. doi:10.1016/S1074-7613(02)00274-1

- MONIZ, R.J.;** Chan, A.M. y Kelly, K.A. 2009. Identification of dendritic cell subsets responding to genital infection by *Chlamydia muridarum*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 55 (2): 226–236. doi:10.1111/j.1574-695X.2008.00523.x
- MONIZ, R.J.;** Chan, A.M.; Gordon, L.K.; Braun, J.; Arditi, M. y Kelly, K.A. 2010. Plasmacytoid dendritic cells modulate nonprotective T-cell responses to genital infection by *Chlamydia muridarum*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 58 (3): 397–404. doi:10.1111/j.1574-695X.2010.00653.x
- MOORE, T.;** Ananaba, G.A.; Bolier, J.; Bowers, S. y Moore, T. 2002. Fc receptor regulation of protective immunity against *Chlamydia trachomatis*. *Immunology*, 105 (2): 213–221.
- MOORE-CONNORS, J.M.;** Fraser, R.; Halperin, S.A. y Wang, J. 2013. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells promote Th17 responses and genital tract inflammation upon intracellular *Chlamydia muridarum* infection. *J. Immunol.*, 191 (6): 3430–3439. doi:10.4049/jimmunol.1301136
- MOORE-CONNORS, J.M.;** Kim, H.S.; Marshall, J.S.; Stadnyk, A.W.; Halperin, S.A. y Wang, J. 2014. CD43-, but not CD43+, IL-10-producing CD1dhiCD5+ B cells suppress type 1 immune responses during *Chlamydia muridarum* genital tract infection. *Mucosal Immunol.*, 8 (1): 94–106. doi:10.1038/mi.2014.45
- MORRISON, R.P. y CALDWELL, H.D.** 2002. Immunity to murine chlamydial genital infection. *Infect. Immun.*, 70 (6) 2741–2751. doi:10.1128/IAI.70.6.2741-2751.2002
- MORRISON, S.G. y MORRISON, R.P.** 2001. Resolution of secondary *Chlamydia trachomatis* genital tract infection in immune mice with depletion of both CD4+ and CD8+ T cells. *Infect. Immun.*, 69 (4): 2643–2649. doi:10.1128/IAI.69.4.2643-2649.2001
- MORRISON, S.G. y MORRISON, R.P.** 2005. A predominant role for antibody in acquired immunity to chlamydial genital tract reinfection. *J. Immunol.* 175 (11): 7536–7542. doi:10.4049/jimmunol.175.11.7536
- MORRISON, S.G. y MORRISON, R.P.,** 2000. In situ analysis of the evolution of the primary immune response in murine *Chlamydia trachomatis* genital tract infection. *Infect. Immun.*, 68 (5): 2870–2879. doi:10.1128/IAI.68.5.2870-2879.2000
- MORRISON, S.G.;** Farris, C.M.; Sturdevant, G.L.; Whitmire, W.M. y Morrison, R.P. 2011. Murine *Chlamydia trachomatis* genital infection is unaltered by depletion of CD4+ T cells and diminished adaptive immunity. *J. Infect. Dis.*, 203 (8): 1120–1128. doi:10.1093/infdis/jiq176
- MOTRICH, R.D.;** Maccioni, M.; Riera, C.M. y Rivero, V.E. 2007. Autoimmune prostatitis: state of the art. *Scand. J. Immunol.*, 66 (2-3): 217-227. doi:10.1111/j.1365-3083.2007.01971.x
