

# UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de  
Doctor en Ciencias Biológicas

**“Estudio de la respuesta inmune frente a infecciones genitales y su relación con infertilidad. Contribución al diseño de estrategias inmunoproliféricas contra *Chlamydia trachomatis*”**

Lic. Romina Cecilia Russi

Dra. Carolina MI Veaute  
Director de Tesis

Laboratorio de Inmunología Experimental - Cátedra de Inmunología Básica  
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas  
Universidad Nacional del Litoral

**-2019-**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mí querido país, Argentina, porque la Educación es pública y gratuita, aún en niveles de posgrados.

A la Universidad Nacional del Litoral y a mi querida Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas por el hermoso espacio físico, por la contención humana, por la cantidad de ofertas y oportunidades que brinda. Particularmente agradezco por brindarme la beca para comenzar mi estudio de posgrado, beca para realizar cursos de posgrados, subsidios para los proyectos de investigación, proyectos de extensión, beca de extensión, programa “Los científicos van a las escuelas”. Asimismo por los espacios de divulgación que ofrecen, Tesis en 3 minutos, comunicación FBCB, prensa UNL, Jornada de Encuentro de jóvenes investigadores, intercambios, entre otros. Gracias a los directivos, personal docente y no docente y a todos aquellos que de una u otra manera contribuyeron con mi formación.

A la Comisión de Doctorado y Comisión de Seguimiento Curricular de la FBCB año 2018, por el diálogo, la participación y particularmente a cada una de las personas que integran las comisiones que de una u otra manera contribuyeron a mi formación profesional y personal.

A Conicet, por brindarme la beca para continuar con mi estudio de posgrado y por los subsidios otorgados.

A mi Directora, que admiro tanto, por ser una persona simple, dedicada a su trabajo y responsable en todo lo que emprende. Y además porque desde el año 2009 que confía en mí y permite y participa activamente en mi crecimiento profesional y personal.

A Marina, por contribuir como co-directora en la beca para Conicet y por mejorar los espacios de la Cátedra de Inmunología Básica para mejor comodidad.

A mi consejera del doctorado, Mercedes, por acompañarme cada año con compromiso hacia mi trabajo expresado en las devoluciones y críticas constructivas de cada informe. Agradezco su ayuda desinteresada en una de las técnicas del doctorado, por su tiempo y buena disposición.

A María Inés, que está siempre para lo que necesitemos dispuesta a colaborar en todo.

A Cris, por ser espontánea y alegre y darnos siempre una mano como si fuese del Lab de Inmuno Experimental.

A Adri, por preguntarme siempre como estoy, desde los ensayos hasta mi vida personal.

A mis compañeras y amigas del Lab, Iva, Sonia, Maga, Jael, Ceci, Lucía por acompañarme cada mañana, con experimentos, con palabras de aliento, con consejos, con ideas y lo mejor con sus abrazos y cariño.

A todos los docentes de Inmunología Básica, además de los que ya nombre a Sofi, Caro, Mili y Edu por su compañía durante el primer cuatrimestre y estar siempre dispuestos ayudar cuando pedimos favores.

Al departamento de matemática de la FBCB, particularmente a Stella, Olga y Liliana por atendernos desinteresadamente y brindarnos sus conocimientos sobre cuestiones de estadística y análisis multivariado.

A la Dra. Diana Müller y el LaQuimAp por su gran colaboración, responsabilidad y cariño.

A la Dra. Rosa Molina de Córdoba por su gran colaboración y buena disposición.

Al Dr. Martin Vacchino del Instituto Malbrán por su gran colaboración y buena disposición.

Al Dr. Ariel Valiente por su gran colaboración y buena disposición.

Al Instituto de Inmunología Clínica y Experimental de Rosario de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario por su gran colaboración y buena disposición para disponer de espacio físico para realizar los ensayos de citometría.

Al Dr. Gustavo Piccinelli Director del Registro Nacional de Donantes de CPH – INCUCAI por su amable respuesta y disposición de información sobre los alelos más frecuentes de la población Argentina.

Al Laboratorio Central de la provincia de Santa Fe por su colaboración.

A Elian, por darnos una mano en los programas de bioinformática y brindarnos sus conocimientos.

A Anto por sumarse al proyecto de extensión con la misma locura y colaborar siempre.

A Juli y Ana Paula, por darme la posibilidad de participar en su formación académica y brindarse como lo hicieron con gran responsabilidad y compromiso.

A los colegas de la facu, todos los compañeros del Lab de Cultivo Celulares, en especial a Seba, Carla de Analítica, Ivancito, las chicas de Clínica, de Mico Flor, por colaborar con equipos y dar una mano.

A Ramiro, por acompañarme durante los primeros años del doctorado, escucharme, contenerme y lo mejor pensar los resultados inesperados y diseñar nuevos ensayos.

A los compañeros y amigos de la Asociación Santafesina de Biotecnología, por hacer de la ASB un espacio cálido, de crecimiento, de fuerza, de ideas, de alegría y de discusiones también pero siempre trabajando para el mismo fin, juntos acomodándonos y haciéndolo como aprendemos y podemos.

A los compañeros del Hospital JB Iturraspe, German, Carla, Eve, por el equipo que formamos por su buena disposición y trabajo durante tantos años y esperarme con la mejor muchos miércoles de las semanas durante tres años.

A Caro Vergara, por su calidez y permitirme realizar dos proyectos de extensión en sus lugares de trabajo. Más que divulgar sobre enfermedades de transmisión sexual, vimos de cerca realidades crudas, impensadas, y de allí nos adaptamos para buscar la manera de brindar el conocimiento al alcance, tangible juntos con apoyo y cariño.

A Jesi y Eve, mis amigas de toda la vida y del alma. Por estar siempre, incondicionalmente acompañándome en cada crecimiento personal de la mejor forma, con su amor y sus escuchas.

A mi familia, por Estar Presentes durante todos estos años pese a la distancia. Es difícil plasmar en palabras todo el agradecimiento hacia ellos. Infinitamente gracias por su interés, sus palabras llenas de amor, optimismo, seguridad y confianza ciega en mí y los resultados. A Lilia, mi mamá, por darme calma, seguridad y amor, mucho amor cada día. A Mario, mi papá, por sus frases y palabras justas llenas de optimismo y desbordadas de cariño en los momentos más complicados y de emoción en los momentos de alegría. A Fede, mi hermano, por pensar y decirme que voy a poder hacerlo y su capacidad de hacérmelo creer.

Así, con todo este equipo el camino se transitó libre, ligero, a veces lleno de flores, y resplandor, otros con nubes y frío pero siempre impulsado con la entrega y el amor de cada uno de ellos y la fuerza de mi pasión. Gracias de corazón.

Aprovecho a citar unas frases de un argentino ligado a la ciencia que admiramos junto con mi papá y muchas personas de este país.

*“En cada acto médico debe estar presente el respeto por el paciente y conceptos éticos y morales, entonces la ciencia y la conciencia estarán siempre del mismo lado, del lado de la humanidad”.*

*“Es necesario insistir una vez más que si no estamos dispuestos a comprometernos, principalmente los universitarios, a luchar por los cambios estructurales que nuestro país y toda Latinoamérica demanda -principalmente en educación y salud- seguiremos siendo testigos de esta sociedad injusta donde parece que el tener y el poder son las aspiraciones máximas”.*

Dr. René Favalloro

## ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico
ADNp	Ácido desoxirribonucleico plasmídico
AMP	Péptidos antimicrobianos
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ASA	Anticuerpos antiespermáticos
β2M	β2 microglobulina
BSA	Albumina sérica bovina
CD	Células dendríticas
CPA	Células presentadoras de antígeno
CPAF	<i>Chlamydial protease-like activity factor</i>
CS	Células de Sertoli
CT	<i>Cycle threshold</i>
C-terminal	Extremo carboxilo terminal
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
DPPC	Dipalmitoil fosfatidil colina
EB	Cuerpos elementales
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EIP	Enfermedad inflamatoria pélvica
F1	Fragmento 1 de PmpD
F2	Fragmento 2 de PmpD
FcRn	Receptor neonatal de Fc
FCI	Fértil con infección
FSI	Fértil sin infección
FOXp3	Factor de transcripción <i>Forkhead box P3</i>
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GATA3	Factor de transcripción GATA <i>Binding Protein 3</i>
Gem	<i>Gemini</i>
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
GSF1	Gen sintético fragmento 1

GSF2	Gen sintético fragmento 2
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
HSP	Proteína de choque térmico
IEDB	<i>Immune epitope database</i>
ISI	Infértil sin infecciones
ICI	Infértil con infecciones
IL	Interleuquina
ITS	Infecciones de transmisión sexual
Ig	Inmunoglobulina
IgAs	Inmunoglobulina A secretora
IFN- $\gamma$	Interferón $\gamma$
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
k	Secuencia de Kozak
LB	Linfocitos B
LGV	Linfogranuloma venéreo
LIF	Factor inhibidor de leucemia
Lp	Liposomas
LPS	Lipopolisacáridos
LRI	Límite de referencia inferior
LRS	Límite de referencia superior
LT	Linfocitos T
LTh	Linfocitos T <i>helper</i>
LTrm	Linfocitos T residentes de memoria
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MIP-1	Proteína inflamatoria de macrófagos 1
MOMP	Proteína principal de membrana externa
NK	Células <i>natural killer</i>
NLS	Señal putativa de localización nuclear
N-terminal	Extremo amino terminal
NCBI	<i>National Center Biotechnology Information</i>
ODN	Oligodesoxinucleótidos
OMS	Organización mundial de la salud
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
pb	Pares de bases
PBS	<i>Buffer</i> fosfato salino
PBS-L	PBS leche descremada

PBS-T	PBS <i>tween</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PGE	Prostaglandina E
pIgR	Receptor de inmunoglobulina polimérica
PMC	Células mioides peritubulares
PMP	Proteína polimórfica de membrana
PO-ODN	Oligodesoxinucleótidos con enlaces fosfodiéster
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
ps	Péptido señal
PS-ODN	Oligodesoxinucleótidos con fosfotioato
qPCR	PCR en tiempo real
ROR $\gamma$ t	Factor de transcripción <i>RAR-related orphan receptor <math>\gamma</math></i>
RB	Cuerpos reticulares
RIV	Respuesta inflamatoria vaginal
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEM	Error estándar de la media
SLiCE	<i>Seamless Ligation Cloning Extract</i>
SLPI	Inhibidor de proteasa leucocitaria secretora
Ta	Temperatura de hibridización
Tbet	Factor de transcripción T-box
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$
TLR	Receptores tipo Toll
TMB	3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
Treg	T reguladores
TRF	Tracto reproductor femenino
TRM	Tracto reproductor masculino
UD	Unión débil
UF	Unión fuerte
uNK	Células <i>natural killer</i> uterinas
VB	Vaginosis bacteriana
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
HIV	Virus de inmunodeficiencia humana
VPH	Virus del papiloma humano

## RESUMEN

La infertilidad es un problema de salud pública que afecta a personas de todo el mundo. Una de las causas de infertilidad son las infecciones de transmisión sexual (ITS). La infección genital por *Chlamydia trachomatis* es la causa más común de ITS en todo el mundo y tiene un efecto significativo en la reproducción humana. Por otra parte, *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* son a menudo concomitantes con *C. trachomatis* y han sido descritos como microorganismos causantes de ITS que en diversas situaciones están estrechamente relacionados con trastornos de la salud reproductiva de mujeres y hombres. Teniendo en cuenta que la infertilidad relacionada con la presencia de infecciones genitales podría ser el resultado tanto de un efecto directo del agente infeccioso como de la respuesta inmune propia del individuo resulta importante investigar esa relación. Entre los factores inmunológicos involucrados en infertilidad, uno de los más estudiados es la presencia de anticuerpos antiespermáticos (ASA). Estos anticuerpos pueden encontrarse tanto en la mujer como en el hombre, y pueden afectar diferentes eventos del proceso de fecundación. Asimismo, las ITS producirían un cambio en las poblaciones leucocitarias presentes en el tejido junto con la producción de mediadores inflamatorios, como citoquinas y quimioquinas, entre otros, que podría alterar la fertilidad. Por otro lado, existe un gran interés en controlar las infecciones genitales. Particularmente, teniendo en cuenta el impacto mundial que produce la infección por *C. trachomatis* en la salud reproductiva de hombres y mujeres, existe un creciente interés en desarrollar una vacuna que pueda inducir una respuesta inmune protectora sin generar patologías como alteraciones en la fertilidad.

El objetivo general de la presente tesis fue investigar la relación entre la respuesta inmune asociada a infecciones genitales y la infertilidad, y contribuir al diseño de una estrategia de prevención de infección por *C. trachomatis*.

En consecuencia, en primer lugar se analizó la prevalencia de infecciones genitales producidas por *C. trachomatis*, *M. hominis* y *U. urealyticum* en pacientes en consulta por infertilidad del hospital JB Iturraspe de la ciudad de Santa Fe. Luego se caracterizó el perfil de respuesta inmune en lavado vaginal y en semen de pacientes infértiles y fértiles, con y sin estas infecciones genitales. Particularmente, la expresión de citoquinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ; IL-17, IL-10, TGF- $\beta$ , IL-6, IL-8), y factores de transcripción maestros de linfocitos T *helper* (LTh) (Th1: Tbet, Th2: GATA3, Treg: FOXP3 y Th17: ROR $\gamma$ t) fue determinada por RT-qPCR. Por otro lado, mediante citometría de flujo se cuantificaron algunas citoquinas entre ellas IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-6, IL-17A. Con todos los resultados obtenidos se establecieron posibles relaciones entre el perfil de respuesta inmune hallado en los pacientes con y sin infecciones genitales y la infertilidad. En segundo lugar se diseñaron, optimizaron, desarrollaron y evaluaron diferentes formulaciones basadas en ADN plasmídico (ADNp) y proteína recombinante para inducir inmunidad hacia PmpD de *C. trachomatis*. Mediante un análisis *in silico* se seleccionó un fragmento de PmpD denominado

Fragmento 2 (F2), que contiene múltiples epitopes de linfocitos B (LB), conformacionales y lineales, y de linfocitos T (LT), con capacidad de unión a moléculas MHC II. La secuencia codificante del mismo fue insertada en un vector de expresión eucariota, precedida de un líder secretorio, para ser usado en la inmunización con ADNp. Asimismo, el fragmento se obtuvo por expresión recombinante en *Escherichia coli*. Se realizó un protocolo de inmunización *prime-boost* aplicando diversas vías de inoculación. Ratonas hembra recibieron una dosis con ADNp desnudo administrado por vía intradérmica. Luego se administraron 2 refuerzos con F2 de la proteína polimórfica de membrana D (*polymorphic membrane protein D*: PmpD) recombinante por dos vías simultáneas: sistémica (subcutánea) y por vía de las mucosas (nasal), formulada con liposomas suplementados o no con un inmunoestimulante. Los inmunoestimulantes empleados fueron: oligodesoxinucleótidos (ODN) CpG y anfifilos *Gemini* (Gem). Para evaluar la respuesta inmune generada se determinaron los niveles de anticuerpos específicos IgG, IgG1 e IgG2a en suero e IgG e IgA en lavados vaginales. Por último, se evaluó la fertilidad *in vivo* de los animales inmunizados mediante el apareo con machos de fertilidad comprobada.

Respecto al análisis de prevalencia, los resultados mostraron que el 29,9% de los 193 pacientes infértiles analizados presenta alguna de estas tres ITS, por lo tanto, las infecciones por *C. trachomatis*, *M. hominis* y *U. urealyticum* son potenciales causas de infertilidad. Particularmente, *C. trachomatis* y *M. hominis* son más prevalente en mujeres infértiles y *U. urealyticum* en hombres infértiles. Si bien la presencia de ASA se asoció a infecciones por *C. trachomatis* y *U. urealyticum*, los resultados obtenidos sugieren que los ASA no serían los principales factores que contribuyen a la infertilidad en los pacientes estudiados. Tanto los pacientes infértiles con ITS como sin ITS presentaron alteraciones en citoquinas y factores de transcripción maestros de LTh tanto en lavado vaginal como en plasma seminal. Las mujeres infértiles infectadas por *C. trachomatis* presentan una alteración en los factores inmunes, particularmente mediado por ROR $\gamma$ t, IL-6 y correlaciones altamente significativas entre IL-10, INF- $\gamma$  y IL-17A. Las pacientes infértiles infectadas con *M. hominis* presentan una alteración de la flora normal con vaginosis bacteriana y un desequilibrio inmunológico potencialmente mediado por IL-10, IL-8, IL-17A, IL-6, ROR $\gamma$ t. Las pacientes infértiles infectadas con *U. urealyticum* presentaron una alteración de factores inmunes, mediada por IFN- $\gamma$ , ROR $\gamma$ t, GATA3, FOXP3. Respecto a los resultados obtenidos sobre parámetros espermáticos en pacientes masculinos, *U. urealyticum* no produciría efectos directos sobre los espermatozoides. Sin embargo, se observó un aumento de TNF- $\alpha$  e IL-10 en plasma seminal. En conjunto, estos resultados apoyan la hipótesis de que las ITS producen alteraciones en el ambiente inmunológico que podrían impactar negativamente en la fertilidad. Por otra parte, en ausencia de infección, las mujeres infértiles presentan claras alteraciones en los factores inmunológicos pero la mayoría presenta microbiota normal. Particularmente, la disminución de TGF- $\beta$ , una citoquina clave para la reproducción, y el aumento de una de las principales citoquinas proinflamatorias INF-

$\gamma$  junto con el aumento de ROR $\gamma$ t los cuales podrían ser factores que contribuyen a la infertilidad en mujeres infértiles sin infección.

El fragmento de PmpD de *C. trachomatis* seleccionado sobre la base del análisis *in silico* fue insertado en un plásmido de expresión eucariota para inmunización génica. Asimismo, se logró expresar y purificar la proteína recombinante F2 de PmpD, que se empleó para la inmunización utilizando la estrategia de *prime-boost*. El diseño desarrollado tiene como objetivo inducir una respuesta tendiente a un perfil Th1 y anticuerpos específicos. La estrategia de *prime-boost* generó una robusta respuesta humoral, tanto sistémica como local (en mucosa vaginal) en un modelo murino, con todas las formulaciones evaluadas. Particularmente, la formulación que contenía la proteína acompañada de liposomas catiónicos y CpG generó altos niveles de anticuerpos IgG2a séricos específicos lo que sugiere que este inmunoestimulante dirige la respuesta hacia un perfil Th1, e IgG en mucosa vaginal. Por otro lado, la formulación con liposomas con inmunoestimulante Gem condujo a la producción de anticuerpos de isotipo IgA en vagina. Las formulaciones evaluadas mediante la estrategia de *prime-boost* no exhibieron alteraciones en los parámetros de fertilidad evaluados (potencial de fertilidad, tasa de pérdida pre- y pos- implantación).

El presente trabajo de tesis permitió por un lado comprender los factores locales que regulan la inmunidad de las mucosas en pacientes infértiles con y sin infecciones genitales y por el otro diseñar, desarrollar y evaluar diversas formulaciones vacunales para lograr inmunidad contra *C. trachomatis* sin alterar la fertilidad.

En conjunto, este trabajo brinda elementos para una mejor comprensión de los trastornos reproductivos y aporta posibles herramientas para la prevención de una ITS con gran impacto en la salud reproductiva y neonatal.

## RESUMEN EN INGLÉS

Infertility is a public health problem that affects people worldwide. Sexually Transmitted Infections (STI) are a common cause of human infertility. Genital infection with *Chlamydia trachomatis* is the most common cause of STI worldwide and has a significant effect on human reproduction. On the other hand, *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* are often concomitant with *C. trachomatis* and have been described as causative organisms of STI that in various situations are related to reproductive health disorders in women and men. Considering that infertility related to the presence of genital infections could be the result of both a direct effect of the infectious agent and the individual's immune response, it is important to investigate this relationship. Among the immunological factors involved in infertility, one of the most studied is antisperm antibodies (ASA). These ASA can be found in both women and men and can affect different events of the fertilization process. Moreover, STI would produce a change in leukocyte populations in the tissue with the production of inflammatory mediators, such as cytokines and chemokines, among others, which could alter fertility. There is a great interest in controlling genital infections. Particularly, taking into account the global impact of *C. trachomatis* infection on the reproductive health of men and women, there is a growing interest in developing a vaccine that can induce a protective immune response without generating pathologies such as alterations in fertility.

The general objective of this thesis was to investigate the relationship between the immune response associated with genital infections and infertility, and to contribute to the design of a strategy to prevent *C. trachomatis* infection.

First, the prevalence of genital infections caused by *C. trachomatis*, *M. hominis* and *U. urealyticum* in patients consulting for infertility at Iturraspe Hospital in Santa Fe, Argentina was analyzed. Then, the immune response profile in vaginal washing and in semen of infertile and fertile patients with and without these genital infections was characterized. Particularly, the expression of cytokines (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-10, TGF- $\beta$ , IL-6, IL-8), and master transcription factors of T helper cells (Th1: Tbet, Th2: GATA3, Treg: FOXP3 and Th17: ROR $\gamma$ t) was determined by RT-qPCR. A principal component analysis, for reducing the dimensionality of such datasets, increasing interpretability but at the same time minimizing information loss was made. Moreover, a Spearman correlation between pairs of immune factors was made using InfoStat software. Some cytokines such as IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-6, IL-17A were quantified by flow cytometry. The relationship between the immune response profile found in patients with and without genital infections and infertility was analyzed. Second, different formulations based on plasmid DNA (pDNA) and recombinant protein were designed, developed and evaluated to induce immunity to *C. trachomatis* PmpD. *In silico* prediction of B-cell and T-cell epitopes within the amino acid sequence of PmpD was made. A fragment of PmpD named F2 was selected, which contains multiple conformational and linear B-cell, and T-cell epitopes capable of binding to MHC II

molecules. The coding sequence of F2 was inserted into a eukaryotic expression vector, preceded by a secretory leader, to be used in pDNA immunization. Moreover, the fragment F2 was obtained by recombinant expression in *Escherichia coli*. A *prime-boost* immunization protocol was applied by different routes of inoculation. Female mice received intradermally a dose with naked pDNA. Then, two doses were administered with recombinant PmpD F2 by two simultaneous routes: systemic (subcutaneous) and mucosal (nasal), formulated with liposomes supplemented with or without an immunostimulant. The immunostimulants used were: CpG oligonucleotides and *Gemini* amphiphiles. To evaluate the generated immune response, the levels of specific IgG, IgG1 and IgG2a antibodies in serum and IgG and IgA antibodies in vaginal washings were determined. Finally, the *in vivo* fertility of the immunized animals was evaluated by mating with males of proven fertility.

Regarding the prevalence analysis, the results showed that 29% of the 193 infertile patients analyzed have any of these three STI, therefore, infections by *C. trachomatis*, *M. hominis* and *U. urealyticum* are potential causes of infertility. Particularly, *C. trachomatis* and *M. hominis* are more prevalent in infertile women and *U. urealyticum* in infertile men. Although the presence of antisperm antibodies was associated with *C. trachomatis* and *U. urealyticum* infections, the results suggest that ASA would not be the main contributing factors to infertility in the patients studied. Infertile patients with and without STI presented alterations in cytokines and master transcription factors of T helper cells both in vaginal washing and in seminal plasma. Particularly, infertile women infected with *C. trachomatis* show alterations in the immune factors, particularly mediated by ROR $\gamma$ t, IL-6 and highly significant correlations among IL-10, INF- $\gamma$  and IL-17A. The infertile female patients infected with *M. hominis* present an alteration of the normal flora with bacterial vaginosis and an immune imbalance potentially mediated by IL-10, IL-8, IL-17A, IL-6, ROR $\gamma$ t. Infertile women infected with *U. urealyticum* present alterations of immune factors, that are mediated by IFN- $\gamma$ , ROR $\gamma$ t, GATA3, FOXP3. Regarding the results obtained on sperm parameters in male patients, *U. urealyticum* would not have direct effects on the sperm. However, an increase in TNF- $\alpha$  and IL-10 in seminal plasma was observed. Taken together, these results support the hypothesis that STI produce alterations in the immune environment that could negatively impact fertility. On the other hand, in the absence of infection, infertile women show clear alterations in the immunological factors but most of them present normal microbiota. Particularly, the decrease of TGF- $\beta$ , a key cytokine for reproduction, and the increase of one of the main proinflammatory cytokines, INF- $\gamma$ , together with the increase of ROR $\gamma$ t could be contributing factors to infertility in infertile women without infection.

The F2 fragment from *C. trachomatis* PmpD, selected on the basis of *in silico* analysis was inserted into an eukaryotic expression plasmid for gene immunization. Likewise, it was possible to express and purify the recombinant protein F2 of PmpD, which was used for immunization using

the *prime-boost* strategy. The developed design aims to induce a response tending to a Th1 profile and specific antibodies. The strategy of *prime-boost* generated a robust humoral response, both systemic and local (in vaginal mucosa) in a murine model, with all the formulations evaluated. Particularly, the formulation containing the protein accompanied by cationic liposomes and CpG generated high levels of specific serum IgG2a antibodies suggesting that this immunostimulant directs the response towards a Th1 profile, and IgG in vaginal mucosa. On the other hand, the formulation with liposomes with *gemini* immunostimulant led to the production of IgA isotype antibodies in the vagina. The formulations administered by the *prime-boost* strategy did not generate alterations in the evaluated fertility parameters (fertility potential, pre- and post-implantation loss rate).

The present work of the thesis allowed on the one hand to understand the local factors that regulate the immunity of the mucosa in infertile patients with and without genital infections and on the other, to design, develop, and evaluate various vaccine formulations to achieve protective immunity against *C. trachomatis* without altering fertility.

Taken together, this work provides elements for a better understanding of reproductive disorders and provides possible tools for the prevention of STI with a great impact on reproductive and neonatal health.

## **INTRODUCCION**

### **Definición de Infertilidad**

En el año 2009 la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Comité Internacional para el Monitoreo de Tecnología Reproductiva Asistida (*International Committee for monitoring assisted reproductive technology: ICMART*) definieron la infertilidad como “una enfermedad del sistema reproductivo definida por la imposibilidad de lograr un embarazo clínico después de 12 meses o más de tener relaciones sexuales regulares sin protección” [1]. Posteriormente, se publicó “el glosario internacional sobre cuidado de la infertilidad y la fertilidad” cuyo objetivo fue generar un consenso en un conjunto de términos y definiciones basados en la evidencia para ser utilizados a nivel mundial con el fin de garantizar coherencia cuando se informa sobre infertilidad [2]. De esta manera, en el año 2017 la definición de "infertilidad" se ha ampliado para abarcar un mayor espectro de condiciones que afectan la capacidad de reproducción de individuos y parejas. Actualmente, la infertilidad se define como una enfermedad caracterizada por la imposibilidad de establecer un embarazo clínico; sin embargo, también reconoce que el hecho de no quedar embarazada no siempre es el resultado de una enfermedad, y por lo tanto introduce el concepto de un deterioro de la función que puede conducir a una discapacidad. Asimismo, se alcanzó un consenso para el término “subfertilidad”. Se acordó que la subfertilidad no define una diferencia o un estado de fertilidad menos grave que la infertilidad, ni es una condición que existe antes de que se diagnostique la infertilidad. Por lo tanto, se llegó a la aceptación que la subfertilidad es un término redundante, siendo reemplazada por el término infertilidad para estandarizar la definición y evitar confusión. Además, se alcanzó un consenso con el término "esterilidad" el cual sólo debería usarse para definir un estado permanente de infertilidad. De este modo, se evitaría la suposición de que el diagnóstico de infertilidad implica esterilidad [2].

### **Prevalencia**

La infertilidad es un problema de salud pública que afecta a personas de todo el mundo [3], [4]. La prevalencia es difícil de determinar dentro y entre diferentes ubicaciones geográficas, esto se debe a la naturaleza de la muestra poblacional, el ambiente sociocultural, socioeconómico, el estigma social, entre otros factores. Si bien se sabe que la infertilidad afecta tanto a hombres como mujeres, la mayoría de los escasos datos de prevalencia reportados se refieren particularmente a mujeres. En el año 2007, Boivin y colaboradores estimaron que en el mundo hay aproximadamente 72,4 millones de mujeres que se encuentran en una relación consensual, de edad entre 20 y 44 años que son infértiles. De éstas, 40,5 millones buscan atención médica para abordar la infertilidad. Asimismo, estimaron que la tasa de prevalencia de 12 meses en países desarrollados varió entre 3,5% al 16,7% mientras que en países sub-desarrollados entre 6,9% y 9,3%, considerando una

prevalencia mediana general estimada del 9% [3]. Las estimaciones del año 2010 refieren que el 1,9% y el 10,5% de mujeres en edad reproductiva (20-40 años) padecen infertilidad primaria y secundaria, respectivamente [5]. La OMS define como infertilidad primaria a la incapacidad para quedar embarazada a pesar de intentar activamente por un cierto número de años mientras que la infertilidad secundaria es definida como la incapacidad para quedar embarazada a pesar de intentar activamente por un cierto número de años y haber estado embarazada o haber tenido un hijo en el pasado. Datos más actuales reportan que la infertilidad afecta al 10% y el 15% de las parejas en edad reproductiva [6].

### **Causas**

Existen diversas causas que pueden provocar fallas en la reproducción. La edad avanzada de las mujeres se relaciona con menor cantidad y calidad de folículos [7], [8], un mayor riesgo de aborto involuntario [8], [9], [10], morbilidad obstétrica y complicaciones perinatales [11]. Edades avanzadas tanto de mujeres como de hombres han sido asociadas con un mayor tiempo para lograr el embarazo [12], [13]. Algunos problemas de infertilidad no pueden prevenirse. Sin embargo, ciertos factores de riesgo son prevenibles [14]. Entre ellos se pueden mencionar, las infecciones de transmisión sexual (ITS) [15] el tabaquismo [16] el consumo de alcohol [17], la obesidad o bajo peso [16], [18], [19], el consumo de cafeína [20], el estrés [20] e incluso el teléfono celular [21], [22] y el uso de internet inalámbrico [23]. Para una revisión completa de algunos de estos y otros factores de riesgo revisar Homan y colaboradores 2007 [20], Anderson y colaboradores 2010 [24], Sharma y colaboradores [25].

### **Infertilidad sin causa aparente**

La infertilidad sin causa aparente o infertilidad inexplicable es un término que se ha aplicado al 30-40% de las parejas infértiles [26]. Particularmente, se refiere a la situación en la que todas las investigaciones estándares (pruebas de ovulación, permeabilidad tubárica, análisis de semen) dan resultados dentro de valores normales [27]. Para la pareja infértil, un "diagnóstico" de infertilidad sin causa aparente puede ser muy frustrante y con frecuencia es interpretado como una falta de explicación para la causa de la infertilidad y, por lo tanto, falta de tratamiento efectivo. La infertilidad sin causa aparente puede estar relacionada con trastornos en el equilibrio inmunológico, endocrinológico, genético y en la fisiología reproductiva [28].

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Investigar la relación entre la respuesta inmune asociada a infecciones genitales y la infertilidad, y contribuir al diseño de una estrategia de prevención de infección por *Chlamydia trachomatis*.

### **Objetivos Particulares**

1. Detectar infección por *Clamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis* en exudados cervicales y uretrales en pacientes en consulta por infertilidad y en pacientes fértiles de nuestra región. Analizar la prevalencia de estas infecciones.
2. Caracterizar el perfil de respuesta inmune en semen y en lavado vaginal de pacientes infértiles/fértiles con y sin infecciones.
3. Analizar la presencia de anticuerpos antiespermáticos en muestras de lavado vaginal o plasma seminal de pacientes infértiles/fértiles con y sin infecciones.
4. Establecer posibles relaciones entre el perfil de respuesta inmune hallado en los pacientes con y sin infecciones genitales y la infertilidad.
5. Diseñar diferentes formulaciones basadas en ADN plasmídico/proteína para inducir inmunidad hacia PmpD de *Chlamydia trachomatis*.
6. Inmunizar ratones hembras con las diferentes formulaciones vacunales.
7. Evaluar la presencia de anticuerpos específicos en suero y en lavados vaginales.
8. Evaluar la fertilidad *in vivo* de los animales inmunizados mediante el apareo con machos de fertilidad comprobada.

# **CAPÍTULO 1**

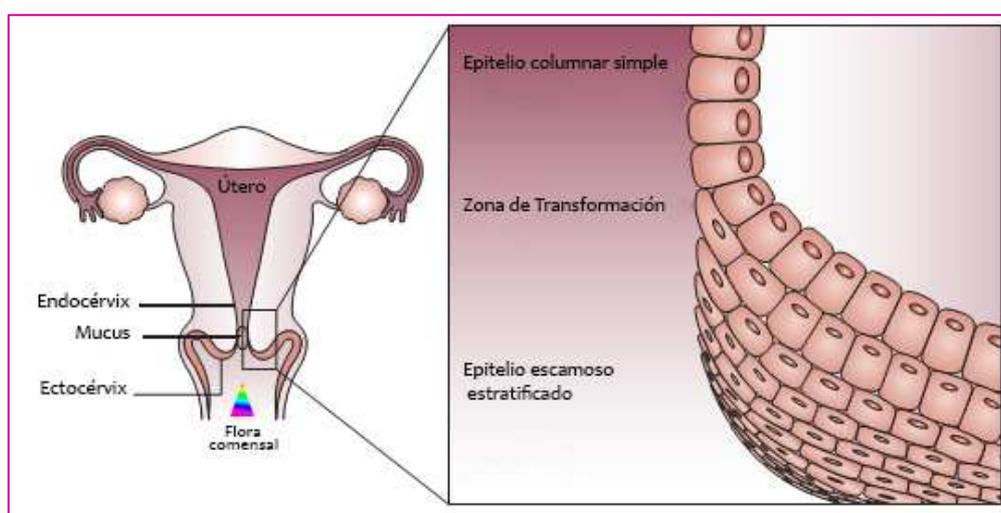
**Estudio de la respuesta inmune asociada a infecciones  
genitales en su relación con la infertilidad**

## INTRODUCCIÓN

### Tracto Reproductor Femenino

#### Estructura y morfología

El tracto reproductor femenino (TRF) en los seres humanos se compone del tracto superior, que incluye las trompas de Falopio, útero y endocervix, y del tracto inferior, compuesto por el ectocervix y el tracto vaginal (Figura 1). El tracto reproductivo superior está recubierto por una sola capa de células epiteliales columnares unidas por uniones estrechas que forman una barrera física que impide la entrada de microorganismos y antígenos presentes en el lumen [29], [30], [31]. A diferencia del tracto reproductivo superior, el revestimiento del tracto reproductivo inferior está compuesto por un epitelio escamoso estratificado que se basa principalmente en la presencia de múltiples capas de células que proporcionan una barrera protectora contra la entrada de microorganismos [29], [30]. Sin embargo, las capas superficiales de las células que componen el tracto reproductivo inferior se diferencian del resto ya que permiten la penetración de microorganismos tanto de la flora comensal como patógenos y otros mediadores [32]. La zona de transformación representa una transición abrupta entre el ectocervix y el endocervix. La susceptibilidad de estas regiones a los organismos infecciosos difiere. Por ejemplo, *Candida albicans* y *Trichomonas vaginalis* colonizan la vagina, mientras que el cuello uterino es susceptible a la infección por *C. trachomatis*, *Neisseria gonorrhoea*, y virus del papiloma humano (*Human papilloma virus*: VPH) [33]. La proliferación y diferenciación del tejido del tracto reproductivo está regulada por las hormonas reproductivas, estrógeno y progesterona. Debajo del epitelio, tanto del tracto reproductivo inferior como superior, se encuentran principalmente fibroblastos, sangre dispersa en vasos revestidos con endotelio y una variedad de células inmunes.

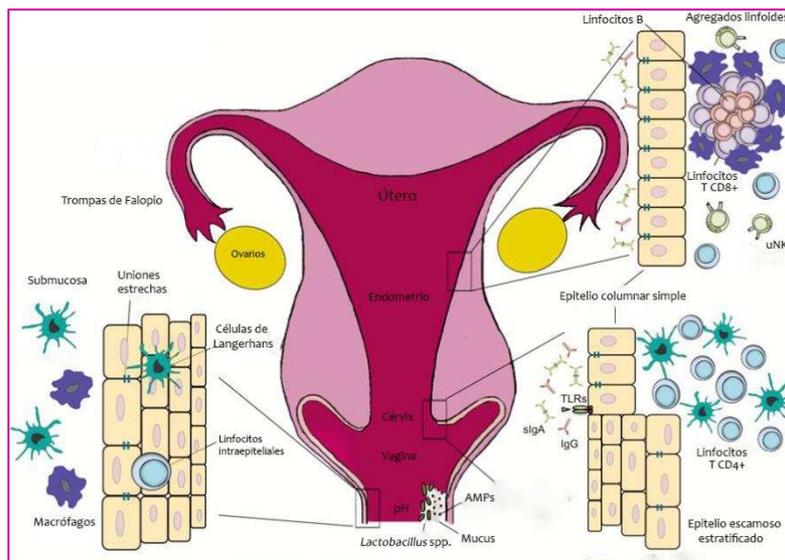


**Figura 1.** Componentes anatómicos y epitelios del tracto reproductor femenino (Figura modificada de Hladik y McElrath, 2008).

## Sistema inmune del tracto reproductor femenino

### Generalidades

El tracto reproductor además de poseer características comunes con otras superficies mucosas, tiene adaptaciones únicas en su sistema inmune que han evolucionado principalmente para proteger al feto del reconocimiento y rechazo inmunológico. Asimismo, el sistema inmunológico humano, a diferencia de muchas otras especies de mamíferos, tiene que conferir protección contra patógenos de transmisión sexual a lo largo de todo el ciclo menstrual. Esto requiere adaptaciones especiales en el sistema inmunológico del TRF, de modo que diferentes componentes de la respuesta inmunitaria, como la inmunidad humoral y mediada por células, se modulan de manera diferencial para extender la protección contra infecciones al mismo tiempo que facilitan la fertilización y la implantación del feto, si fuera necesario. Por un lado, las hormonas sexuales han demostrado ser reguladores claves de las células inmunes del TRF y juegan un papel importante en los cambios cíclicos en la inmunidad [29], [34], [35]. El sistema inmunológico de las trompas de Falopio, el útero, cérvix, y la vagina funcionan de forma independiente entre sí ante cambios en los niveles hormonales durante el ciclo menstrual. El resultado neto es una protección inmune coordinada que complementa las exigencias reproductivas de cada órgano [35], [36]. Además de las hormonas sexuales, la flora microbiana de la mucosa genital compuesta de miles de especies juega un papel esencial en la regulación del sistema inmune [37], [38]. Existen cada vez más evidencias que indican que la presencia de *Lactobacillus* spp. en el microbioma es fundamental para el desarrollo y la configuración de las respuestas inmunes innatas y adaptativas del tracto reproductor [37], [38]. En la Figura 2 se observa una imagen representativa de las distintas células y moduladores que participan de las respuestas inmunes en el TRF.



**Figura 2.** Componentes inmunológicos del Tracto Reproductor Femenino (Figura modificada de Nguyen y col., 2014).

## Células Epiteliales

Las células epiteliales uterinas y vaginales no sólo proporcionan una barrera física que evita la transmisión de ITS, también tienen capacidad para conferir protección inmune. Es por esta función clave que poseen que están siendo reconocidas como centinelas [39], [40], [41]. Particularmente, las células epiteliales tienen la capacidad de comunicación bidireccional ya que dirigen tanto la función reproductiva como la inmune para mantener un nivel de protección que distingue entre patógenos, comensales, espermatozoides alogénicos y el feto en desarrollo. Por lo tanto es muy importante que se mantenga un equilibrio dinámico en el TRF entre las células epiteliales que responden al estradiol y progesterona [42], [43], las citoquinas y factores de crecimiento producidos por células residentes (fibroblastos y células inmunes) y células migratorias (células inmunes).

Las células epiteliales uterinas y vaginales están protegidas del contacto directo con patógenos mediante una capa de moco, que además de contener inmunoglobulinas y péptidos antimicrobianos (*Antimicrobial peptides: AMP*) se compone de una familia de proteínas glicosiladas, conocidas como mucinas. La función de las mucinas es atrapar físicamente los patógenos y evitar que infecten la mucosa epitelial [44]. Otro componente importante del moco cervico-vaginal que afecta la infección por microorganismos patógenos es el pH ácido, el cual normalmente se encuentra entre 4 y 5 [45]. El microentorno ácido de la vagina se mantiene mediante la producción de ácido láctico de bacterias comensales, particularmente *Lactobacillus* spp. [46].

Las células epiteliales uterinas y vaginales confieren protección inmune a través de diversos mecanismos. Por un lado transportan IgA e IgG a las secreciones del TRF. Asimismo, expresan Receptores de Reconocimiento de Patrones (*Patterns recognition receptor: PRR*) que incluyen receptores tipo Toll (*Toll-like receptor: TLR*) y receptores tipo NOD que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (*Pathogen associated molecular patterns: PAMP*) conservados en los microorganismos [29], [32], [47]. Los PRR median la secreción de citoquinas, quimioquinas y AMP [29]. Particularmente, las células epiteliales uterinas humanas expresan desde el TLR-1 al TLR-9 por lo tanto están preparadas para responder a diversos patógenos entre ellos virus, bacterias y hongos [32], [48], [49]. Por otro lado, las células epiteliales vaginales también actúan como centinelas del sistema inmune innato, y expresan TLR-1, -2, -3, -5 y -6 [50]. Diversos trabajos demostraron que la estimulación microbiana de diversos TLR de las células epiteliales vaginales induce la expresión de interleuquinas (IL) tales como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (*Tumor necrosis factor: TNF- $\alpha$* ) y las proteínas inflamatoria de macrófagos 1  $\alpha$  y  $\beta$  (*Macrophage inflammatory protein: MIP*) [48], [50]. Las células epiteliales a través de producción de citoquinas y quimioquinas contribuyen al reclutamiento y activación de células del sistema inmune innato y adaptativo.

## **Inmunidad innata del tracto reproductor femenino**

Además de las células epiteliales, las células inmunes tales como macrófagos, células dendríticas (CD), células *Natural Killer* (NK) y neutrófilos actúan como primera línea de protección frente a ITS [34], [40].

### **CD y macrófagos**

Tanto las CD como los macrófagos son centinelas del sistema inmunológico de la mucosa y se han identificado en todo el TRF especialmente en el ecto- y endocervix [33], [40], [51]. Estas células, son presentadoras de antígenos profesionales (CPA), que constantemente inspeccionan y procesan antígenos del entorno externo proporcionando señales para la generación de respuestas inmunitarias adaptativas [52], [53].

Las CD de la mucosa son reconocidas por su habilidad única de reconocer y responder a antígenos induciendo diferentes respuestas inmunes en el huésped. Las respuestas pueden ir desde tolerogénicas hasta la inducción de inmunidad efectora específica para antígenos [54], [55]. Las CD vaginales están presentes dentro de la capa epitelial, donde principalmente residen células de Langerhans que poseen capacidad inmunoestimuladora [56], mientras que las CD uterinas se localizan en el estroma subepitelial del endometrio y tienen un fenotipo principalmente tolerogénico. Las células epiteliales uterinas secretan mediadores solubles que inducen en las CD uterinas un fenotipo semi-maduro tolerogénico que se caracteriza por disminución de la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 así como una disminución de la sensibilidad a ligandos del TLR-3 y TLR-4 [32], [57]. Al igual que en otros tejidos, en condiciones de daño tisular, inflamación o por el ingreso de un patógeno, las CD cambian su fenotipo y función, convirtiéndose en CD maduras que presentan un aumento de moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (*Major histocompatibility complex: MHC*) y moléculas coestimuladoras. Asimismo, tienen la capacidad de migrar hacia los ganglios linfáticos drenantes, donde presentan los antígenos a los linfocitos T *helper* (LTh) o colaboradores, que luego se diferenciarán a LT efectores específicos de distintos perfiles: Th1, Th2, Th17, Treguladores (Treg) [55], [58], [59].

Los macrófagos representan aproximadamente el 10% de los leucocitos presentes en el TRF, mayormente se encuentran en el estroma endometrial y en el tejido conjuntivo miometrial [40]. En contraste con las CD que expresan niveles constitutivamente altos de moléculas del MHC II, los monocitos y macrófagos regularmente expresan niveles muy bajos de MHC II [56]. Se han encontrado distintos subconjuntos de macrófagos en tejidos vaginales y cervicales del tracto genitourinario de humanos [33], [60], [61], particularmente poblaciones de macrófagos M1 y M2 [62]. En respuesta a infecciones bacterianas o virales, los macrófagos que adquieren un fenotipo de activación clásico, llamado M1 por analogía con la nomenclatura de LTh, se caracterizan por la

producción de citoquinas proinflamatorias y diversos metabolitos que sostienen la inflamación y fagocitan a los microbios invasores. En contraste, estímulos tales como IL-4 e IL-13, junto con señales del tejido residente, llevan a los macrófagos a adquirir una activación 'alternativa' o estado M2, que está involucrado en la remodelación de tejidos [63], [64]. Aunque la polarización M1 – M2 ha sido demostrado *in vivo*, esta clasificación sólo debe considerarse una representación esquemática de un espectro de fenotipos intermedios inducidos por los efectos combinatorios de los estímulos y otros tipos de células presentes en el microambiente [65]. En el TRF superior, los macrófagos cambian en número, distribución y función según las fases del ciclo estral y fluctuaciones en los niveles de estrógenos. Los macrófagos con actividades similares a M2, de tipo reguladores, son más abundantes durante la fase preovulatoria, mientras que los macrófagos inflamatorios aumentan bruscamente al final del ciclo ovárico en el endometrio y generalmente predominan en los tejidos durante la fase pos-ovulatoria. Más allá de funciones inmunes, los macrófagos del TRF superior modulan la producción de hormonas, ovulación, proliferación de células epiteliales y actividad secretora del endometrio, donde también regulan la producción de matriz extracelular y remodelación vascular, entre otros procesos [62]. En el TRF inferior, los macrófagos permanecen más constantes durante el ciclo menstrual y presentan principalmente, mecanismos defensivos contra la invasión de patógenos [40]. Para una mejor revisión sobre macrófagos en el TRF consultar Pepe y colaboradores, 2018 [62].

### **Células *Natural Killer* (NK)**

El número de células NK varía en el endometrio a lo largo del ciclo menstrual, alcanzando un pico de aproximadamente 70% de la población total de leucocitos en la fase de secreción [40], [66]. Sin embargo, los números de células NK en otras regiones del tracto reproductivo no se ven afectados durante el ciclo menstrual y representan el 10-30% de leucocitos en estos lugares [34], [67]. En general, el número más bajo de células NK se encuentra en las trompas de Falopio. Los mecanismos que controlan la localización específica de las células NK dentro del TRF son desconocidos y pueden reflejar las diferentes funcionalidades. Las células NK uterinas (uNK) tienen un fenotipo distinto en comparación con las encontradas en la sangre [68], [69]. Sin embargo, de manera similar a las células NK de la sangre, se ha demostrado *in vitro* que las células uNK en el endometrio de mujeres no embarazadas tienen función citolítica y producen cantidades significativas de interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (*Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor*: GM-CSF), IL-10, factor de crecimiento transformante (*Transforming growth factor*: TGF)  $\beta$ 2 e IL-8 [29], [40]. Por lo tanto, también son capaces de promover una respuesta inflamatoria, induciendo la activación de macrófagos y la generación de LT citotóxicos [29]. Particularmente, las células uNK, producen factores de crecimiento angiogénicos y factor inhibidor de leucemia (*Leukemia inhibitory factor*: LIF), los

cuales son esenciales para el desarrollo de arterias espiraladas y en general en los procesos de decidualización e implantación [32], [70]. Las células uNK requieren que la IL-15 sea producida constitutivamente por las células del estroma endometrial para sobrevivir y proliferar [51]. Para mejor revisión sobre células uNK consultar Acar y colaboradores, 2011 [70].

### **Neutrófilos**

Si bien los neutrófilos están presentes en todo el TRF, su número es mayor en las trompas de Falopio y disminuye progresivamente desde la parte superior del TRF hacia la vagina [40]. Sus niveles son relativamente constantes a través del ciclo menstrual. Sin embargo, en el endometrio hay un aumento significativo de neutrófilos en la menstruación que está precedido por un aumento de IL-8, que es un factor quimioattractante de leucocitos. La presencia de neutrófilos ayuda en la descomposición del tejido endometrial a través de la liberación de elastasa que posteriormente activa las metaloproteinasas de matriz. Este proceso de degradación y reconstrucción del tejido forma parte del ciclo menstrual normal. Por otro lado, dado que se rompe la barrera epitelial, debe aumentar la actividad inmune innata. Los neutrófilos expresan TLR 1-9 y responden a patógenos a través de la fagocitosis, producción de compuestos oxidantes y liberación de AMP. Asimismo, los neutrófilos cruzan el epitelio hacia el lumen para fagocitar espermatozoides, microorganismos y cualquier otro residuo celular. En efecto, algunos estudios han demostrado que después del coito, hay una significativa infiltración de neutrófilos en el endometrio, como parte de una respuesta inflamatoria normal [71].

### **Péptidos antimicrobianos**

Las secreciones del TRF contienen una serie de AMP los cuales previenen y/o reducen la infección al dificultar el crecimiento de microorganismos por mecanismos directos o indirectos. Los AMP son péptidos o proteínas pequeñas con propiedades antimicrobianas, secretados principalmente por neutrófilos y células epiteliales. En el TRF se detectan defensinas, lisozima, lactoferrina, inhibidores de proteasas tales como el inhibidor de proteasa leucocitaria secretora (*Secretory leukocyte protease inhibitor*: SLPI) y elafina, entre otros [32], [72]. Los AMP mejor caracterizados y más abundantes del TRF humano son las defensinas  $\alpha$  y  $\beta$ . Estas defensinas humanas tienen propiedades antivirales, antifúngicas y antibacterianas contra bacterias gram-negativas y gram-positivas [40]. Asimismo, la lisozima y la lactoferrina ejercen efectos antibacterianos y antivirales [40], [72]. La lisozima actúa principalmente a través de la digestión enzimática de paredes de las células bacterianas mientras que la lactoferrina actúa secuestrando el hierro del ambiente ácido requerido por algunos patógenos. Por otro lado, los inhibidores de proteasas también son producidos por macrófagos y CD, los cuales además de tener propiedades antibacterianas y antifúngicas [73] funcionan como factores anti-inflamatorios al inhibir las

proteasas secretadas por las células inmunitarias como los neutrófilos, que pueden desencadenar la activación del sistema del complemento y secreción de otros mediadores inflamatorios que pueden causar daño tisular e inflamación severa [74]. Si bien el espectro de los AMP es amplio, no inhiben la colonización de bacterias comensales protectoras en condiciones normales del TRF. Para una mejor revisión sobre AMP en el TRF consultar Yarbrough y colaboradores, 2015 [75].

### **Citoquinas y quimioquinas**

La secreción de citoquinas y quimioquinas conduce a una comunicación rápida entre las diferentes células presentes en el TRF. En general, estos mediadores son reguladores de la integridad de la barrera de las células epiteliales vaginales y uterinas teniendo un rol importante en la fisiología del TRF. Asimismo, estas moléculas median una respuesta inmune innata y adaptativa que interfiere directamente con la patogénesis microbiana, algunas veces produciendo una respuesta que elimina al patógeno y otras veces creando un ambiente hostil para su supervivencia.

### **Inmunidad adaptativa**

#### **Linfocitos T**

En la inmunidad adaptativa participan los linfocitos T (LT) efectores citotóxicos CD8+ y LTh CD4+ los cuales pueden generar diferentes perfiles de respuestas, entre ellas Th1, Th2, Th17 y Treg. En la actualidad, el papel de los LT en la biología reproductiva es de importancia fundamental, sin embargo aún no está completamente entendido [76]. En general, se considera que la acción de los linfocitos Treg es fundamental para el éxito de la concepción y del desarrollo fetal [77]. La diferenciación de LT CD4+ a Treg está asociada a la generación de un ambiente tolerogénico e inmunosupresión mediante la liberación de IL-10, TGF- $\beta$  e IL-35 y se caracteriza por la expresión del factor de transcripción FOXP3 [78]. Si bien se ha demostrado que la participación de los linfocitos Th2 no es imprescindible para el mantenimiento de la preñez [79], la presencia de las citoquinas IL-4 e IL-5 resulta favorable. Los LT diferenciados hacia este perfil pueden ser identificados por la expresión del factor de transcripción GATA3. Por otra parte, la diferenciación hacia perfiles Th1 y Th17 se relacionan con fallas en la implantación y pérdidas fetales [80]. La subpoblación de linfocitos Th1 se caracteriza por la producción de IFN- $\gamma$  junto con la expresión del factor de transcripción Tbet. Los linfocitos Th17 secretan principalmente IL-17 e IL-22, y el factor de transcripción que los caracteriza es ROR $\gamma$ t [78]. Asimismo, la presencia de mediadores de inflamación, como IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-8, resultaría perjudicial en la generación del microambiente uterino de tolerancia, necesario para el progreso de la preñez [80].

En el TRF, los LT se encuentran principalmente en el estroma de la vagina, debajo del epitelio del cuello uterino, en el útero, y también se dispersan entre las células epiteliales, estos últimos se conocen como linfocitos intraepiteliales [81]. Un estudio indicó que los LT (CD4+ y/o

CD8+) constituyen aproximadamente el 6 al 20% del número total de células dentro del TRF [82]. En el TRF, los LT CD8+ (35-50%) predominan sobre los LT CD4+ (25%) [67], [83]. Yeaman y colaboradores mostraron que el endometrio uterino contiene agregados linfoides organizados que se encuentran en la capa del estrato basal (Figura 2) [84], los cuales son anatómicamente y funcionalmente distintos a las placas de Peyer presentes en la mucosa intestinal [85]. Los agregados linfoides uterinos son estructuras conformadas por un núcleo de linfocitos B (LB) que está rodeado por LT CD8+ y más externamente, por macrófagos [84], [86], [87]. No está claro si los LT CD8+ que conforman los agregados linfoides tienen un rol citotóxico [32]. Algunos estudios demostraron que los LT del TRF tienen funciones citolíticas [88], sin embargo, el desarrollo de agregados linfoides sugiere un papel en la supresión de la inmunidad mediada por células que se produce en el útero durante la fase secretora del ciclo, cuando es más probable que ocurra la ovulación y la implantación [88]. El estradiol y la progesterona regulan la formación y el tamaño de los agregados linfoides uterinos, por lo tanto si bien pueden encontrarse a lo largo del ciclo menstrual, un menor número se encuentra durante la etapa proliferativa y un mayor número durante la fase secretora [84], [87]. El tracto reproductivo inferior, aunque carece de agregados linfoides, contiene un espectro de LT ubicados tanto dentro de la submucosa como en el revestimiento epitelial (Figura 2).

En un estudio realizado por Pudney y colaboradores se examinaron las proporciones y la localización de las poblaciones de LT en el cuello uterino y la vagina de mujeres no embarazadas [33]. Estos autores mostraron que los LT son más prevalentes en la zona de transformación cervical que en tejido vaginal. Particularmente, en la zona de transformación fueron detectados acúmulos de LT CD4+ y LT CD8+ citotóxicos, los cuales funcionan como una barrera inmunológica dinámica frente a patógenos ascendentes al tracto genital superior. En el tracto genital inferior la mayoría de los LT fueron localizados en la interfaz estroma/epitelio. Sin embargo, un número significativo de LT CD8+ se encontraron intercalados en el epitelio escamoso vaginal y ectocervical (linfocitos intraepiteliales). Asimismo, estos autores indicaron que los LT presentes tanto en el epitelio como en la lámina propia poseen predominantemente un fenotipo de memoria. Estos autores indicaron que los LT CD8+ de la vagina en condiciones normales no pueden ser capaces de realizar funciones citolíticas; por lo que sugieren que estos LT representan una población de células reguladoras como las que también han sido descritas en la mucosa intestinal [89], [90]. Curiosamente, en condiciones de inflamación estos autores detectaron un mayor número de LT intraepiteliales CD4+ lo que sugiere que estos LT median la defensa inmunitaria celular. En este estudio, no observaron cambios en las poblaciones de LT que se correlacionen con el ciclo menstrual.

En el momento de la fertilización, el sistema inmunológico en todo el TRF optimiza las condiciones para la implantación y el embarazo. En el útero humano, durante la fase proliferativa del ciclo menstrual que conduce a la ovulación (en la cual predomina el estradiol), se produce la

expansión de los linfocitos Treg FOXP3+ [91]. Esto coincide con una disminución en la actividad citolítica de los LT CD8+ uterinos después de la ovulación [88]. Asimismo, un subconjunto único de linfocitos intraepiteliales, designado por un fenotipo de LT  $\gamma\delta$ , está presente en el útero y suprime las respuestas inmunes antifetales maternas a través del TRF [92]. Asimismo, estudios recientes han demostrado que los linfocitos Treg y Th17 pueden estar presentes en el TRF. En general, la presencia de estas células se ha observado después de la exposición a condiciones inmunorreguladoras o inflamatorias, respectivamente [93], [94]. Por ejemplo, se descubrió que los linfocitos Treg constituyen una fuente rica de TGF- $\beta$  [94] tanto en modelos experimentales de ratones como en humanos. Esta población sería estimulada por la exposición al plasma seminal contribuyendo a la tolerancia hacia antígenos paternos [95]. En presencia de citoquinas proinflamatorias como la IL-6, los linfocitos Treg se diferencian a linfocitos Th17 que participan en la inflamación. También se ha demostrado que los linfocitos Th17 regulan la migración de neutrófilos en las infecciones por *C. trachomatis* y se cree que desempeñan un papel en el aborto espontáneo tardío [96], [97]. De manera similar, varios estudios han descrito un aumento en el número y la distribución de los linfocitos Th17 después de una infección del tracto genital, también en otras infecciones, como las producidas por *Neisseria gonorrhoeae* y el Virus de inmunodeficiencia humana (*Human immunodeficiency virus*: HIV) [93].

La regulación de las respuestas inmunitarias Th1, Th2, Th17 y Treg depende del entorno de citoquinas liberadas durante la respuesta inmune innata frente a la estimulación con los antígenos. Asimismo, varios estudios en animales han demostrado que la generación de respuestas inmunitarias adaptativas humorales y celulares frente a la vacunación o a la infección, está influenciada por la etapa del ciclo reproductivo, es decir por hormonas sexuales [98], [99]. Los mecanismos a través de los cuales las respuestas adaptativas se equilibran para inducir protección y memoria específicas contra un patógeno mientras se logra un embarazo aún no se han dilucidado por completo.

## **Linfocitos B**

La investigación en inmunología reproductiva se ha centrado durante mucho tiempo en las respuestas de los LT en la tolerancia a los antígenos paternos y en mecanismos de tolerancia fetal. La participación de los LB en inmunología reproductiva todavía está siendo investigada. Un trabajo publicado en el año 2014 por Fettke y colaboradores propone, por un lado, que los LB contribuyen a la tolerancia al embarazo al secretar la citoquina inmunomoduladora IL-10, pero por otro, que los LB pueden perjudicar seriamente el embarazo por su capacidad de producir autoanticuerpos [100].

En cuanto a los LB protectores recientemente fue descrito un subconjunto de linfocitos B2, denominados reguladores en humanos y B10, en ratones [100]. Esta población inhibe respuestas inflamatorias excesivas que contribuyen al desarrollo de enfermedades autoinmunes.

Surgen nuevas evidencias en modelos de ratones que sugieren que los linfocitos B10 producen IL-10 y ayudan a mantener la tolerancia hacia los antígenos fetales semi-alogénicos. Asimismo, estas células pueden ser importantes para combatir las señales de peligro en la interfaz materno-fetal en el caso de infecciones con el objetivo de restablecer la tolerancia fetal alterada. Los LB productores de IL-10 aumentan al inicio del embarazo, pero no en el caso de abortos [100]. IL-10 tiene un rol importante en la protección del embarazo frente a los efectos adversos del estrés inflamatorio durante la gestación. Particularmente, se sabe que en condiciones de autoinmunidad IL-10 inhibe la síntesis de citoquinas proinflamatorias, específicamente TNF- $\alpha$  a partir de monocitos y macrófagos [101]. Asimismo, se demostró *in vitro* que los linfocitos B10 son capaces de suprimir la producción de TNF- $\alpha$  por parte de los LT de en mujeres embarazadas.

Por otro lado, los LB también pueden ser perjudiciales para el embarazo. El comportamiento aberrante de LB está asociado con patologías obstétricas. En particular, la capacidad de los linfocitos B2 para producir autoanticuerpos específicos o de los linfocitos B1 para generar anticuerpos naturales polirreactivos que pueden reconocer moléculas propias, como por ejemplo anticuerpos contra la hormona folículo estimulante [102].

### **Inmunidad Humoral**

La inmunidad humoral se caracteriza por la producción de anticuerpos que se unen tanto a antígenos libres como asociados a las células, lo que inhibe la entrada a las células y/o neutraliza la actividad de un patógeno. La unión de anticuerpos media la eliminación de los patógenos a través de la posterior fagocitosis por macrófagos o por activación del sistema complemento. Los LT CD4+ desempeñan un papel en la inmunidad humoral al conducir la maduración de los LB a células plasmáticas secretoras de anticuerpos [103]. Las inmunoglobulinas IgG e IgA secretora (IgAs) se expresan en las secreciones genitales. Los LB que conforman el centro de los agregados linfoides del endometrio uterino expresan principalmente CD5, un marcador que normalmente se asocia con los linfocitos B1 [85]. Sin embargo, se han identificado células plasmáticas productoras de IgA residentes en el TRF, especialmente en el cuello uterino [42]. Si bien una serie de publicaciones han sugerido que en el TRF hay sitios efectores, es necesario seguir investigando sobre la capacidad del TRF para inducir una respuesta inmune humoral local [32]. Por otro lado, diversos estudios demostraron que el endocervix contiene la mayor cantidad de células plasmáticas productoras de anticuerpos IgG e IgA en comparación con el ectocervix, vagina y trompas de Falopio [104], [105], [106], [107]. Respecto a las proporciones de inmunoglobulinas encontradas en el moco cervical y líquido de lavado cervicovaginal, indican que los niveles de IgG son dos a seis veces más altos que los de IgA. En contraste, las secreciones endocervicales tienen mayores niveles de IgA que de IgG [108]. El transporte de IgA e IgG desde el tejido al lumen del TRF depende de la expresión de proteínas transportadoras presentes en el epitelio genital tales como el

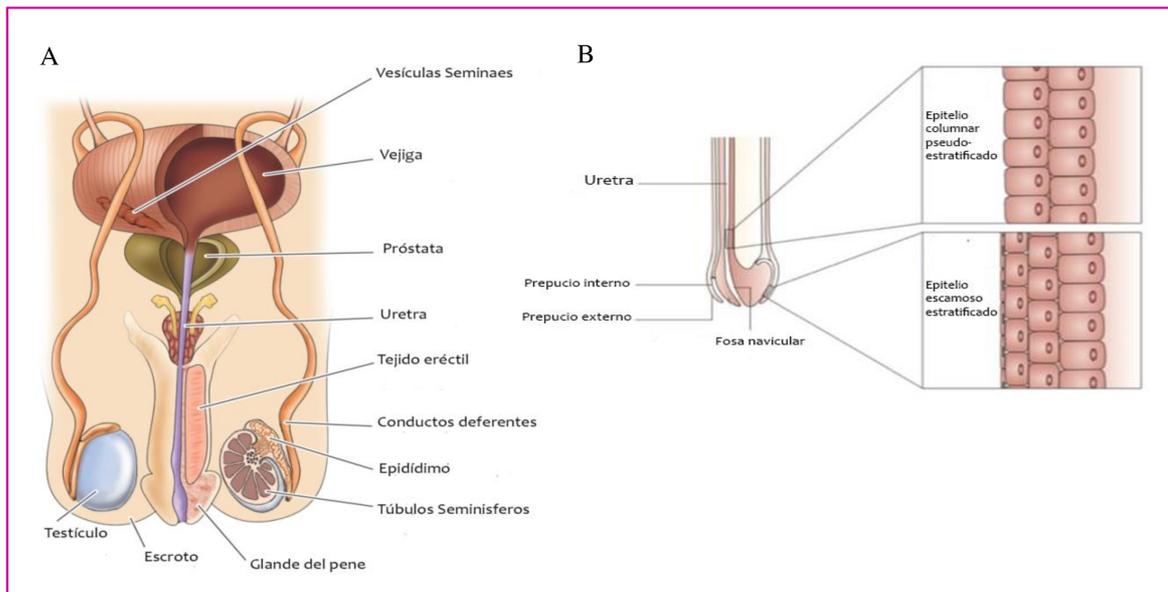
receptor de inmunoglobulina polimérica (*polimeric immunoglobulin receptor*: pIgR), para el transporte de IgA y el receptor neonatal de Fc (*neonatal Fc receptor*: FcRn), para el transporte de IgG. Los niveles de pIgR, varían con la etapa del ciclo menstrual, es decir que estaría regulado por hormonas sexuales [109], [110].

## **Tracto reproductor masculino**

### **Estructura y morfología**

El tracto reproductivo masculino (TRM) básicamente comprende los testículos, donde ocurre el proceso de producción de gametos (espermatogénesis) y donde se produce testosterona; el epidídimo, un sistema de conductos excurrentes para el transporte, la maduración y el almacenamiento de los espermatozoides; los órganos glandulares accesorios que producen el fluido seminal y secretan una serie de compuestos que integran la eyaculación final; y el pene, en cuyo interior atraviesa la uretra, la cual proporciona el pasaje de orina y semen (Figura 3A).

Análogo al TRF superior e inferior, la mucosa uretral está formada por diferentes microambientes que se componen de diversos epitelios. La abertura uretral es similar en morfología a la zona de transformación del TRF, donde el epitelio escamoso estratificado queratinizado se transforma abruptamente en epitelio escamoso estratificado no queratinizado en la fosa navicular (Figura 3B). Posteriormente, a medida que el epitelio escamoso estratificado no queratinizado entra en el eje del pene, pasa a epitelio columnar glandular pseudoestratificado, que recubre la longitud de la uretra [111]. Dentro del epitelio de la uretra, las invaginaciones profundas, conocidas como glándulas de Littre, son las responsables de la secreción de líquido viscoso, como el pre-eyaculado, que sirve como lubricante durante las relaciones sexuales y ayuda a neutralizar la orina residual en la uretra [111].



**Figura 3.** A) Componentes anatómicos del tracto reproductor masculino (Figura modificada de Chapter 22.2 Human Reproduction open class Male Genital Tract) B) Epitelios del pene (Figura modificada de Hladik y McElrath, 2008).

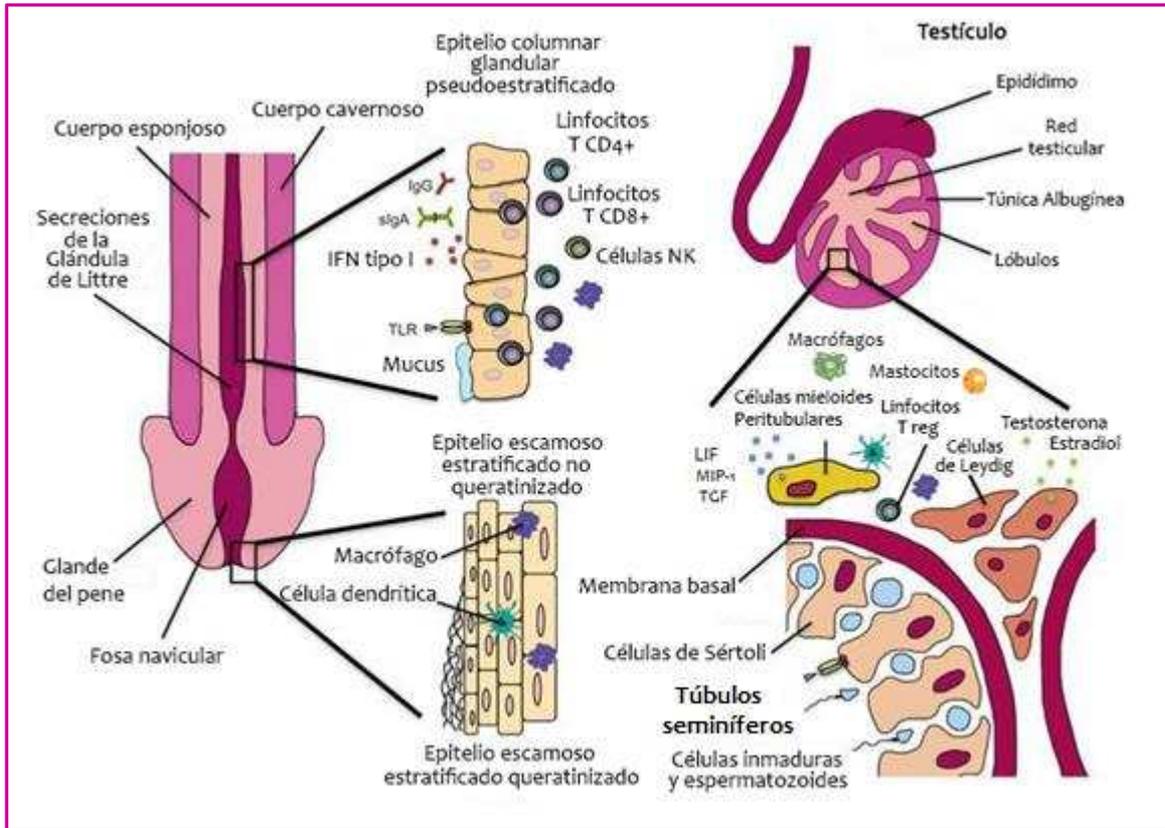
## Testículos

La estructura de los testículos humanos es altamente organizada y compleja. Los mismos se encuentran dentro del escroto fuera de la cavidad abdominal. Tienen una cápsula que los recubren de tejido conjuntivo llamada túnica albugínea. A lo largo de la superficie posterior del testículo, la túnica albugínea se protrusiona para formar el mediastino testicular. Cada testículo está dividido en alrededor de 250 lobulillos por tabiques incompletos de tejido conjuntivo. Dentro de los lobulillos se visualizan de 1 a 4 túbulos convolutos, denominados túbulos seminíferos. Cada túbulo seminífero continúa cerca del mediastino en un túbulo de menor diámetro o túbulo recto, que finaliza en la red testicular y se encuentra rodeado por tejido mioide peritubular [112]. El testículo tiene dos funciones principales, la generación de espermatozoides (espermatogénesis), que se produce en los túbulos seminíferos, y la producción de las hormonas esteroideas sexuales, principalmente la testosterona (esteroidogénesis) [113], [114], [115].

Los túbulos seminíferos están conformados por células de Sertoli (CS) que rodean las células madres y los distintos estadios de las células espermatogénicas (Figura 4) [116], [117]. Además de proporcionar nutrientes esenciales y factores de crecimiento, las CS juegan un papel importante en mediar los cambios morfológicos del espermatozoide durante la espermatogénesis [118]. Asimismo, diversos estudios demostraron que las CS tienen capacidades inmunosupresoras [119]. En el compartimento intersticial entre los túbulos seminíferos predomina una población de células denominadas células de Leydig. Éstas son las responsables de la síntesis de testosterona y pequeñas cantidades de estradiol bajo el estímulo de la hormona luteinizante secretada por la

glándula pituitaria [114]. Asimismo, varios estudios han demostrado que las células de Leydig regulan la expansión de los macrófagos y linfocitos testiculares en los testículos de rata; sin embargo, estas células han mostrado débiles respuestas en humanos [120], [121]. Por otro lado, las células mioideas peritubulares (PMC) rodean los túbulos seminíferos proporcionando un soporte para la integridad de los túbulos [114] y permiten el movimiento contráctil necesario para facilitar la movilidad y la maduración de los espermatozoides hacia el epidídimo. Las PMC pueden regular indirectamente la espermatogénesis y el desarrollo testicular mediante la secreción de factores tales como el TGF- $\beta$ 2, MIP-1 y LIF [122]. Asimismo, estas células expresan los receptores 1 y 2 de TNF- $\alpha$ , que median la expresión de otros tipos de moléculas inflamatorias tales como IL-6 y ciclooxigenasa 2 (COX-2) [123].

La expresión de citoquinas pro y antiinflamatorias en las CS, células de Leydig y PMC está regulada por los andrógenos. Particularmente, altas concentraciones de testosterona tienen funciones inmunosupresoras que permiten el mantenimiento del inmunoprivilegio testicular. Los espermatozoides se producen desde la pubertad, mucho después del establecimiento de la tolerancia a los autoantígenos. Sin embargo, la mayoría de los hombres, no producen anticuerpos contra sus propios gametos. El desarrollo de los mecanismos para prevenir o limitar las respuestas autoinmunes a los espermatozoides es esencial para preservar la capacidad reproductiva. Los testículos, representan un ambiente inmunológico único ya que constituyen un sitio inmunoprivilegiado. Anteriormente, se creía que el privilegio inmunitario de los testículos era principalmente una consecuencia del secuestro de antígenos por el sistema inmunitario sistémico el cual estaba mediado por las uniones estrechas entre CS adyacentes (barrera hemato-testicular) en el epitelio de los tubulos seminíferos [124]. Sin embargo, los mecanismos inmunitarios han evolucionado para suprimir activamente la respuesta autoinmune a los espermatozoides dentro del tracto genital. Actualmente, se propone que la combinación entre la estructura física de los testículos (entre ellas la barrera hemato-testicular), factores fisiológicos (andrógenos) e inmunológicos (citoquinas antiinflamatorias, macrófagos, CD, mastocitos y linfocitos) son necesarios para el establecimiento y mantenimiento de la inmunotolerancia en el testículo [125].



**Figura 4.** Componentes anatómicos e inmunológicos del tracto reproductor masculino (Figura modificada de Nguyen y col., 2014).

## Sistema inmune del tracto reproductor masculino

### Generalidades

Comparado con el TRF, existe menos información disponible sobre la respuesta inmune en el TRM en el estado de homeostasis o después de una infección por algún patógeno. Esto en parte podría explicarse debido a las limitaciones en las técnicas de muestreo y la disponibilidad de muestras [111], [126].

### Inmunidad innata

#### Receptores de reconocimiento de patrones

En el TRM, similar a lo que ocurre en TRF, existen células que presentan PRR, como los TLR, que se unen a los PAMP y activan genes de respuesta asociados con la inmunidad innata.

Estudios recientes han sugerido que los TLR no sólo están involucrados en la enfermedad y la inflamación, sino que también juegan un papel importante en la fisiología de la reproducción [113], [124], [127]. Un estudio previo realizado por Pudney y Anderson detalló que las células epiteliales e inmunes de la red testicular, vasos deferentes, tejido del prepucio y los macrófagos de los conductos eferentes y epidídimos, no presentan expresión de TLR [111]. Sólo el TLR-1, que

reconoce las lipoproteínas bacterianas, está presente en las células inmunes, en el testículo, conductos eferentes, epidídimo y vesículas seminales. Las células epiteliales en la próstata y la uretra también expresan TLR-3 y TLR-8 o TLR-9, respectivamente [111], [124], [128].

## **Moco**

Como parte de la barrera biológica, el moco sirve como una de las primeras líneas de defensa inmune mediante la captura y eliminación de patógenos antes de que puedan alcanzar la superficie epitelial. Estudios previos han demostrado que las mucinas se expresan asociadas a la membrana en la superficie apical de células epiteliales en todo el TRM [129]. Las mucinas no sólo proporcionan una barrera física y lubricada sino también sirven como transductores de señal a través de sus regiones yuxtamembrana [130].

## **Péptidos antimicrobianos**

Los AMP se expresan de forma constitutiva en las células de la mucosa epitelial, que incluyen CD, macrófagos, neutrófilos, células NK y células epiteliales [131]. Como se nombró anteriormente, los AMP desempeñan un papel importante en la inhibición de la infección por bacterias, hongos y virus tanto en el TRF como en el TRM [130]. Las defensinas, son expresadas principalmente por las células epiteliales uretrales y neutrófilos en respuesta a ITS, entre ellas *C. trachomatis* [111], [131], [132]. Otros AMP también han sido detectados en el TRM, como la expresión de lisozima en las glándulas de Littre, células intraepiteliales, epidídimo, próstata, testículo y líquido seminal [133]. Asimismo, la proteína SLPI, se expresa abundantemente en plasma seminal, células epiteliales y lámina propia de la próstata, vesículas seminales, epidídimo, así como en el epitelio columnar de la mucosa uretral [134], [135]. De manera similar, las células epiteliales columnares de la uretra expresan constantemente lactoferrina, una proteína que se encuentra comúnmente en el semen.

Además de producir AMP, algunas células del TRM secretan interferones tipo 1 (IFN- $\alpha$  y - $\beta$ ), que tienen efectos inmunomoduladores y antivirales [136], [137]. Las células productoras de IFN se observan comúnmente en la lámina propia y ocasionalmente se observan en la capa epitelial del tracto uretral [111].

## **Células de la inmunidad innata**

### **Macrófagos**

Si bien hay muchos tipos de células inmunes en la uretra y los testículos, los macrófagos son las células que predominan comúnmente en el espacio intersticial entre los túbulos seminíferos [124], [138]. Diversos estudios han identificado al menos dos subconjuntos de macrófagos en los testículos. Los macrófagos testiculares presentan propiedades inmunosupresoras y tienen una

capacidad reducida de producir factores inflamatorios comparados con macrófagos en otros tejidos [139], [140]. Los macrófagos residentes representan aproximadamente el 80% de los macrófagos testiculares, los cuales se clasifican por la expresión superficial de CD63 y son positivos para ED2 [124], [141]. Por el contrario, los macrófagos positivos para ED1 son reclutados a los testículos de la circulación como monocitos [124] y no expresan CD63. Los macrófagos ED1+ y ED2+ tienen diferencias en su capacidad para iniciar respuestas inflamatorias. Un estudio de Gerdspratt y colaboradores, mostró que los macrófagos ED2+ carecen de la capacidad de inducir citoquinas inflamatorias en respuesta al desafío con lipopolisacáridos en ratas [142]. Otros estudios han demostrado que el equilibrio entre estos dos tipos de macrófagos puede romperse en casos de infección [141]. Los macrófagos ED1+ son reclutados a los testículos durante inflamación aguda y crónica; sin embargo, la afluencia de estos macrófagos sólo dura un par de días en casos agudos [142]. En contraste, los macrófagos ED1+ migran hacia el testículo durante una inflamación crónica, participando mediante la liberación de citoquinas proinflamatorias, con el potencial de superar el privilegio inmune y montar una respuesta innata en defensa a los patógenos [141], [142]. Para una mejor revisión de macrófagos testiculares consultar Bhushan y Meinhardt, 2017 [143].

### **Células Dendríticas**

Las CD representan una pequeña población celular dentro de los testículos y comprenden aproximadamente el 10% del tamaño de la población de macrófagos [144]. Estudios *in vivo*, muestran que las CD presentes en el testículo son tolerogénicas, las cuales inducen en linfocitos Treg la liberación de IL-10 [141]. En condiciones de inflamación testicular el número de CD aumenta en gran medida, y predomina un fenotipo de CD maduras, sugiriendo que las CD pueden desempeñar un papel en la desregulación inmune de los testículos [145], [146].

### **Mastocitos**

Los mastocitos se encuentran principalmente en el espacio intersticial entre los túbulos seminíferos regulando la esteroidogénesis mediante las células de Leydig [147]. Un aumento en el número de mastocitos en el TRM se ha asociado con infertilidad en hombres. Además de liberar triptasa para promover la proliferación de los fibroblastos y el colágeno, los mastocitos regulan de forma positiva MIP-1, la proteína quimioattractante de monocitos y, por lo tanto, reclutan macrófagos en los testículos [148].

Por otro lado, algunos trabajos han informado la presencia de células NK en la mucosa de la uretra, sin embargo, su rol en TRM no es claro [149].

## **Inmunidad Adaptativa**

### **Linfocitos T**

Los LT son abundantes en todas las regiones de la uretra y representan aproximadamente el 15% de las células inmunes testiculares en ratas adultas [120], [149]. Ambas subpoblaciones de LT, CD8+ y CD4+, están presentes en el epitelio y lámina propia de la uretra, sin embargo, los LT CD8+ son más abundantes al igual que en los testículos [120], [111], [149]. Asimismo, linfocitos Treg se encuentran dentro del intersticio testicular en condiciones fisiológicas, los cuales pueden ser responsables de las características inmunosupresoras de los testículos. Por otro lado, una pequeña población de LT naïve se encontró en la uretra, principalmente en la lámina propia [111], [113], [120]. La mayoría de los LT del epitelio y de la lámina propia son células de memoria y expresan la integrina  $\alpha 4\beta 7$ , la cual es un receptor de localización en la mucosa [111], [120], [149].

Sobre la base de estudios recientes, está claro que el TRM es un sitio inmunológicamente competente capaz de generar respuestas inmunológicas tanto celulares como humorales [32].

### **Linfocitos B e inmunidad humoral**

La uretra del pene, especialmente la lámina propia, contiene numerosas células plasmáticas productoras de IgA [111]. Las células plasmáticas positivas para IgM también están presentes y su expresión se correlacionó con la de las células positivas para IgA. Sin embargo, en la uretra hay más células plasmáticas productoras de IgG que productoras de IgA. La mayor parte de la población de células productoras de IgG parece derivar de sangre, mientras que la población de IgA se produce localmente [32].

### **Composición del semen**

El semen, además de espermatozoides, contiene altas concentraciones de ciertos factores inmunorreguladores principalmente prostaglandina E (PGE) y TGF- $\beta$  que modulan la inmunidad en el microambiente del TRF [150].

### **Prostaglandinas seminales**

Las prostaglandinas seminales, ejercen su rol como proteínas inmunorreguladoras en el TRF al inhibir la función y la expansión clonal de células NK y T CD4+ las cuales tienden a polarizar hacia un perfil Th2 [151]. Asimismo, la PGE induce tolerancia promoviendo sobre las CD un cambio en la producción de IL-12 por IL-10 [151], [152], [153]. Si bien esta propiedad inmunosupresora de la PGE, es importante para la supervivencia de los espermatozoides dentro del TRF, podría ser perjudicial en el contexto de ITS tales como el HIV, VPH o *C. trachomatis* porque desviaría las respuestas inmunes mediadas por células contra estos patógenos.