- MOTRICH, R.D.;** Sanchez, L.; Maccioni, M.; MacKern-Oberti, J.P. y Rivero, V.E. 2012. Male rat genital tract infection with *Chlamydia muridarum* has no significant consequence on male fertility. *J. Urol.*, 187 (5): 1911–1917. doi:10.1016/j.juro.2011.12.055
- MURPHY, S.F.;** Schaeffer, A.J. y Thumbikat, P. 2014. Immune mediators of chronic pelvic pain syndrome. *Nat. Rev. Urol.*, 11 (5): 259-69. doi:10.1038/nrurol.2014.63
- MURTHY, A.K.;** Li, W.; Chaganty, B.K.; Kamalakaran, S.; Guentzel, M.N.; Seshu, J.; Forsthuber, T.G.; Zhong, G. y Arulanandam, B.P. 2011. Tumor necrosis factor alpha production from CD8+ T cells mediates oviduct pathological sequelae following primary genital *Chlamydia muridarum* infection. *Infect. Immun.*, 79 (7): 2928–2935. doi:10.1128/IAI.05022-11

- MYLONAS, I.** 2012. Female genital *Chlamydia trachomatis* infection: Where are we heading? *Arch. Gynecol. Obstet.*, 285 (5): 1271–1285. doi:10.1007/s00404-012-2240-7
- NAGARAJAN, U.M.;** Sikes, J.; Prantner, D.; Andrews, C.W.; Frazer, L.; Goodwin, A.; Snowden, J.N. y Darville, T. 2011. MyD88 deficiency leads to decreased NK cell gamma interferon production and T cell recruitment during *Chlamydia muridarum* genital tract infection, but a predominant Th1 response and enhanced monocytic inflammation are associated with infection resolution. *Infect. Immun.*, 79 (1): 486–498. doi:10.1128/IAI.00843-10
- NEVES, P.;** Lampropoulou, V.; Calderon-Gomez, E.; Roch, T.; Stervbo, U.; Shen, P.; Kühl, A.A.; Loddenkemper, C.; Haury, M.; Nedospasov, S.A.; Kaufmann, S.H.; Steinhoff, U.; Calado, D.P. y Fillatreau, S. 2010. Signaling via the MyD88 adaptor protein in B cells suppresses protective immunity during salmonella typhimurium infection. *Immunity*, 33 (5): 777–790. doi:10.1016/j.immuni.2010.10.016
- NOGUEIRA, C.V.;** Zhang, X.; Giovannone, N.; Sennott, E.L. y Starnbach, M.N. 2015. Protective immunity against *Chlamydia trachomatis* can engage both CD4+ and CD8+ T cells and bridge the respiratory and genital mucosae. *J. Immunol.*, 194 (5): 2319–2329. doi:10.4049/jimmunol.1402675
- O’MEARA, C.P.;** Andrew, D.W. y Beagley, K.W. 2014. The mouse model of *Chlamydia* genital tract infection: a review of infection, disease, immunity and vaccine development. *Curr. Mol. Med.*, 14 (3): 396-421.
- Occhionero, M.;** Panicciaa, L.; Pedersena, D.; Rossi, G.; Mazzucchini, H.; Entrocassi, A.; Gallo Vaulet, L.; Gualtieri, V. y Rodríguez Fermepin, M. 2015. Prevalencia de la infección por *Chlamydia trachomatis* y factores de riesgo de infecciones transmisibles sexualmente en estudiantes universitarios. *Rev. Argent. Microbiol.*, 47 (1): 9-16.