## **TGF- $\beta$**

Esta potente citoquina inmunorreguladora media la tolerancia hacia los antígenos masculinos en el TRF. Su concentración en el semen es una de las más altas medidas en fluidos biológicos [114], [154], [155]. La próstata ha sido identificada como la principal fuente de TGF- $\beta$  en los hombres, mientras que la vesícula seminal es la principal fuente en ratones [154]. Cuando el TGF- $\beta$  presente en el semen se deposita en el TRF, lo activa provocando una respuesta inflamatoria transitoria que conduce a la activación y el reclutamiento de neutrófilos, macrófagos y CD, culminando en la inducción de un fenotipo tolerogénico de estas células en la mucosa genital del tracto femenino [154], [155]. Asimismo, otros estudios han observado que TGF- $\beta$  seminal aumenta la expresión y producción de citoquinas que favorecen la tolerancia fetal a partir de células epiteliales del TRF [94], [154], [156], [157].

Además de TGF- $\beta$  una amplia gama de citoquinas, factores de crecimiento, leucocitos y varios isotipos de inmunoglobulinas se han detectado en semen. Se ha documentado la presencia de IgG, IgA e IgM, sin embargo, sus respectivos niveles y propiedades moleculares varían según los estudios, posiblemente debido a los diferentes protocolos de recolección y ensayos de detección utilizados. La mayoría de los estudios han demostrado que IgG, en lugar de IgA, es la inmunoglobulina más abundante presente en el semen de hombres sanos [126], [158]. Asimismo, se ha detectado IgA secretora, polimérica y monomérica en semen [126].

*Esta revisión muestra que los tractos genitales femenino y masculino son sitios complejos conformados por células del tejido estructural, células inmunes residentes y sistémicas que interactúan en un microambiente regulado por hormonas femeninas y masculinas, respectivamente. Debido a las diversas demandas fisiológicas de los tractos genitales, el sistema inmunológico está altamente compartimentado y ha desarrollado adaptaciones únicas.*

*En el TRF, las células de la inmunidad innata, adaptativa y factores solubles poseen plasticidad y redundancia y muchas de ellas tienen características particulares respecto a las células del sistema inmune sistémico, ya que están finamente reguladas bajo la influencia de células epiteliales del tracto reproductor, hormonas sexuales, factores de crecimiento y organismos comensales. En conjunto, todos estos actores orquestan un ambiente inmunológico que pretende ser capaz de proteger al tracto reproductivo femenino contra posibles patógenos y/o de favorecer la implantación y el embarazo.*

*En el TRM, las células inmunes residentes en testículo también poseen características particulares respecto a las células del sistema inmune sistémico. La regulación de estas células tiene como objetivo mantener un ambiente tolerogénico propicio para que pueda desarrollarse la espermatogénesis. Asimismo, otra de las funciones principales de todas las células que conforman*

*el TRM es aportar al semen mediadores particulares que contribuyen a proteger al espermatozoide y generar el ambiente adecuado en el TRF que favorezca la preservación de la gameta masculina y la fecundación.*

### **Infertilidad Inmunológica**

Los sistemas inmunes de los tractos reproductivos tanto femenino como masculino juegan un rol principal en el establecimiento y mantenimiento del embarazo. Es necesario mejorar el conocimiento en esta área para optimizar el diagnóstico y el tratamiento de pacientes infértiles [159]. Diversos factores inmunológicos podrían influir de manera positiva o negativa en la reproducción. En consecuencia, tanto el logro de la fertilización como el mantenimiento del embarazo dependen de la interacción entre los mediadores inmunes durante todo el trascurso del mismo. Agenor y colaboradores destacan el rol en la reproducción de diversos factores entre ellos: la expresión de antígenos leucocitarios humanos (*Human leukocyte antigen: HLA*), integrinas, LIF, anticuerpos antifosfolípidos, mucina-1, factores de adhesión endometrial, células uNK, anticuerpos antispermáticos (*Antisperm antibodies: ASA*) y citoquinas [160].

Los ASA se han detectado en suero, plasma seminal y secreciones vaginales de pacientes, relacionándose en algunos casos con reducción de la fertilidad. La incidencia reportada de ASA en parejas infértiles es de 9% a 55% [161]. Según diversos reportes, presentan ASA entre el 8% y el 21% de los hombres infértiles (autoanticuerpos) y entre el 6% y el 43% de mujeres infértiles (isoanticuerpos). Los anticuerpos antispermáticos pueden afectar el transporte, la movilidad y la viabilidad de los espermatozoides, la interacción entre los gametos, el desarrollo embrionario temprano, la implantación y el desarrollo fetal [162], [163], [164], [165], [166]. En particular, los ASA aglutinantes puede reducir la motilidad progresiva del espermatozoide afectando la penetración de los espermatozoides a través del moco cervical [167]. Asimismo, los ASA pueden alterar la capacitación espermática, la reacción acrosomal, la unión y la penetración del espermatozoide a la zona pelúcida del ovocito [168], [169], [170]. Otros ASA pueden actuar como opsoninas, facilitando el reconocimiento y la destrucción de la gameta por fagocitos o pueden evocar la cascada del complemento que conduce a la lisis del espermatozoide [171], [172]. Diverseas regiones y proteínas de la superficie del espermatozoide podrían estar involucradas en la inmunofertilidad, por lo tanto, existe un número sustancial de funciones espermáticas diferentes que pueden ser potencialmente afectadas por ASA.

Las citoquinas están involucradas en el desarrollo de gametos, invasión del trofoblasto, implantación, desarrollo placentario, deciduización y tolerancia inmune al embarazo entre otros procesos reproductivos [173]. La fecundación y el mantenimiento del embarazo dependen del entorno inmune, es decir si es patológico o protector, lo que sugiere un rol importante de las citoquinas en el resultado reproductivo final [174], [175], [176]. Diversos estudios actuales

describen el impacto de las citoquinas sobre la reproducción tanto en mujeres como en hombres [177], [178], [179]. Por ejemplo, algunos estudios informaron que las mujeres con mayores tasas de recurrencia de aborto espontáneo tuvieron una mayor concentración de citoquinas correspondientes al perfil Th1 mientras que las mujeres con éxito en los embarazos tenían niveles más altos de citoquinas del perfil Th2 [180], [181]. Asimismo, se ha demostrado que el desequilibrio crónico de las citoquinas con concentraciones crecientes de aquellas proinflamatorias puede conducir a desregulación inmune-endocrina e infertilidad [182], [183].

### **Infecciones de Transmisión Sexual**

Cada día más de un millón de personas contraen una ITS [184]. Más allá del efecto inmediato de la infección en sí misma, las ITS pueden tener consecuencias graves. Una de las principales causas de daño prevenibles en los sistemas reproductivos femenino y masculino son las ITS [15] que en la mayoría de los casos, son asintomáticas. Por lo tanto, el principal problema es la falta de tratamiento, lo que provoca complicaciones de profundo impacto en la salud sexual y reproductiva [185]. Asimismo, pueden afectar la salud infantil y tener efectos indirectos, ya que muchas de ellas aumentan el riesgo de contraer otras infecciones como, por ejemplo, HIV. Todas las complicaciones que traen aparejadas las ITS merman considerablemente la calidad de vida de las personas y repercuten sustancialmente en la economía de los hogares y países [184].

Las ITS son causadas por más de 30 bacterias, virus y parásitos diferentes que se propagan predominantemente por contacto sexual. Entre estos patógenos, ocho se han vinculado a la máxima incidencia de ITS. Lamentablemente, de las ocho ITS más incidentes, actualmente sólo cuatro son curables, a saber, clamidiasis, gonorrea, sífilis y tricomoniasis. Se estima que, anualmente, unos 357 millones de personas contraen alguna de estas cuatro ITS: clamidiasis (131 millones), gonorrea (78 millones), sífilis (5,6 millones) o tricomoniasis (143 millones). Las otras cuatro, hepatitis B, virus del herpes simplex, HIV y VPH, son infecciones virales incurables que, no obstante, se pueden mitigar o atenuar con tratamientos [184]. Tal como describe la OMS, las ITS afectan a personas de todo el mundo con distintas situaciones socioeconómicas. A pesar de los considerables esfuerzos realizados para identificar intervenciones simples que puedan reducir los comportamientos sexuales de riesgo, los cambios de esos comportamientos siguen suponiendo un desafío complejo.

### **Infertilidad e ITS**

Aunque existen varias causas asociadas con la infertilidad, la principal preocupación de los médicos e investigadores en medicina reproductiva son las ITS debido a que las infecciones genitales no tratadas producen daños tanto en el tracto reproductivo femenino como masculino [186]. Las infecciones genitales, particularmente las infecciones crónicas y recurrentes pueden

causar graves consecuencias a largo plazo, como la infertilidad. Aproximadamente, el 15% de todos los casos de infertilidad en las parejas se debe a infecciones del tracto urogenital [187]. La infertilidad masculina asociada con la infección del tracto genital es aproximadamente del 8% al 35% [188], [189] mientras que la infertilidad femenina es aproximadamente del 35% [190].

Teniendo en cuenta que la infertilidad relacionada con la presencia de infecciones genitales podría ser el resultado tanto de un efecto directo del agente infeccioso, como de la respuesta inmune propia del individuo resulta importante investigar esa relación. El factor inmunológico más frecuentemente involucrado en infertilidad es la presencia de ASA. Las infecciones genitales, tanto en hombres como en mujeres, han sido propuestas como inductoras de ASA. Es decir, una respuesta inmune evocada contra un microorganismo invasor genera anticuerpos que podrían producirse contra un epítotope del microorganismo que tiene similitud con algunas proteínas espermáticas, lo que conduce a la formación de ASA que pueden obstaculizar el proceso de fertilización. Por otra parte, la infección del tracto genital produciría un estado de inflamación que alteraría el ambiente tolerogénico pudiendo inducirse una respuesta inmune hacia antígenos espermáticos. Asimismo, se produciría un cambio en las poblaciones leucocitarias presentes en el tejido junto con la producción de mediadores inflamatorios, como citoquinas y quimioquinas, entre otros, que podría alterar la funcionalidad espermática, la receptividad uterina y diversos procesos reproductivos [178] [179].

Existen varios agentes infecciosos que pueden dañar las funciones biológicas de los tractos reproductivos con consecuencias devastadoras. Entre los microorganismos más comúnmente implicados en ITS que tienen un impacto en la fertilidad se destacan las infecciones bacterianas producidas por *C. trachomatis* [6], [191], [192], [193]. Las infecciones por *C. trachomatis* es una de las ITS más comunes en todo el mundo [194] que tienen un efecto significativo en la reproducción humana. Por otra parte, cabe mencionar que *M. hominis* y *U. urealyticum* son a menudo concomitantes con *C. trachomatis* y que en diversas situaciones han sido estrechamente relacionados con perturbaciones en la salud reproductiva de mujeres [195], [196], [197]. Sin embargo, sus roles patológicos son motivo de controversia ya que se ha descrito que estos microorganismos pueden formar parte de la flora normal de los tractos reproductivos [198], [199].

### ***Chlamydia trachomatis***

*C. trachomatis* es una bacteria intracelular obligada gram-negativa perteneciente al género *Chlamydia*, familia *Chlamydiaceae*. En humanos, es un agente patógeno con tropismo urogenital y conjuntival. Se han descrito diferentes cepas de *C. trachomatis* basadas en la secuenciación del genoma y las propiedades antigénicas de la proteína principal de membrana externa (*Major outer membrane protein: MOMP*) [200]. Actualmente hay más de 20 serotipos distintos de *C. trachomatis* identificados sobre la base de ensayos de tipado basados en anticuerpos monoclonales

[201], [202], [203]. Los serotipos A, B, Ba y C tienen tropismo por el epitelio ocular, causando desde conjuntivitis aguda hasta tracoma, una enfermedad ocular grave endémica en África y Asia que se caracteriza por presentarse como una conjuntivitis crónica que puede conducir a ceguera infecciosa [204], [205]. Los serotipos D, Da, E, F, G, Ga, H, I, J y K son predominantemente aislados del tracto reproductivo femenino y genitourinario masculino y están asociados principalmente con ITS, aunque ocasionalmente causan conjuntivitis o neumonía en los recién nacidos infectados durante el trabajo de parto de madres infectadas [204]. Los serotipos L1, L2, L2a y L3 son responsables de una enfermedad sistémica linfogranuloma venéreo (LGV). Estos serotipos se detectan principalmente en los ganglios linfáticos inguinales aunque el LGV también está asociado con ITS ulcerativas [205]. El genotipado de *C. trachomatis* es útil para determinar el tropismo tisular [206], [207], [208]. Varios estudios intentaron vincular directamente la gravedad de la enfermedad con serotipos de *C. trachomatis*. Sin embargo, en la actualidad, la capacidad bacteriana para ascender y colonizar el tracto reproductivo superior femenino no está claramente asociada a un serotipo específico. En la Tabla 1 se resumen los serotipos, el tropismo tisular y las manifestaciones clínicas de *C. trachomatis*.

**Tabla 1.** Serotipos de *Chlamydia trachomatis*, tropismo celular y enfermedades clínicas (Tabla modificada de Lujan y col., 2016).

<b>Cepas bacterianas y enfermedades clínicas</b>			
<b>Serotipos</b>	<b>Hospedero</b>	<b>Agudas</b>	<b>Crónicas</b>
<b>A-C</b>	Recien nacido Ambos sexos	Conjuntivitis	Tracoma
<b>D-K</b>	Recien nacido	Oftalmia neonatorum	Neumonía neonatal
	Hombres	Uretritis	Proctitis Epididimitis
	Mujeres	Uretritis Cervicitis	Cervicitis mucopurulenta Enfermedad inflamatoria pélvica Infertilidad tubárica Embarazos ectópicos
			Ruptura prematura de membranas Corioamnionitis Parto prematuro Infección puerperal Neoplasia cervical
<b>L1-L3</b>	Ambos sexos		Linfogranuloma venéreo
<b>Diferentes serotipos y polimorfismos Bacterianos</b>	Ambos sexos		Enfermedades autoinmunes Artritis reactiva Colagenopatías Síndrome de Reiter Enfermedad inflamatoria intestinal Enfermedad de Crohn

Uno de los principales problemas de las infecciones por *C. trachomatis* es el carácter asintomático, siendo una proporción significativa en mujeres (70-90%) y menor en hombres (30-50%) [209], [210]. Aproximadamente, el 10% de las infecciones por *C. trachomatis* no tratadas en mujeres progresan a enfermedad inflamatoria pélvica (EIP) [211]. Las infecciones genitales recurrentes o persistentes de *C. trachomatis* pueden causar otras complicaciones en el tracto reproductivo, como endometritis, embarazo ectópico [212], salpingitis, oclusión de trompas, cervicitis [213]. Asimismo, pueden producir consecuencias adversas en el embarazo, como parto prematuro espontáneo, aborto [214], embarazo ectópico o infecciones neonatales [200], [215]. Generalmente en los hombres, a diferencia de las mujeres, las infecciones por *C. trachomatis* suelen ser sintomáticas, menos frecuentes y más fáciles de erradicar [204]. El papel que desempeña la infección por *C. trachomatis* en la infertilidad masculina también es controvertido [216]. Algunos autores demostraron que las infecciones por *C. trachomatis* pueden provocar inflamación de la próstata [217] y del epidídimo [218], uretritis, atrofia testicular, orquitis y obstrucción ductal [219], [220] y esto estaría asociado a una calidad deficiente del semen [221]. Asimismo, otros autores proponen que dado que la infección por *C. trachomatis* es la causa principal de la uretritis e inflamación de las glándulas accesorias en los hombres, la secuela de infecciones ascendentes puede inducir un daño severo en los túbulos seminíferos, la espermatogénesis y la morfología de las células espermáticas que pueden alterar la fertilidad masculina [204]. Sin embargo, otros investigadores han demostrado que la infección por *C. trachomatis* no afectaría la calidad espermática [222].

### **Prevalencia de *Chlamydia trachomatis***

*C. trachomatis* es una de las principales causas de infecciones del tracto reproductivo en todo el mundo [200]. La OMS estima que *C. trachomatis* es responsable de 131 millones de los 357 millones de nuevos casos de ITS por año. La prevalencia de esta ITS varía según regiones del mundo, sexo, edad, entre otros factores. Para una mejor revisión consultar Newman y colaboradores, 2015 [194]. Los serotipos E y D son aislados con más frecuencia a nivel mundial [204]. Particularmente, los serotipos L1-L3 son endémicos frecuentemente aislados en países tropicales, particularmente de África, Sudeste Asiático, Latinoamérica y el Caribe [223], [224]. Sin embargo, desde 2003 se han registrado brotes en Europa, América del Norte y Australia, entre hombres que tienen sexo con hombres, con mayor riesgo en los pacientes HIV positivos [225], [226]. En Argentina no se habían registrado casos confirmados de LGV hasta el año 2017. En el año 2018, el Ministerio de Salud y Desarrollo Social de Argentina emitió una alerta epidemiológica sobre LGV [227]. En la alerta se comunica que desde septiembre de 2017 hasta el 11 de julio de 2018, se habían detectado 33 casos de infección por *C. trachomatis* pertenecientes al biovar LGV, específicamente se identificaron 20 genotipos los cuales correspondieron a los serovares L2b (13) y

L2 (7), sugiriendo al menos dos cadenas de transmisión. Estos diagnósticos fueron reportados por el Laboratorio de Clamidas de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires (28 casos) [226], [228], y el Centro Nacional de Referencia en Enfermedades de Transmisión Sexual del INEI-ANLIS (5 casos). Los casos fueron detectados en pacientes de sexo masculino de edades comprendidas entre 21 y 57 años. El 90% de los pacientes tenía diagnóstico de HIV y refirieron haber mantenido relaciones sexuales con hombres. Para más información sobre el alerta epidemiológico de Argentina remitirse a <https://www.argentina.gob.ar/salud/epidemiologia/alertas2018> [227], específicamente al archivo del 16 de agosto del 2018.

Existen pocos trabajos actuales que determinen la prevalencia de *C. trachomatis* en pacientes infértiles. Varios estudios han informado que la prevalencia de *C. trachomatis* varió de 1,7% a 17% entre mujeres europeas [229] y de 1% a 40% entre hombres asintomáticos con una larga historia de infertilidad [230]. Un estudio publicado en México [231] describió una prevalencia de 15,8% en mujeres con infertilidad. Sin embargo, las tasas más altas de prevalencia han sido reportadas en hombres asintomáticos en Túnez, África (43,3%) [232] y en mujeres infértiles de Brasil (52,8%) [233]. Un estudio realizado en Córdoba, Argentina reveló que la prevalencia de *C. trachomatis* en mujeres infértiles fue del 7,2% (48/660) y su distribución genotípica fue L1 (50%) seguido de G (25%), E (12,5%) y D (12,5%) [234].

### **Respuesta inmune producida por *Chlamydia trachomatis***

A pesar de las consecuencias que provoca la infección por *C. trachomatis* y el impacto sustancial en todo el mundo, los factores bacterianos y del huésped que causan infertilidad aún no son claros [204]. Uno de los factores del hospedador que no se comprenden completamente son los factores inmunológicos. La respuesta inmune a la infección por *C. trachomatis* es dinámica e involucra células y mediadores del sistema inmune del hospedador. Una respuesta inmune poco eficiente genera un entorno adecuado para la colonización de patógenos, mientras que una fuerte respuesta inmune podría provocar una inflamación excesiva y daño tisular [204]. Por lo tanto, comprender la respuesta inmune a la infección por *C. trachomatis* es esencial para comprender el desarrollo de la infertilidad.

El paradigma celular de la patogénesis de *C. trachomatis* afirma que la respuesta del hospedador es iniciada y sostenida por las células epiteliales que son los principales blancos de la infección de esta bacteria [235]. Estas células secretan quimioquinas, las cuales reclutan leucocitos en el sitio de la infección, luego se produce la secreción de citoquinas y diversos factores que inducen y aumentan la respuesta inflamatoria celular [236] y de esta manera se genera daño directo a los tejidos. Entre los mediadores que se liberan se pueden enumerar citoquinas tanto pro como antiinflamatorias, que incluyen IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-

12, IL-13, IL-17, IL-22 y otros factores tales como factor de crecimiento endotelial vascular (*Vascular endothelial growth factor*: VEGF), GM-CSF y lactoferrina [204]. La mayoría de estos mediadores activan respuestas inflamatorias celulares que median el daño directo a los tejidos [237], [238]. Asimismo, están involucrados en la fisiopatología de la infertilidad tubárica, defectos de nacimiento y aborto espontáneo [239]. Diferentes estudios han reportado que las citoquinas proinflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e IL-6 conducen al reclutamiento y activación de células inmunes innatas y, posteriormente, adaptativas para efectuar la resolución de la infección por *C. trachomatis*, sin embargo estas respuestas celulares conllevan a inflamaciones crónicas que inducen daño colateral del tejido del tracto genital [212], [240], [241]. Asimismo, otros autores describen que, además de TNF- $\alpha$ , las citoquinas IL-10, IL-1, IL-6, IL-4 fueron asociadas a un mayor riesgo de secuelas patológicas en infecciones urogenitales y tracoma por *C. trachomatis* [242], [243] [244]. Por otro lado, otros autores sugieren que IL-10 podría estar secretada por linfocitos Treg [245], [246], los cuales podrían ser importantes en la patogenia causada por *C. trachomatis*, ya que podrían suprimir las respuestas específicas contra *C. trachomatis* y contribuirían a la persistencia de la bacteria [212].

Varios trabajos coinciden en que la producción de IFN- $\gamma$  es crítica para inhibir el crecimiento de *Chlamydia* spp. [212] ya que afecta la supervivencia de la bacteria por varios mecanismos. Por un lado, el IFN- $\gamma$  es capaz de mejorar las capacidades fagocíticas de los macrófagos [247] y de esta manera contribuir a la eliminación del patógeno [248]. Por otro lado, IFN- $\gamma$  puede inhibir el crecimiento de *C. trachomatis* mediante la disminución de la expresión del receptor de transferrina [249] en células infectadas lo cual limita el hierro disponible, que es un nutriente importante para la supervivencia de este patógeno [250]. Asimismo, IFN- $\gamma$  induce la expresión de la enzima indoleamina-2,3-dioxigenasa (IDO), la cual degrada triptófano, un aminoácido que la bacteria requiere para sobrevivir [251].

Como fue enunciado anteriormente en el sitio de la invasión se produce una inflamación intensa inducida por las células epiteliales que atrae a diferentes tipos de células inmunes tales como neutrófilos, NK, NKT, macrófagos, CD y LT y LB. Sin embargo, el rol de algunas células inmunes aún sigue siendo controversial.

Varios trabajos demostraron que *C. trachomatis* puede infectar CD y macrófagos humanos que conducen a la producción de citoquinas proinflamatorias [252], [253], [254], [255]. Los lipopolisacáridos (LPS) y la proteína de choque térmico (*Heat shock protein*: HSP) 60 de *C. trachomatis* fueron los primeros antígenos descritos que son reconocidos por TLR-2 y TLR-4 expresados en monocitos y CD [256], [257]. Asimismo, otros estudios demostraron que tanto MOMP, una proteína abundante expuesta en la superficie de *C. trachomatis*, como Pmp (*polymorphic membrane proteins*: Pmp) una familia de proteínas de *C. trachomatis*, tienen la capacidad de inducir inmunidad innata [258], [259].

Diferentes estudios empleando *C. trachomatis* han mostrado que los macrófagos migran a los sitios de infección y tienen la capacidad de fagocitar [260] y producir citoquinas proinflamatorias [261], [262]. Sin embargo, a diferencia de las células epiteliales, los macrófagos no son un nicho para la replicación intracelular de *C. trachomatis* [263]. La destrucción de *C. trachomatis* dentro de los macrófagos se asoció con autofagia celular, proceso alternativo de presentación de antígenos a los LT [264]. Sin embargo, otros autores describen que los macrófagos podrían inducir la apoptosis de LT [265], [266] perpetuando la persistencia de la infección por *C. trachomatis*.

Las células NK son importantes para la eliminación de bacterias intracelulares [267], [268]. Frente a la infección por *C. trachomatis*, las células NK modulan negativamente la respuesta Th2 permitiendo así la expresión de una fuerte inmunidad mediada por Th1, que se ha demostrado que es esencial para la resolución de la infección [263].

Existen evidencias contradictorias sobre el rol de las células NKT. Estas células son una población única de LT que expresan marcadores típicos de células NK y un receptor de LT semivariante [269]. Algunos resultados sugieren que las células NKT promueven la inmunidad protectora contra *C. trachomatis* ya que aumentan las citoquinas asociadas al perfil Th1 [270] mientras que otros sugieren que estas células median la respuesta hacia un perfil Th2, que se caracteriza por ser una respuesta patogénica [271].

*C. trachomatis* logra evadir a la respuesta inmune del huésped construyendo un nicho dentro de las células epiteliales [272], [273]. Se ha demostrado que las células epiteliales infectadas promueven la liberación de IL-1, la que contribuye a la diferenciación de Th17 [274]. Los linfocitos Th17 producen IL-17 que recluta neutrófilos a los sitios inflamatorios e induce quimioquinas promotoras de neutrófilos. Los linfocitos Th17 específicas para *C. trachomatis* deben examinarse como posibles mediadores de la patogenia, ya que activan neutrófilos que se han asociado con un aumento de la inflamación y daños en los tejidos. Esto también se ha observado en otras enfermedades infecciosas [243]. Asimismo, Darville y colaboradores, proponen que la producción de IFN- $\gamma$  por linfocitos Th1 inhibe las respuestas Th17 que promueven la enfermedad [243]. Otros estudios indican que las respuestas Th17 colaboran con el desarrollo de la patología del tracto genital femenino así como con la inducción de protección [275]. Actualmente, se requieren estudios complementarios para determinar el rol preciso de los linfocitos Th17 en la infección por *C. trachomatis* en los tractos genitales.

Tanto la respuesta inmune humoral como la inmunidad mediada por células han sido implicadas en la inducción de protección contra la infección por *C. trachomatis* [276], [277]. La mayoría de los estudios indican que la respuesta Th1/IFN- $\gamma$  es crucial para el control y la resolución de la infección por *C. trachomatis* [242], [276], [278], [279]. Por otro lado, los linfocitos Th2, que favorecen la respuesta inmune humoral, producen IL-4, IL-5, IL-10 y conduce a

desarrollar respuestas que suelen estar asociadas con susceptibilidad, persistencia, fibrosis tisular e inmunopatología [280], [281], [282].

Con respecto a los LT CD8+ citotóxicas, la información disponible es contradictoria. Si bien los primeros estudios sugerían que estas células no son críticas para la resolución de la infección por *C. trachomatis* [276], [283], posteriormente se propuso que los LT CD8+ podrían brindar protección inmunitaria contra *C. trachomatis* [284]. Sin embargo, otros autores proponen que estas células son responsables de la inmunopatogénesis observada en infecciones producidas por *C. trachomatis* [285], [286]. Actualmente se necesitan estudios adicionales para determinar el rol preciso de los LT CD8+ en la infección por *C. trachomatis* en el tracto genital.

La infección por *C. trachomatis* provoca una respuesta inmune humoral local y sistémica. Anticuerpos específicos de isotipo IgG e IgA, contra distintas proteínas de *C. trachomatis*, entre ellas MOMP, Pmp, HSP, entre otras, fueron detectados en pacientes infectados con *C. trachomatis* [287], [288], [289]. El rol de los anticuerpos en proporcionar una respuesta protectora frente a *C. trachomatis* ha sido informado y debatido por diversos autores. Algunos estudios describen que los anticuerpos si bien desempeñan un papel en la inmunidad protectora contra *C. trachomatis* mediante diversos mecanismos entre ellos, neutralización, opsonización mediada por anticuerpos, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (*Antibody-dependent cellular cytotoxicity: ADCC*), formación de complejos inmunes [290], entre otros [291] no aseguran la resolución de la infección [204]. No obstante, diversos autores demostraron que los anticuerpos tienen un rol importante en la protección frente a reinfecciones [283], [292]. Otros estudios determinaron que anticuerpos contra MOMP fueron significativamente mayores en pacientes con infecciones primarias, mientras que anticuerpos contra HSP de *C. trachomatis* fueron significativamente mayores en pacientes con infecciones recurrentes y en mujeres con trastornos de la fertilidad [289], [293].

Teniendo en cuenta lo descrito anteriormente, la respuesta inmune del huésped se considera uno de los determinantes más importantes en el desarrollo de la infección por *C. trachomatis*. Por lo tanto, se requiere un delicado equilibrio entre células inmunes, citoquinas pro y antiinflamatorias y anticuerpos para eliminar la infección, evitando lesiones en los tejidos [204].

### ***Micoplasmas***

Los micoplasmas pertenecen a una clase de bacterias designadas como *mollicutes*, que carecen de paredes celulares y esta característica, junto con su tamaño diminuto, las distingue del resto de las bacterias. Los micoplasmas se encuentran principalmente en la boca, el tracto respiratorio superior y las partes distales de las vías genitourinarias de los seres humanos [294].

*M. hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *U. urealyticum*, y *Ureaplasma parvum* son especies potencialmente patógenas, frecuentemente aisladas del tracto genitourinario [295]. Estas bacterias,

junto con *Neisseria gonorrhoeae* y *C. trachomatis*, se consideran entre los patógenos de transmisión sexual más prevalentes con una amplia distribución mundial [296], [232].

### ***Mycoplasma hominis***

*M. hominis* son bacterias anaerobias facultativas que se asocian con la colonización e infección genital en los seres humanos adultos y colonización e infección respiratoria en los recién nacidos. Estas especies son agentes causales de una amplia variedad de cuadros patológicos. Sin embargo, como se nombró anteriormente estas mismas especies también pueden aislarse en individuos asintomáticos, lo que sugiere que pueden formar parte de la flora comensal y comportarse como patógenos oportunistas [297].

La colonización por *M. hominis* puede tener lugar durante el nacimiento, pero en la mayoría de los casos la infección se autolimita. Sólo en un pequeño número de casos la colonización persiste y las tasas de colonización se incrementan cuando los individuos comienzan a ser sexualmente activos, hasta aproximadamente el 15% [297]. Se considera que *M. hominis* presenta una prevalencia del 20% al 50%, aunque varios autores coinciden que la prevalencia de *U. urealyticum* está por encima de la de *M. hominis* [298], [297].

Si bien los *Mycoplasmas* spp. patógenos para el humano son capaces de causar enfermedades agudas, generalmente producen patologías de evolución silenciosa que tienden a la cronicidad, afectando múltiples sitios con un amplio espectro de complicaciones y actuando como cofactores en diversas enfermedades [299].

La infección por *M. hominis* ha sido asociada al desarrollo de vaginosis bacteriana (VB), la cual se caracteriza por el desplazamiento de *Lactobacillus* spp. beneficiosos, por otras bacterias, generalmente anaerobias gram-negativas [300]. La VB se asocia con complicaciones clínicas como infecciones del tracto reproductivo superior que resultan en aborto y partos prematuros [301], [302]. Otras posibles consecuencias de la infección por *M. hominis* incluyen cervicitis, endometritis, salpingitis, abscesos tubáricos, embarazo ectópico, EIP, las cuales se asocian con infertilidad femenina [222], [303], [304], [305], [306]. Asimismo, la infección por *M. hominis* se asocia con infertilidad masculina ya que se ha observado que este patógeno causa alteraciones en los parámetros espermáticos [222], [307].

Existen pocos trabajos donde se determine el perfil de mediadores inmunológicos en la infección por *M. hominis*, más particularmente estudios *in vivo*. En un estudio realizado por Scoot y colaboradores 2005, se observó que *M. hominis* tiene una capacidad reducida para inducir la liberación de citoquinas por parte de CD *in vitro*, ya que sólo observaron inducción de IL-10 [308], lo cual puede asociarse con la generación de infecciones crónicas. Por otro lado, otros autores indicaron más recientemente que *M. hominis* induce la maduración de las CD humanas con la secreción predominante de IL-23 de una manera dependiente del receptor TLR-2. Las CD activadas

por *M. hominis* indujeron una respuesta de LT CD4+ productoras de IL-17 [309], [310]. Sus hallazgos demostraron un potencial rol del eje IL-23/Th17 en la defensa contra *M. hominis* sugiriendo una asociación entre estas bacterias y enfermedades inflamatorias y autoinmunes. La capacidad de *M. hominis* para generar inflamación crónica y enfermedades autoinmunes podría deberse a su plasticidad antigénica [311].

### ***Ureaplasma* spp.**

Entre los *Mycoplasmas* spp. genitales, la especie *Ureaplasma* spp. es la más prevalente y potencialmente patógena de las aisladas del tracto urogenital de hombres y mujeres [294].

Los *Ureaplasmas* spp. han evolucionado a partir de bacterias gram-positivas por evolución degenerativa para perder su pared celular de peptidoglicano [312]. Son organismos pertenecientes a la familia *Mycoplasmataceae*. Se conocen 14 serotipos, los cuales se dividen en dos especies: *U. parvum* y *U. urealyticum* [313]. *U. urealyticum* fue descubierto por primera vez en 1954 por Shepard y colaboradores, como un patógeno que causa la uretritis no gonocócica en los hombres [314]. Sin embargo, *U. urealyticum* se considera parte de la flora genital normal con una tasa de colonización del 75% [297]. Los serotipos 2, 4, 5, 7, 13 de *U. urealyticum* y los serotipos 1, 3, 6, 14 de *U. parvum* se detectaron como bacterias comensales en el tracto genital inferior del 40 al 80% de mujeres en edad reproductiva [315], [316]. Por lo tanto, son considerados patógenos oportunistas porque se pueden aislar fácilmente del tracto urogenital inferior de humanos asintomáticos sanos, así como individuos con enfermedad [294]. Estas especies han sido implicadas como agentes causales en una amplia variedad de cuadros patológicos [297].

En los humanos, *U. urealyticum* y *U. parvum* se transmiten a través del contacto sexual [297] por eso se asocian con colonización e infección genital en los adultos. Asimismo, los *Ureaplasmas* pueden transmitirse de la madre a la descendencia verticalmente en el útero o a través de fluidos corporales infectados en el momento del nacimiento [317], por eso se asocian con infección respiratoria y colonización en los recién nacidos [297]. Asimismo, otro de los principales problemas que desencadenan estos microorganismos es que generalmente producen patologías de evolución silenciosa que tienden a la cronicidad, afectando múltiples sitios, con un amplio espectro de complicaciones. *Ureaplasma* spp. han sido implicados en problemas tales como embarazo ectópico, EIP, partos prematuros, además de una amplia gama de riesgos ginecológicos y otras complicaciones en el embarazo [294], [318]. Diversos estudios detectaron *Ureaplasma* entre 20,8% y 32% de mujeres infértiles [319], [320]. Asimismo, *Ureaplasma* spp. también se ha aislado en una gran proporción (62-97%) en pacientes con VB [321].

En el tracto genital masculino la infección por *Ureaplasma* spp. provoca complicaciones tales como uretritis no gonocócica, prostatitis y epididimitis [322], [323]. *Ureaplasma* spp. se ha identificado como una etiología de la infertilidad masculina desde 1967 [324]. La prevalencia de

infección de *U. urealyticum* detectada en fluidos seminales ha sido reportada entre 10 y 40% [325], [307]. Friberg y Gnarpe demostraron una mayor frecuencia de *Ureaplasma* spp. aislado del semen de hombres con infertilidad inexplicable (76%) en comparación con los hombres fértiles (19%) [326]. Otros estudios más actuales determinaron que la prevalencia de *Ureaplasma* spp. aislado de semen de pacientes masculinos infértiles varía entre 5% y 58%, mientras que en hombres fértiles es entre 3% y 31% [196], [327], [328]. Los mecanismos de infertilidad masculina causados por la infección por *Ureaplasma* spp. no son claros. Existe controversia respecto a los efectos que genera la infección provocada por estos patógenos sobre los parámetros espermáticos. Algunos estudios no encontraron correlación entre la infección y alteraciones del semen [197], [222], [232] mientras que otros correlacionaron la presencia de *Ureaplasma* spp. en el semen con la disminución de la concentración de espermatozoides [329], [330] y de la motilidad [331], así como con morfología alterada de la gameta masculina [319], [332]. Asimismo, otros trabajos indican que la infección por *Ureaplasma* provoca cambios en la membrana de los espermatozoides que podrían inducir la producción de ASA, los cuales se asocian con un mayor riesgo de infertilidad [333].

La infección con *Ureaplasma* spp., aumenta potencialmente la susceptibilidad a adquirir y transmitir el HIV [294]. Varios estudios demostraron que *U. urealyticum* es potencialmente más patógeno que *U. parvum* jugando un papel etiológico tanto en las infecciones genitales como en la infertilidad masculina [232], [332], [334]. Por otro lado, aún se encuentra en discusión si *Ureaplasma* spp. son comensales inocuos o contribuyen significativamente a la patogenia de la infección intrauterina y neonatal [315], [335], [336], [337].

Existen pocos trabajos que caractericen la respuesta inmune en las patologías desencadenadas por *U. urealyticum*. En modelos animales de infección intrauterina con *Ureaplasma* spp. se observó un aumento en la expresión de citoquinas proinflamatorias en diferentes tejidos e intensidades variables de inflamación [338], [339], [340]. Es interesante destacar que el efecto neto de las citoquinas pro y antiinflamatorias *in vivo* puede diferir de condiciones *in vitro*, ya que los factores locales y sistémicos de la respuesta inmune, así como la capacidad de respuesta de las células diana y todo el entorno inmunológico en su conjunto pueden ejercer diferentes influencias [341], [342]. Asimismo, factores adicionales como la duración de la infección por *Ureaplasma*, la interacción con otros patógenos de la microflora y la respuesta inmune del huésped podrían agravar la inflamación y promover lesiones en los órganos [343]. Estudios *in vitro* demostraron que monocitos y macrófagos producen respuestas proinflamatorias mediante la liberación de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 tras la estimulación con cepas de *Ureaplasma* spp. [344], [345]. Estas citoquinas son mediadores claves de la inflamación temprana, orquestando una cascada de respuestas celulares y humorales [341]. Asimismo, otro estudio reciente de Glaser y colaboradores, sugiere que *Ureaplasma* spp. produce un desequilibrio de citoquinas. Estos autores realizaron ensayos de estimulación aguda de monocitos *in vitro* demostrando que *Ureaplasma* spp.

es capaz de inducir la expresión de citoquinas proinflamatorias, sin inducir citoquinas antiinflamatorias como IL-10 [343].

Diversos estudios han revelado que la prevalencia de ASA e infertilidad inmunológica es mayor en pacientes positivos a *Ureaplasma* [222]. Esto podría ser provocado por el mimetismo molecular ya que existen antígenos de *U. urealyticum* y proteínas de espermatozoides humanos que juegan un papel clave en la producción de ASA [346]. Por otro lado, se ha descrito que *Ureaplasma* presenta una actividad de proteasa de IgA, que podría destruir anticuerpos presentes en la mucosa, facilitando la colonización de microorganismos oportunistas [294].

Por último, otro mecanismo que podría contribuir a la patología de *U. urealyticum* es la actividad de ureasa por la cual este microorganismo es capaz de generar amoníaco a partir de la escisión de la urea, lo que podría causar toxicidad en los tejidos del hospedador debido a cambios en el pH del tracto genital [294].

*En este trabajo de tesis se analizó, en primer lugar, la prevalencia de infecciones por C. trachomatis, M. hominis y U. urealyticum en pacientes infértiles de la ciudad de Santa Fe. Asimismo, por lo descripto anteriormente resulta de gran interés el estudio de la respuesta inmune generada por estas infecciones genitales como potencial causa de infertilidad. Por este motivo, en este capítulo se analiza la respuesta inmune humoral y celular en pacientes infértiles con y sin estas infecciones genitales y en pacientes fértiles sin infección para estudiar posibles relaciones entre el perfil de la respuesta inmune inducidas por las ITS y la infertilidad.*

## Objetivos

1. Detectar infección por *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis* en exudados cervicales y uretrales en pacientes en consulta por infertilidad y en pacientes fértiles de nuestra región. Analizar la prevalencia de estas infecciones.
2. Caracterizar el perfil de respuesta inmune en semen y en lavado vaginal de pacientes infértiles y fértiles, con y sin infecciones.
3. Analizar la presencia de anticuerpos antiespermáticos en muestras de lavado vaginal y plasma seminal de pacientes infértiles y fértiles, con y sin infecciones.
4. Establecer posibles relaciones entre el perfil de respuesta inmune hallado en los pacientes con y sin infecciones genitales y la infertilidad.

## **Materiales y Métodos**

### **1. Detección de *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis* en exudados cervicales y uretrales. Análisis de la prevalencia de estas infecciones.**

#### 1.1. Población de estudio

Se realizó un estudio transversal sobre la prevalencia de ITS por *C. trachomatis*, *M. hominis* y *U. urealyticum* sobre pacientes infértiles que asistieron al servicio de fertilidad del Hospital JB Iturraspe de Santa Fe, Argentina, en el período de marzo a noviembre de los años 2015, 2016 y 2017. La infertilidad se definió como la incapacidad de concebir después de al menos 12 meses de relaciones sexuales sin protección. Se reclutaron 223 muestras de las cuales 193 muestras correspondieron a pacientes infértiles con infecciones (56) por *C. trachomatis*, *M. hominis* y *U. urealyticum* y sin estas infecciones (137) y 30 a pacientes fértiles con (7) y sin (23) estas infecciones. Fueron criterios de exclusión: la presencia de patologías que afecten al sistema inmune, como inmunodeficiencias y enfermedades autoinmunes, así como tratamientos prolongados con antibióticos, corticoides o drogas citotóxicas. Este estudio fue aprobado por el Comité Asesor de Ética y Seguridad de la Investigación de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral y el Comité de Ética en Investigación del Hospital JB Iturraspe y se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes.

#### 1.2. Colección de semen

Los pacientes recogieron las muestras de semen en receptores no tóxicos estériles mediante masturbación después de 3-5 días de abstinencia sexual. Las muestras de semen se licuaron inmediatamente en una incubadora a 37 °C durante aproximadamente 30 minutos antes del análisis.

#### 1.3. Análisis de semen

Los análisis del semen se realizaron según el manual de examinación y procesamiento de semen humano de la Organización Mundial de la Salud [347].

#### 1.4. Colección de muestras endocervicales y fluido vaginal

Se tomaron muestras endocervicales de rutina con hisopo de Dacron para el análisis bacteriológico, muestras con un hisopado de fondo de saco para exudados vaginales y también se realizaron lavados vaginales. Para ello, se colocaron con una pipeta Pasteur 2 mL de solución salina estéril en la vagina. El líquido de lavado vaginal se aspiró de la parte posterior y se recogió en un recipiente estéril.

### 1.5. Análisis del exudado vaginal

Los exudados vaginales se realizaron para determinar los siguientes parámetros: prueba de aminas, pH, tricomonas vaginalis, células *clue*, levaduras, respuesta inflamatoria vaginal, diagnóstico del estado vaginal basal.

### 1.6. Recolección de muestras y detección de *C. trachomatis*, *M. hominis* y *U. urealyticum*

Se utilizaron un total de 223 muestras (incluyendo hisopados endocervicales y semen) obtenidas de rutina para el diagnóstico y control de infecciones genitales o para estudios de fertilidad. La recolección de muestras y el análisis bacteriológico se llevaron a cabo en el Laboratorio Central del Hospital Iturraspe de Santa Fe, Argentina. El diagnóstico de *C. trachomatis* se realizó por PCR y la detección de *M. hominis* y *U. urealyticum* se llevó a cabo por cultivo. Sobre la base de estos resultados y el historial de fertilidad/infertilidad, las muestras se clasificaron en los siguientes grupos para realizar el análisis de prevalencia.

- Infértil sin infecciones (ISI): grupo de pacientes con diagnóstico negativo para las tres infecciones (*C. trachomatis*, *M. hominis* y *U. urealyticum*).
- Infértil con infecciones (ICI): grupo de pacientes cuyo diagnóstico fue positivo para al menos una de las tres infecciones (*C. trachomatis*, *M. hominis* y *U. urealyticum*).
- Fértil sin infección (FSI): grupo de pacientes cuyo diagnóstico fue negativo para las tres infecciones (*C. trachomatis*, *M. hominis* y *U. urealyticum*).
- Fértil con infección (FCI): grupo de pacientes cuyo diagnóstico fue positivo para al menos una de las tres infecciones (*C. trachomatis*, *M. hominis* y *U. urealyticum*).

### 1.7. Procesamiento y conservación de muestras

El remanente de las muestras de semen y las muestras del lavado vaginal se recogieron en contenedores estériles y se transportaron al Laboratorio de Inmunología Experimental de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, en doble recipiente adecuado para la conservación y transporte. Las muestras fueron identificadas con un número para proteger la identidad de los pacientes. Desde el momento de la extracción de las muestras, se realizó el procesamiento inicial y su conservación en un lapso menor a 2 horas.

Estas muestras se centrifugaron a 2000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. El pellet celular de muestras de mujeres fue resuspendido con 400 µL de Trizol™ (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EE.UU.) mientras que las muestras de hombres fueron resuspendidas con 200 µL. Posteriormente, se almacenaron a -80 °C para el análisis de la expresión de citoquinas y factores de transcripción maestros de diferentes perfiles de LTh. El sobrenadante obtenido se dividió en dos alícuotas. Una alícuota se conservó y almacenó a -20 °C para el análisis de ASA, mientras que la otra se almacenó a -80 °C para la cuantificación de citoquinas.

## 1.8. Determinación de la prevalencia de infecciones en pacientes infértiles y fértiles.

Se calcularon los porcentajes de pacientes que presentaron infección por *C. trachomatis*, *M. hominis* y *U. urealyticum*, así como infecciones concomitantes, respecto al total de pacientes infértiles y fértiles.

## 2. Caracterizar el perfil de respuesta inmune en semen y en lavado vaginal de pacientes infértiles/fértiles con y sin infecciones

### 2.1. Cuantificación del ARN mensajero (ARNm). Expresión relativa por PCR en tiempo real (qPCR)

Se realizó la cuantificación de la expresión relativa de citoquinas y de factores de transcripción maestros de LTh de 95 muestras de pacientes de las 223 muestras recolectadas. Según los resultados de los análisis bacteriológicos, las muestras de mujeres fueron clasificadas en los siguientes grupos: FSI F (n = 17), ISI F (n = 14), ICI F (n = 30). Estas muestras corresponden a: 8 pacientes infectadas por *C. trachomatis*, 13 por *M. hominis* y 9 por *U. urealyticum*. Las muestras masculinas se dividieron en los grupos: ISI M (n = 19) y ICI M (n = 15), correspondientes a pacientes infectados por *U. urealyticum*.

#### 2.1.1. Purificación de ARN a partir de muestras de pacientes

A partir de las células provenientes del lavado vaginal y semen se obtuvo el ARN mediante purificación con el reactivo Trizol™. Brevemente, en el lapso menor a un mes las muestras conservadas a -80 °C en Trizol™ se descongelaron e incubaron 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, a cada muestra se le adicionó 200 µL de cloroformo por 1 mL de Trizol™, se agitó vigorosamente 15 segundos y se incubó 2 minutos a temperatura ambiente. La muestra fue centrifugada a 12.000 g, 15 minutos, a 4 °C. Posteriormente, se transfirió la fase acuosa transparente a un tubo cónico estéril de 1,5 mL teniendo precaución de no tomar de la interfase para obtener buena calidad del ARN. El ARN fue precipitado con el agregado de 500 µL de isopropanol por cada mililitro de Trizol™. Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C. Después de eliminar el sobrenadante, el ARN precipitado se lavó con 1 mL de Etanol 75% por cada mL de Trizol y se centrifugó a 7500 g por 5 minutos a 4 °C. Se dejó secar el pellet (ARN) durante 8 minutos. Luego se disolvió en 22 µL de agua milliQ estéril y se incubó en baño a 55 °C – 60 °C durante 10 minutos. Dos microlitros del ARN fueron utilizados para calcular la concentración y la pureza, mediante lectura de absorbancia (A) a 260 y 280 nm (NanoDrop™ Lite de Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Los

20  $\mu\text{L}$  restantes de ARN se conservaron inmediatamente en ultrafreezer a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ . En la mayoría de las muestras se obtuvieron relaciones de absorbancias  $A_{260}/A_{280}$  cercanas a 1,8.

### 2.1.2. Retrotranscripción del ARN

Posteriormente, el ARN purificado se retrotranscribió a ADN copia (ADNc) utilizando la enzima RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) y hexanucleótidos al azar. Brevemente, en hielo, se adicionó 1  $\mu\text{g}$  de ARN, 1  $\mu\text{L}$  de hexanucleótidos al azar 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y se completó hasta 12,5  $\mu\text{L}$  con agua milli-Q estéril. Luego se incubó 5 minutos a  $65\text{ }^\circ\text{C}$  en un baño termostático, se enfrió en hielo unos segundos y se adicionaron 7,5  $\mu\text{L}$  de MasterMix a cada tubo compuesta por: *buffer* de la enzima, 20 unidades de Inhibidor de ARNsas, 2  $\mu\text{L}$  de dNTP (deoxiribonucleótidos trifosfato: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 10 mM de cada uno y 200 unidades de transcriptasa reversa RevertAid. Se colocaron los tubos en el termociclador con el siguiente programa de ciclado: 10 minutos a  $25\text{ }^\circ\text{C}$ , una hora a  $42\text{ }^\circ\text{C}$  y 10 minutos a  $70\text{ }^\circ\text{C}$ . Posteriormente, el ADNc se conservó en freezer a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . Tanto para realizar la purificación del ARN como la retrotranscripción se emplearon micropipetas destinadas exclusivamente para ARN y el material de plástico fue esterilizado 2 veces en autoclave a 1 atmósfera, 15 minutos. Para corroborar tanto la purificación de ARN como la posterior retrotranscripción, se realizaron pruebas de PCR a tiempo final, en las cuales se amplificó un fragmento de  $\beta$ -Actina (gen de expresión constitutiva en humanos).

### 2.1.3. PCR en tiempo real (qPCR)

Una vez corroborada la integridad del ADNc, las secuencias de interés fueron amplificadas utilizando oligonucleótidos específicos de citoquinas que fueron previamente descritos en los siguientes artículos: de Brito y colaboradores 2015 (IL-17, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) [348], Berger y colaboradores 2003 (TGF- $\beta$ 1) [349], Cho y colaboradores 2015 (IL-6, IL-8) [350], Stordeur y colaboradores 2002 ( $\beta$ -Actina) [351] y Chao y colaboradores 2014 para los factores de transcripción característicos de los diferentes perfiles Th (Th1: Tbet Th2: GATA3, Th17: ROR $\gamma$ t, Treg: FOXP3) [352]. En las Tablas 2 y 3 se presentan las secuencias de los oligonucleótidos sentido y antisentido, y el tamaño de los productos específicos de amplificación para las citoquinas en pares de bases (pb) y factores de transcripción maestros de LTh, respectivamente. Los tamaños de los productos de amplificación estaban comprendidos entre 52 pb y 107 pb. Cada par de oligonucleótidos fue evaluado utilizando el programa Blast-n (*Blast Local Alignment Search Toll nucleotide*) [353], donde además de chequear que los oligonucleótidos tengan las características físicoquímicas óptimas se verificó que hibriden en diferentes regiones codificantes (exones) y que no hibriden en secuencias humanas diferentes a las secuencias blanco. Asimismo todos los oligonucleótidos para las citoquinas presentaron una temperatura de hibridación ( $T_a$ ) de  $60\text{ }^\circ\text{C}$ .

**Tabla 2.** Oligonucleótidos específicos de citoquinas y gen de referencia

Citoquinas	Oligonucleótidos sentido	Oligonucleótidos antisentido	Tamaño del producto (pb)
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	TTCTGGCTCAAAAAGAGAATTG	TGGTGGTCTTGTTGCTTAAGG	73
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	CAACAATTCCTGGCGATACCT	CAACCACTGCCGCACAAC	100
<b>IL-10</b>	GGTTGCCAAGCCTTGTCTGA	TCCCCAGGGAGTTCACAT	107
<b>IL-17A</b>	CAATGACCTGGAATTACCCAA	TGAAGGCATGTGAAATCGAGA	52
<b>IL-6</b>	TTTTCTGCCAGTGCCTCTTT	TACCCCCAGGAGAAGATTCC	100
<b>IL-8</b>	CTCTGCACCCAGTTTCCTT	GTGCAGTTTTGCCAAGGAGT	100
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	GAACTGTCGCCAGCAGCTAAA	TGCAGGCAGGACAACCATTA	95
<b><math>\beta</math>-Actina</b>	GGATGCAGAAGGAGATCACTG	CGATCCACACGGAGTACTTG	90

pb: pares de bases

**Tabla 3.** Oligonucleótidos específicos para factores de transcripción maestros de LTh

Factores de transcripción	Oligonucleótidos sentido	Oligonucleótidos antisentido	Tamaño del producto (pb)
<b>ROR<math>\gamma</math>t</b>	ACCTCACCGAGGCCATTAG	TAGGCCCGGCACATCCTAAC	139
<b>FOXp3</b>	AAACAGCACATCCCAGAGTTCC	TCATTGAGTGTCCGCTGCTTC	135
<b>Tbet</b>	TGTTGTGGTCCAAGTTTAATCAGCA	CCCGGCCACAGTAAATGACAG	95
<b>GATA3</b>	GAGATGGCACGGGACACTACCT	TGGTTGTGGTGGTCTGACAGTTC	150

pb: pares de bases.

#### 2.1.4. Optimización de la técnica de qPCR

Previamente a la determinación de la expresión de citoquinas y factores de transcripción maestros de LTh se debió optimizar la técnica de PCR en tiempo real. La mezcla empleada para realizar la qPCR en tiempo real fue *HOT FIREPol*® *EvaGreen*® qPCR Mix Plus (sin ROX) (Solis Biodyne, Tartu, Estonia). Esta mix está optimizada lista para usar en ensayos de qPCR ya que comprende además del intercalante *EvaGreen*®, todos los componentes necesarios para realizar qPCR: ADN polimerasa *HOT FIREPol*®, dNTP ultrapuros, Cloruro de Magnesio. Por lo tanto, se agregan los oligonucleótidos, el ADNc a analizar y agua estéril.

La ADN polimerasa *HOT FIREPol*® se activa mediante un paso de incubación de 15 minutos a 95 °C. Esto evita la extensión de los oligonucleótidos reconocidos no específicamente y de dímeros de primers formados a bajas temperaturas durante la configuración de qPCR.

A partir de las instrucciones recomendadas por el fabricante, se optimizó el programa de ciclado, logrando emplear el mismo para todas las citoquinas y factores de transcripción maestros de LTh. En la tabla 4 se muestran las condiciones establecidas para la qPCR.

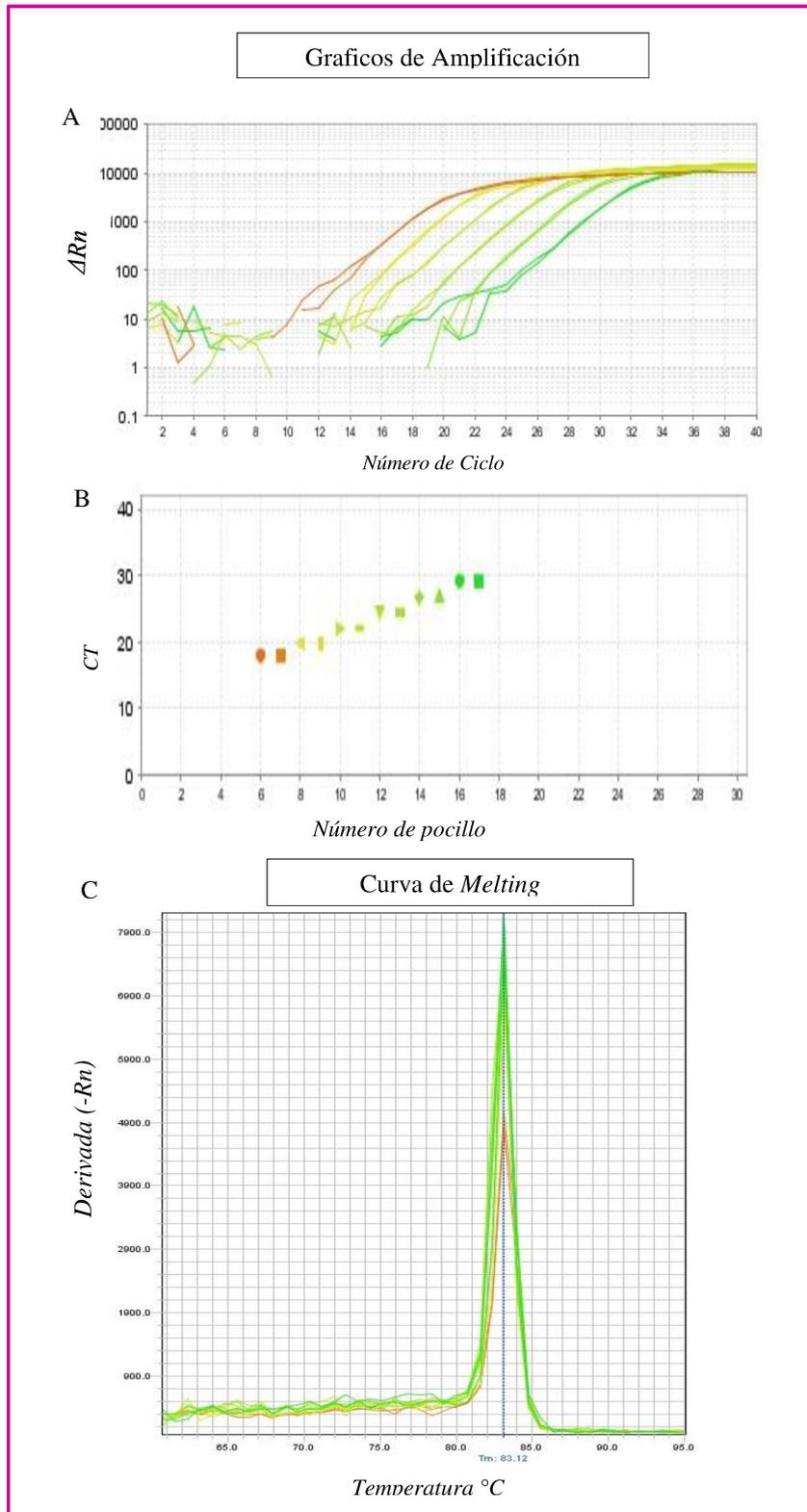
**Tabla 4.** Condiciones del programa de qPCR

<b>Programa qPCR</b>			
	<b>Temperatura (° C)</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
<i>Desnaturalización inicial</i>	95	15 min	1
<i>Desnaturalización</i>	95	15 s	40
<i>Hibridación</i>	60	20 s	
<i>Extensión</i>	72	20 s	
<i>Elongación final</i>	72	10 min	1

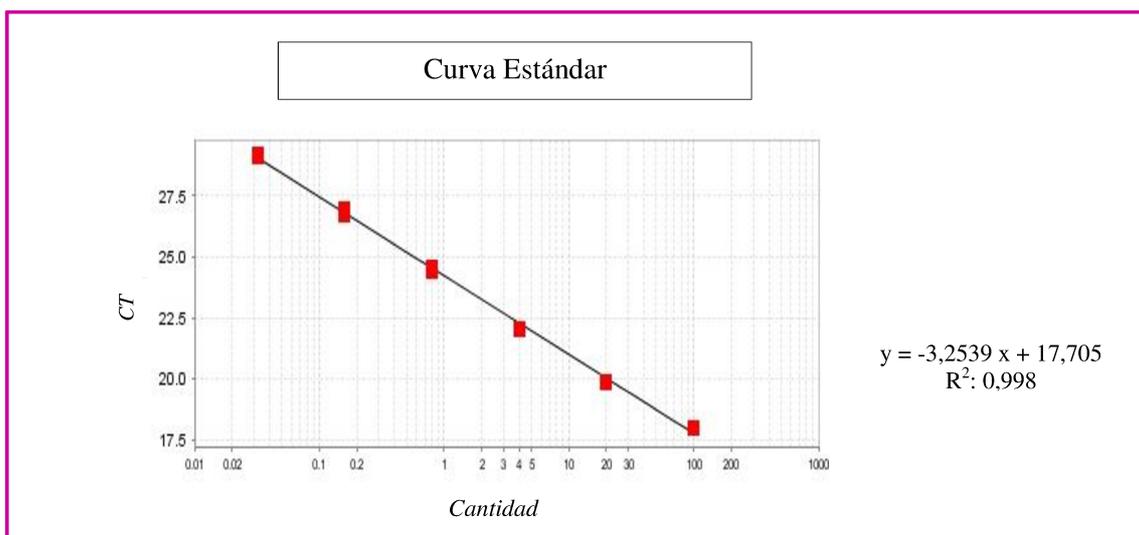
min: minutos; s: segundos

Las reacciones fueron realizadas en un equipo StepOne™ de Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) colocando, 2 µL de mezcla de master mix, 0,1 µL de oligonucleótidos específicos (40 pmol/µL), 5,8 µL de agua milliQ estéril y 2 µL de ADNc diluido según corresponda. Cada muestra fue analizada por duplicado y siempre se realizó el control de reacción negativo (sin ADNc).

Para establecer la cantidad de molde a colocar en la mezcla de reacción se hicieron diluciones seriadas del ADNc obtenido a partir de una muestra de sangre control y de un *pool* de muestras masculinas y femeninas. Así se confeccionó una recta, de cuya pendiente se calculó la eficiencia de reacción mediante la fórmula  $E = 10^{1/\text{pendiente}} - 1$  [354] y permitió, además, elegir la dilución apropiada de muestra para las reacciones de PCR. A modo de ejemplo, en la Figura 5 se observa la amplificación de la curva de eficiencia obtenida para β-Actina, la cual fue realizada partiendo de ADNc concentrado y realizando 6 diluciones seriadas al quinto. En la Figura 6 se representa el gráfico lineal para la curva de eficiencia de β-Actina. Curvas similares fueron obtenidas para el resto de las citoquinas y factores de transcripción maestros de LTh cuyas eficiencias son descriptas en la Tabla 5.



**Figura 5.** Gráficas de la amplificación (A)  $\Delta Rn$  es la magnitud de señal de fluorescencia normalizada vs el número de ciclos. (B) Número de CT respecto al número de pocillo. CT: *Cycle Threshold*. (C) Representación de la curva de *Melting*. Derivada negativa de la fluorescencia normalizada (-Rn) vs Temperatura.



**Figura 6.** Gráfico lineal de la curva de eficiencia para  $\beta$ -Actina.

**Tabla 5.** Eficiencias de reacción

		<b>Pendiente</b>	<b>Eficiencias</b>	<b>% Eficiencias</b>
<b>Citoquinas</b>	<i>INF-<math>\gamma</math></i>	-3,544	0,91	91
	<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	-3,268	1,02	102
	<i>IL-10</i>	-3,288	1,01	101
	<i>IL-17A</i>	-3,313	1,00	100
	<i>TGF-<math>\beta</math>1</i>	-3,319	1,00	100
	<i>IL-6</i>	-3,365	0,98	98
	<i>IL-8</i>	-3,134	1,08	108
<b>Factores de transcripción maestros de LTh</b>	<i>FOXP3</i>	-2,88	1,22	122
	<i>GATA3</i>	-2,72	1,33	133
	<i>ROR<math>\gamma</math>t</i>	-3,573	0,90	90
	<i>Tbet</i>	-3,367	0,98	98
<b>Genes de referencia</b>	<i><math>\beta</math>-Actina</i>	-3,253	1,03	103
	<i>GAPDH</i>	-3,2	1,05	105
	<i><math>\beta</math>2M</i>	-2,97	1,17	117

La selección de un gen de referencia es crítica, ya que numerosos estudios han demostrado que algunos genes de referencia se regulan y varían en condiciones experimentales [355], [356] [357], [358], [359]. Por estos motivos, además de evaluar  $\beta$ -Actina como gen de referencia se diseñaron oligonucleótidos específicos para  $\beta$ 2 microglobulina ( $\beta$ 2M) y Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) que fueron evaluados y comparados como posibles genes de referencia. Para el diseño de los oligonucleótidos específicos se empleó el programa Vector NTI y Primer 3

plus. En la Tabla 6 se muestran las secuencias de los oligonucleótidos diseñados, la Ta y el tamaño del amplicón.

**Tabla 6.** Secuencia de oligonucleótidos para otros genes de referencia

Genes de referencia	Oligonucleótidos sentido	Oligonucleótidos antisentido	Ta (°C)
<b>B2M</b>	GCTACTCTCTCTTTCTGGC	GAAACCCAGACACATAGC	60
<b>GAPDH</b>	CTTCGCTCTCTGCTCCTCCT	CTCCGACCTTCACCTTCCC	60

Ta: Temperatura de hibridización

Para poder seleccionar el mejor gen de referencia se amplificaron los tres genes de referencia en 8 muestras de pacientes y se analizaron los datos empleando el software *on line* de acceso libre *NormFinder* (<https://moma.dk/normfinder-software>) [360]. Con los valores de CT (*Cycle threshold*) obtenidos para cada muestra se calcularon los parámetros de estabilidad y variabilidad para cada uno de los genes evaluados.

#### 2.1.5. Análisis de los datos

Los niveles de expresión de cada molécula analizada fueron calculados en forma relativa al gen de referencia mediante el método  $2^{-\Delta Ct}$  de Livak y Schmittgen 2001 [361].

#### 2.2. Cuantificación de citoquinas solubles presentes en fluidos biológicos

A partir de los sobrenadantes conservados a  $-80^{\circ}\text{C}$  provenientes tanto de lavados vaginales como de semen se cuantificaron algunas citoquinas, particularmente aquellas que tuvieron significancia en los resultados de expresión de ARNm. Las muestras de mujeres evaluadas fueron: FSI F (n = 15), ISI F (n = 15), ICI F (n = 31) de las cuales 7 son pacientes infectados por *C. trachomatis*, 14 por *M. hominis* y 10 por *U. urealyticum*. Las muestras de hombres correspondieron a: ISI M (n = 12) y ICI M (n = 12, infectados por *U. urealyticum*).

##### 2.2.1. Cytometric Bead array (CBA)

Para la cuantificación de citoquinas se empleó el kit comercial BD<sup>TM</sup> Human Protein Flex Set (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) para medir los niveles de proteína de IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10 e IL-17A en el sobrenadante de las muestras utilizando la tecnología *cytometric bead array* (CBA). CBA es una aplicación de citometría de flujo que permite cuantificar múltiples proteínas simultáneamente. El sistema BD<sup>TM</sup> CBA emplea un amplio rango dinámico de

detección de fluorescencia ofrecido por citometría de flujo y perlas recubiertas de anticuerpos específicos para capturar eficientemente las citoquinas. Las perlas específicas para cada citoquina tienen una intensidad de fluorescencia única por lo que se pueden mezclar y realizar simultáneamente el análisis en un mismo tubo. En comparación con el método ELISA tradicional, esta tecnología permite la evaluación de múltiples citoquinas con un mismo volumen de muestra.

Brevemente, los estándares para las 4 citoquinas fueron preparados siguiendo las instrucciones del fabricante, y se realizaron diluciones seriadas al medio, desde 1:2 hasta 1:1024. Asimismo, se preparó una mezcla con las perlas recubiertas con los anticuerpos específicos para cada citoquina, que fue lavada con *buffer* de lavado y diluida en diluyente de perlas para suero/plasma provisto por el kit. Se agitaron en vortex y se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente, previo a su uso. Posteriormente, a 50  $\mu\text{L}$  de cada dilución de estándares o 50  $\mu\text{L}$  de cada muestra se le agregaron 50  $\mu\text{L}$  de la mezcla de perlas y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente. Cumplido el tiempo de incubación se colocaron 50  $\mu\text{L}$  del reactivo de detección diluido a cada tubo y se incubó 2 horas a temperatura ambiente y se lavaron con *buffer* de lavado. Finalmente, las muestras fueron medidas en el citómetro, habiendo establecido previamente las condiciones de medición con los calibradores provistos por el kit.

#### 2.2.2. Mediciones y análisis de datos

Las muestras se midieron en el citómetro de flujo BD<sup>TM</sup> FACS ARIA II (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) Para la cuantificación, los datos de intensidad de fluorescencia de los estándares diluidos se emplearon para generar una curva estándar para cada citoquina y en consecuencia se realizaron los cálculos finales de las concentraciones de cada citoquina empleando el software FCAP Array<sup>TM</sup> v3.

### 3. Análisis de la presencia de anticuerpos antiespermáticos en muestras de lavado vaginal y plasma seminal de pacientes infértiles/fértiles con y sin infecciones

A los fines de evaluar la presencia de ASA en muestras de lavados vaginales y de semen, se optimizó un ELISA indirecto. Se realizó el análisis de ASA al siguiente número de pacientes para cada grupo: FSI F (n=17), ISI F (n=17), ICI F (n=25), ISI M (n=17), ICI M (n=10).

#### 3.1. ELISA ASA

Como antígeno se emplearon proteínas espermáticas obtenidas del lisado de espermatozoides obtenido a partir de 5 pacientes con espermograma normal según el manual de examinación y procesamiento de semen humano de la OMS [347]. Para la lisis de los espermatozoides, se evaluaron dos detergentes: *Tween* 20 y Triton, además del empleo del

sonicador. El detergente seleccionado fue Triton debido a que generó menos *background* respecto al *Tween*. Como anticuerpo conjugado se utilizó un anti-IgA, IgM, IgG humano hecho en cabra conjugado a peroxidasa (Abcam Inc. Cambridge, MA, EE.UU.) que fue previamente titulado para establecer la dilución óptima. Como diluyente de muestra se empleó *buffer* fosfato salino (PBS) y como agente bloqueante PBS-BSA1% (*Serine bovine albumin*: BSA).

Teniendo en cuenta que el ELISA-ASA debe discriminar muestras positivas de negativas, fue necesario determinar un *cut-off* para poder establecer el umbral de Densidad Óptica (DO) a partir del cual la muestra es positiva o negativa. Se calculó un *cut-off* para pacientes femeninos y otro para pacientes masculinos. Para ello se realizó un ELISA en las condiciones anteriormente nombradas empleando sueros ASA positivos y sueros ASA negativos según la técnica de *Immunobeads*® (Irvine Scientific Sales Company Inc., Santa Ana, CA, EE. UU.). Dichos sueros fueron cedidos gentilmente por la Dra. Rosa Molina del laboratorio de Andrología y Reproducción de la ciudad de Córdoba. Los valores de *cut-off* fueron obtenidos calculando el promedio de valores de DO de las muestras control negativas (según ensayo de *immunobeads* indirecto) más dos desviaciones estándares.

#### **4. Investigación de las posibles relaciones entre el perfil de respuesta inmune hallado en los pacientes con infecciones genitales y la infertilidad**

Se analizaron los antecedentes de fertilidad/infertilidad, de las infecciones genitales y de los valores obtenidos de los espermogramas y análisis de exudados vaginales. Con esta información se realizaron diversos análisis junto con los datos obtenidos de los factores inmunológicos estudiados con el fin de encontrar posibles asociaciones y correlaciones.

#### **5. Análisis estadísticos**

Para la representación y análisis de los datos se empleó el programa GraphPad versión 5.00 para Windows (San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) [362].

Para los análisis estadísticos de los datos se empleó la prueba estadística no paramétrica de Mann-Withney, ya que los valores no se ajustan a una distribución normal. Los valores de  $p$  menores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos (dos colas).

Con los datos de expresión de qPCR se realizó un análisis multivariado de componentes principales empleando el software InfoStat versión 2018 (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, <http://www.infostat.com.ar>) [363], cuyo objetivo fue describir en dos dimensiones el

comportamiento en conjunto de las citoquinas y factores de transcripción maestros de LTh para los distintos grupos experimentales. Asimismo, se realizó un análisis de correlación empleando la prueba estadística de Spearman no paramétrica, considerándose asociaciones significativamente estadísticas cuando  $p$  fue menor a 0,05.

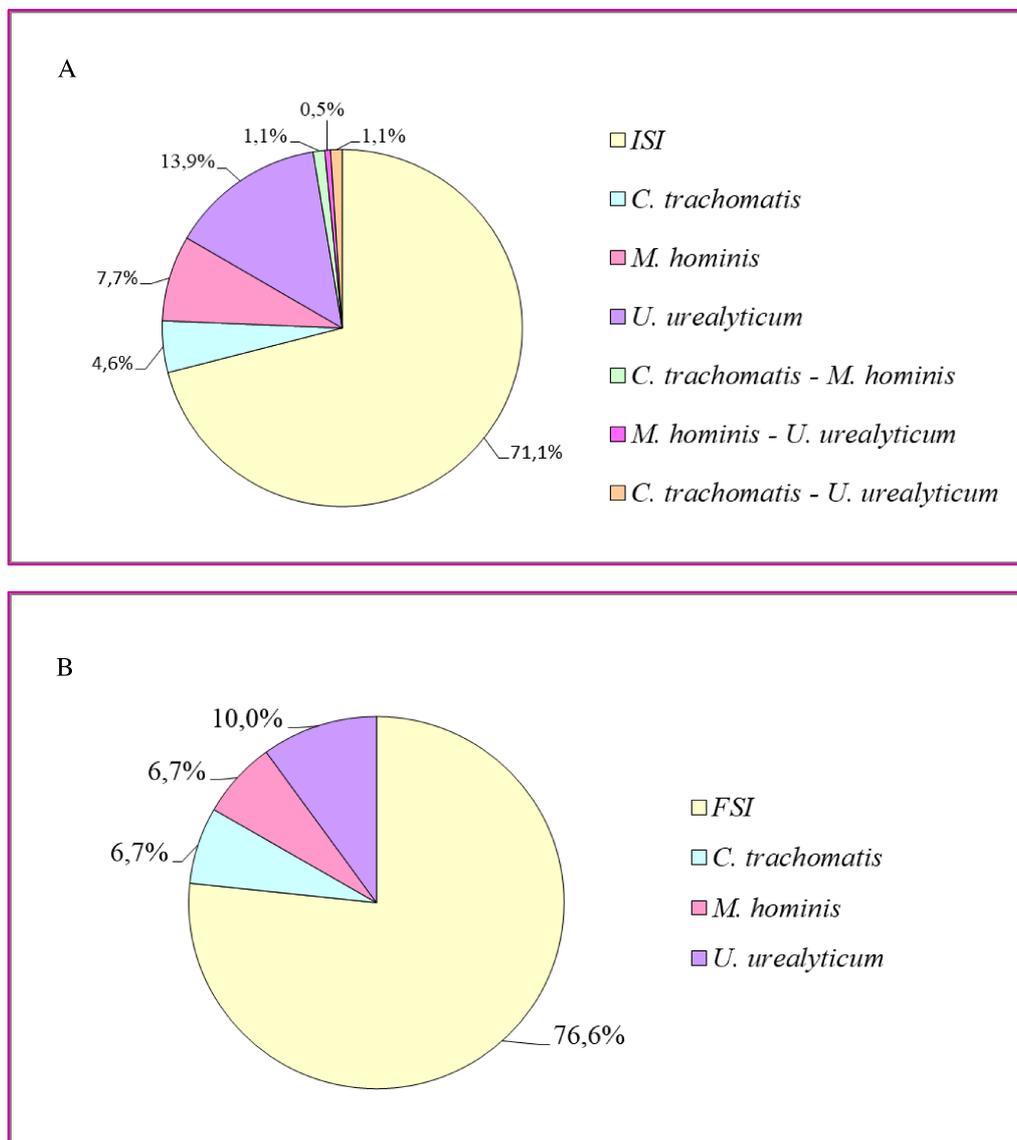
Para variables no categóricas se realizaron tablas de contingencia cuyos datos fueron analizados estadísticamente empleando la prueba exacta de Fisher. Los valores de  $p$  menores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos (dos colas).

## Resultados

### 1. Detección de *C trachomatis*, *U urealyticum* y *M hominis* en exudados cervicales y uretrales. Análisis de la prevalencia de estas infecciones en pacientes infértiles

Teniendo en cuenta que uno de los objetivos de este trabajo es establecer relaciones entre las ITS, la respuesta inmune y la infertilidad, resulta de interés conocer, en primer lugar, la prevalencia de estas infecciones en la ciudad de Santa Fe y zonas cercanas.

En las siguientes figuras se muestran la prevalencia de las tres infecciones genitales estudiadas para pacientes infértiles (Figura 7A) expresada en porcentajes. Asimismo se muestran los resultados obtenidos de los pacientes fértiles (Figura 7B).



**Figura 7.** Proporción de pacientes infértiles (A, n=193) y fértiles (B, n=30) con infecciones genitales.

Como puede observarse en la Figura 7A, el 29,9% de los pacientes infértiles (56/193) presenta algunas de las 3 infecciones genitales evaluadas. La más frecuente de las tres infecciones evaluadas fue *U. urealyticum*. Del 13,9% encontrado (27/193), 11 son mujeres y 16 pacientes masculinos. El total de pacientes infértiles infectados con *M. hominis* fueron pacientes mujeres (15). La mayoría de los pacientes positivos para *C. trachomatis* fueron mujeres (8) mientras que sólo 1 paciente masculino fue positivo para *C. trachomatis*. Se observó un bajo porcentaje de infecciones concomitantes. Hubo 2 pacientes positivos para *C. trachomatis* – *M. hominis*, 2 pacientes positivos para *C. trachomatis* - *U. urealyticum* y sólo 1 paciente fue positivo para *M. hominis* - *U. urealyticum*. Dentro del 71,1% de los pacientes infértiles negativos para estas tres infecciones genitales evaluadas, 81 eran mujeres y 56 hombres.

Los resultados de los análisis de infecciones genitales en pacientes fértiles se muestran en la Figura 7B. La infección más frecuente en mujeres fértiles de las tres evaluadas fue *U. urealyticum* y la menos frecuente fue *C. trachomatis* como también se observó para pacientes infértiles. Resulta interesante notar que las mujeres fértiles presentan mayor proporción de infección por *C. trachomatis* que las mujeres infértiles. Sin embargo, teniendo en cuenta que el número de muestras disponibles para este grupo fue menor, no se realizó una comparación estadística.

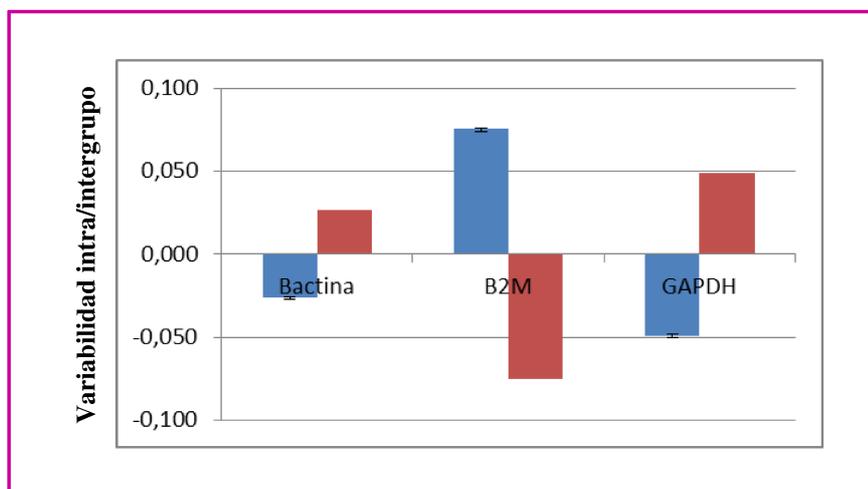
## **2. Estudio de poblaciones leucocitarias y citoquinas en semen y en lavado vaginal de pacientes infértiles/fértiles con y sin infecciones**

La caracterización de la repuesta inmune de los pacientes fue llevada a cabo mediante los análisis de expresión de citoquinas y factores de transcripción maestros de LTh característicos de diferentes perfiles. Para ello, en primer lugar, se analizaron los niveles relativos de ARNm codificante para cada una de las moléculas.

### **2.1. Evaluación del mejor gen de referencia para muestras de semen y lavado vaginal humanos**

Los genes de referencia evaluados fueron  $\beta$ -Actina,  $\beta$ 2M, GAPDH. El análisis del desempeño de cada uno de ellos fue realizado empleando el software *NormFinder*. Para ello se utilizaron 8 valores de CT obtenidos de la amplificación de cada gen por qPCR en muestras de 4 pacientes femeninos y 4 pacientes masculinos. Se pudo determinar que el gen de referencia más estable era  $\beta$ -Actina ya que se obtuvo un valor de estabilidad de 0,051 mientras que para el resto de los genes evaluados se obtuvieron valores superiores; 0,116 para  $\beta$ 2M y 0,067 para GAPDH (Figura 8). Asimismo,  $\beta$ -Actina obtuvo la menor variación intra/inter grupo 0,001/0,026 comparado con  $\beta$ 2M (0,005/0,075) y similar comparado con GAPDH (0,001/0,049). Es importante destacar que el mejor gen de referencia es aquel que tenga el valor de estabilidad más cercano a cero y la menor

variabilidad intra/intergrupo. Por lo tanto, los resultados de expresión relativa que se presentan a continuación fueron obtenidos empleando  $\beta$ -Actina como gen de referencia.



**Figura 8.** Variación intra e intergrupo de los genes  $\beta$ -Actina,  $\beta$ 2M, GAPDH según lo estimado por *NormFinder* para pacientes femeninos (barras color rojo) y masculinos (barras color azul). Las columnas representan la variación intergrupo y las barras de error indican el intervalo de confianza para la variación intergrupala para cada candidato como el promedio de las varianzas intragrupo. El gen mejor clasificado es aquel con una variación intergrupala tan cercana a cero como sea posible y al mismo tiempo con barras de error tan pequeñas como sea posible.