- OHMAN, H.;** Tiitinen, A.; Halttunen, M.; Birkelund, S.; Christiansen, G.; Koskela, P.; Lehtinen, M.; Paavonen, J. y Surcel, H.M. 2006. IL-10 polymorphism and cell-mediated immune response to *Chlamydia trachomatis*. *Genes Immun.*, 7 (3): 243–249. doi:10.1038/sj.gene.6364293
- OUBURG, S.;** Lyons, J.M.; Land, J.A.; den Hartog, J.E.; Fennema, J.S.; de Vries, H.J.; Bruggeman, C.A.; Ito, J.I.; Peña, A.S.; Lundberg, P.S. y Morr e, S.A. 2009. TLR9 KO mice, haplotypes and CPG indices in *Chlamydia trachomatis* infection. *Drugs of Today*, 45 Suppl. B: 83–93. doi:4599 [pii]
- PAL, S.;** Peterson, E.M. y de la Maza, L.M. 2004. New murine model for the study of *Chlamydia trachomatis* genitourinary tract infections in males. *Infect. Immun.*, 72 (7): 4210–4216. doi:10.1128/IAI.72.7.4210-4216.2004
- PAL, S.;** Sarcon, A.K. y de la Maza, L.M. 2009. C3H male mice with severe combined immunodeficiency cannot clear a urethral infection with a human serovar of *Chlamydia trachomatis*. *Infect. Immun.*, 77 (12): 5602–5607. doi:10.1128/IAI.00766-09
- PALLADINO, M.A.;** Johnson, T.A.; Gupta, R.; Chapman, J.L. y Ojha, P. 2007. Members of the Toll-like Receptor family of innate immunity pattern-recognition receptors are abundant in the male rat reproductive tract. *Biol. Reprod.*, 76 (6): 958–964. doi:10.1095/biolreprod.106.059410
- PARKS, K.S.;** Dixon, P.B.; Richey, C.M. y Hook, E.W. 1997. Spontaneous clearance of *Chlamydia trachomatis* infection in untreated patients. *Sex. Transm. Dis.*, 24 (4): 229–235. doi:10.1097/00007435-199704000-00008

- PENTTILÄ, T.;** Haveri, A.; Tammiruusu, A.; Vuola, J.M.; Lahesmaa, R. y Puolakkainen, M. 2008. *Chlamydia pneumoniae* infection in IL-10 knock out mice: Accelerated clearance but severe pulmonary inflammatory response. *Microb. Pathog.*, 45 (1): 25–29. doi:10.1016/j.micpath.2008.02.004
- PIOLI, P.A.;** Amiel, E.; Schaefer, T.M.; Connolly, J.E.; Wira, C.R. y Guyre, P.M. 2004. Differential expression of Toll-like Receptors 2 and 4 in tissues of the human female reproductive tract. *Infect. Immun.*, 72 (10): 5799–5806. doi:10.1128/IAI.72.10.5799-5806.2004
- PIRBHAI, M.;** Dong, F.; Zhong, Y.; Pan, K.Z. y Zhong, G. 2006. The secreted protease factor CPAF is responsible for degrading pro-apoptotic BH3-only proteins in *Chlamydia trachomatis*-infected cells. *J. Biol. Chem.*, 281 (42): 31495–31501. doi:10.1074/jbc.M602796200
- PORTER, E.;** Yang, H.; Yavagal, S.; Preza, G.C.; Murillo, O.; Lima, H.; Greene, S.; Mahoozi, L.; Klein-Patel, M.; Diamond, G.; Gulati, S.; Ganz, T.; Rice, P.A. y Quayle, A.J. 2005. Distinct defensin profiles in *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* urethritis reveal novel epithelial cell-neutrophil interactions. *Infect. Immun.*, 73 (8): 4823–4833. doi:10.1128/IAI.73.8.4823-4833.2005
- PREENA, B.;** Baveja, U.K.; Chawla, R.; Saini, S.; Khaki, P.; Bhalla, K.; Mahajan, S. y Ready, B.S. 2007. Simultaneous detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* by PCR in genitourinary specimens from men and women attending an STD clinic. *J. Commun. Dis.*, 39 (5): 1–6.