## 2.2. Expresión relativa de ARNm de citoquinas en muestras de pacientes fértiles e infértiles

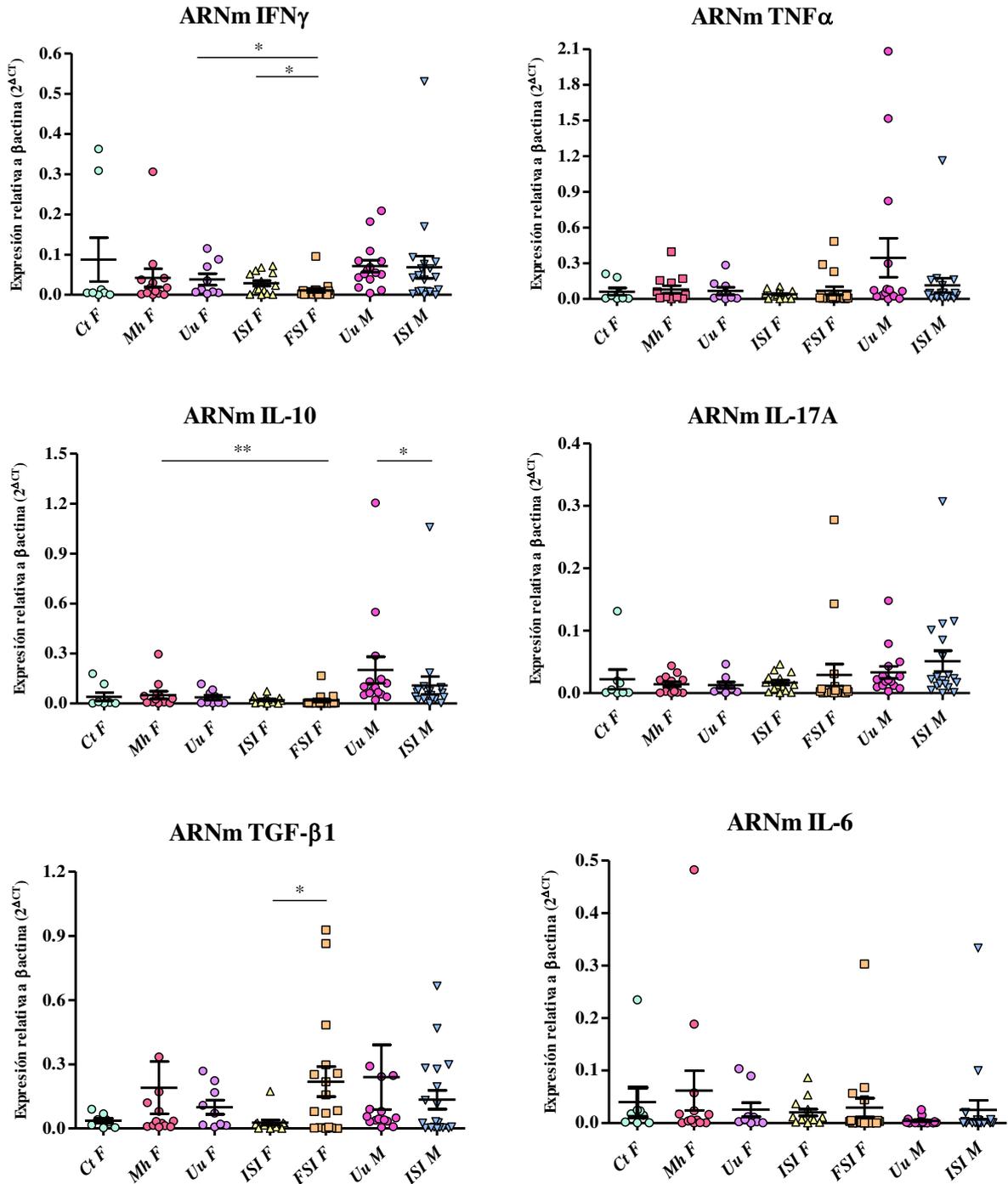
Considerando la importancia de los moduladores de la respuesta inmune, se evaluaron los niveles de expresión de ARNm de  $\text{INF-}\gamma$ ,  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-10, IL-17A,  $\text{TGF-}\beta$ 1, IL-6 e IL-8 en el fluido vaginal y el semen de pacientes con y sin las siguientes infecciones genitales: *C. trachomatis*, *M. hominis* y *U. urealyticum*.

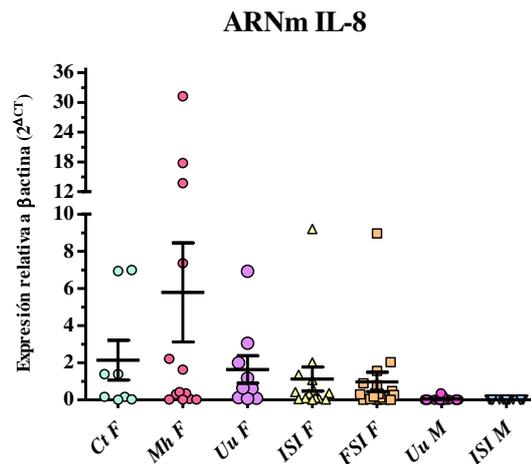
En la Figura 9 se muestra la expresión relativa de ARNm de citoquinas. La expresión de  $\text{INF-}\gamma$  se observa aumentada significativamente en el grupo de pacientes femeninos infértiles infectados con *U. urealyticum* (*Uu* F) respecto al grupo de pacientes femeninos fértiles sin infección (*FSI* F), ( $p < 0,05$ ). Por otro lado, es interesante notar que, entre las mujeres sin estas infecciones, las pacientes infértiles (*ISI* F) presentan un aumento significativo de la expresión de  $\text{INF-}\gamma$  respecto a mujeres fértiles sin estas infecciones (*FSI* F), ( $p < 0,05$ ).

La expresión de  $\text{TNF-}\alpha$  fue detectada pero no se observaron diferencias significativas entre los grupos estudiados. Cabe destacar que pacientes masculinos infértiles infectados con *U. urealyticum* (*Uu* M) presentan una tendencia al incremento de  $\text{TNF-}\alpha$  respecto a pacientes masculinos infértiles sin estas infecciones (*ISI* M).

Respecto a los niveles de  $\text{TGF-}\beta$ 1 se observó una disminución significativa en mujeres infértiles respecto a mujeres fértiles, en ausencia de infecciones ( $p < 0,05$ ).

La expresión de IL-10 en lavado vaginal, se observó aumentada significativamente en pacientes infértiles infectados con *M. hominis* (Mh F) respecto a pacientes fértiles sin estas infecciones (FSI F), ( $p < 0,01$ ). Con respecto a los hombres infértiles infectados con *U. urealyticum* (Uu M) se observó un incremento significativo de la expresión de IL-10 respecto a hombres infértiles sin infección (ISI M), ( $p < 0,01$ ).



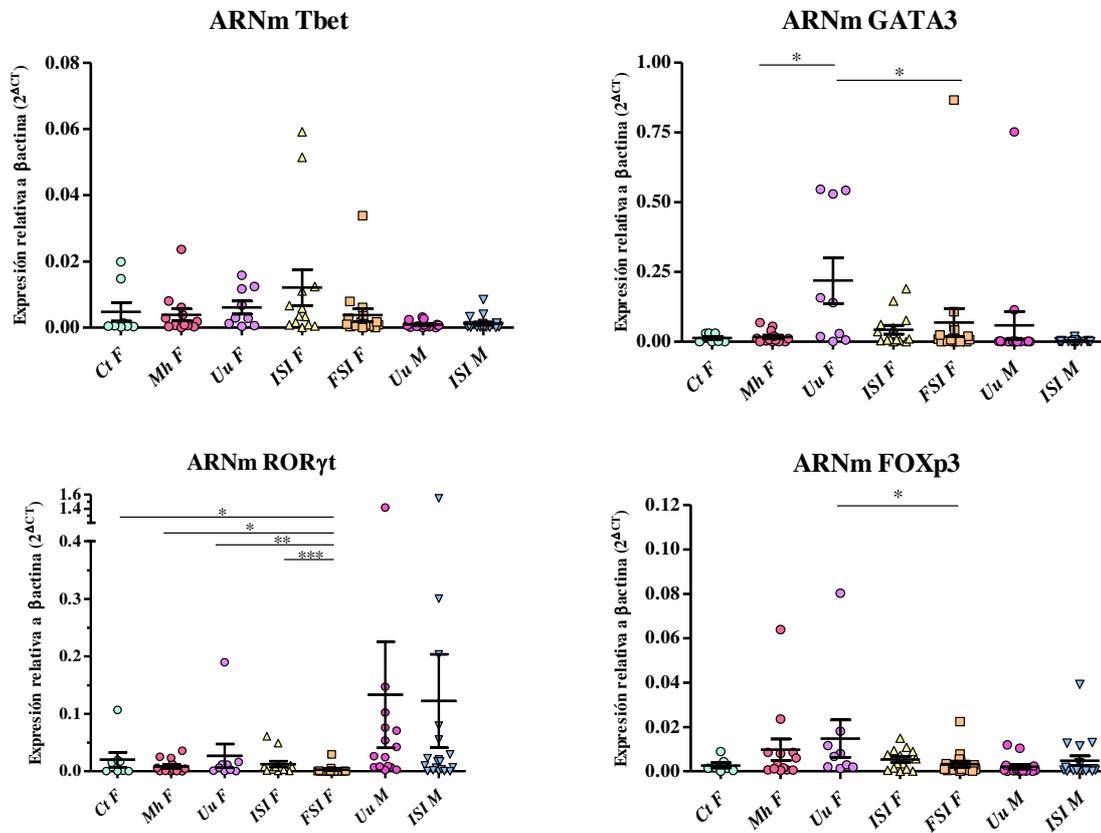


**Figura 9.** Expresión relativa de citoquinas para los diferentes grupos de pacientes. *Ct*, corresponde a los pacientes infértiles infectados con *C. trachomatis* (n=8), *Mh* a los pacientes infértiles infectados con *M. hominis* (n=13) y *Uu* a los pacientes infértiles infectados con *U. urealyticum* (F: n=9, M: n=15). ISI: pacientes infértiles sin infección (F: n=14, M: n=19). FSI: pacientes fértiles sin infección (n=17). F: pacientes Femeninos y M: pacientes masculinos. (\*p<0,05, \*\*p<0,01; Prueba de Mann Whitney).

### 2.3. Expresión relativa de ARNm de factores de transcripción maestros de LTh en muestras de pacientes fértiles e infértiles

El análisis de los principales factores de transcripción también se realizó con el fin de caracterizar el perfil de linfocitos T activados en cada situación. En la Figura 10 se muestran los resultados de expresión relativa de ARNm de factores de transcripción maestros. La expresión de FOXP3, el factor de transcripción maestro de linfocitos Treg, se observó aumentada significativamente en pacientes femeninos infectados con *U. urealyticum* (*Uu F*) respecto a mujeres sin infección (FSI F), (p<0,05). La expresión del ARNm de GATA3, factor de transcripción característico de linfocitos Th2 fue significativamente mayor en mujeres infectadas con *U. urealyticum* (*Uu F*) respecto a mujeres infectadas con *M. hominis* (*Mh F*), (p<0,05). Asimismo, al igual que lo observado para FOXP3, se hallaron aumentos significativos de la expresión de GATA3 en mujeres infectadas con *U. urealyticum* (*Uu F*) respecto a fértiles sin infección (FSI F), (p<0,05). Para el factor de transcripción maestro característico del perfil Th1, Tbet, no se observaron variaciones significativas, aunque las mujeres infértiles sin infección (ISI F) mostraron una tendencia al incremento. Se encontraron aumentos significativos de la expresión de RORγt (factor de transcripción característico del perfil Th17) en mujeres infértiles infectadas con *C. trachomatis*, *M. hominis*, y *U. urealyticum* respecto a mujeres fértiles sin estas infecciones (FSI F), (p<0,05; p<0,05; p<0,01; respectivamente). Asimismo, en ausencia de infección se observó un aumento

significativo del ARNm de ROR $\gamma$ t en mujeres infértiles (ISI F) respecto a mujeres fértiles (FSI F), ( $p < 0,001$ ).

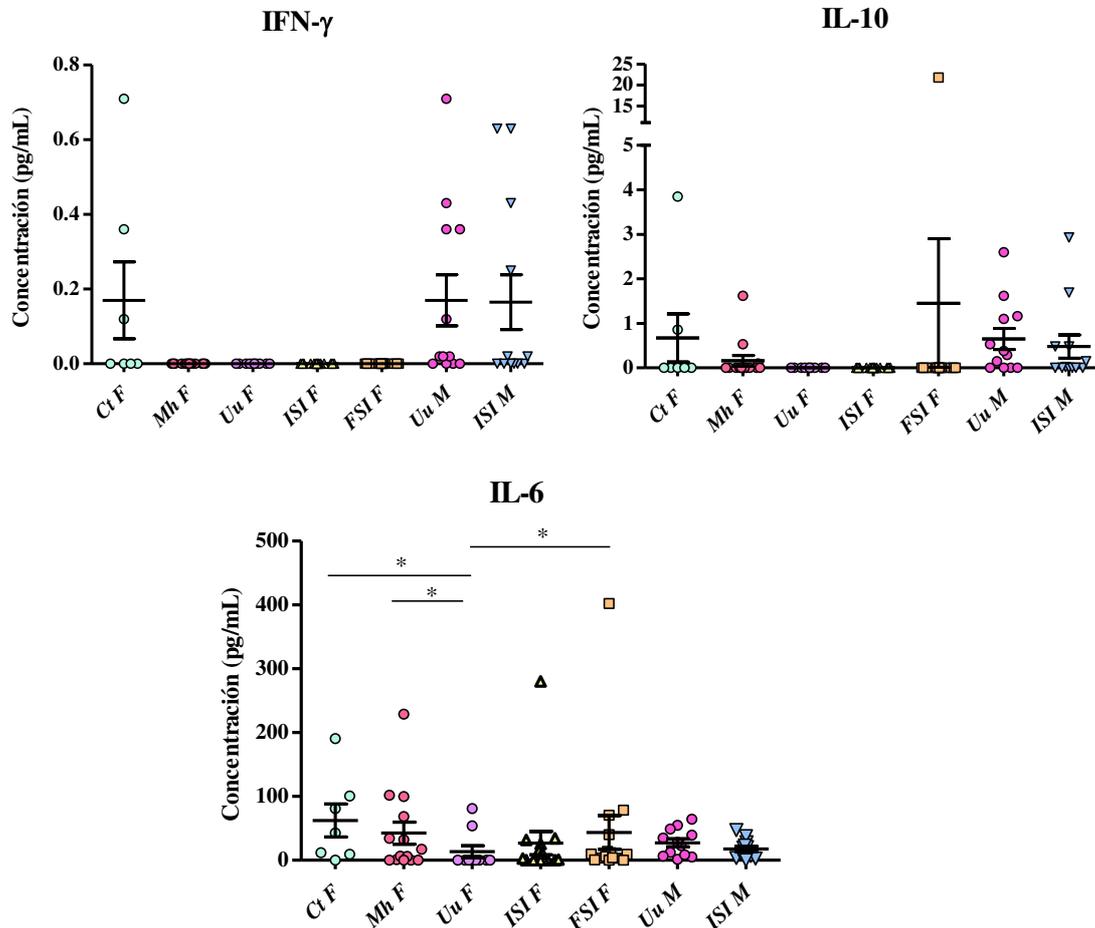


**Figura 10.** Expresión relativa de factores de transcripción maestros de LTh para los diferentes grupos de pacientes. Ct, corresponde a los pacientes infértiles infectados con *C. trachomatis* (n=8), Mh a los pacientes infértiles infectados con *M. hominis* (n=13) y Uu a los pacientes infértiles infectados con *U. urealyticum* (F: n=9, M: n=15). ISI: pacientes infértiles sin infección (F: n=14, M: n=19). FSI: pacientes fértiles sin infección (n=17). F: pacientes femeninos y M: pacientes masculinos. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; Prueba de Mann Whitney).

#### 2.4. Cuantificación de citoquinas en muestras de pacientes fértiles e infértiles

Los niveles de proteínas de IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-6 and IL-17A fueron cuantificados por citometría de flujo. En la Figura 11 se observan las concentraciones de citoquinas determinadas para cada grupo de pacientes. IL-6 fue detectada en todos los grupos, observándose los valores más bajos en mujeres infértiles infectadas con *U. urealyticum* (Uu F). Este último grupo presenta una disminución significativa de IL-6 respecto a mujeres fértiles sin infección (FSI F) y respecto a las mujeres infértiles infectadas con *C. trachomatis* (Ct F) y con *M. hominis* (Mh F), ( $p < 0,05$ ). INF- $\gamma$  e IL-10 fueron detectadas pero no se observaron diferencias significativas en la concentración de estas citoquinas entre los grupos evaluados. Sin embargo, es interesante observar que en plasma seminal de algunos pacientes y en lavado vaginal de algunas mujeres infectadas con *C.*

*trachomatis*, se observó un incremento en la concentración de IFN- $\gamma$  respecto al resto de los grupos, en los que esta citoquina no fue detectada. Respecto a IL-17A no se hallaron valores por encima del límite de detección de esta citoquina en ninguna de las muestras evaluadas pese a que el estándar correspondiente mostró una señal adecuada que permitió elaborar la curva de calibrado.



**Figura 11.** Concentración de citoquinas expresadas en pg/mL para los diferentes grupos experimentales. *Ct*, corresponde a los pacientes infértiles infectados con *C. trachomatis* (n=7), *Mh* a los pacientes infértiles infectados con *M. hominis* (n=14) y *Uu* a los pacientes infértiles infectados con *U. urealyticum* (F: n=10, M: n=12). ISI: pacientes infértiles sin infección (F: n=15, M: n=12). FSI: patients fértiles sin infección (n= 15). F: pacientes femeninos y M: pacientes masculinos. (\*p<0,05; prueba de Mann Whitney).

## 2.5. Análisis multivariado de componentes principales para los valores de expresión relativa de ARNm de citoquinas y factores de transcripción maestros de LTh para los distintos grupos de pacientes fértiles e infértiles

Dado que las moléculas estudiadas interactúan entre sí, ejerciendo frecuentemente sinergismo y antagonismo, resulta de interés evaluar sus variaciones en conjunto. Para esto, se

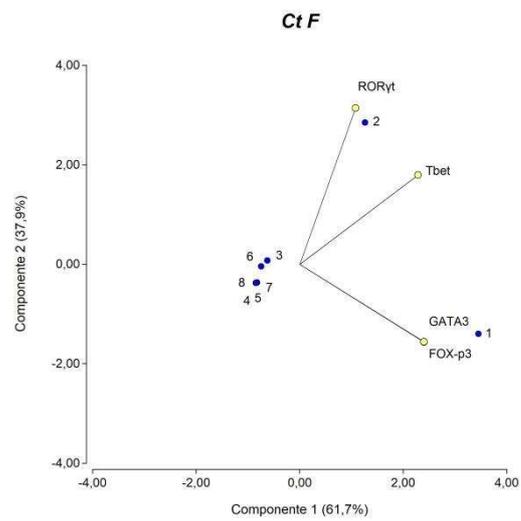
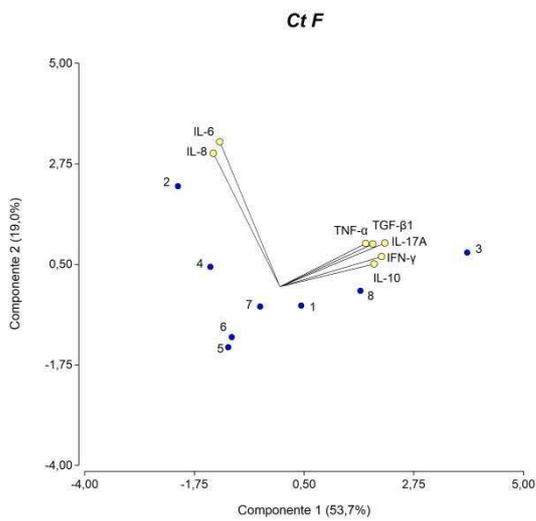
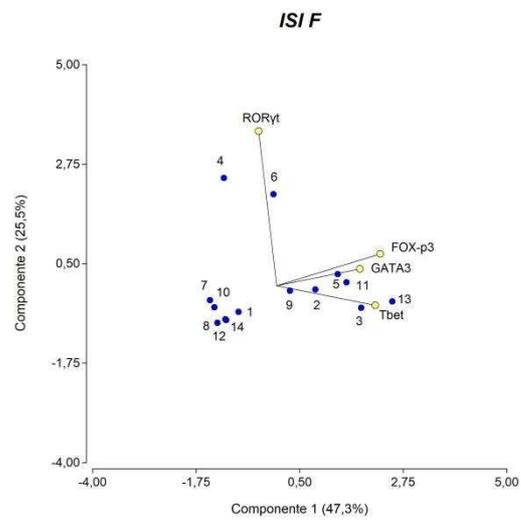
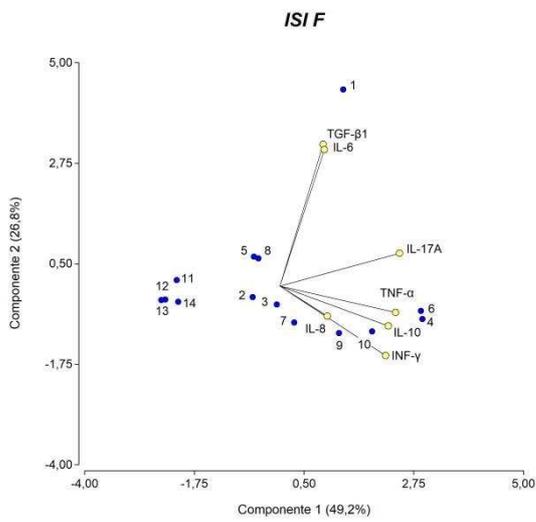
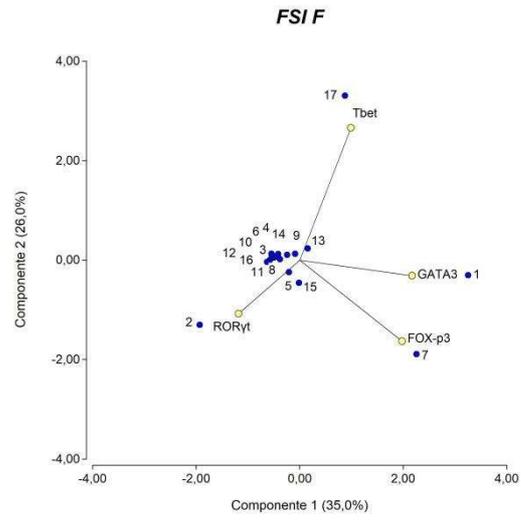
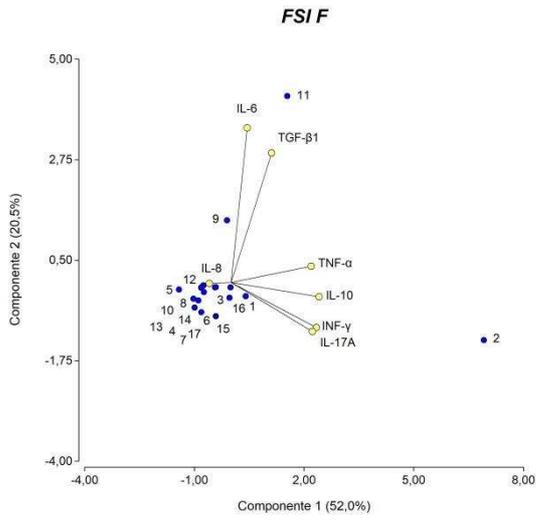
aplicó un análisis multivariado que permite describir observaciones multidimensionales obtenidas entre las variables para cada uno de los diferentes grupos de pacientes. Las variables incluidas fueron los niveles de ARNm de las citoquinas y de los factores de transcripción maestros de LTh en estudio.

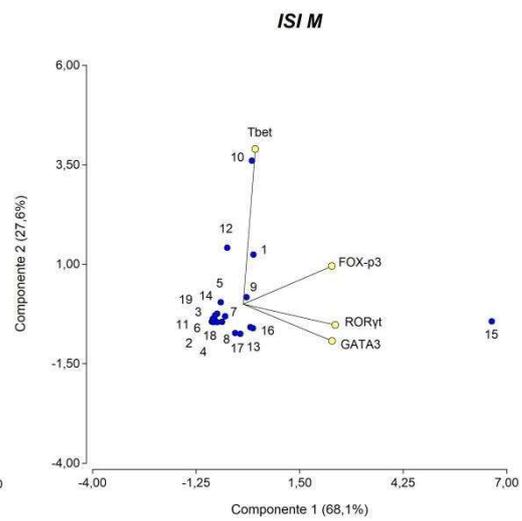
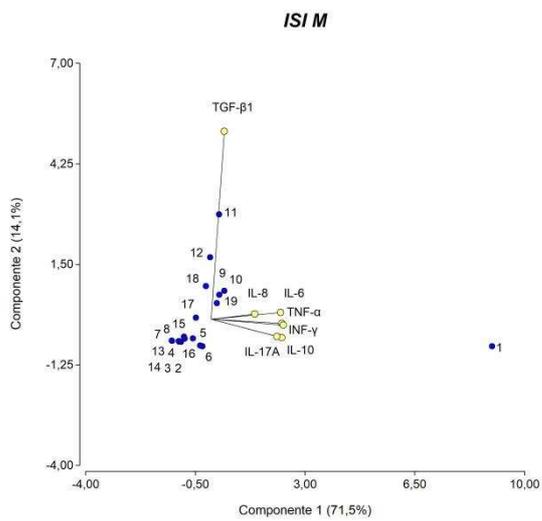
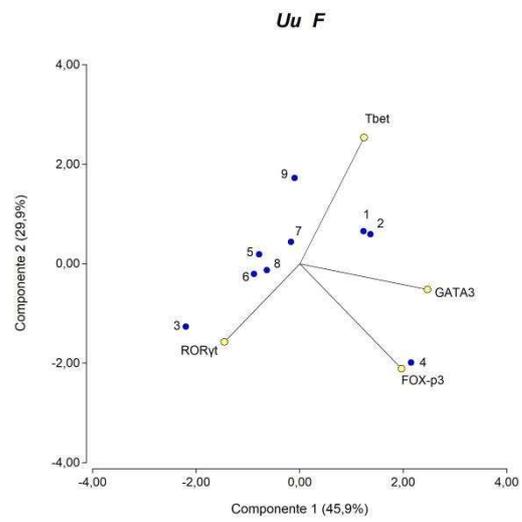
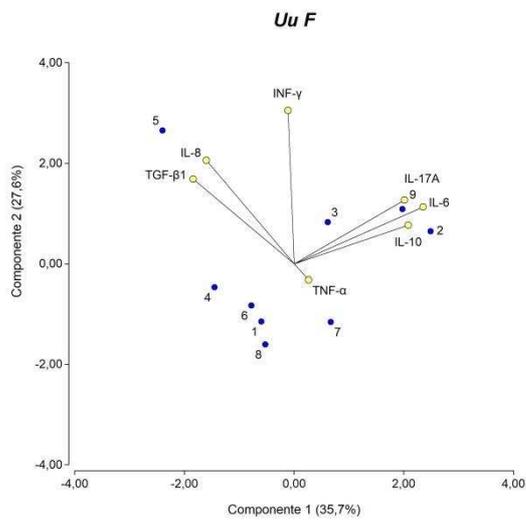
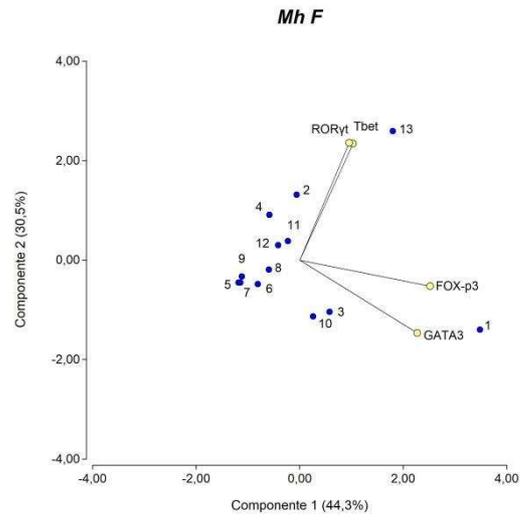
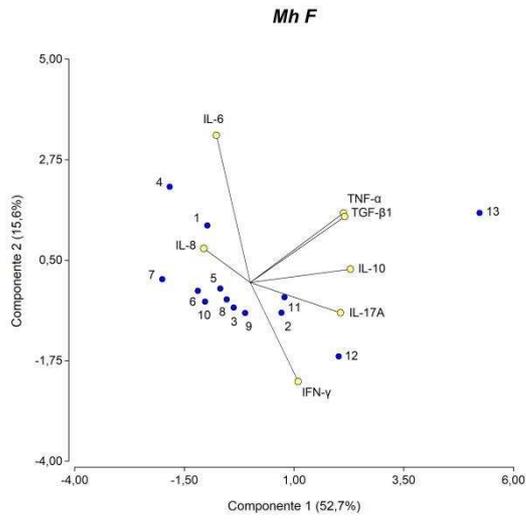
Los resultados se representan como gráficos biplot para cada grupo experimental (Figura 12), que resumen los datos de los dos o tres componentes principales que representan aproximadamente el 63-86% de la varianza observada para citoquinas y 61-100% de la varianza observada para factores de transcripción maestros de LTh. Las variables que conforman un ángulo inferior a 90° sugieren una asociación positiva. Por el contrario, las variables ubicadas para formar ángulos superiores a 90° se asocian negativamente. Cada paciente individual está representado por un punto y su posición en relación con cada vector está relacionada con el nivel de la variable correspondiente.

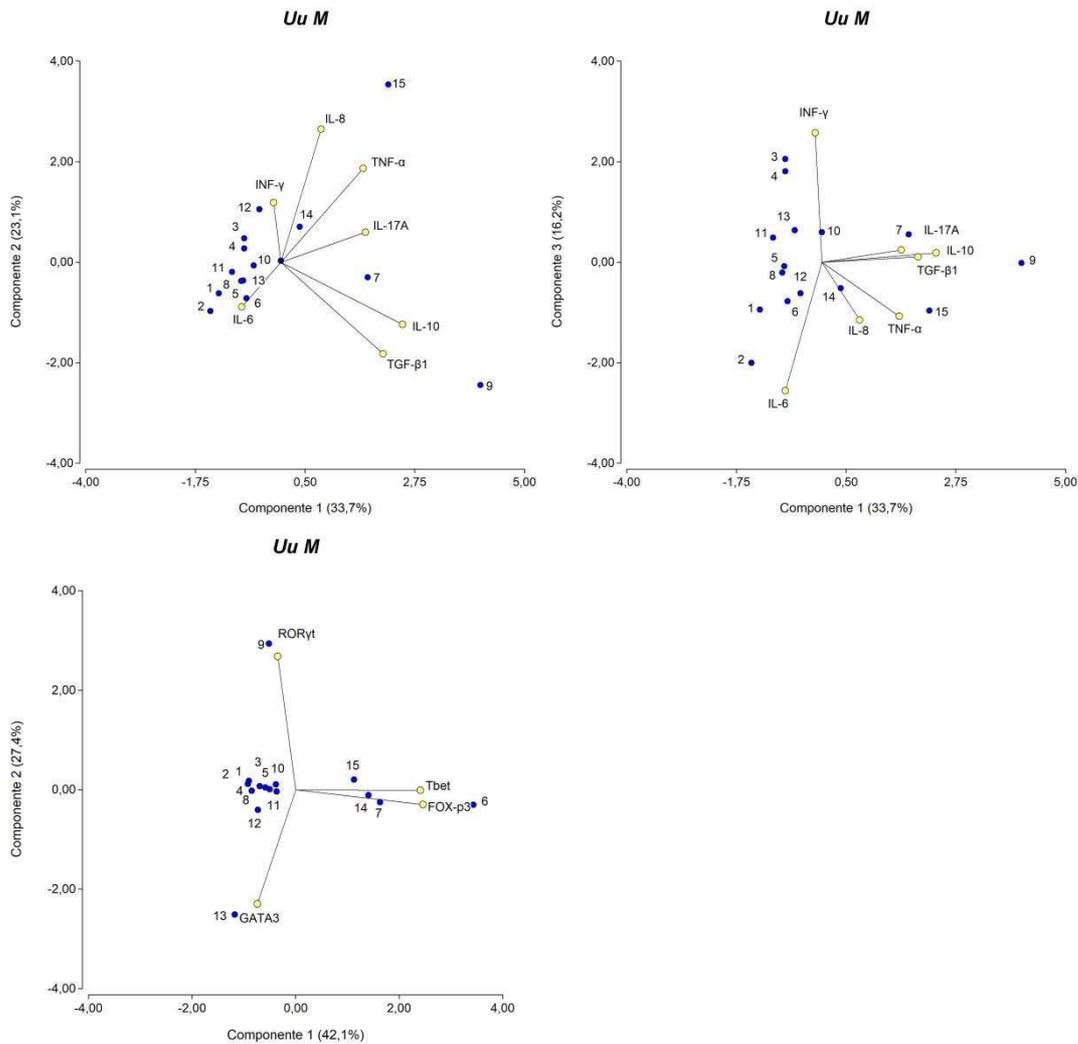
Con respecto a los pacientes femeninos, en ausencia de infección (grupos FSI F e ISI F) se observó una asociación entre IL-6 y TGF- $\beta$ , y entre TNF- $\alpha$ , IL-10, IFN- $\gamma$  e IL-17A. Sin embargo, entre los pacientes infértiles (ISI F), el 36% (5/14) se asoció con niveles elevados de las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-10, IFN- $\gamma$  e IL-17A y los factores de transcripción Tbet, GATA3, FOXP3 y ROR $\gamma$ t. En presencia de infección se observó una clara diferencia en el patrón de expresión de citoquinas y factores de transcripción maestros. La infección por *M. hominis* (*Mh F*) se asoció con niveles elevados de IL-8 en el 31% de los pacientes (4/13) y con niveles moderados a altos de IFN- $\gamma$  en otro 31%. En las infecciones por *C. trachomatis* (*Ct F*) y *U. urealyticum* (*Uu F*) se observó un aumento en el número de pacientes con altos niveles de citoquinas, pero no se observaron subgrupos de pacientes con predominio de alguna de las citoquinas evaluadas.

En cuanto a los pacientes masculinos, el 58% (11/19) del grupo infértiles sin infección (*ISI M*) mostró bajos niveles de citoquinas y factores de transcripción maestros. Al igual que con las mujeres, se observó asociación entre TNF- $\alpha$ , IL-10, IFN- $\gamma$  e IL-17A y, particularmente, se observó un subgrupo de pacientes (31%) (6/19) que se asoció con altos niveles de TGF- $\beta$ 1 Sin embargo, el patrón cambia en presencia de una infección. El 33% (5/15) de los pacientes infértiles con *U. urealyticum* (*Uu M*) se asoció positivamente con niveles elevados de IFN- $\gamma$  y otro 33%, con niveles elevados de IL-6.

En general, en cuanto a las variables estudiadas, particularmente las citoquinas, es importante señalar que la IL-10 y las citoquinas relacionadas con los perfiles Th1 y Th17 están asociadas positivamente en la mayoría de los grupos con diferentes grados de asociación según la condición. En cuanto a los factores de transcripción maestros, FOXP3 y GATA3 están asociados positivamente en la mayoría de los grupos con diferentes grados de asociación dependiendo de la condición, excepto para el grupo de pacientes masculinos infectados con *U. urealyticum* (*Uu M*).







**Figura 12.** Representación del análisis de los componentes principales de las citoquinas y los factores de transcripción maestros. Los gráficos biplot de citoquinas resumen los datos de 63-86% de la varianza observada para las variables, mientras que para los factores de transcripción maestros representan 61-100% de la varianza. Se presentan dos gráficos de biplot para el grupo de pacientes masculinos infectados con *U. urealyticum* (*Uu M*) dado que en este caso se necesitan más de 2 componentes para representar al menos el 60% de la varianza observada para las variables. Los vectores representan a cada una de las variables. Un ángulo por debajo de 90° entre las variables sugiere una asociación positiva mientras que las variables que conforman ángulos superiores a 90° están asociadas negativamente. Cada uno de los pacientes está representado con punto azul.

2.6. Correlaciones entre variables para los valores de expresión relativa de ARNm de citoquinas y factores de transcripción maestros de LTh para los distintos grupos de pacientes fértiles e infértiles.

Los resultados del estudio de correlaciones entre variables para cada grupo de pacientes se muestran en las Tablas 7A-G. Todos los grupos, excepto las mujeres infértiles infectadas con *U. urealyticum* (*Uu F*), mostraron correlaciones positivas estadísticamente significativas entre las citoquinas proinflamatorias (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17A, IL-8). Además, todos los grupos estudiados mostraron correlaciones positivas entre las citoquinas proinflamatorias y al menos una citoquina inmunomoduladora (IL-10, TGF- $\beta$ 1). Particularmente, hubo una asociación positiva entre IL-10 e IL-17 en todos los grupos, siendo estadísticamente significativa en los grupos sin infección FSI F, ISI F, ISI M e infectados con *C. trachomatis* (*Ct F*) y con *U. urealyticum* (*Uu M*). Cabe señalar que se detectó una correlación negativa significativa en el grupo de mujeres infértiles infectadas con *M. hominis* (*Mh F*) entre las citoquinas IL-17A e IL-8. En relación con el estudio entre citoquinas y factores de transcripción maestros de LTh, se encontró una correlación positiva entre IFN- $\gamma$  y Tbet en los grupos de mujeres infértiles infectadas con *M. hominis* (*Mh F*). Por otro lado, se encontró una correlación positiva entre IL-17A y ROR $\gamma$ t en mujeres fértiles (FSI F) e infértiles (ISI F) sin infección. En el grupo de pacientes masculinos infectados con *U. urealyticum* (*Uu M*) se correlacionaron positivamente IL-10 y TGF- $\beta$ 1 con FOXP3. En las matrices presentadas a continuación, se observan otras correlaciones, además de las enunciadas anteriormente.

**Tabla 7:** Correlaciones entre variables en los siguientes grupos: FSI F (A), ISI F (B), mujeres infértiles infectadas con *C. trachomatis*: *Ct F* (C), mujeres infértiles infectadas con *M. hominis*: *Mh F* (D), mujeres infértiles infectadas con *U. urealyticum*: *Uu F* (E), ISI M (F) y hombres infértiles infectados con *U. urealyticum*: *Uu M* (G).

**Tabla 7A:** matriz de correlación de variables del grupo de mujeres fértiles sin infección

FSI F	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	IL-10	IL-17A	TGF- $\beta$ 1	IL-6	IL-8	FOXP3	GATA3	Tbet	ROR $\gamma$ t
IFN- $\gamma$	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TNF- $\alpha$	0,25	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IL-10	0,51 (*)	0,36	1	-	-	-	-	-	-	-	-
IL-17A	0,56 (*)	0,38	0,9 (***)	1	-	-	-	-	-	-	-
TGF- $\beta$ 1	0,13	0,42	0,6 (*)	0,58 (*)	1	-	-	-	-	-	-
IL-6	0,3	0,51 (*)	0,18	0,09	-0,05	1	-	-	-	-	-
IL-8	-4,90E-03	0,33	-0,28	-0,27	-0,37	0,59 (*)	1	-	-	-	-
FOXP3	0,45	0,2	0,11	0,18	-0,04	0,19	0,33	1	-	-	-
GATA3	0,28	-0,11	0,22	0,3	0,03	0	-0,14	0,33	1	-	-
Tbet	0,02	0,01	0,18	0,37	0,24	-0,23	-0,06	0,43	0,62 (*)	1	-
ROR $\gamma$ t	0,83 (**)	0,45	0,66 (*)	0,7 (**)	0,4	0,33	-0,07	0,42	0,31	0,15	1

**Tabla 7B:** matriz de correlación de variables del grupo de mujeres infértiles sin infección

ISIF	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	IL-10	IL-17A	TGF- $\beta$ 1	IL-6	IL-8	FOXP3	GATA3	Tbet	RORyt
IFN- $\gamma$	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TNF- $\alpha$	0,76 (**)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IL-10	0,89 (**)	0,78 (**)	1	-	-	-	-	-	-	-	-
IL-17A	0,71 (*)	0,78 (**)	0,79 (**)	1	-	-	-	-	-	-	-
TGF- $\beta$ 1	0,4	0,61 (*)	0,5	0,64 (*)	1	-	-	-	-	-	-
IL-6	0,4	0,45	0,43	0,56 (*)	0,59 (*)	1	-	-	-	-	-
IL-8	0,73 (**)	0,56 (*)	0,52	0,48	0,41	0,38	1	-	-	-	-
FOXP3	-0,11	0,12	-0,04	0,03	0,09	-0,18	-0,17	1	-	-	-
GATA3	-0,43	-0,2	-0,31	-0,42	0,09	-0,16	-0,52	0,58 (*)	1	-	-
Tbet	-0,26	0,02	-0,16	-0,13	0,24	-0,29	-0,24	0,85 (**)	0,77 (**)	1	-
RORyt	0,5	0,56 (*)	0,6 (*)	0,49	0,62 (*)	0,35	0,21	0,24	0,17	0,23	1

**Tabla 7C:** matriz de correlación de variables del grupo de mujeres infértiles infectadas con *C. trachomatis*

Ct F	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	IL-10	IL-17A	TGF- $\beta$ 1	IL-6	IL-8	FOXP3	GATA3	Tbet	RORyt
IFN- $\gamma$	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TNF- $\alpha$	0,74	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IL-10	1 (**)	0,74	1	-	-	-	-	-	-	-	-
IL-17A	0,86 (*)	0,67	0,86 (*)	1	-	-	-	-	-	-	-
TGF- $\beta$ 1	0,36	0,48	0,36	0,57	1	-	-	-	-	-	-
IL-6	-0,26	-0,07	-0,26	-0,26	0	1	-	-	-	-	-
IL-8	-0,1	-0,36	-0,1	-0,29	-0,12	0,6	1	-	-	-	-
FOXP3	-0,05	0,21	-0,05	-0,02	-0,17	0,12	0,17	1	-	-	-
GATA3	0,24	0,55	0,24	0,21	0,02	-0,55	-0,5	0,62	1	-	-
Tbet	0,24	0,71	0,24	0,14	0,52	0,26	0,05	0,4	0,45	1	-
RORyt	0,24	0,6	0,24	0,14	-0,21	0,14	-0,29	0,55	0,5	0,38	1

**Tabla 7D:** matriz de correlación de variables del grupo de mujeres infértiles infectadas con *M. hominis*

Mh F	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	IL-10	IL-17A	TGF- $\beta$ 1	IL-6	IL-8	FOXP3	GATA3	Tbet	RORyt
IFN- $\gamma$	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TNF- $\alpha$	0,5	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IL-10	0,64 (*)	0,65 (*)	1	-	-	-	-	-	-	-	-
IL-17A	0,74 (*)	0,51	0,56	1	-	-	-	-	-	-	-
TGF- $\beta$ 1	0,67 (*)	0,45	0,66 (*)	0,29	1	-	-	-	-	-	-
IL-6	-0,03	0,41	-0,06	-0,23	0,2	1	-	-	-	-	-
IL-8	-0,34	-0,24	-0,21	-0,69 (*)	-0,23	0,18	1	-	-	-	-
FOXP3	0,25	0,48	0,13	0,14	0,42	0,3	0,04	1	-	-	-
GATA3	0,34	0,37	0,02	0,47	0,09	0,29	-0,29	0,51	1	-	-
Tbet	0,87 (**)	0,55	0,46	0,58 (*)	0,69 (*)	0,35	-0,23	0,54	0,53	1	-
RORyt	0,28	0,74 (*)	0,3	0,45	0,19	0,4	-0,33	0,3	0,29	0,3	1

**Tabla 7E:** matriz de correlación de variables del grupo de mujeres infértiles infectadas con *U. urealyticum*

Uu F	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	IL-10	IL-17A	TGF- $\beta$ 1	IL-6	IL-8	FOXP3	GATA3	Tbet	RORyt
IFN- $\gamma$	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TNF- $\alpha$	0,3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IL-10	0,5	-0,13	1	-	-	-	-	-	-	-	-
IL-17A	0,67	0,55	0,65	1	-	-	-	-	-	-	-
TGF- $\beta$ 1	0,72 (*)	0,28	-0,1	0,28	1	-	-	-	-	-	-
IL-6	0,42	0,45	0,53	0,67	-0,15	1	-	-	-	-	-
IL-8	0,25	0,15	-0,37	-0,3	0,3	-0,05	1	-	-	-	-
FOXP3	-0,3	0,1	-0,57	-0,22	0,22	-0,13	-0,12	1	-	-	-
GATA3	-0,43	-0,13	-0,53	-0,5	-0,15	0,03	0,08	0,8	1	-	-
Tbet	0,22	0,18	0,38	0,33	-0,2	0,82 (*)	0,17	0,12	0,35	1	-
RORyt	0,28	0,38	0,05	0,25	0,13	0,58	-0,1	0,18	0,32	0,3	1

**Tabla 7F:** matriz de correlación de variables del grupo de hombres infértiles sin infección

ISI M	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	IL-10	IL-17A	TGF- $\beta$ 1	IL-6	IL-8	FOXP3	GATA3	Tbet	RORyt
IFN- $\gamma$	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TNF- $\alpha$	0,76 (**)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IL-10	0,64 (**)	0,46 (*)	1	-	-	-	-	-	-	-	-
IL-17A	0,65 (**)	0,56 (*)	0,76 (**)	1	-	-	-	-	-	-	-
TGF- $\beta$ 1	0,72 (**)	0,79 (***)	0,51 (*)	0,41	1	-	-	-	-	-	-
IL-6	-0,04	0,28	-0,04	0,07	0,07	1	-	-	-	-	-
IL-8	0,08	0,3	-0,29	-0,02	-0,05	0,44	1	-	-	-	-
FOXP3	0,31	0,34	0,17	0,44	0,14	0,1	0,48 (*)	1	-	-	-
GATA3	-0,38	-0,12	-0,32	-0,08	-0,26	0,47 (*)	0,52 (*)	0,31	1	-	-
Tbet	0,44	0,44	0,28	0,54 (*)	0,17	-0,09	0,26	0,77 (**)	-0,04	1	-
RORyt	-0,27	0,06	-0,02	0,15	-0,16	0,12	0,07	0,48 (*)	0,31	0,49 (*)	1

**Tabla 7G:** matriz de correlación de variables del grupo de hombres infértiles infectados con *U. urealyticum*

Uu M	IFN- $\gamma$	TNF $\alpha$	IL-10	IL-17A	TGF- $\beta$ 1	IL-6	IL-8	FOXP3	GATA3	Tbet	RORyt
IFN- $\gamma$	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TNF- $\alpha$	0,03	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IL-10	0,4	0,65 (*)	1	-	-	-	-	-	-	-	-
IL-17A	0,05	0,71 (*)	0,65 (*)	1	-	-	-	-	-	-	-
TGF- $\beta$ 1	0,35	0,38	0,59 (*)	0,5	1	-	-	-	-	-	-
IL-6	-0,24	0,59 (*)	0,16	0,17	0,13	1	-	-	-	-	-
IL-8	-0,13	0,8 (**)	0,45	0,56 (*)	0,35	0,43	1	-	-	-	-
FOXP3	-0,1	0,73 (**)	0,53 (*)	0,79 (**)	0,57 (*)	0,4	0,84 (**)	1	-	-	-
GATA3	-0,04	0,71 (**)	0,4	0,47	0,23	0,31	0,85 (**)	0,71 (**)	1	-	-
Tbet	-0,05	0,61	0,41	0,63 (*)	0,53 (*)	0,32	0,76 (**)	0,91 (***)	0,66 (*)	1	-
RORyt	0,35	0,27	0,41	0,24	0,22	0,2	-0,09	-0,1	-0,16	-0,27	1

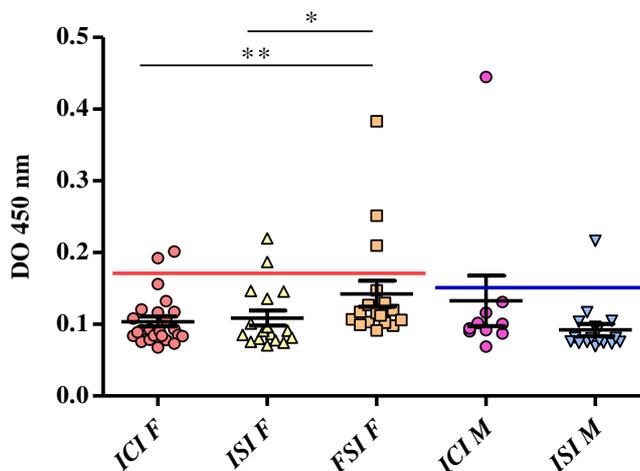
El valor indicado representa el coeficiente de correlación de Spearman, y la significación estadística se indica con asterisco \*p <0,05; \*\*p <0,01; \*\*\*p <0,001.

### 3. Análisis de la presencia de anticuerpos antiespermáticos en muestras de lavado vaginal y plasma seminal de pacientes fértiles e infértiles y con y sin infecciones

Teniendo en cuenta que algunos factores inmunológicos, como los ASA, se han asociado con la infertilidad, se realizó un ensayo ELISA para detectar ASA en muestras de pacientes fértiles e infértiles con y sin infecciones genitales. Los valores de *cut-off* fueron 0,171, para el grupo de pacientes femeninos, y 0,154, para el grupo de pacientes masculinos.

En la Figura 13, se muestran los valores de DO obtenidos para cada grupo. Considerando los valores de *cut-off*, los datos indican que el 17% de las mujeres fértiles presentaron anticuerpos anti-espermáticos en lavado vaginal mientras que el 12% de las mujeres infértiles sin y con infección (*C. trachomatis* y *U. urealyticum*) fueron positivas para ASA. Esta diferencia fue significativa entre FSI F vs ISI F (p < 0,05) y entre FSI F y ICI F (p < 0,01). Cuando se analizaron los niveles de ASA en hombres, no se observaron diferencias significativas entre los grupos ICI M (10%) e ICI M (6%).

## ELISA ASA



**Figura 13.** Evaluación de anticuerpos antiespermáticos en lavado vaginal y en semen. Respuesta inmune humoral contra los espermatozoides evaluados mediante ELISA indirecto. Niveles de anticuerpos en fluido vaginal y semen expresados como DO (media  $\pm$  SEM) para cada paciente en los grupos: FSI F (n = 17), ISI F (n = 17), ICI F (n = 25), ISI M (n = 17) y ICI M (n = 10). La línea roja indica el *cut-off* para pacientes femeninos mientras que la línea azul indica el *cut-off* para pacientes masculinos. (\*p <0.05, \*\*p <0,01; prueba de Mann Whitney).

#### 4. Análisis de relaciones entre el perfil de respuesta inmune hallado en los pacientes con infecciones genitales y la infertilidad

Teniendo en cuenta la relación entre la infertilidad, las ITS y el rol de la respuesta inmune, se realizó un análisis para encontrar posibles asociaciones a partir de los datos clínicos del paciente.

Este estudio reveló una asociación significativa entre el sexo y el tipo de infección, particularmente los pacientes femeninos infértiles estuvieron asociados con infección por *M. hominis* (p<0,01) mientras que los pacientes infértiles masculinos, con la infección por *U. urealyticum* (p<0,001).

En la Tabla 8, se muestran los parámetros de rutina en secreción vaginal de mujeres fértiles, mujeres infértiles con infecciones: *C. trachomatis* (n=8), *M. hominis*: (n=13) y *U. urealyticum*: (n=9) y mujeres infértiles sin estas infecciones. Un mayor número de pacientes femeninos con infecciones por *C. trachomatis* y *M. hominis* tuvieron positiva la prueba de aminas en comparación con las mujeres sin infecciones (p<0,05; p<0,001; respectivamente). La infección por *M. hominis* se asoció con un aumento de células *clue* en comparación con FSI F y ISI F (p<0,01). Esto podría estar asociado con el hecho de que, entre las mujeres con *M. hominis*, hay una mayor frecuencia de VB con respecto a las mujeres fértiles e infértiles sin infección (p<0,01; p <0,01). Además, en el

grupo de mujeres con *M. hominis*, el porcentaje de pacientes con una microbiota normal es significativamente menor que en el grupo de mujeres infértiles sin infección ( $p < 0,001$ ; prueba de Fisher). En la Tabla 9, se muestran los parámetros espermáticos para cada grupo de pacientes masculinos. No se observa diferencia significativa en la calidad espermática entre pacientes infértiles infectados con *U. urealyticum* y pacientes infértiles sin infección.

Por otro lado, se realizaron estudios de correlación entre ASA y citoquinas para pacientes femeninos y masculinos, pero no se encontraron asociaciones significativas entre los factores inmunes de la respuesta celular y la respuesta humoral. Asimismo, se analizaron correlaciones entre citoquinas y los estados vaginales básicos, pero no se hallaron asociaciones significativas.

**Tabla 8.** Parámetros de exudados vaginales de rutina de mujeres fértiles (FSI F), mujeres infértiles infectadas con *C. trachomatis* (Ct F), *M. hominis*: (Mh F) y *U. urealyticum*: (Uu F) y mujeres infértiles sin estas infecciones (ISI F).

		<b>FSI F</b> <b>(n=17)</b>	<b>ISI F</b> <b>(n=17)</b>	<b>Ct F</b> <b>(n=8)</b>	<b>Mh F</b> <b>(n=13)</b>	<b>Uu F</b> <b>(n=9)</b>
	<b>Prueba de Aminas</b>	+ 29% (5/17)	+ 6% (1/17)	+ 50% * (4/8)	69% *** (9/13)	+ 22% (2/9)
	<b>pH</b>	4,9 <sup>a</sup> (4-6)	5 <sup>a</sup> (4-5,5)	5,3 <sup>a</sup> (4,6-6,5)	5 <sup>a</sup> (4,6-7)	5 <sup>a</sup> (4-5,8)
	<b>Trichomonas vaginalis</b>	0% (0/17)	12% (2/17)	0% (0/8)	15% 2/13	0% (0/9)
	<b>Células Clue</b>	18% (3/17)	18% (3/17)	63% 5/8	77%** (10/13)	22% 2/9
	<b>Levaduras</b>	0% (0/17)	6% (1/17)	25% 2/8	8% 1/13	11% 1/9
	<b>Respuesta inflamatoria vaginal (RIV)</b>	47% (8/17)	18% (3/17)	50% (4/8)	23% (3/13)	33% (3/9)
	<b>Mobiluncus</b>	0% (0/17)	0% (0/17)	0% (0/8)	7% 1/13	0%
<b>Estados Vaginales Básicos</b>	<b>Microbiota Normal</b>	35% (6/17)	70% *** (12/17)	25% (2/8)	8% (1/13)	44% (4/9)
	<b>Microbiota Normal + RIV</b>	35% (6/17)	0% (0/17)	13% (1/8)	8% (1/13)	22% (2/9)
	<b>Microbiota Intermedia</b>	0% (0/17)	0% (0/17)	0% (0/8)	0% (0/13)	11% (1/9)
	<b>Vaginosis Bacteriana</b>	18% (3/17)	12% (2/17)	25% (2/8)	69% ** (9/13)	22% (2/9)
	<b>Vaginitis Microbiana no específica</b>	12% (2/17)	18% (3/17)	38% (3/8)	15% (2/13)	0% (0/9)

El valor indicado por el superíndice 'a' representa la mediana, y luego los valores mínimo y máximo se muestran entre paréntesis. Los valores en negrita y con asteriscos (\*) son estadísticamente diferentes en comparación con aquellos en negrita sin asteriscos (\*p<0.05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; prueba de Fisher).

**Table 9.** Parámetros espermáticos de pacientes masculinos infértiles sin infección (ISI M) e infértiles con infección: *U. urealyticum* (Uu M).

	<b>Parametros espermáticos</b>	<b>ISI M (n=19)</b>	<b>Uu M (n=15)</b>
<b>Exámenes macroscópicos</b>	Volumen [LRI: ≥1,5] (mL)	79 % (15/19) 2,5 <sup>a</sup> (0,8-7,2)	100% (15/15) 3,6 <sup>a</sup> (1,5-8,3)
	pH [LRI: ≥7,2]	100% (19/19) 7,7 <sup>a</sup> (7,2-8,0)	100% (19/19) 7,8 <sup>a</sup> (7,2-8,0)
	Licuefaccion	100% completa (15/15)	100% completa (19/19)
	Consistencia	26% aumentada (5/19) 53%disminuída (10/19) 21% normal (4/19)	33% aumentada (5/15) 67% disminuída (10/15) 33% normal (5/15)
<b>Exámenes microscópicos</b>	Agregación aislada	Si 74% (14/19)	Si 87% (13/15)
	Aglutinación	Si 32% (6/19)	Si 7% (1/15)
	Cristales	0% (0/19)	0% (0/15)
<b>Motilidad espermática</b>	Móviles Progresivos (MP) [LRI: ≥32] (%)	84% (16/19) 62 <sup>a</sup> (14-79)	80% (12/15) 47 <sup>a</sup> (3-80)
	MP+No Progresivos [LRI: ≥40] (%)	84% (16/19) 73 <sup>a</sup> (23-87)	93% (14/15) 64,5 <sup>a</sup> (37-88)
<b>Test de Vitalidad espermática</b>	Espermatozoides vivos [LRI: ≥58] (%)	95% (18/19)	93% (14/15)
<b>Células redondas por ml de semen</b>	Células germinales inmaduras ([LRS: <4.10 <sup>5</sup> ] /mL semen)	58% (11/19) 5,5 x10 <sup>a</sup> (6,8 x10 <sup>4</sup> -4,2 x10 <sup>6</sup> )	47% (7/15) 6,6 x10 <sup>a</sup> (2 x10 <sup>5</sup> -4,8 x10 <sup>8</sup> )
	Macrófagos ([LRS: <6.10 <sup>5</sup> ] /mL semen)	100% (19/19) 1,1 x10 <sup>a</sup> (1,1 x10 <sup>4</sup> -1,6 x10 <sup>5</sup> )	93% (14/15) 1,1 x10 <sup>a</sup> (1,1 x10 <sup>4</sup> -9,3 x10 <sup>5</sup> )
	Leucocitos polimorfonucleares ([LRS: <1.10 <sup>6</sup> ] / mL semen)	100% (19/19) 1,4 x10 <sup>a</sup> (1,1 x10 <sup>4</sup> -6,2 x10 <sup>5</sup> )	93% (14/15) 4,81 x10 <sup>a</sup> (3,3 x10 <sup>4</sup> -4,9 x10 <sup>6</sup> )
<b>Concentración Espermática</b>	[LRI: 15] (10 <sup>6</sup> /mL semen)	100% (19/19) 32,5 <sup>a</sup> (1,7-131)	100% (15/15) 33,1 <sup>a</sup> (10,3-130)
<b>Total de espermatozoides</b>	[LRI: 39] (10 <sup>6</sup> /eyaculado)	63% (12/19) 126,8 <sup>a</sup> (5,9-552,3)	93% (14/15) 171,1 <sup>a</sup> (26,9-530)
<b>Morfología espermática</b>	Normal [LRI: ≥4] (%)	57% (11/19) 4,5 <sup>a</sup> (1-9)	66% (10/15) 5 <sup>a</sup> (1-9)

'LRI' indica el Límite de Referencia Inferior establecido por la OMS, que se define como el valor mínimo con el que se logra el embarazo. Se informa el porcentaje del número de pacientes que excede el LRI, excepto para el parámetro células redondas por mL de semen, donde se informa el porcentaje de pacientes que no superan el LRS (Límite de Referencia Superior). El valor indicado por el superíndice 'a' representa la mediana y los valores mínimo y máximo se muestran entre paréntesis.

## Discusión

### *ITS como causa de infertilidad. Prevalencia de C. trachomatis, M. hominis, U. urealyticum en pacientes infértiles.*

Actualmente, el incremento de casos de infertilidad se está convirtiendo en un problema de salud con gran impacto en los países subdesarrollados y desarrollados que parece coincidir con el incremento de las ITS [364]. Teniendo en cuenta que la principal causa prevenible de infertilidad son las ITS, uno de los objetivos de la Estrategia Global del Sector de Salud contra las ITS para 2016-2021 de la OMS es fortalecer la vigilancia y aumentar la conciencia sobre la prevalencia de las ITS [365]. Por lo tanto, el primer paso para comprender el impacto de las ITS y su relación con la infertilidad es conocer la prevalencia de infecciones genitales.

En la presente tesis se determinó que el 29,9 % de los pacientes infértiles evaluados (193) del hospital JB Iturraspe de Santa Fe, Argentina tiene alguna de las tres infecciones genitales *C. trachomatis* (4,6%), *M. hominis* (7,7%) y *U. urealyticum* (13,9%). Estos datos epidemiológicos son muy valiosos porque según la bibliografía consultada no existen datos actuales que brinden información sobre estas ITS en pacientes infértiles de nuestra región. Asimismo, en Argentina y América Latina también son escasos los datos actuales sobre la prevalencia de estas ITS.

De las tres ITS evaluadas, el porcentaje de infección más bajo se obtuvo para *C. trachomatis*. El 6% del total de las mujeres infértiles presentó infecciones con *C. trachomatis* mientras que entre los hombres infértiles, el porcentaje fue menor, 1,4%. Un estudio realizado en Córdoba, Argentina reveló que la prevalencia de *C. trachomatis* en mujeres infértiles fue del 7,2% [234], un porcentaje similar a los hallazgos de la presente tesis. Es importante considerar que la prevalencia depende del área de residencia, método de diagnóstico, antecedentes socio-económicos, ocupación, entre otros. Esto explica la variabilidad encontrada en la bibliografía y refuerza la importancia de contar con datos regionales para establecer políticas de salud. Por otro lado, cabe mencionar que el 50% de los hombres y el 80% de las mujeres con *C. trachomatis* no presentan síntomas en la etapa temprana de la infección, por lo tanto, muchas personas pueden permanecer sin diagnosticar [209], enmascarando la verdadera prevalencia de esta infección. En muchos casos la infección se detecta frente a alguna de sus consecuencias, como es la infertilidad [323], [366].

La más frecuente de las tres infecciones evaluadas fue *U. urealyticum*. Este resultado es consistente con varios estudios que también observan una mayor prevalencia de *U. urealyticum* cuando se evalúa la prevalencia de estas tres infecciones en pacientes infértiles [6], [367], [368]. Los resultados obtenidos respecto a la infección por *U. urealyticum* revelan que el 9% de las mujeres infértiles y el 22% de hombres infértiles presentan esta infección. Estudios recientes

indican que la prevalencia en mujeres infértiles está comprendida entre 4% y 39% [187], [222], [369], [370], mientras que en hombres infértiles es entre 10% y 39% [306], [328], [371], [372]. Por lo tanto, los valores de prevalencia obtenidos en la presente tesis están incluidos dentro de los rangos reportados por diferentes autores, aunque sean de regiones y niveles socioeconómicos diferentes. Actualmente varios autores asocian la infertilidad masculina con la infección por *U. urealyticum* [323], [328], [372], [373] coincidente con los resultados de la presente tesis.

Entre los pacientes infértiles con infecciones evaluados, se detectaron 15 mujeres con infección por *M. hominis*, mientras que ningún hombre fue positivo para este patógeno. Estos resultados revelaron una asociación significativa entre el sexo y el tipo de infección en particular las mujeres infértiles con infección por *M. hominis*. Esta asociación también coincide con la obtenida por otros autores [6], [323], [373]. En la literatura, se han encontrado pocos estudios actuales que evalúen *M. hominis* en hombres infértiles. Algunos trabajos indican que la prevalencia de *M. hominis* en hombres infértiles suele ser entre el 3 y el 33% [198], [374]. Respecto a las mujeres infértiles, existen más estudios, comparados con los reportados de hombres, que evalúan la presencia de *M. hominis* y que indican que la prevalencia está entre 3% y 8% [187], [369], [370], [374]. Los resultados obtenidos en la presente tesis revelaron una mayor prevalencia de *M. hominis* en mujeres infértiles (13%) que puede deberse a antecedentes socio-económicos, región, edad, ocupación, entre otros.

Teniendo en cuenta los porcentajes de prevalencia obtenidos para cada infección genital no se descarta la posibilidad de que la presencia de estas infecciones contribuya a los trastornos de fertilidad.

### ***Citoquinas y Linfocitos T helper como potenciales factores inmunológicos causales de infertilidad.***

Las citoquinas son mediadores inmunológicos que forman parte de una compleja red de comunicación entre células. Estos mediadores regulan la fertilidad, tanto de manera positiva como negativa. Por lo tanto, es necesario un delicado equilibrio entre citoquinas pro y antiinflamatorias para lograr un embarazo exitoso. Asimismo, los LTh desempeñan un papel central en la modulación de las respuestas inmunitarias adaptativas frente a infecciones [375]. Es por esto que la respuesta inmune del huésped es uno de los determinantes más importantes del embarazo y frente a infecciones genitales [204].

En este trabajo se caracterizaron los niveles de expresión relativos de los factores de transcripción maestros de las poblaciones de LTh y de citoquinas. Asimismo, se cuantificó la concentración de algunas citoquinas en muestras humanas. Cuando se realizan investigaciones en pacientes, uno de los inconvenientes que existe es que se desconoce cuándo contrajeron la

infección, lo que podría explicar la variabilidad en los resultados de los marcadores inmunes. Sin embargo, los resultados que pueden obtenerse a partir de estos estudios pueden ser muy valiosos porque permiten comprender la importancia de las citoquinas en la infertilidad y superar el principal obstáculo referido a la dificultad de extrapolar los resultados obtenidos de modelos animales a humanos [376], [377].

#### Caracterización de la expresión de citoquinas

El rol de *Ureaplasma* y *Mycoplasma* en pacientes con infertilidad aún no se comprende completamente [368]. La presencia aguda o crónica de cualquier patógeno en el TRF superior puede generar efectos adversos en la fertilidad, debido a la alteración del ambiente que se produce por las reacciones inflamatorias [368]. Particularmente, la presencia de *M. hominis* y *U. urealyticum* se asocia con la presencia de citoquinas inflamatorias [378].

Los resultados de la presente tesis indicaron un aumento significativo de la expresión de IFN- $\gamma$ , en lavado vaginal de mujeres infértiles con *U. urealyticum* en comparación con mujeres fértiles sin infección.

Con respecto a *M. hominis*, un aumento de IL-8 se observó en las mujeres infértiles pero no fue significativo en comparación con los otros grupos de pacientes. IL-8 es una citoquina que participa en la respuesta inmune innata como quimioattractante de neutrófilos los cuales se asocian con estados de inflamación. Asimismo, en lavado vaginal de pacientes infértiles infectadas con *M. hominis* se observó un aumento significativo en la expresión de IL-10 con respecto a las mujeres fértiles sin infecciones. Diversos autores coinciden en que altos niveles de esta citoquina evitan los efectos patológicos de las citoquinas proinflamatorias y juegan un papel en la limitación del daño inducido por el huésped en el tracto genital superior [379] contribuyendo al éxito del embarazo [380]. Sin embargo, Scoot y colaboradores en un ensayo *in vitro* de estimulación de CD humanas determinaron que *M. hominis* aumentaba los niveles de IL-10 pero no ocurría lo mismo con las citoquinas inflamatorias tales como IFN- $\gamma$  e IL-12 [308]. Sus resultados sugieren que los patógenos típicamente asociados con infecciones crónicas inducen sólo la secreción de IL-10. Por lo tanto, el efecto inmunomodulador de esta citoquina no sólo puede inhibir estados inflamatorios [381] sino que también puede crear un ambiente favorable para la persistencia de microbios [240]. De ese modo, una secreción excesiva de IL-10 podría conducir a una eliminación incompleta de bacterias desarrollando un estado de anergia que da como resultado trastornos relacionados con la fertilidad [240]. Por lo tanto, la presencia de IL-10 en mujeres infértiles infectadas con *M. hominis* podría indicar que se trata de infecciones crónicas en las cuales esta citoquina favorecería la persistencia de *M. hominis* contribuyendo indirectamente a los trastornos de fertilidad.

Respecto a la infección por *C. trachomatis* en mujeres infértiles, no se detectaron diferencias significativas en las citoquinas analizadas por PCR en tiempo real en comparación con mujeres fértiles e infértiles sin infección.

El impacto de cualquier inflamación o infección del tracto reproductivo masculino sobre la fertilidad depende de muchos factores, incluyendo la naturaleza crónica/aguda de la enfermedad y el tipo de patógeno invasor. Los principales mediadores de la respuesta inflamatoria en el tracto reproductor masculino son las citoquinas proinflamatorias, principalmente TNF- $\alpha$  [382], [383]. Las altas concentraciones de estas moléculas se han asociado con leucospermia. Varios investigadores indicaron que macrófagos y LT estimulados con *U. urealyticum* *in vitro* producen TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  [345], [384], [385]. Sin embargo, *in vivo*, la relación entre *U. urealyticum* y TNF- $\alpha$ , requiere de estudios adicionales [386]. IL-10 también se libera en estados de inflamación y se han encontrado diferentes niveles de esta citoquina en el semen de hombres infértiles [387]. En la presente tesis, se observó un aumento significativo en el nivel de expresión de IL-10 en hombres infértiles infectados con *U. urealyticum* en comparación con hombres infértiles sin infección, lo que coincide con la bibliografía. Además, se observó un aumento, aunque no significativo, en el ARNm de TNF- $\alpha$  en hombres infértiles infectados con *U. urealyticum* en comparación con hombres infértiles sin infección. Probablemente, las diferencias en los niveles de TNF- $\alpha$  no fueron significativas entre estos grupos de pacientes debido al efecto inmunomodulador que podría estar ejerciendo IL-10. Según los resultados obtenidos se sugiere que la infección por *U. urealyticum* podría estimular la liberación de TNF- $\alpha$  *in vivo*, además de lo observado *in vitro* como han descrito otros autores previamente [60], [385], [388], [389].

Por otro lado, es interesante observar que en ausencia de estas infecciones, las mujeres infértiles presentan una alteración en la expresión de las citoquinas, particularmente un aumento de IFN- $\gamma$  y disminución de TGF- $\beta$ 1 respecto a las mujeres fértiles. Diferentes autores han demostrado que IFN- $\gamma$  tiene efectos nocivos en el embarazo [390], [391] y se ha asociado al aborto espontáneo recurrente [176], [181], parto prematuro [392], [393] y la ruptura prematura de membranas fetales [394]. TGF- $\beta$ 1 es una citoquina inmunomoduladora secretada por los linfocitos Treg para prevenir el daño tisular [395], y contribuir al éxito del embarazo [95]. Por lo tanto, la alteración en estas citoquinas que presentan las mujeres infértiles sin infección es un indicador de algún trastorno, el cual podría ser una potencial causa de infertilidad.

En cuanto al análisis de los niveles de proteínas, fue posible cuantificar IL-6, IFN- $\gamma$  e IL-10. En particular, se observó que mujeres infértiles con *C. trachomatis* y *M. hominis* presentaron niveles más altos de IL-6 que mujeres infértiles con *U. urealyticum*. Varios autores sugieren que la familia de citoquinas de IL-6 podría estar involucrada en la respuesta inmune y/o el daño tubárico inducido por las infecciones bacterianas por *C. trachomatis* y *Mycoplasma genitalium* del tracto

genital superior [240], [396]. La citoquina IL-6, entre otras, está involucrada en promover el reclutamiento de células inmunes, desencadenar respuestas inflamatorias y contribuir activamente al desarrollo de respuestas inmunes innatas y adaptativas [240]. Esta citoquina, entre otras, se detectó en las secreciones cervicales de mujeres infectadas con *C. trachomatis*, así como también en mujeres con trastornos de fertilidad [240], [397]. Por otro lado, existen trabajos que indican que la biodisponibilidad excesiva de IL-6 puede inhibir la generación de linfocitos Treg requeridas para la tolerancia al embarazo [398]. Asimismo, hay reportes que describen que la IL-6 es significativamente más alta en el moco cervical de pacientes que sufrieron abortos que en aquellas que lograron un nacimiento vivo [399]. Particularmente, en casos de abortos recurrentes se ha observado una correlación positiva entre los niveles de IL-6 e IL-1 $\beta$  y de linfocitos Th17 [400]. Es importante recordar que la diferenciación a linfocitos Th17 es inducida por las citoquinas TGF- $\beta$  e IL-6 y diversos trabajos han demostrado que ambas se producen en respuesta a *C. trachomatis* [261], [401], [402]. Todos los trabajos mencionados anteriormente están en concordancia con los resultados obtenidos respecto a los pacientes con *C. trachomatis*, donde se observa un aumento significativo de los niveles de expresión de ROR $\gamma$ t, factor de transcripción característico del perfil Th17 y un aumento en la concentración de IL-6. Por lo tanto, sugerimos que este perfil de respuesta presente en pacientes con *C. trachomatis* podría ser clave en los trastornos de fertilidad que provoca este patógeno. No obstante, para dilucidar de manera fehaciente este comportamiento es necesario seguir realizando estudios respecto a este perfil de respuesta contando con un mayor número de pacientes infértiles con *C. trachomatis*.

Cabe mencionar que las alteraciones observadas de IL-6, particularmente los resultados de los niveles de ARNm y la proteína no fueron coincidentes. En parte esto se podría explicar porque las técnicas utilizadas son diferentes y cada una tiene sus niveles de sensibilidad, especificidad, límites de detección y reproducibilidad, también podrían existir regulaciones a nivel transcripcional, que sería interesante investigar. Por otro lado se podría suponer que IL-6 podría ser secretada por otras células que no se recuperan del lavado vaginal, por lo tanto sería interesante determinar cuáles son las células que generan IL-6 frente a infecciones por *C. trachomatis* y *M. hominis*.

Si bien se detectaron las proteínas IFN- $\gamma$  e IL-10 en lavado vaginal de mujeres y plasma seminal, no se observaron diferencias significativas entre los grupos analizados. La proteína IL-17A no se detectó en ninguno de los grupos estudiados.

#### Caracterización de la expresión de factores de transcripción maestros de linfocitos T helper

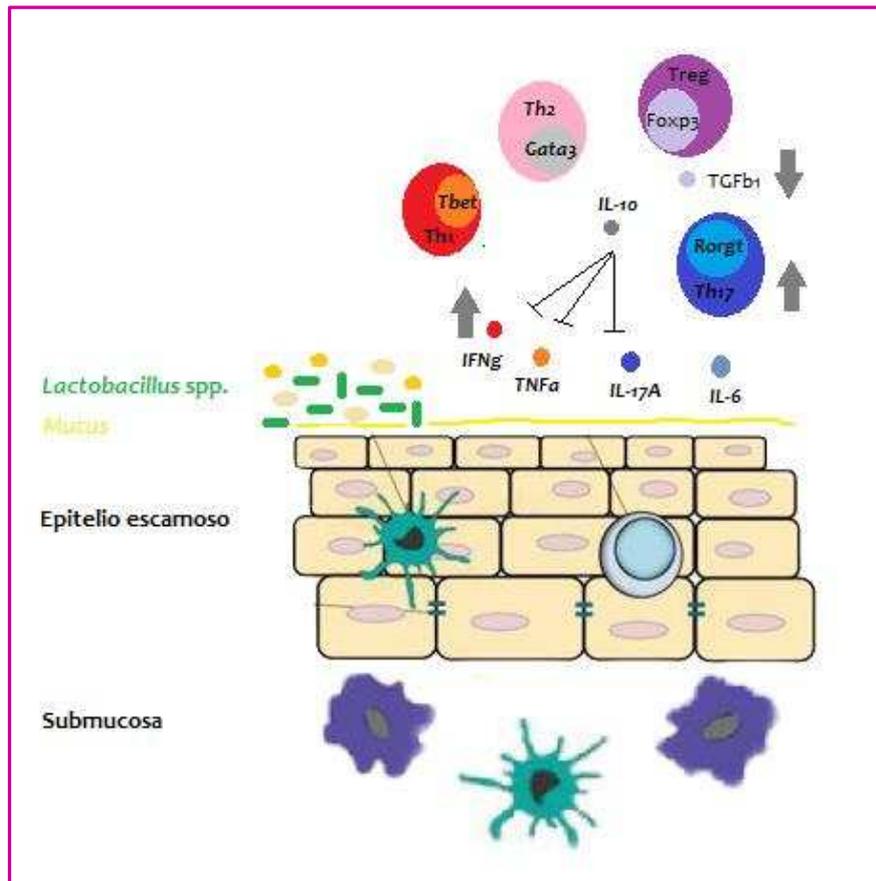
Aunque los factores de transcripción Tbet, GATA3, ROR $\gamma$ t y FOXP3 no se expresan exclusivamente en LT CD4+, la expresión de estos factores de transcripción maestros se puede

utilizar para identificar los subconjuntos Th1, Th2, Th17 y Treg, respectivamente [403], [404], [405], [406].

Particularmente, se observó que, en ausencia de infección, las mujeres infértiles mostraron un aumento significativo del ARNm de ROR $\gamma$ t con respecto a las mujeres fértiles. Asimismo, las mujeres infértiles infectadas con *C. trachomatis*, *M. hominis*, *U. urealyticum* tienen un aumento significativo en el ARNm de ROR $\gamma$ t respecto a las mujeres fértiles sin infección. ROR $\gamma$ t es el factor de transcripción maestro de linfocitos Th17. Es interesante recordar que este perfil de respuesta no controlada podría generar un importante estado de inflamación y daño tisular asociado a trastornos del embarazo [400].

Un área emergente de interés central es la relación entre Th17-Treg cuya diferenciación requiere TGF- $\beta$  [407]. Zhu y Paul, 2008 demostraron que, junto con las citoquinas proinflamatorias, TGF- $\beta$  orquesta la diferenciación de los linfocitos Th17 de una manera dependiente de la concentración. A bajas concentraciones, el TGF- $\beta$  en sinergia con otras citoquinas, favorece la diferenciación a linfocitos Th17, mientras que las altas concentraciones de TGF- $\beta$  favorecen la diferenciación a linfocitos Treg FOXP3+. Otros autores han observado que un subconjunto de LT CD4+ vírgenes expuestos a TGF- $\beta$  de la lámina propia del intestino delgado coexpresaban ROR $\gamma$ t y FOXP3. Los LT de LP que coexpresan ambos factores de transcripción producen menos IL-17 que las que expresan ROR $\gamma$ t sólo [408]. También se ha observado que los linfocitos Treg existentes, en ausencia o insuficiencia de TGF- $\beta$ 1, pueden convertirse en linfocitos Th17 [409]. Este antagonismo mutuo y la plasticidad entre los linfocitos Treg y Th17 ilustran la delgada línea entre un resultado inmune supresor o proinflamatorio y la importancia de las citoquinas presentes en el entorno del TRF [407].

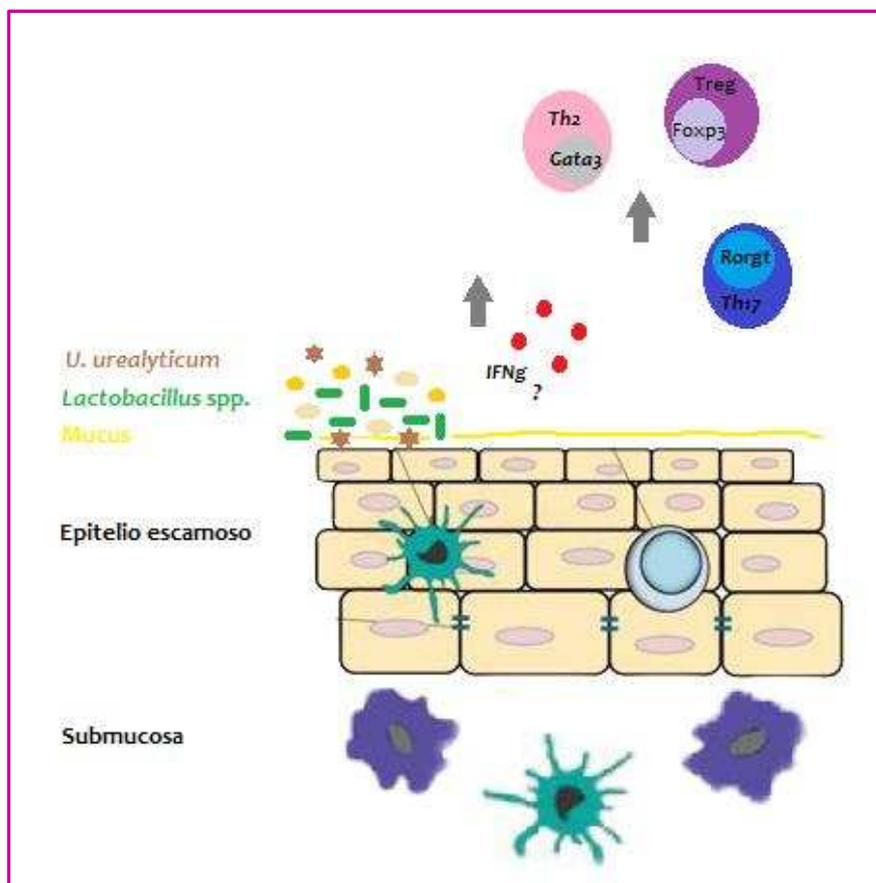
Por lo tanto, lo mencionado anteriormente podría explicar los resultados encontrados en la mucosa genital de las mujeres infértiles sin infección respecto a citoquinas y factores de transcripción maestros. En las mujeres infértiles, se encontró un aumento en el ARNm de INF- $\gamma$ , una disminución en el ARNm de TGF- $\beta$ 1 y un aumento en ROR $\gamma$ t, sin un aumento en el ARNm de IL-17 respecto a las mujeres fértiles. Según estos resultados, podríamos especular que los linfocitos Treg presentes en el tracto genital inferior de las mujeres infértiles podrían haberse diferenciado a linfocitos Th17 debido al desequilibrio de las citoquinas (aumento de la citoquina proinflamatoria como INF- $\gamma$  y disminución de TGF- $\beta$ 1). En la Figura 14 se representa un modelo hipotético de un mecanismo de daño en las mujeres infértiles sin infección.



**Figura 14.** Modelo hipotético de un mecanismo de daño en las mujeres infértiles sin infección. Las flechas hacia arriba indican aumento (citoquinas o linfocitos Th) y hacia abajo disminución.

En las mujeres infértiles con infección por *U. urealyticum*, los niveles de expresión de GATA3 y FOXP3 fueron mayores que en las mujeres fértiles sin infección. Además, en mujeres infértiles se observó que la infección con *U. urealyticum* produce un aumento significativo de GATA3 con respecto a la infección por *M. hominis*. Aunque la inmunidad de tipo Th2 se asocia con un embarazo normal [380], las respuestas inmunes excesivas ejercidas por las linfocitos Th2 y Th17 también causan enfermedades autoinmunes e inflamatorias [410]. Los linfocitos Treg FOXP3+ son esenciales para la tolerancia inmune y juegan un papel crucial en la limitación de la respuesta inmune inflamatoria excesiva ejecutada por el resto de los perfiles de LTh. Particularmente, se ha informado que FOXP3 inhibe la diferenciación Th17 antagonizando la función de los factores de transcripción RORγt [411], [412]. Este mecanismo de regulación podría explicar el hallazgo en la presente tesis de un aumento de RORγt y FOXP3 en mujeres infértiles con infección por *U. urealyticum* en comparación con mujeres fértiles. Aunque las mujeres infértiles con *U. urealyticum* mostraron un aumento en IFN-γ, no se detectó un aumento en el factor de transcripción maestro de LTh1 (Tbet). Por lo tanto, se sugiere que otras células inmunes

podrían contribuir al aumento de IFN- $\gamma$ . En la Figura 15 se representa un modelo hipotético de un mecanismo de daño en las mujeres infértiles con infección por *U. urealyticum*.



**Figura 15.** Modelo hipotético de un mecanismo de daño en las mujeres infértiles con infección por *U. urealyticum*. Las flechas grises indican aumento de citoquinas o linfocitos Th.