- QUICK, M.L.;** Wong, L.; Mukherjee, S.; Done, J.D.; Schaeffer, A.J. y Thumbikat, P. 2013. Th1-Th17 cells contribute to the development of uropathogenic *Escherichia coli*-induced chronic pelvic pain. *PLoS One*, 8 (4): e60987. doi:10.1371/journal.pone.0060987
- RANK, R.G.;** Bowlin, A.K. y Kelly, K.A. 2000. Characterization of lymphocyte response in the female genital tract during ascending chlamydial genital infection in the guinea pig model. *Infect. Immun.*, 68 (9): 5293–5298. doi:10.1128/IAI.68.9.5293-5298.2000
- RANK, R.G.;** Whittimore, J.; Bowlin, A.K.; Dessus-Babus, S. y Wyrick, P.B. 2008. *Chlamydiae* and polymorphonuclear leukocytes: unlikely allies in the spread of chlamydial infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 54 (1): 104–113. doi:10.1111/j.1574-695X.2008.00459.x
- READING, P.C.;** Whitney, P.G.; Barr, D.P.; Smyth, M.J. y Brooks, A.G. 2006. NK cells contribute to the early clearance of HSV-1 from the lung but cannot control replication in the central nervous system following intranasal infection. *Eur. J. Immunol.*, 36 (4): 897–905. doi:10.1002/eji.200535710
- REDGROVE, K.A. y MCLAUGHLIN, E.A.** 2014. The role of the immune response in *Chlamydia trachomatis* infection of the male genital tract: a double-edged sword. *Front. Immunol.*, 5: 534. doi:10.3389/fimmu.2014.00534
- RICCIOLI, A.;** Starace, D.; Galli, R.; Fuso, A.; Scarpa, S.; Palombi, F.; De Cesaris, P.; Ziparo, E. y Filippini, A. 2006. Sertoli cells initiate testicular innate immune responses through TLR activation. *J. Immunol.*, 177 (10): 7122–7130.
- RISSE, A.** 2000. Leukocyte antimicrobial peptides: multifunctional effector molecules of innate immunity. *J. Leukoc. Biol.*, 68 (6): 785–792.
- ROLF, J.;** Motta, V.; Duarte, N.; Lundholm, M.; Berntman, E.; Bergman, M.L.; Sorokin, L.; Cardell, S.L. y Holmberg, D. 2005. The enlarged population of marginal zone/CD1d (high) B lymphocytes in nonobese diabetic mice maps to diabetes susceptibility region Idd11. *J. Immunol.*, 174 (8): 4821–4827. doi:10.4049/jimmunol.174.8.4821

- RONCAROLO, M.G.**; Gregori, S. y Bacchetta, R. 2014. Tr1 Cells and the Counter-Regulation of Immunity: Natural Mechanisms and Therapeutic Applications. pp. 38-68. En: S. Fillatreau y A. O'Garra (eds.). *Interleukin-10 in Health and Disease*, Current Topics in Microbiology and Immunology 380. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- RUDICK, C.N.**; Schaeffer, A.J. y Thumbikat, P. 2008. Experimental autoimmune prostatitis induces chronic pelvic pain. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 294 (4): R1268–R1275. doi:10.1152/ajpregu.00836.2007
- SABAT, R.**; Grütz, G.; Warszawska, K.; Kirsch, S.; Witte, E.; Wolk, K. y Geginat, J. 2010. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 21 (5): 331–344.
- SAYED, B.A.**; Christy, A.; Quirion, M.R. y Brown, M.A. 2008. The master switch: the role of mast cells in autoimmunity and tolerance. *Annu. Rev. Immunol.*, 26: 705–739. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090320
- SCAPINI, P.**; Lamagna, C.; Hu, Y.; Lee, K.; Tang, Q.; DeFranco, A.L. y Lowell, C.A. 2011. PNAS Plus: B cell-derived IL-10 suppresses inflammatory disease in Lyn-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 108 (41): E823–E832. doi:10.1073/pnas.1107913108