#### Analisis multivariado expresión de citoquinas y factores de transcripción maestros de LT helper

A partir del análisis de expresión de siete citoquinas y cuatro factores de transcripción maestros, se realizó un análisis de componentes principales para reducir la dimensionalidad de dichos conjuntos de datos y aumentar la capacidad de interpretación, evitando al mismo tiempo reducir la pérdida de información. Para esto, se representaron gráficamente el conjunto de factores inmunológicos determinados para realizar un estudio descriptivo del comportamiento global de los mismos.

Los resultados se representaron como gráficos de biplot, siendo capaces de explicar más de un 60% de la varianza observada tanto para citoquinas como para factores de transcripción maestros. Los porcentajes obtenidos son aceptables, siendo en algunos casos cercanos al 100%, lo que permitió un análisis confiable, de los comportamientos de estos factores inmunológicos en conjunto. Asimismo, se incluyó a cada paciente dentro del comportamiento global de los factores

inmunológicos, pretendiendo dilucidar si dentro de cada grupo de pacientes fértiles e infértiles con y sin infecciones existen subgrupos según el perfil de citoquinas y/o factores de transcripción maestros que presentan.

Con respecto a los biplots que resumen el comportamiento global de los factores inmunológicos en los grupos de pacientes femeninos fértiles e infértiles en ausencia de infección se observó una asociación, por un lado, entre IL-6 y TGF- $\beta$  y por el otro entre TNF- $\alpha$ , IL-10, IFN- $\gamma$  e IL-17. Sin embargo, un mayor número de pacientes infértiles, se asoció con altos niveles de las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-10, IFN- $\gamma$ , e IL-17, y los factores de transcripción Tbet, GATA3, FOXP3 y ROR $\gamma$ t. Este resultado podría indicar que en las mujeres infértiles existe un desequilibrio general de citoquinas caracterizado por un perfil proinflamatorio acompañado de un aumento de IL-10. Como se enunció anteriormente, varios estudios indican que IL-10 tiende a suprimir la producción de citoquinas inflamatorias [240], [413]. Por lo tanto se sugiere que en el grupo de mujeres infértiles sin infección IL-10 tendría un efecto inmunomodulador el cual podría estar coordinado con el aumento de Treg, que podrían cooperar con el efecto tolerogénico de IL-10.

En presencia de una infección se observó una clara diferencia en el comportamiento global de expresión de citoquinas y factores de transcripción respecto a los grupos de pacientes sin infección. Particularmente, se observaron tres subgrupos de mujeres infértiles con *M. hominis* que presentaron distintos patrones de citoquinas. Un grupo se asoció con altos niveles de IL-8. Este resultado concuerda con el antes mencionado respecto a la asociación entre VB e infección con *M. hominis* y que estos pacientes generalmente tienen esta citoquina aumentada. Otro grupo de mujeres con *M. hominis* presentó altos niveles de IFN- $\gamma$ , y el resto de los pacientes no presenta asociación con estas citoquinas. Por otro lado, las mujeres infértiles con *C. trachomatis* y *U. urealyticum* no presentaron asociación con alguna citoquina en particular ya que se observan diversos comportamientos entre los pacientes.

Es interesante observar que el comportamiento global de los factores inmunológicos que presentó el grupo de los pacientes masculinos infértiles sin infección coincide con el que presentó el grupo de mujeres infértiles sin infección donde se observa una asociación entre citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  IL-17A) e IL-10. Otros autores también han detectado la presencia de algunas de esas citoquinas en semen de pacientes infértiles [387], [414], [415]. Sin embargo, según los resultados hallados en su mayoría los pacientes masculinos infértiles sin infección presentan bajos niveles de citoquinas proinflamatorias y factores de transcripción maestros. Asimismo, se destaca un subgrupo de pacientes masculinos que representan el 31% de los pacientes infértiles sin infección, los cuales presentan una asociación positiva con altos niveles de TGF- $\beta$ 1. Como se mencionó anteriormente, el rol de TGF- $\beta$ 1 en la fertilidad es claro, ya que se ha demostrado que esta citoquina induce la tolerancia inmune hacia los antígenos seminales [154]. Como se enunció en la introducción, TGF- $\beta$ 1 podría junto con IL-6 inducir un perfil Th17 [407],

también podría ser secretado por linfocitos Treg y actuar como citoquina moduladora de la respuesta inmune inflamatoria [394]. Teniendo en cuenta que en el grupo de pacientes masculinos infértiles sin infección se observó una correlación entre TGF- $\beta$ 1 e IL-10 (y no con IL-6), se sugiere que el subgrupo que presentó TGF- $\beta$ 1 presentaría un perfil inmunorregulador, posiblemente con presencia de Treg, para evitar el daño tisular. Igualmente, cabe destacar que los pacientes infértiles sin infección presentaron una correlación entre FOXP3 y ROR $\gamma$ t, por lo tanto sería muy interesante investigar los pacientes que presentan altos niveles de TGF- $\beta$ 1, para dilucidar el rol de esa citoquina.

Al igual que con los pacientes femeninos, en los pacientes masculinos el patrón global de los factores inmunológicos cambió drásticamente en presencia de infección. Particularmente se observaron tres subgrupos de pacientes masculinos infértiles infectados con *U. urealyticum*. De los cuales un subgrupo presentó una asociación positiva con altos niveles de IFN- $\gamma$ , otro subgrupo de pacientes se asoció con IL-6 y el resto con ninguna de estas citoquinas. Otros autores también han observado que *U. urealyticum* produce alteraciones en los niveles de estas citoquinas, particularmente IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$  [416], [417] las cuales han sido relacionadas con la infertilidad masculina [416]. Asimismo, IL-6 juega un papel importante en las reacciones inflamatorias frente a infecciones [386]. Algunos autores indican que la infección por *U. urealyticum* aumenta los niveles de IL-6 en plasma seminal de humanos [417] mientras que otros no encontraron la presencia de esta citoquina [418]. Otros autores relacionaron niveles altos de IL-6 en semen con leucospermia [419], [420], inflamación de la próstata [421] e infecciones crónicas por *C. trachomatis* [402]. Por lo tanto, son necesarios estudios adicionales para dilucidar tanto el rol de esta citoquina como también el rol de IFN- $\gamma$  en pacientes infértiles con *U. urealyticum*.

En cuanto al patrón de comportamiento global de las citoquinas considerando todos los grupos de pacientes estudiados es importante señalar que IL-10 y las citoquinas relacionadas con los perfiles Th1 y Th17 están asociadas positivamente en la mayoría de los grupos con diferentes grados de asociación según la afección.

En cuanto al patrón de comportamiento global de los factores de transcripción maestros, FOXP3 y GATA3 se asociaron positivamente en la mayoría de los grupos de pacientes estudiados con diferentes grados de asociación dependiendo de la condición, excepto para los pacientes masculinos infértiles infectados con *U. urealyticum*. Este resultado es interesante teniendo en cuenta lo que describe Wohlfert y colaboradores particularmente en tracto gastrointestinal y piel. Estos autores proponen que se requiere la expresión selectiva del factor de transcripción GATA3 (característico principalmente de linfocitos Th2) en los linfocitos Treg para limitar la polarización de Treg hacia un fenotipo de LT efectores (por ejemplo, Th17, cuya plasticidad ya fue descrita) y la producción de citoquinas proinflamatorias [422]. Asimismo, dichos autores destacan el rol de GATA3 en el control de la fisiología de Treg durante la inflamación. Por lo tanto, se sugiere que

los pacientes masculinos infértiles infectados con *U. urealyticum*, presentarían una producción de citoquinas inflamatorias con una polarización a linfocitos Th17.

Si bien el análisis de componentes principales es meramente descriptivo fue capaz de brindar información valiosa para analizar el comportamiento general de la respuesta inmune en condiciones de infertilidad e infecciones y dilucidar el comportamiento de determinados factores inmunológicos. Asimismo permitió visualizar la complejidad del sistema inmune, el sinergismo, la plasticidad y la coexistencia de varios perfiles de respuestas inmunes.

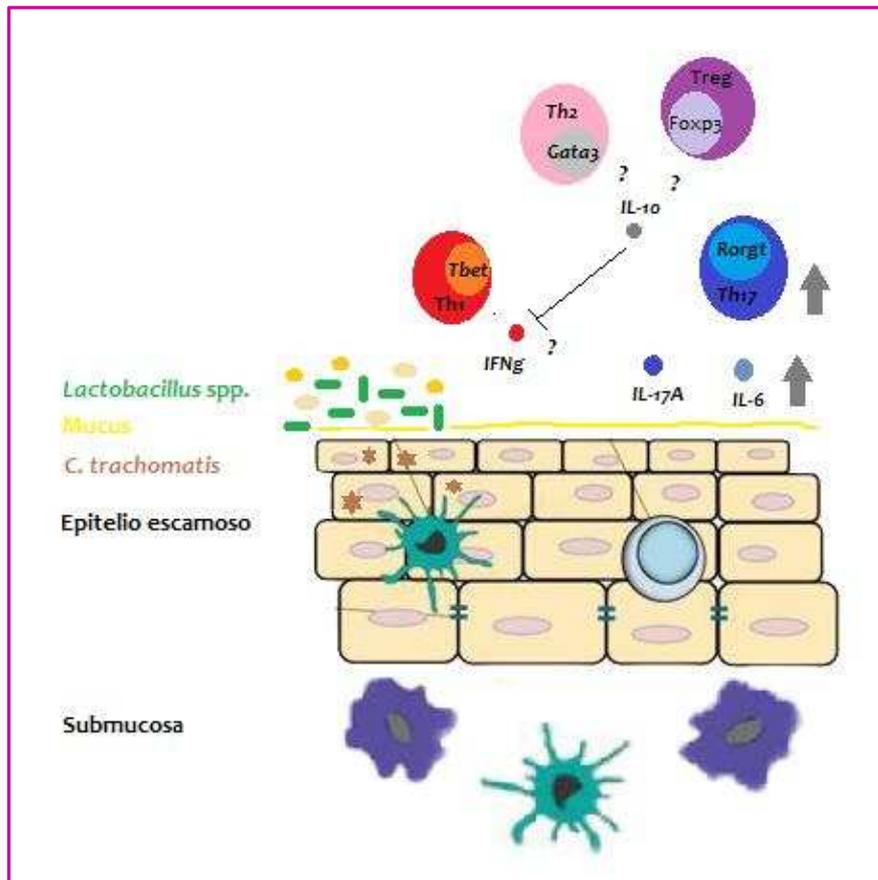
#### Correlación entre pares de citoquinas y factores de transcripción maestros de linfocitos T helper

Finalmente, además del análisis de los componentes principales, se analizó la correlación entre pares de factores inmunológicos. Se encontraron correlaciones múltiples entre las citoquinas en todos los grupos analizados.

Todos los grupos, excepto las mujeres infértiles infectadas con *U. urealyticum*, mostraron correlaciones positivas estadísticamente significativas entre las citoquinas proinflamatorias (IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-17A, IL-8). Además, fue sorprendente encontrar en todos los grupos estudiados una correlación positiva entre alguna de las citoquinas proinflamatorias y al menos una citoquina inmunomoduladora (IL-10, TGF- $\beta$ 1). Particularmente, hubo una asociación positiva entre IL-10 e IL-17 en la mayoría de los grupos. Este perfil de citoquinas proinflamatorias y la presencia de alguna inmunomoduladora (IL-10, TGF- $\beta$ 1) ha sido descrito en pacientes con trastornos de fertilidad tanto en mujeres [240], [397] como en hombres [387] y también en presencia de infecciones por diferentes patógenos incluyendo *C. trachomatis* [240]. Como se enunció anteriormente TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-8 se han asociado con leucospermia y alteración de la fertilidad. Asimismo, el perfil de respuesta Th17 no controlada puede ser mediador de la inflamación y el daño tisular en las enfermedades del embarazo y autoinmunidad [398], [400].

Respecto a las infecciones, resulta interesante destacar que las mujeres infértiles infectadas con *C. trachomatis* presentan tres asociaciones con una alta correlación positiva ( $\rho \sim 1$ ) entre IFN- $\gamma$  e IL-10, entre IFN- $\gamma$  e IL-17A y entre IL-17 e IL-10. Esto podría indicar reacción inflamatoria dada por IFN- $\gamma$  e IL-17A, controlada posiblemente por el efecto inmunomodulador de IL-10, pero cuyos efectos posiblemente sean necesarios para erradicar la infección por *C. trachomatis* [423]. NsoNwu-ANyANwu y colaboradores sugieren que los niveles más altos de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ 1 observados en mujeres fértiles con diagnóstico negativo para *C. trachomatis* pueden ser responsables de su protección contra la infección y que los niveles más altos de IL-10 y un menor IFN- $\gamma$  pueden estar implicados en la oclusión de trompas inducida por este patógeno. Asimismo, otros autores también sugieren que la producción excesiva de IL-10 suprime el IFN- $\gamma$  y respuestas Th1, lo que favorece la susceptibilidad y persistencia de *C. trachomatis* que resulta en el desarrollo de trastornos relacionados con la fertilidad [240], [424], [425]. Asimismo se ha descrito que las

respuestas de tipo Th1 desempeñan un papel en la resolución de la infección, mientras que las respuestas de tipo Th2 han sido involucradas en la patogénesis de *C. trachomatis* ya que pacientes con enfermedades más graves a menudo producen patrones de citoquinas del perfil Th2 [426], [427]. En la Figura 16 se representa un modelo hipotético de alteración de citoquinas y factores de transcripción de LTh en mujeres infectadas por *C. trachomatis*.



**Figura 16.** Modelo hipotético de un mecanismo de daño en las mujeres infértiles con infección por *C. trachomatis*. Las flechas grises indican aumento de citoquinas o linfocitos T.

Resulta interesante destacar que en el grupo de mujeres infértiles infectadas con *M. hominis* se detectó una correlación significativa positiva entre IL-17A e IFN- $\gamma$ , IFN- $\gamma$  e IL-10 y negativa entre las citoquinas IL-17A e IL-8. Diversos estudios sugieren que *M. hominis* a través de IL-17 [308], [309] media trastornos crónicos mientras que IL-8 es una quimioquina producida por macrófagos y otras células somáticas que actúa como un quimioattractante de neutrófilos y LT [378] que podría tener un papel importante principalmente en infecciones agudas. Por lo tanto sería muy interesante investigar el rol de estas citoquinas y factores de transcripción en condiciones de infecciones con *M. hominis* agudas y crónicas, ya que podría haber un cambio en el perfil de citoquinas en función del tiempo de evolución de la enfermedad.

En relación con la asociación entre las citoquinas secretadas y los factores de transcripción maestros LTh, se encontró una correlación positiva entre IFN- $\gamma$  y Tbet en los grupos de mujeres infértiles infectadas con *M. hominis*. Por otro lado, se encontró una correlación positiva entre IL-17A y ROR $\gamma$ t en los grupos de mujeres fértiles sin infección. Finalmente, FOXP3 se correlacionó positivamente con IL-10 y con TGF- $\beta$  en el grupo de pacientes masculinos con *U. urealyticum*. Por lo tanto, en estos grupos las citoquinas detectadas potencialmente podrían ser liberadas principalmente por los LTh correspondientes al perfil de respuesta inmune. Sin embargo, es interesante mencionar que las células epiteliales escamosas vaginales presentan baja expresión de algunos factores de transcripción tales como GATA3 [428] por lo que no se descarta la posibilidad que los niveles relativos de citoquinas y los factores de transcripción maestros detectados provengan de otros tipos celulares.

Respecto al grupo de mujeres infértiles sin infección, las correlaciones observadas entre TGF- $\beta$ 1 e IL-17A, TGF- $\beta$ 1 e IL-6, y entre TGF- $\beta$ 1 y ROR $\gamma$ t, podrían indicar que TGF- $\beta$ 1 contribuye a un perfil Th17 más que a un perfil inmunosupresor proveniente de Treg.

#### ***Anticuerpos antiespermáticos como potenciales factores inmunológicos causales de infertilidad.***

Cada patógeno genera una respuesta inmune caracterizada por la activación y diferenciación de subpoblaciones de células inmunes, producción de citoquinas y de anticuerpos [429]. Las infecciones genitales, particularmente *C. trachomatis*, *U. urealyticum* y *M. hominis* han sido propuestas como inductoras de ASA en suero, secreción vaginal y plasma seminal de pacientes [430]. Teniendo en cuenta la asociación propuesta entre ASA, ITS e infertilidad, en la presente tesis se evaluó la presencia de ASA en pacientes fértiles e infértiles con y sin infecciones genitales.

Las mujeres fértiles sin estas infecciones genitales (*C. trachomatis*, *M. hominis*, *U. urealyticum*) presentaron un mayor porcentaje de ASA en el lavado vaginal que las mujeres infértiles sin y con infección (*C. trachomatis* y *U. urealyticum*). Si bien este resultado parece contradictorio, no es sorprendente debido a que no todos los ASA causan trastornos de fertilidad [161]. Es importante destacar que diversos autores han detectado en el 1,2%-19% de las parejas fértiles la presencia de ASA [161]. Asimismo, cabe señalar que la prueba ELISA ASA sólo detecta la presencia de ASA pero no evalúa la capacidad que tienen estos anticuerpos de producir alteraciones en la fertilidad. Por otro lado, diversos autores han descrito que los ASA de pacientes infértiles pueden dirigirse a diferentes antígenos y/o grupos de antígenos de espermatozoides, o poseer diferentes características de unión al antígeno respecto a los ASA presentes en pacientes fértiles [431].

En el grupo de hombres infértiles con infección por *U. urealyticum* el porcentaje de pacientes con ASA resultó similar al de los hombres infértiles sin estas tres infecciones. Otros autores también han encontrado ASA en el 8%-21% de hombres infértiles; sin embargo, la presencia de ASA también se ha detectado en el 1,2%-19% de los hombres fértiles, lo que, al igual que en las mujeres, sugiere que no todos los ASA causan infertilidad [161], [296], [432].

Como se enunció anteriormente, las infecciones del tracto genital son una causa importante de formación de ASA [430]. En este estudio la presencia de ASA se asoció, aunque no significativamente, con la presencia de infecciones genitales. Particularmente, presentaron ASA las mujeres infértiles infectadas con *C. trachomatis* y *U. urealyticum* y los hombres infértiles infectados por *U. urealyticum*. Cabe mencionar que se ha descrito mimetismo molecular entre proteínas de estos patógenos y proteínas espermáticas, por lo cual la inmunidad antiespermática podría deberse a la presencia de infecciones genitales [433], [434]. Si bien no es objetivo de este estudio determinar la especificidad de estos ASA, resulta interesante comentar que diversos estudios demostraron la presencia de epitopes compartidos entre las proteínas HSP 70/ HSP 60 de *C. trachomatis* y las proteínas HSP D1, HSP A2 y HSP A1L de espermatozoides humanos [435], [420]. Asimismo, diversos investigadores han demostrado que comparten epitopes el antígeno UreG de *U. urealyticum* con la proteína autoantigénica nuclear espermática (*Nuclear autoantigenic protein sperm: NASP*) y la proteína de membrana espermática humana (*Human sperm membrane protein: hSMP*) [346].

Por otro lado, se ha descrito que infecciones persistentes o recurrentes de *C. trachomatis* producen la liberación de HSP 60 de células infectadas para iniciar una respuesta inmune en el huésped [190]. También se ha descrito que *U. urealyticum* podría aumentar los niveles de HSP 60 en las células infectadas [436], [437]. Teniendo en cuenta que las HSP bacterianas tienen una similitud mayor al 55% con la HSP 60 humana es posible que la respuesta inmune al desafío bacteriano pueda dar lugar a reactividad cruzada al atacar a las células huésped que expresan HSP 60 humana [438], [439]. De este modo estos patógenos podrían conducir a la alteración de la fertilidad a través de un proceso inflamatorio y de autoinmunidad [438], [439].

En mujeres con trastornos de fertilidad, se ha informado la presencia de anticuerpos anti-HSP 60 de *C. trachomatis* [293]. Asimismo, varias investigaciones han demostrado una correlación entre la inmunidad hacia HSP 60 de *C. trachomatis* y los episodios recurrentes de salpingitis, oclusión tubárica y embarazo ectópico [440], [441], [442].

Por otro lado, en plasma seminal se ha encontrado una correlación entre los niveles de HSP 60 y ASA [443]. Cabe recordar que las HSP son abundantes componentes de espermatozoides humanos [444]. Estas correlaciones fueron generalmente observadas en pacientes con infecciones genitales recurrentes o crónicas [190], [420].

Por lo tanto sería interesante investigar si los ASA detectados tanto en pacientes infectados con *C. trachomatis* como con *U. urealyticum* tienen reactividad contra HSP 60 humana. Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente no se descarta la posibilidad que la inmunidad antiespermática contribuya a la infertilidad en pacientes con *C. trachomatis* y *U. urealyticum*.

### ***Alteraciones espermáticas asociadas a la infección por U. urealyticum como posible causa de infertilidad.***

Las infecciones pueden afectar la fertilidad debido al efecto directo del patógeno sobre los espermatozoides [387]. Se han descrito varios microorganismos bacterianos y virales que interactúan con los espermatozoides y producen alteraciones en parámetros del semen lo que conlleva a trastornos de la fertilidad [445], [446]. Los mecanismos de infertilidad masculina causados por la infección con *Ureaplasma* spp. aún no son claros [328]. Existen resultados controvertidos respecto a los efectos que produce este patógeno sobre los parámetros espermáticos.

Numerosos trabajos describen que *U. urealyticum* podría perjudicar la integridad de la cromatina nuclear de los espermatozoides [188], [445], [447] así como también la concentración y la motilidad de los gametos [307], [447]. Asimismo, hay reportes que indican que estos patógenos inducen un estado de estrés oxidativo desencadenando la liberación de especies reactivas de oxígeno, lo que lleva a un mayor deterioro de la función del gameto masculino [448], [449]. Sin embargo, otros estudios demostraron que las infecciones por *U. urealyticum* no afectaron la calidad del semen [197], [222], [450]. Estos trabajos coinciden con los resultados obtenidos en la presente tesis ya que no se encontraron diferencias significativas en los parámetros relacionados con la calidad espermática entre los pacientes masculinos infértiles sin infección respecto a los masculinos infértiles con *U. urealyticum*.

Por otro lado, diversos trabajos sugieren que los leucocitos presentes durante la respuesta inflamatoria aumentan el efecto perjudicial del patógeno invasor sobre la calidad del semen [448], [451]. La relación entre los linfocitos polimorfonucleares seminales y las citoquinas proinflamatorias, entre estas TNF- $\alpha$ , se ha informado previamente en hombres infértiles [219], [452], [453], [454]. A partir de esto resulta interesante recordar que en la presente tesis se ha detectado un incremento no significativo en los niveles de ARNm de TNF- $\alpha$ , y un incremento significativo en los niveles de ARNm de IL-10 en pacientes infértiles con infección por *U. urealyticum* en comparación con pacientes infértiles sin infección. Estos resultados sugieren que IL-10 podría estar regulando la respuesta inflamatoria y posiblemente evitando el reclutamiento de leucocitos y las alteraciones en la calidad espermática. Por otro lado, es importante considerar que las citoquinas y otros factores en el semen, además de afectar el tracto genital del hombre, también

pueden afectar el ambiente inmunológico vaginal y la fertilidad femenina después de la inseminación [150].

A partir de lo descrito y según los resultados obtenidos en el grupo de pacientes analizados, no se puede afirmar que *U. urealyticum* produzca efectos directos sobre los espermatozoides. Por lo tanto, sugerimos que los trastornos de fertilidad pueden ser una consecuencia de la respuesta inmune que desencadena este patógeno.

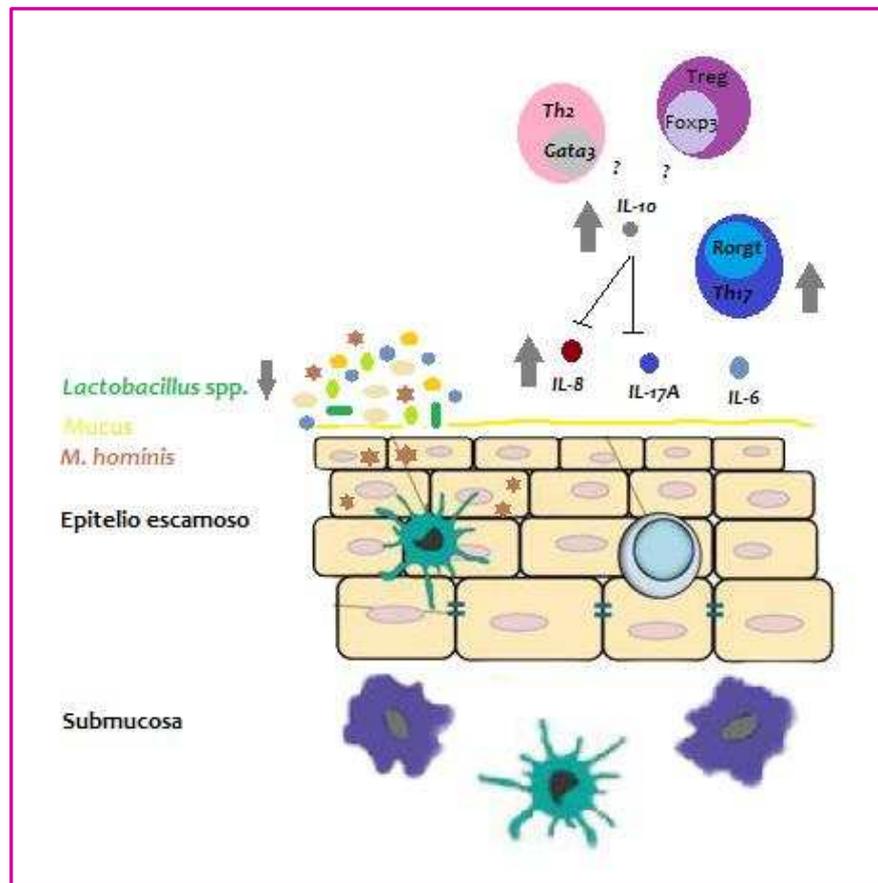
### ***Disbiosis microbiana y alteración de citoquinas como consecuencia de la infección por M. hominis como posibles causas de infertilidad.***

La población microbiana del ecosistema vaginal no es estática, cambia continuamente según la influencia de los factores endógenos y exógenos [455], [456]. La VB, ampliamente considerada como el trastorno vaginal más común en mujeres en edad reproductiva, se define como una alteración de los morfotipos bacterianos vaginales caracterizada por el sobrecrecimiento de varias bacterias anaeróbicas y disminución de especies de *Lactobacillus* spp. [457], [458]. Existe una fuerte evidencia que asocia la VB con niveles elevados de citoquinas tales como IL-8 e IL-1 en lavados cervicales [379], [459]. Asimismo, diversos estudios reportan que VB provoca graves consecuencias como embarazos adversos, partos prematuros, ruptura prematura de membranas, infección en el líquido amniótico y bajo peso al nacer [460], [461]. Varios estudios hacen referencia a las relaciones entre infertilidad tubárica y VB o infecciones bacterianas previas [462], [463]. Particularmente, los micoplasmas, entre ellos *M. hominis* y *U. urealyticum*, se encuentran con mayor frecuencia en mujeres con VB [378], [464].

Con respecto a los parámetros de secreción vaginal analizados de rutina, encontramos un mayor número de pacientes con infección por *C. trachomatis* y *M. hominis* con resultados positivos para la prueba de aminas respecto a mujeres infértiles sin infecciones. Una prueba positiva de aminas sugiere fuertemente VB y una flora vaginal predominada por *Gardnerella vaginalis*, *M. hominis*, especies de *Mobiluncus* y especies anaeróbicas, junto con la falta de *Lactobacillus* spp. [465]. Esto es coincidente con nuestros hallazgos, ya que detectamos que mujeres infértiles infectadas por *M. hominis* presentan un aumento de las células *clue* en comparación con mujeres fértiles e infértiles sin infección. Estas células pueden indicar cambios en la microbiota vaginal. Asimismo, este resultado podría estar asociado con el hecho de que en las pacientes infectadas con *M. hominis* existe una mayor frecuencia de VB. Esto también coincide con los resultados hallados que indican que la mayoría de mujeres infectadas con *M. hominis* presentan VB con un incremento significativo de IL-10 y con un incremento, aunque no significativo, de IL-8.

En conjunto, estos resultados sugieren que las infecciones, especialmente *M. hominis*, podrían alterar la flora normal y producir un desequilibrio inmunológico, potencialmente mediado

por IL-10 e IL-8, lo que podría causar la infertilidad. Estos hallazgos destacan la importancia de estudiar varios parámetros en conjunto para realizar una evaluación lo más representativa posible respecto al estado general del tracto genital femenino. En la Figura 17 se representa un modelo hipotético de daño en mujeres infértiles infectadas con *M. hominis*.



**Figura 17.** Modelo hipotético de un mecanismo de daño en las mujeres infértiles con infección por *M. hominis*. Las flechas grises indican aumento de citoquinas o linfocitos Th. Asimismo se representa una alteración en la flora habitual.

***Alteraciones de citoquinas claves para la reproducción como posible causa de infertilidad en mujeres infértiles sin infección.***

Resulta interesante observar que el grupo de mujeres infértiles sin infección presenta alteraciones en la expresión de citoquinas, particularmente un aumento de IFN- $\gamma$ , disminución de TGF- $\beta$ 1 junto con un aumento de ROR $\gamma$ t respecto a las mujeres fértiles como se describió anteriormente, sin embargo la mayoría de estos pacientes presentan microbiota normal. Por lo tanto, no puede descartarse una causa inmunológica de infertilidad, aunque posiblemente no sea debida a la presencia de ASA ya que no se encontraron diferencias significativas entre mujeres fértiles e infértiles respecto a este parámetro. Por otro lado, tampoco se encontró una correlación

entre las alteraciones de las citoquinas y la presencia de ASA en mujeres infértiles. Asimismo, es importante considerar la posibilidad de que estas pacientes presenten otras infecciones que no fueron evaluadas en este estudio. Sería interesante investigar cuáles son los efectos que conducen a alterar el delicado equilibrio de las citoquinas en el aparato reproductor femenino. Como se enunció en la introducción, las células del sistema inmune innato y adaptativo son influenciadas por las hormonas sexuales y factores de crecimiento además de los organismos comensales, para proteger el tracto reproductivo femenino contra potenciales patógenos [29].

## Conclusiones

En conjunto los resultados obtenidos del primer capítulo de tesis contribuyen a comprender los factores locales que regulan la inmunidad de las mucosas en la patología de infertilidad, tanto en presencia de infecciones genitales producidas por *C. trachomatis*, *M. hominis* y *U. urealyticum* como en ausencia de estas infecciones.

El 29,9% de los 193 pacientes infértiles analizados presentó alguna de estas tres ITS, por lo tanto las infecciones por *C. trachomatis*, *M. hominis* y *U. urealyticum* son potenciales causas de infertilidad. Particularmente, *C. trachomatis* y *M. hominis* son más prevalente en mujeres infértiles y *U. urealyticum* en hombres infértiles. Si bien la presencia de ASA se asoció a infecciones por *C. trachomatis* y *U. urealyticum*, los resultados obtenidos sugieren que los ASA no serían los principales factores que contribuyen a la infertilidad en los pacientes estudiados.

Tanto los pacientes infértiles con ITS como sin ITS presentaron alteraciones en citoquinas y factores de transcripción maestros de LTh. A continuación se resumen los principales hallazgos obtenidos para cada condición.

La infección por *C. trachomatis* en mujeres infértiles produce un aumento significativo en la expresión de ROR $\gamma$ t en comparación con mujeres fértiles sin infección y un aumento de los niveles de la proteína IL-6 respecto a las mujeres infectadas con *U. urealyticum*. Asimismo las mujeres infértiles infectadas por *C. trachomatis* presentan correlaciones altamente significativas entre IL-10, INF- $\gamma$  y IL-17A. Por lo que consideramos que la presencia de estas citoquinas son factores que contribuyen a la infertilidad en mujeres infértiles con *C. trachomatis*.

Las pacientes infértiles infectadas con *M. hominis* presentan una alteración de la flora normal produciendo vaginosis bacteriana y un desequilibrio inmunológico potencialmente mediado por IL-10, IL-8, IL-17A, IL-6, ROR $\gamma$ t en lavado vaginal, lo que podría explicar la infertilidad en las mujeres infectadas con este patógeno.

Las pacientes infértiles infectadas con *U. urealyticum* presentan una alteración de factores inmunes en lavado vaginal particularmente mediada por IFN- $\gamma$ , ROR $\gamma$ t, GATA3, FOXP3, lo que podría explicar la infertilidad de las mujeres infectadas con este patógeno.

Respecto a los resultados obtenidos sobre parámetros espermáticos en pacientes masculinos, consideramos que *U. urealyticum* no produce efectos directos sobre los

espermatozoides. Por lo tanto, los trastornos de fertilidad podrían ser, al menos en parte, una consecuencia de la respuesta inmune que desencadena este patógeno. En consecuencia, podemos proponer que la alteración de citoquinas hallada en plasma seminal, principalmente el aumento de TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6 e IFN- $\gamma$ , estaría involucrada en la infertilidad.

Las mujeres infértiles sin infección presentan claras alteraciones en los factores inmunológicos pero la mayoría presenta microbiota normal. Por lo tanto, la causa de la infertilidad podría ser inmunológica, pero no debida a la presencia de anticuerpos antiespermáticos ya que en el presente estudio no se encontraron diferencias significativas respecto a mujeres fértiles. No obstante, se detectaron claras alteraciones de citoquinas y factores de transcripción maestros de linfocitos LTh en lavado vaginal. Particularmente consideramos que la disminución de TGF- $\beta$ , una citoquina clave para la reproducción, y el aumento de una de las principales citoquinas proinflamatorias, INF- $\gamma$ , junto con el aumento de ROR $\gamma$ t (factor de transcripción maestro característico de linfocitos Th17) podrían ser los principales factores causales de infertilidad en mujeres infértiles sin infección.

*Por lo tanto estos hallazgos permiten concluir que la infertilidad en pacientes femeninos y masculinos, tanto en presencia como en ausencia de infección, es potencialmente generada por un desequilibrio de factores inmunológicos, evidenciado por alteraciones en las subpoblaciones de linfocitos T helper y en las citoquinas que éstos producen.*

*Las alteraciones de los factores inmunológicos halladas para cada infección resultan interesantes para contribuir al diseño de estrategias terapéuticas e inmunoproliféricas frente a infecciones de transmisión sexual. Asimismo, estos resultados aportan información para dilucidar posibles mecanismos de infertilidad, contribuyendo a un mejor diagnóstico y tratamiento de este trastorno.*

## **CAPÍTULO 2**

**Contribución al diseño de estrategias  
inmunoproliféricas para *Chlamydia trachomatis***

## Introducción

### Impacto de *Chlamydia trachomatis*

Como se enunció en el capítulo 1, *C. trachomatis* es una bacteria intracelular obligada gram-negativa que produce una de las ITS de origen bacteriano más común en todo el mundo, con gran impacto en la salud pública y en la reproducción [185]. *C. trachomatis* se transmite sexualmente por vía vaginal, anal u oral y también se puede diseminar perinatalmente a partir de la madre a su bebé causando conjuntivitis neonatal o neumonía. Se estima que, aproximadamente, el 2% de las mujeres con infección por *C. trachomatis* en el tracto genital inferior puede tener complicaciones en el embarazo, el 3% infertilidad tubárica, el 4% dolor pélvico crónico, y el 20 % desarrollará EIP [216]. La EIP es una infección e inflamación del útero, Trompas de Falopio, ovarios y/o peritoneo pélvico [466]. Es una de las secuelas más graves y se produce debido a que la infección del tracto genital inferior suele ser asintomática, lo que conlleva al ascenso del patógeno al tracto genital superior [466]. Asimismo, la inflamación y la cicatrización de la EIP en las trompas de Falopio pueden llevar a secuelas a largo plazo, como la infertilidad por factor tubárico, el embarazo ectópico y dolor pélvico crónico. Además de EIP y complicaciones asociadas a esta patología, el ascenso de *C. trachomatis* al tracto genital superior también puede producir embarazo ectópico, aborto involuntario, ruptura prematura de membranas, corioamnionitis, parto prematuro, muerte fetal e infecciones puerperales y neonatales [467]. La infección genital con *C. trachomatis* también aumenta dos a tres veces el riesgo de contraer la infección por HIV [468], [469]. Si todas las infecciones producidas por *C. trachomatis* no se trataran, podrían resultar en cerca de 1 millón de nuevos casos de infertilidad por año [466].

Si bien existen tratamientos antimicrobianos para controlar las infecciones que produce *C. trachomatis*, muchas veces conllevan a un desequilibrio en la flora intestinal asociado al uso prolongado de antibióticos [470]. Asimismo, la falta de cumplimiento del tratamiento, la persistencia de la infección incluso después de un tratamiento completo, junto con la alta prevalencia de casos asintomáticos [209], que conducen a complicaciones reproductivas severas respaldan fuertemente el desarrollo de una vacuna efectiva contra *C. trachomatis*. Existe un gran interés en controlar las infecciones por *C. trachomatis* mediante una vacuna que pueda inducir una respuesta inmune más eficiente que la que ocurre naturalmente. Hasta el presente, no se ha desarrollado una vacuna exitosa debido, en parte, a que tanto la patogénesis de *C. trachomatis*, como el papel de la inmunología del huésped no han sido completamente dilucidados. Además, no se dispone de un modelo animal óptimo [263], [471], [472] ni de herramientas adecuadas para manipular genéticamente la *C. trachomatis*. Para una revisión de los modelos animales de *C. trachomatis* consultar Vasilevsky y colaboradores, 2014 [263].

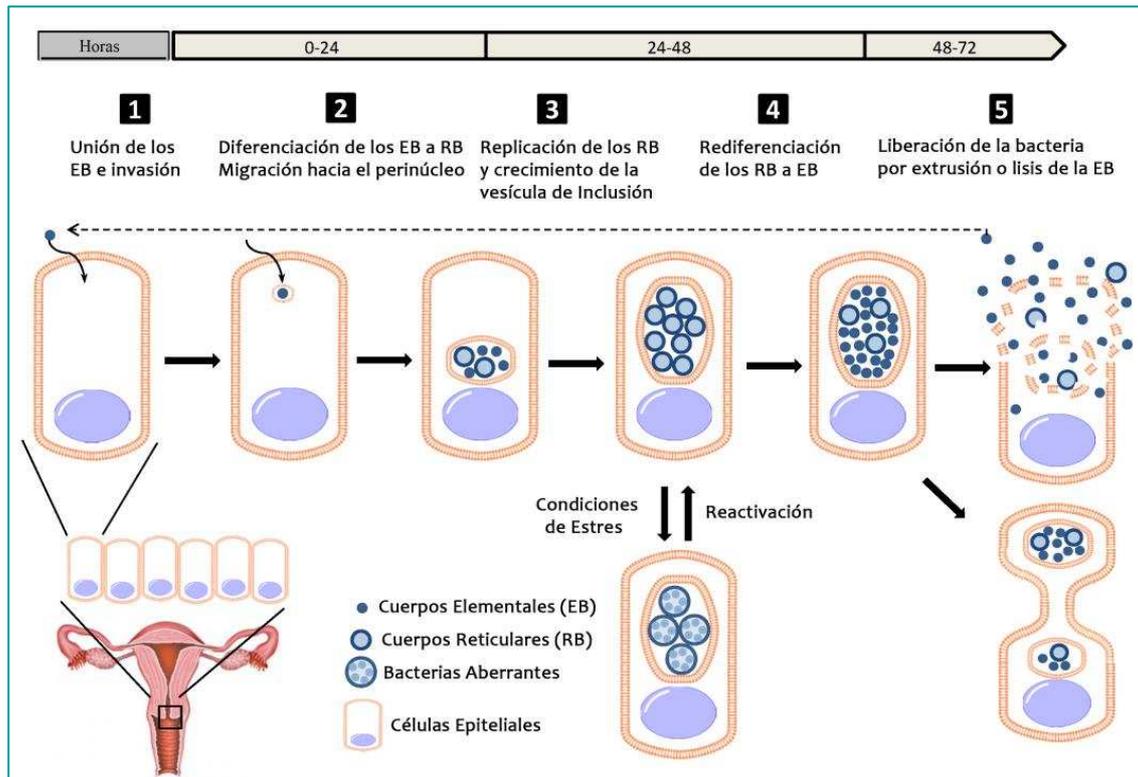
### **Ciclo replicativo de *Chlamydia trachomatis***

El ciclo replicativo de *C. trachomatis* se compone de dos fases y comienza por el contacto de los cuerpos elementales infecciosos (*Elemental Body*: EB), los cuales son metabólicamente inactivos y ambientalmente resistentes, con la superficie apical de la célula epitelial. Varios mecanismos están involucrados en la invasión de la célula hospedadora, probablemente fagocitosis o endocitosis mediada por receptores [204]. Se han descrito múltiples receptores [473], [474], y otras moléculas [475], [476], [477] que participan en la interacción entre el EB y la célula hospedadora. Asimismo, por el lado del patógeno, múltiples adhesinas bacterianas y ligandos tales como MOMP [478], y PmpD [479] entre otros [480], [481] facilitan la unión de los EB a las células hospedadoras.

Los EB infecciosos ingresan a la célula en vesículas unidas a la membrana que viajan hacia el perinúcleo y se fusionan para formar una sola vacuola de inclusión. Dentro de la vacuola de inclusión los EB cambian a la forma de cuerpo reticular metabólicamente activo (*Reticular Body*: RB) los cuales no son infecciosos ni ambientalmente resistentes pero tienen la capacidad de multiplicarse asincrónicamente por fisión binaria dentro de los límites de la creciente vacuola de inclusión. La replicación dentro de esta inclusión intracelular ayuda al patógeno a evitar la respuesta inmune del huésped y promover la infección crónica [205].