- SCURLOCK, A.M.**; Frazer, L.C.; Andrews, C.W.; Connell, C.M.; Foote, I.P.; Bailey, S.L.; Chandra-Kuntal, K.; Kolls, J.K. y Darville, T. 2011. Interleukin-17 contributes to generation of Th1 immunity and neutrophil recruitment during *Chlamydia muridarum* genital tract infection but is not required for macrophage influx or normal resolution of infection. *Infect. Immun.*, 79 (3): 1349–1362. doi:10.1128/IAI.00984-10
- SELLAMI, H.**; Said-Sadier, N.; Znazen, A.; Gdoura, R.; Ojcius, D.M. y Hammami, A. 2014. *Chlamydia trachomatis* infection increases the expression of inflammatory tumorigenic cytokines and chemokines as well as components of the Toll-like Receptor and NF- $\kappa$ B pathways in human prostate epithelial cells. *Mol. Cell. Probes*, 28 (4): 147–154. doi:10.1016/j.mcp.2014.01.006
- SHARMA, M.**; Machuy, N.; Böhme, L.; Karunakaran, K.; Mäurer, A.P.; Meyer, T.F. y Rudel, T. 2011. HIF-1 $\alpha$  is involved in mediating apoptosis resistance to *Chlamydia trachomatis*-infected cells. *Cell. Microbiol.*, 13 (10): 1573–1585. doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01642.x
- SHEKHAR, S.**; Joyee A.G. y Yang, X. 2015. Dynamics of NKT-cell responses to chlamydial infection. *Front. Immunol.*, 6: 233. doi:10.3389/fimmu.2015.00233
- SINGH, D. y MARRAZZO, J.M.** 2013. Screening and management of genital chlamydial infections. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, 27 (4): 739–753. doi:10.1016/j.idc.2013.08.006
- SKERK, V.**; Krhen, I.; Schonwald, S.; Cajic, V.; Markovinovic, L.; Roglic, S.; Zekan, S.; Andracevic, A.T. y Kruzic, V. 2004. The role of unusual pathogens in prostatitis syndrome. *Int. J. Antimicro. Agents.*, 24 Suppl 1: S53-6. doi:10.1016/j.ijantimicag.2004.02.010
- SU, H.**; Messer, R.; Whitmire, W.; Fischer, E.; Portis, J.C. y Caldwell, H.D. 1998. Vaccination against chlamydial genital tract infection after immunization with dendritic cells pulsed ex vivo with nonviable *Chlamydiae*. *J. Exp. Med.*, 188 (5): 809–818. doi:10.1084/jem.188.5.809
- SU, H.**; Raymond, L.; Rockey, D.D.; Fischer, E.; Hackstadt, T. y Caldwell, H.D. 1996. A recombinant *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein binds to heparan sulfate receptors on epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93 (20): 11143–11148. doi:10.1073/pnas.93.20.11143

- THACKER, M.A.;** Clark, A.K.; Marchand, F. y McMahon, S.B. 2007. Pathophysiology of peripheral neuropathic pain: Immune cells and molecules. *Anesth. Analg.*, 105 (3): 838–847. doi:10.1213/01.ane.0000275190.42912.37
- VABULAS, R.M.;** Ahmad-Nejad, P.; Da Costa, C.; Miethke, T.; Kirschning, C.J.; Häcker, H. y Wagner, H. 2001. Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J. Biol. Chem.*, 276 (33): 31332–31339. doi:10.1074/jbc.M103217200
- VATS, V.;** Agrawal, T.; Salhan, S. y Mittal, A. 2007. Primary and secondary immune responses of mucosal and peripheral lymphocytes during *Chlamydia trachomatis* infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 49 (2): 280–287. doi:10.1111/j.1574-695X.2006.00196.x
- WAGENLEHNER, F.M.;** Naber, K.G. y Weidner, W. 2006. Chlamydial infections and prostatitis in men. *BJU Int.*, 97 (4): 687–690. doi:10.1111/j.1464-410X.2006.06007.x
- Walker, M.E.;** Hatfield, J.K. y Brown, M.A. 2012. New insights into the role of mast cells in autoimmunity: Evidence for a common mechanism of action? *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, 1822 (1): 57–65. doi:10.1016/j.bbadis.2011.02.009
- WANG, S.;** Fan, Y.; Brunham, R.C. y Yang, X. 1999. IFN- $\gamma$  knockout mice show Th2-associated delayed-type hypersensitivity and the inflammatory cells fail to localize and control chlamydial infection. *Eur. J. Immunol.*, 29 (11): 3782–3792. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199911)29:11<3782::AID-IMMU3782>3.0.CO;2-B
- WEIDNER, W.;** Diemer, T.; Huwe, P.; Rainer, H. y Ludwig, M. 2002. The role of *Chlamydia trachomatis* in prostatitis. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 19 (6): 466–470. doi:10.1016/S0924-8579(02)00094-8
- WEIDNER, W.;** Krause, W. y Ludwig, M. 1999. Relevance of male accessory gland infection for subsequent fertility with special focus on prostatitis. *Hum. Reprod. Update.*, 5 (5): 421-432. doi:10.1093/humupd/5.5.421
- WELTER-STAHN, L.;** Ojcius, D.M.; Viala, J.; Girardin, S.; Liu, W.; Delarbre, C.; Philpott, D.; Kelly, K.A. y Darville, T. 2006. Stimulation of the cytosolic receptor for peptidoglycan, Nod1, by infection with *Chlamydia trachomatis* or *Chlamydia muridarum*. *Cell. Microbiol.*, 8 (6): 1047–1057. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00686.x
- WIZEL, B.;** Nyström-Asklin, J.; Cortes, C. y Tvinnereim, A. 2008. Role of CD8+T cells in the host response to *Chlamydia*. *Microbes Infect.*, 10 (14-15): 1420–1430.
- WOLF, S.D.;** Dittel, B.N.; Hardardottir, F. y Janeway, C.A. 1996. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *J. Exp. Med.*, 184 (6): 2271–2278. doi:10.1084/jem.184.6.2271
- YANG, M.;** Rui, K.; Wang, S. y Lu, L. 2013. Regulatory B cells in autoimmune diseases. *Cell. Mol. Immunol.*, 10: 122–32. doi:10.1038/cmi.2012.60
- YANG, Y.;** Tung, J.W.; Ghosn, E.E.B.; Herzenberg, L.A. y Herzenberg, L.A., 2007. Division and differentiation of natural antibody-producing cells in mouse spleen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104 (11): 4542–4546. doi:10.1073/pnas.0700001104
- YAO, S.;** Zhu, Y. y Chen, L. 2013. Advances in targeting cell surface signalling molecules for immune modulation. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 12: 130–46. doi:10.1038/nrd3877
- YOSHIZAKI, A.;** Miyagaki, T.; DiLillo, D.J.; Matsushita, T.; Horikawa, M.; Kountikov, E.I.; Spolski, R.; Poe, J.C.; Leonard, W.J. y Tedder, T.F. 2012. Regulatory B cells control T-cell

autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature*, 491 (7423): 264–268. doi:10.1038/nature11501

**YU, H.**; Schwarzer, K.; Förster, M.; Kniemeyer, O.; Forsbach-Birk, V.; Straube, E. y Rödel, J. 2010. Role of high-mobility group box 1 protein and poly (ADP-ribose) polymerase 1 degradation in *Chlamydia trachomatis*-induced cytopathicity. *Infect. Immun.*, 78 (7): 3288–3297. doi:10.1128/IAI.01404-09

**Zaharik, M.L.**; Nayar, T.; White, R.; Ma, C.; Vallance, B.A.; Straka, N.; Jiang, X.; Rey-Ladino, J.; Shen, C. y Brunham, R.C. 2007. Genetic profiling of dendritic cells exposed to live- or ultraviolet-irradiated *Chlamydia muridarum* reveals marked differences in CXC chemokine profiles. *Immunology*, 120 (2): 160–172. doi:10.1111/j.1365-2567.2006.02488.x

**ZHANG, J.P.** y **STEPHENS, R.S.** 1992. Mechanism of *C. trachomatis* attachment to eukaryotic host cells. *Cell*, 69 (5): 861–869. doi:10.1016/0092-8674(92)90296-O

**ZHANG, X.** 2013. Regulatory functions of innate-like B cells. *Cell. Mol. Immunol.*, 10 (2): 113–21. doi:10.1038/cmi.2012.63