Después de numerosas rondas de replicación, los RB se diferencian nuevamente en EB infecciosos para propagarse a las células adyacentes [482], [483] mediante la lisis de la célula hospedera o la extrusión de la inclusión [473]. Todo el ciclo replicativo se produce aproximadamente en 48 a 72 horas pos-infección dependiendo de la especie, serotipos y mecanismo de liberación de la célula infectada [205].

Se ha descrito que los RB pueden entrar en una etapa latente donde persisten cuando están en un ambiente estresante tal como en presencia de antibióticos o frente a la respuesta inmune innata [212]. Estas bacterias aberrantes están presentes en infecciones persistentes y crónicas [204]. En la Figura 18 se representa el ciclo replicativo de *C. trachomatis*.



**Figura 18.** Ciclo de desarrollo de *Chlamydia trachomatis*. Figura modificada de Lujan y col., 2016.

### Vacunas para *Chlamydia trachomatis*

Una potencial vacuna contra *C. trachomatis* idealmente debe inducir respuestas inmunes humoral y celular a nivel sistémico y en mucosas, evitando las reacciones cruzadas autoinmunes con antígenos humanos y la inflamación no regulada que se asocia con patologías, entre ellas, alteraciones en la fertilidad. Varios autores sugieren que la inmunidad contra *C. trachomatis* requiere LT CD4+ (principalmente Th1) con producción de INF- $\gamma$  [484], [485], así como la generación de linfocitos T residentes de memoria (LTrm) [472] y una respuesta humoral, particularmente, anticuerpos con capacidad neutralizante, los cuales son el principal foco en la protección inmune y el desarrollo de vacunas [486].

Pese a que existe un consenso entre la comunidad científica sobre las características que debe reunir la respuesta inmune para generar una vacuna efectiva, existen otras causas que dificultan el desarrollo de la vacuna contra *C. trachomatis* en humanos, además de las nombradas anteriormente. Algunas de ellas son la falta de conocimiento de mecanismos de la inmunidad del tracto genital femenino [487], la escasez de adyuvantes y una comprensión limitada de los mecanismos por los cuales los antígenos de *C. trachomatis* inducen una inmunidad protectora [263]. Hasta el momento ha sido difícil lograr una vacuna eficiente contra este patógeno, pero

existe un creciente interés y notables avances científicos sobre esta problemática. Actualmente, hay una potencial vacuna contra *C. trachomatis* que se encuentra en evaluación en fase clínica I [488].

Existen numerosos estudios que evaluaron diversos tipos de vacunas para *C. trachomatis*, empleando organismos atenuados, péptidos, proteínas recombinantes, ADN plasmídico (ADNp) [263], [489], [490].

### **Vacunas Génicas**

Las vacunas génicas o también conocidas como vacunas a ADN representan un nuevo enfoque en los desarrollos inmunoterapéuticos. La inyección de ADNp que contiene la secuencia codificante de una proteína de interés resulta en la posterior expresión del gen y en la inducción de una respuesta inmune en el huésped. Estas vacunas son consideradas de tercera generación y tienen numerosas ventajas cuando se comparan con las estrategias de vacunación clásicas [491]. Particularmente, las vacunas génicas se destacan porque permiten inducir respuestas inmunes celulares y humorales duraderas. Existen tres vacunas de este tipo aprobadas para uso veterinario y numerosos estudios clínicos en desarrollo para la evaluación de vacunas profilácticas y terapéuticas humanas [492], [493].

### **Estrategias de vacunación**

Estudios actuales destacan otra estrategia interesante para atacar enfermedades infecciosas donde la inmunidad y la protección duradera no se han logrado con éxito con otros enfoques. Esta estrategia comprende la vacunación con un esquema heterólogo o *Prime-Boost* (ADNp-Proteína). Es decir, la vacunación comprende una primera dosis con ADNp, que contiene la secuencia codificante de la proteína de interés y un refuerzo con la proteína recombinante. La ventaja de este esquema de vacunación es que permite obtener una respuesta inmune humoral con abundantes anticuerpos y una respuesta celular T de memoria, lo que permite un rápido reconocimiento y control del patógeno [494], [495].

Para aumentar la eficacia de las vacunas, la naturaleza del sistema *delivery* y adyuvante utilizado en la formulación ha sido identificada como un factor crítico. La nanotecnología juega un rol significativo en formulaciones vacunales al permitir una liberación controlada del antígeno, mejorar el procesamiento, la estabilidad y la inmunogenicidad. Vacunas con nanopartículas de diversas composiciones han sido aprobadas para uso humano y otras están en ensayos preclínicos y clínicos [496], [497], [498], [499].

### **Adyuvantes**

Las vacunas de organismos enteros atenuados por lo general no requieren componentes adicionales para inducir una robusta respuesta inmune. Sin embargo, las vacunas que comprenden

subunidades del organismo a menudo requieren sustancias denominadas adyuvantes, que están destinadas a mejorar la inmunogenicidad de estas vacunas.

Pese a la investigación durante más de 70 años, sólo unos pocos adyuvantes naturales y sintéticos están actualmente autorizados para su uso en vacunas humanas. Estos incluyen hidróxido de aluminio, AS04 (hidróxido de aluminio con monofosforil lípido A), AS03 y MF59 (adyuvantes a base de escualeno) y liposomas [500], [501].

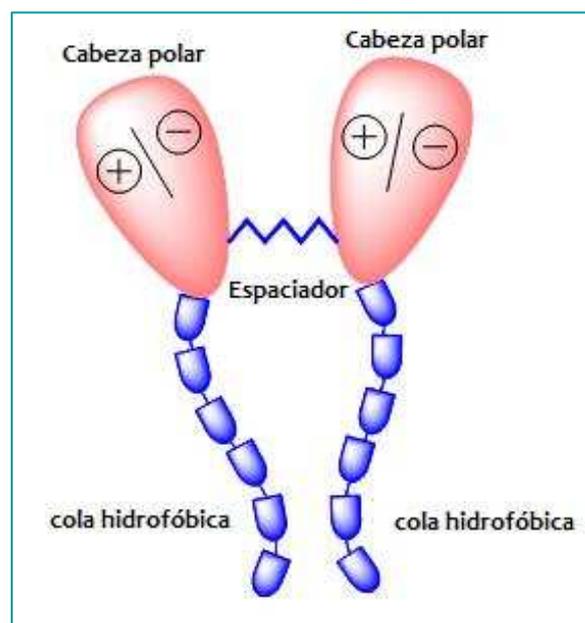
Los adyuvantes presentan distintos mecanismos de acción [502]. Algunos de ellos actúan como sistemas de *delivery*, es decir se unen con el antígeno y tienen la capacidad de estabilizarlo y permitir su liberación lenta, lo que contribuye a la estimulación de las células inmunes y la posible captación por parte de las CPA, como las CD. Otros adyuvantes actúan como potenciadores o inmunoestimulantes, los cuales son estructuralmente similares a moléculas del microorganismo natural, generalmente son componentes bacterianos o virales purificados o moléculas sintéticas. Estos componentes se reconocen como "señales de peligro" a través de los PRR de las células inmunes innatas, induciendo la expresión de citoquinas y favoreciendo la presentación del antígeno a los LT. Ejemplos de potenciadores inmunitarios son MPL (monofosforil lípido A), MDP (N-acetil-muramil-L-alanil-D-isoglutamina), lipopéptidos, ARN de doble cadena, componentes bacterianos o virales, CpG, entre otros [503].

Los liposomas son un tipo de nanopartículas biodegradables y no tóxicas que consisten en vesículas fosfolipídicas que, además de encapsular antígenos para su *delivery*, tienen la capacidad de incrementar las respuestas inmunes [504]. Particularmente, sus principales ventajas como adyuvantes incluyen la capacidad de mimetizar patógenos al transportar grandes cantidades de antígenos a las CPA, y la posibilidad de co-encapsular antígenos junto con moléculas inmunoestimulantes [505].

Un componente inmunoestimulante que está cobrando gran importancia en la actualidad son los oligonucleótidos con motivos CpG no metilados. Estudios previos demostraron que la utilización de CpG puede conllevar a la estimulación de TLR-9 en CPA, que induce una cascada de señalización que conduce a la maduración, diferenciación y proliferación de células del sistema inmune innato y adaptativo [506]. La utilización de un adyuvante que permita administrar el antígeno junto con el CpG asegura que ambos ingresen a la misma CPA mejorando y direccionando la respuesta específica hacia el antígeno. Trabajos previos demostraron que la combinación de liposomas con CpG permite obtener respuestas más potentes que con ambos adyuvantes por separado y con una marcada tendencia a un perfil Th1 [507], [508].

Otro grupo de nanopartículas que se aplican en el campo de la nanotecnología y han atraído gran interés como agentes para el *delivery* de drogas y para terapia génica, son los lipopéptidos *gemini* [509], los cuales, hasta el presente, no han sido empleados como adyuvantes. Entre los más promisorios se encuentran aquellos derivados de aminoácidos naturales los cuales son

biocompatibles, biodegradables y ampliamente explorados debido a sus propiedades fisicoquímicas y potenciales aplicaciones en el área de la biología [510], [511]. El diseño básico de un lipopéptido *gemini* comprende una cadena hidrofóbica formada por ácidos grasos naturales (usualmente entre 12 a 18 carbonos) y una región polar, catiónica, constituida por un oligopéptido. La mayor amplitud de la variación estructural se encuentra en la región polar de estas moléculas. En particular aquellos que incluyen cisteína en su estructura pueden formar dímeros en solución a pH fisiológico a partir de estructuras monoméricas, dando lugar a la formación de sistemas supramoleculares estables capaces de englobar ADN o ARN, proteínas y/o drogas de uso terapéutico [512], [513], [514] (Figura 19).



**Figura 19.** Representación esquemática simplificada de la estructura física de *gemini*. Figura modificada de Mondal y col., 2015.

### Rutas de administración

Para un diseño racional de una vacuna además de definir el tipo de antígeno y sistema *delivery/* adyuvante, es fundamental la elección de la ruta de inmunización. Para la inmunización con antígenos de *C. trachomatis*, se han utilizado numerosas vías de inmunización incluidas la oral [515], intranasal [516], intravaginal [491], subcutánea [517], intramuscular [518], perivaginal [516], rutas perisacras [516], sublinguales [519] y colónicas [520].

Una estrategia reciente y muy interesante consiste en combinar varias vías de inmunización para influir tanto en el perfil inmune como en la localización de la respuesta inmune. En cuanto al perfil inmune, como se nombró anteriormente se considera que una vacuna óptima contra *C.*

*trachomatis* tendrá que provocar inmunidad en mucosa que comprenda tanto anticuerpos neutralizantes como una respuesta celular [484], [521], [522]. Si bien la infección por *C. trachomatis* se produce por vía sexual, es importante considerar que la mucosa del tracto genital carece de sitios inductivos organizados [40], [523], [524] a diferencia de las mucosas intestinal y respiratoria [525], [526], [527].

Se ha demostrado que las rutas de inmunización tanto sistémicas como de la mucosa pueden inducir respuestas inmunes mediadas por anticuerpos y células en el tracto genital. La inmunización intranasal puede inducir respuestas de memoria humoral y celular tanto en el mucosa respiratoria como en el tracto genital [521], [524], [528], [529], [530], [531]. Sin embargo, la inmunización intranasal no siempre induce respuestas inmunes fuertes, dependiendo en gran medida de la combinación del adyuvante con el antígeno [527], [530]. Diversos estudios han demostrado que las combinaciones de las rutas de inmunización parenteral y nasal representan una estrategia para modular la inmunidad, la magnitud y la localización de la respuesta a la vacuna [524], [527], [530]. Así, los LT sistémicos inducidos por la vía de inmunización parenteral pueden migrar libremente a través de órganos como el bazo y el hígado, mientras que su ingreso a las mucosas sería limitado [532]. Por lo tanto, se requiere de la inmunización en mucosa para generar o permitir la entrada de LT activados y establecer un grupo local de LT<sub>mr</sub> en el tejido, que formarán un compartimiento separado del grupo de linfocitos de memoria circulante [525], [526], [533]. De este modo los LT<sub>mr</sub> podrán proporcionar una respuesta temprana en el sitio frente a la re-exposición del antígeno en la mucosa.

### **Antígenos**

Un aspecto fundamental para realizar un diseño vacunal racional y efectivo, es la elección del antígeno, el cual debe ser capaz de generar una respuesta inmune protectora contra el microorganismo y que no sea patogénica para el hospedero. Numerosos antígenos se han empleado en el diseño de vacunas contra *C. trachomatis*. La proteína más evaluada fue MOMP, aunque asimismo se evaluaron otras tales como el factor clamidial de actividad proteasa (*chlamydial protease-like activity factor*: CPAF), OmcB el cual es un polipéptido de membrana externa rico en cisteína, varias de las proteínas de la familia Pmp, entre otras, además de las combinaciones entre varias proteínas [263]. Para una revisión de las potenciales vacunas evaluadas para *C. trachomatis* consultar Vasilevsky y colaboradores, 2014 [263]. Estos autores enuncian diferentes estudios y resumen las estrategias de vacunación desde los antígenos clamidiales seleccionados, los sistemas de administración, las vías de vacunación y de infección hasta la respuesta inmune obtenida en cada caso.

## **Pmp D**

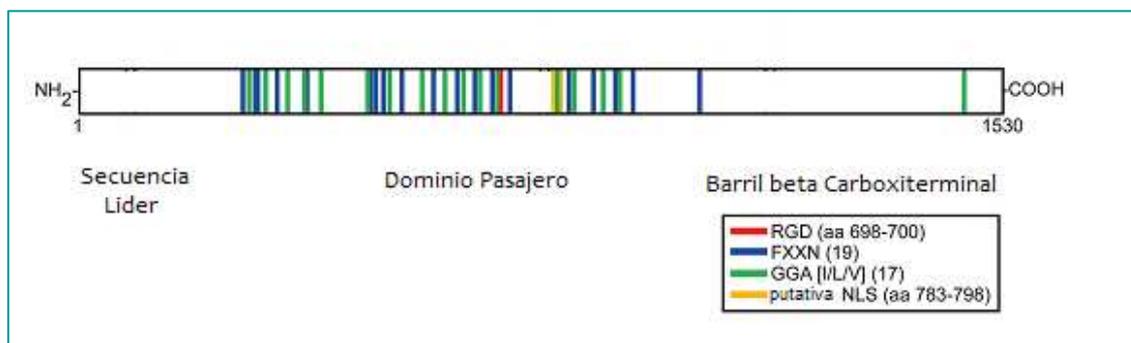
Entre los antígenos candidatos para generar inmunidad contra *C. trachomatis* que se han estudiado, los miembros de la familia de Pmp, que incluyen los serotipos A-I, han demostrado ser prometedores como componentes de vacuna ya que son blancos antigénicos dominantes para respuestas inmunes celulares [287], [534], [535].

Las Pmp son un grupo de proteínas clamidiales expuestas a la superficie ligadas a la membrana [259] que se han caracterizado como adhesinas autotransportadoras. Estas proteínas están involucradas en la administración de los factores de virulencia implicados en la fase inicial de la infección por *Chlamydia* spp. [259], la progresión de la enfermedad y la evasión inmune [536].

Como autotransportadores tipo V típicos [537] todas las Pmp se caracterizan por contener motivos GGA conservados (I, L, V), tetrapéptidos de FxxN, una secuencia líder en el extremo amino (N-terminal), seguida de un dominio pasajero y un barril  $\beta$  carboxiterminal (C-terminal) [259], [537]. La región C-terminal se incorpora a la membrana externa, formando un poro y permitiendo la translocación del dominio pasajero N-terminal a la superficie bacteriana [537]. Las proteínas Pmp también pueden experimentar un procesamiento proteolítico pos-traducciona [536], [538], [539]. Estas proteínas median la unión clamidial *in vitro* a las células epiteliales y endoteliales humanas [486], [538].

PmpD es la segunda Pmp más conservada que demuestra un 99,1% de identidad de aminoácidos (aa) entre serotipos de *C. trachomatis* [540]. Asimismo, PmpD de *C. trachomatis* presenta distintos grados de identidad con PmpD de otras especies tales como *C. muridarum* (71,46%), *C. pneumoniae* (34,74%) y *C. caviae* (36,50%) [541], [542], [543].

Por otro lado, PmpD es un objetivo de anticuerpos neutralizantes [486]. Asimismo, diversos autores han hallado en pacientes masculinos y femeninos infectados con *C. trachomatis*, anticuerpos contra PmpD [287], [544]. Dentro de las características estructurales de PmpD, se destacan su tamaño relativamente grande (1.530 aa) (168,3 kDa), un motivo RGD de unión a integrina (aa 698 a 670), una señal putativa de localización nuclear (*Putative nuclear localization signal*: NLS: aa 783 a 798) [536] además de regiones repetidas tales como GGA (I / L / V) y el tetrapéptido FxxN en la región N-terminal como todas las Pmp. En la Figura 20 se representan las características estructurales descritas de PmpD de *C. trachomatis*.



**Figura 20.** Características estructurales de PmpD de *C. trachomatis*. Figura modificada de Kiselev y col., 2007.

Debido a su naturaleza conservada, su localización en la superficie e importancia inmunológica, PmpD es un candidato atractivo para una vacuna preventiva en infecciones humanas [486]. Sin embargo, tiene un alto peso molecular con una estructura compleja que lo hace difícil de manejar mediante técnicas de ADN recombinante. Por lo tanto, se necesita un estudio en profundidad de la molécula para realizar una elección racional del inmunógeno teniendo en cuenta los epítopos críticos para inducir la reacción inmunológica apropiada.

Como se enunció anteriormente varios autores sugieren que la inmunidad contra *C. trachomatis* requiere LT CD4+ Th1 con producción de INF- $\gamma$ , LTrm y anticuerpos neutralizantes. Una de las principales dificultades para desarrollar una vacuna contra *C. trachomatis* eficaz es identificar los epítopos de la proteína para LB y los epítopos que se unan al MHC para que sean reconocidos por los LT. En este contexto, los enfoques bioinformáticos pueden contribuir al diseño de vacunas basadas en epítopos. Por lo tanto, previo al diseño de las formulaciones se realizó una predicción *in silico* de los epítopos B y T dentro de la secuencia de aminoácidos de PmpD para el diseño de una vacuna contra *C. trachomatis*. Sobre la base de estos resultados se diseñaron y obtuvieron dos construcciones plasmídicas que contienen un fragmento de PmpD para ser expresado en células eucariotas y en células procariontas para la obtención de la proteína recombinante. Con estas construcciones, se realizó en ratones hembra un esquema de vacunación heterólogo *prime-boost* en el cual, el ADNp fue administrado desnudo, mientras que la proteína fue formulada con lipomas catiónicos suplementados con diversos inmunoestimulantes y administrada por vía sistémica y de mucosa. Finalmente, se evaluó la respuesta humoral sistémica y local y el efecto de la inmunización sobre la fertilidad *in vivo*.

## Objetivos

1. Diseñar diferentes formulaciones basadas en ADN plasmídico/proteína para inducir inmunidad hacia PmpD de *Chlamydia trachomatis*.
2. Inmunizar ratones hembras con las diferentes formulaciones vacunales.
3. Evaluar la presencia de anticuerpos específicos en lavados vaginales y en suero.
4. Evaluar la fertilidad *in vivo* de los animales inmunizados mediante el apareo con machos de fertilidad comprobada.

## Materiales y Métodos

### 1. Diseño de diferentes formulaciones basadas en ADN plasmídico/proteína para inducir inmunidad hacia Pmp D de *Chlamydia trachomatis*.

#### 1.1 Estudio *in silico* de PmpD de *C. trachomatis*

##### 1.1.1 Conjuntos de datos

Existen diversas secuencias nucleóticas de PmpD disponibles en el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) [545]. Para los análisis de predicción de epitopes se empleó una secuencia de aminoácidos de PmpD del serotipo L2 de *C. trachomatis* disponible de NCBI (Genbank AAK69391.2). La secuencia AF268092.2 posee una identidad del 99%-100% con PmpD de diversos serotipos de *C. trachomatis*, entre ellas las cepas D-K, implicadas en infecciones genitales [539]. Esto fue confirmado por Clustal Omega, un algoritmo de alineación de secuencias de aminoácidos múltiples disponible en <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> [546].

##### 1.1.2 Predicción de la estructura 3D

El software Raptor X disponible *on line* (<http://raptorx.uchicago.edu/>) [547] se usó para el modelado por homología de PmpD con el fin de predecir epitopes de LB en conformación tridimensional. Raptor X es un servidor de predicción de estructura de proteínas para secuencias de proteínas sin homólogos cercanos en el *Protein Data Bank* (PDB) [548]. El servidor usa PSI-BLAST para encontrar plantillas de homólogos y modelar la estructura 3D sobre la base de accesibilidad de solvente, estructuras secundarias, terciarias y regiones desordenadas. Los siguientes parámetros se determinaron para indicar la calidad del modelo 3D predicho: valor P para la calidad global relativa y uGDT (GDT no normalizado) para la calidad global absoluta.

Por otra parte, los programas de análisis estructural ANOLEA Y RAMPAGE se utilizaron para verificar el modelo 3D. El primero se usó para cálculos de energía a nivel atómico en la estructura de proteínas [549] y RAMPAGE para generar la gráfica de Ramachandran, que muestra los residuos proteicos en las regiones favorecidas y permitidas [550].

##### 1.1.3 Predicción de epitopes B

###### 1.1.3.1 Predicción de epitopes lineales de linfocitos B

BepiPred fue el software empleado para determinar los epitopes lineales de LB de PmpD. Es un método que combina las predicciones de un modelo oculto de Markov y la escala de propensión de Parker [551], [552]. BepiPred asigna un valor de puntuación a cada residuo de proteína. La especificidad y la sensibilidad del método dependen del umbral de puntuación. Para

este análisis, se empleó el umbral de 0,35. BepiPred está disponible en [www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred](http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred) [553].

#### 1.1.3.2 Predicción de epitopes discontinuos de linfocitos B

DiscoTope se empleó para predecir los epitopes de superficie en una estructura globular. El método se basa en las estadísticas de aminoácidos, información espacial y accesibilidad superficial teniendo en cuenta el valor de hidrofiliicidad de la escala de propensión de Parker [552]. Estos análisis se llevan a cabo teniendo en cuenta un conjunto de datos compilados de epitopes discontinuos determinados por cristalografía de rayos X de complejos anticuerpo/proteína [554], [555]. La versión actualizada de DiscoTope está disponible en [www.cbs.dtu.dk/services/DiscoTope-2.0](http://www.cbs.dtu.dk/services/DiscoTope-2.0) [556].

#### 1.1.4 Predicción de epitopes de linfocitos T

Para determinar epitopes de LT, se utilizaron los programas, NetMHC versión 3.4 [557], [558], [559] y NetMHCII versión 2.2 [560], [561] realizando la predicción con los alelos del MHC de clase I o MHC II más frecuentes en Argentina, respectivamente, según Perusco y colaboradores 2014 [562]. Las predicciones se basan en redes neuronales artificiales. Los servidores son de uso gratuito y están disponibles en: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC> [563] y en <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCII> [564].

### 1.2 Selección y clonado de dos fragmentos F1 y F2 de PmpD de *C. trachomatis*

Con los resultados obtenidos mediante el análisis *in silico* y con apoyo bibliográfico se seleccionaron dos fragmentos (F1 y F2) con abundantes epitopes de LB y LT candidatos a ser evaluados como inmunógenos.

#### 1.2.1 Obtención de ADNp para el plan de inmunización

Teniendo en cuenta que se desea obtener una respuesta Th1 con altos niveles de anticuerpos específicos contra los fragmentos seleccionados de PmpD, es necesario que la proteína una vez sintetizada por la maquinaria celular de las células huésped del ratón sea liberada fuera de la célula. Es por ello que en el plásmido para inmunización génica (pVAX1) se insertó la secuencia codificante de los fragmentos F1 y F2 de PmpD de *C. trachomatis* precedida del péptido señal de  $\alpha$ 1-antitripsina humana. Este péptido señal fue anteriormente empleado en el grupo de investigación del Laboratorio de Inmunología Experimental en un modelo murino de vacuna génica con una proteína espermática obteniendo altos niveles de anticuerpos [565].

##### 1.2.1.1 Diseño de oligonucleótidos para el gen sintético (GSF1- GSF2)

Para obtener el péptido señal se realizó una síntesis *de novo*, para lo cual previamente se diseñaron los oligonucleótidos específicos empleando el software de acceso libre *on-line DNAsworks v3.2.4*, <https://hpcwebapps.cit.nih.gov/dnaworks/> [566], [567]. Para el diseño de los oligonucleótidos fue necesario considerar la estrategia de clonado a emplear, denominada SLiCE (*Seamless Ligation Cloning Extract*). Este método facilita el clonado mediante recombinación por homología de extremos cortos (15-52 pb), superando las limitaciones de los métodos tradicionales de clonado con enzimas de restricción [568]. Para realizar el clonado, se empleó un extracto de una cepa de *E. coli* derivada de DH10B que expresa un sistema de recombinación denominado PPY, que facilita el SLiCE con eficacias muy altas, el cual fue gentilmente cedido por el Dr. Yongwei Zhang. Teniendo en cuenta que el clonado de estos productos se realizó mediante el método SLiCE, se diseñaron oligonucleótidos que hibridan en el vector empleado para inmunización génica (pVAX1) a partir del sitio de corte *EcoRI*.

El programa *DNAsworks* arrojó que para generar cada uno de los genes sintéticos (GSF1 y GSF2) se requieren 4 oligonucleótidos de diversos tamaños (23, 60, 60 y 28 pb) que solapan entre sí, los cuales hibridan a 62 °C y contienen: una región de 20 pb complementaria al plásmido pVAX1 a partir del sitio de corte de *EcoRI*, la secuencia de Kozak (k) [5'ACCATGG3'] que facilita el reconocimiento de la secuencia de iniciación del proceso de traducción en células eucariotas, el gen que codifica para el péptido señal (ps) de  $\alpha 1$ -antitripsina humana, y los primeros 19 pb que codifican para el fragmento F1 o F2 (Tabla 10). Los genes sintéticos (GSF1 y GSF2) de 118 pb se obtuvieron por síntesis *de novo* mediante PCR de extensión solapada (Figura 15).

**Tabla 10.** Oligonucleótidos para la síntesis *de novo* del gen sintético F1 (GSF1) y F2 (GSF2)

GSF1/GSF2 PmpD	Oligonucleótidos sentido (1, 3 y 5) Oligonucleótidos antisentido (2, 4 y 6)
1 pVAX1-k	CCACTAGTCCAGTGTGGTGGACC
2. pVAX1-k-ps	TGCCAGCAGGAGGATGCCCCACGAGACAGAAGACGGTGCCATGGTCCACCACACTGGACT
3. ps-F1	ATCCTCCTGCTGGCAGGCCTGTGCTGCCTGGTCCCTGTCTCCCTGGCTGATAGTCAGGCT
4. ps-F1	GTCCCTCAGCCTGACTATCAGCCAGGGA
5. ps-F2	ATCCTCCTGCTGGCAGGCCTGTGCTGCCTGGTCCCTGTCTCCCTGGCTATTCTTGCTTA
6. ps-F2	CTCCACGTAAGCAAGAAATAGCCAGGGA

El GSF1 se sintetizó con los oligonucleótidos 1, 2, 3 y 4 y el GSF2 con los oligonucleótidos 1, 2, 5 y 6. Las regiones resaltadas en celeste son homólogas a pVAX1, las regiones resaltadas en verde a la secuencia de Kozak (k), las regiones resaltadas en rojo al gen que codifica para el péptido señal de  $\alpha 1$ -antitripsina humana (ps) y las resaltadas en amarillo a las primeras 19 bases del F1 o F2.

### 1.2.1.2 Obtención de los fragmentos F1 y F2 de PmpD de *C. trachomatis*

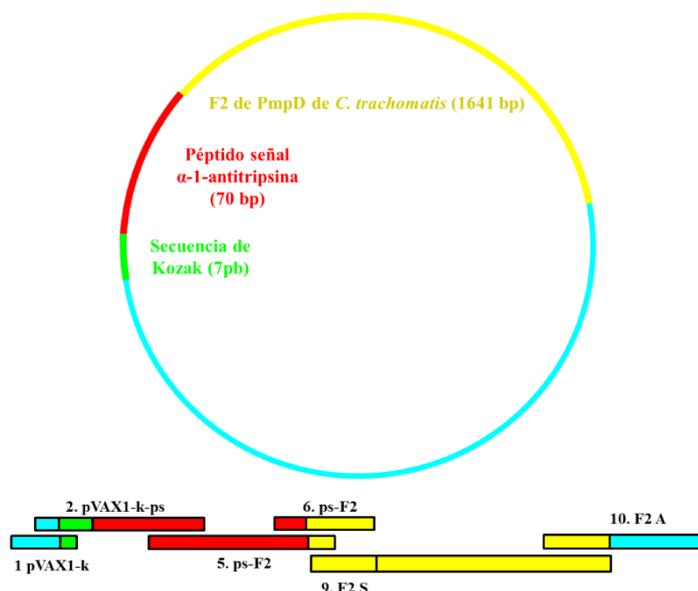
Los fragmentos F1 y F2 de PmpD fueron obtenidos por PCR empleando oligonucleótidos específicos diseñados a partir de la secuencia AF268092.2 del serotipo L2, empleando el software Primer 3 Plus de acceso *on-line* (Tabla 11) [569]. Los fragmentos fueron amplificados a partir de ADN genómico (ADNg) de células McCoy infectadas con EB del serotipo D de *C. trachomatis* purificado mediante kit ADN PuriPrep-S kit (Inbio Highway S.A., Tandil, BA, Argentina). Dichas células fueron obtenidas y cedidas gentilmente por el Servicio de Enfermedades de Transmisión Sexual del Instituto Malbrán. Cabe aclarar que la identidad entre las secuencias del serotipo L2 y el D es del 99%, y las variaciones de bases no están en las secuencias de los oligonucleótidos.

**Tabla 11.** Oligonucleótidos específicos para amplificar los fragmentos F1 y F2 de PmpD de *C. trachomatis*

PmpD	Oligonucleótidos sentido (S) (7 y 9) Oligonucleótidos antisentido (A) (8 y 10)
7. F1 S	GATAGTCAGGCTGAAGGACAGT
8. F1 A	TGCTGGATATCTGCAGAATTCTATTGCTCAGGAGCTGGCTCTA
9. F2 S	ATTTCTTGCTTACGTGGAGATG
10. F2 A	TGCTGGATATCTGCAGAATTCTACTGAGCAGTGAGATTATGAGCAA

Las regiones resaltadas en amarillo hibridan con la secuencia de PmpD de *C. trachomatis*. Las regiones resaltadas en celeste corresponden a las secuencias complementarias antisentido del vector para inmunización génica pVAX1 a partir del sitio de corte de *EcoRI*. El codón CTA, que se encuentra en los oligonucleótidos antisentido corresponde al codón de terminación de la traducción de la proteína.

**Figura 21.** Representación de la estrategia de clonado por SLiCE. Los oligonucleótidos 1, 2, 5 y 6 (Gen sintético GSF2) se describen en la Tabla 10 y los oligonucleótidos 9 y 10 (F2 de PmpD) en la Tabla 11.



### 1.2.2 Clonado de F1 y F2 en el Vector pGEM®-T Easy y transformación de bacterias *E. coli*

Los fragmentos F1 y F2 correspondientes a PmpD de *C. trachomatis* se clonaron en el vector pGEM®-T Easy (Promega, Madison, WI, EE. UU.) y se transformaron bacterias *E. coli* para disponer de estos fragmentos indefinidamente sin recurrir al ADN bacteriano.

Brevemente, se colocaron 50 ng de pGEM®-T Easy con 5 µL del buffer 2x de la T4 ligasa, 1 µL de la enzima (3 Unidades) y una relación molar 3:1 (inserto: vector) de producto de PCR previamente chequeado mediante electroforesis en gel de agarosa. Se completaron 10 µL de reacción con agua estéril. Por otro lado, se realizó el control de reactivos donde fueron colocados todos los reactivos descriptos excepto el producto de PCR. Los dos tubos se incubaron toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se realizó la transformación de bacterias *E. coli* Top 10 aplicando el método del cloruro de calcio [570]. La incorporación de los insertos fue chequeada mediante electroforesis en geles de agarosa observando el retraso en la movilidad electroforética. La fidelidad de la amplificación por PCR fue verificada por secuenciación. Finalmente, se realizaron stock de 6 clones bacterianos positivos, en glicerol 15%, los cuales se almacenaron a -80 °C.

### 1.2.3. Clonado de GSF2/F2 en el vector pGEM®-T Easy y transformación de bacterias *E. coli*.

Los genes sintéticos obtenidos como indica el inciso 1.2.1.1 fueron corroborados mediante electroforesis en gel de agarosa empleando un marcador de peso molecular. Por otro lado, se amplificaron por PCR los fragmentos F1 y F2 clonados previamente en pGEM®-T Easy Vector como se detalla en el inciso anterior. Luego los genes sintéticos (GSF1 y GSF2) y los fragmentos obtenidos (F1 y F2) se unieron mediante PCR obteniéndose amplificados de mayor tamaño denominados GSF1-F1 y GSF2-F2. Posteriormente, los fragmentos completos se clonaron en el vector pGEM®-T Easy de Promega como se describió en el inciso 1.2.2 y se transformaron bacterias *E. coli* Top 10 para disponer de estos fragmentos indefinidamente. Finalmente, los fragmentos GSF1-F1 y GSF2-F2 clonados fueron evaluados mediante electroforesis en geles de agarosa, PCR y secuenciación. Se realizaron stocks de 6 clones bacterianos positivos, en glicerol 15% los cuales se almacenaron a -80 °C.

En la presente tesis se decidió continuar con la evaluación de F2 de PmpD debido a que según la bibliografía consultada hasta el momento ese fragmento no ha sido evaluado como candidato vacunal. Sin embargo, también se cuenta con F1 y GSF1-F1 de PmpD clonados en el Vector pGEM®-T Easy y secuenciados para futuras investigaciones.

### 1.2.4 Clonado de GSF2-F2 en pVAX1 para inmunización génica

La secuencia de ADN codificante del GSF2-F2 de Pmp D fue clonada en el vector para inmunización génica pVAX1. Como se explicó en el inciso 1.2.1 el clonado fue realizado mediante el método SLiCE. Para ello se realizó una minipreparación de ADNp a partir de bacterias

transformadas con pVAX1. Posteriormente, se procedió a realizar la digestión con la enzima de restricción seleccionada *EcoRI*, la cual fue chequeada mediante electroforesis en gel de agarosa observándose una sola banda correspondiente al pVAX1 linealizado, cuyo tamaño era 3 kb. Mediante el kit comercial Wizard SV Gel (Promega, Madison, WI, EE.UU.) el ADNp fue purificado a partir de la banda correspondiente a 3 kb.

Finalmente, se realizó una ligación a temperatura ambiente, 18 hs, donde se colocó el pVAX1 cortado en el sitio *EcoRI* y los fragmentos GSF2 y F2 en relaciones equimolares. Estos últimos fragmentos y el vector tenían regiones homólogas de aproximadamente 20 pb como lo indica la Tabla 11. Al día siguiente se realizó la transformación de bacterias *E. coli* Top 10 aplicando el método de cloruro de calcio [570]. Los fragmentos clonados fueron evaluados mediante electroforesis en gel de agarosa, PCR y secuenciación. Por último, se realizaron stocks a partir de 1 clon bacteriano positivo, en glicerol 15%, los cuales se almacenaron a -80 °C.

#### 1.2.5 Maxipreparación de ADNp: pVAX1- GSF2-F2

El plásmido pVAX1-GSF2-F2 contiene la secuencia codificante de un fragmento de PmpD precedida del gen sintético, el cual contiene la secuencia de Kozak y el líder secretorio de  $\alpha$ 1-antitripsina humana. Células de *E. coli* Top 10 transformadas con este plásmido fueron cultivadas en 200 ml de medio Luria Bertani en presencia de Kanamicina, a 37°C, 18 hs. Posteriormente, el plásmido fue recuperado mediante lisis alcalina y purificado por extracción orgánica con fenol y cloroformo. El mismo procedimiento se realizó para el plásmido sin inserto (pVAX1).

#### 1.2.6 Clonado de F2 en pET32a para expresión del fragmento de PmpD

La secuencia de ADN codificante del F2 de PmpD fue clonada en el vector de expresión procarionta pET-32a. Para ello, el fragmento F2 fue amplificado por PCR a partir del F2 subclonado en pGEM®-T Easy Vector, agregando las secuencias correspondientes a los sitios de restricción para las enzimas *NcoI* y *SalI*. Estas enzimas fueron utilizadas para digerir el ADNp y los productos de PCR. Los productos de ambas reacciones de digestión fueron tratados con T4 ADN Ligasa (Promega, Madison, WI, EE.UU.), 18 hs a 4 °C. Con este plásmido que contiene la secuencia de interés se transformaron células de *E. coli* BL21-DE3. El clonado fue chequeado mediante electroforesis en gel de agarosa, PCR y secuenciación. Finalmente, se realizaron stocks de 6 clones bacterianos positivos, en glicerol 15%, los cuales se almacenaron a -80 °C.

#### 1.2.7. Minipreparación de ADNp, electroforesis y cuantificación

El ADNp fue obtenido aplicando el método de lisis alcalina [570]. La separación de ADNp por electroforesis fue realizada en geles de agarosa al 1% o 2%, en solución tampón de Tris-

Acetato-EDTA, pH 8,2-8,4, en presencia del colorante fluorescente GelRed® (Biotium, Inc, Fremont, CA, EE.UU.). El ADNp fue cuantificado por medición de la absorbancia a 260 nm en NanoDrop™ Lite (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) y la correcta eliminación de las proteínas fue estimada según la relación de absorbancias a 260 nm y a 280 nm.

### 1.3. Obtención de F2 de PmpD recombinante (rF2PmpD)

Células de *E. coli* BL21-DE3 transformadas con el plásmido pET32-F2 que contiene la secuencia codificante de un fragmento de PmpD fueron cultivadas en el medio Luria Bertani en presencia de ampicilina 100 µg/mL, y la expresión de la proteína recombinante fue inducida mediante el agregado de IPTG (Promega, Madison, WI, EE. UU.) 1 mM e incubación 18 hs a 37 °C. Luego, las células fueron resuspendidas en agua, sonicadas y posteriormente, la proteína fue purificada a partir de la fracción soluble, mediante cromatografía de pseudoafinidad utilizando resinas que contienen Níquel (Gold Biotechnology, Inc. St Louis, MO, EE. UU). Las fracciones obtenidas luego de la elución con imidazol 100 mM fueron evaluadas mediante lecturas de absorbancia a 280 nm y electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) [571].

### 1.4 Obtención de las formulaciones vacunales

Se obtuvieron dos formulaciones liposomales las cuales están compuestas por rF2PmpD y liposomas catiónicos combinados con inmunoestimulantes, tales como ODN con secuencias CpG no metiladas (CpG) o lipopéptidos *gemini* (Gem). Para la obtención de los liposomas catiónicos se aplicó el método de inyección etanólica como se describe en el inciso 1.4.1. Posteriormente a los liposomas se le agregaron CpG con la secuencia: 5'-tcgtcgtttgcgttttgcgtt-3', que han demostrado ser inmunomoduladores [572]. Los CpG contienen enlaces fosfodiéster y fueron obtenidos por síntesis química (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). Alternativamente, los liposomas fueron combinados con *gemini*, desarrollado y evaluado por el Laboratorio de Química Aplicada de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (LaQuimAp) como se describe en el inciso 1.4.2.

#### 1.4.1 Obtención de liposomas catiónicos (Lp)

Los liposomas fueron preparados utilizando dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC), colesterol y estearilamina por el método de inyección etanólica. Los tres componentes, en proporción 7:2:2 mol/mol, se disolvieron en una mezcla de etanol/isopropanol (1:1 v/v). La fase orgánica fue incorporada por inyección a la fase acuosa (buffer acetato de sodio 50 mM, pH 4,3) en proporción 1:9 v/v [508], [573], [574].

#### 1.4.2 Obtención del lipopéptido *gemi*

El lipopéptido empleado en el plan de inmunización fue diseñado y sintetizado por el grupo de investigación LaQuimAp. La síntesis fue realizada en fase sólida mediante la química del 9-fluorenil-metoxicarbonilo (Fmoc) [575]. Estas unidades monoméricas se dimerizan a compuestos *gemi* (Gem), en forma espontánea por formación de puentes disulfuro, en presencia del ácido nucleico o proteína que luego va a transportar.

## 2. Inmunización de ratones hembras con las diferentes formulaciones vacunales

Se utilizaron ratones hembras de la cepa Balb/c de 7 semanas de edad al comienzo del plan de inmunización, las cuales fueron mantenidas en el bioterio del Laboratorio de Inmunología Experimental, con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, con suministro de agua y alimento *ad libitum*. Se realizó un protocolo de inmunización *prime-boost* según se describe a continuación.

### 2.1 Grupos experimentales, dosis, vías de administración y protocolo de inmunización

Los ratones hembra recibieron una dosis con ADNp desnudo administrado por vía intradérmica. Luego, se administraron 2 dosis de F2 de PmpD recombinante. Cada dosis de proteína comprendió dos inoculaciones simultáneas, una por vía subcutánea y otra por vía nasal. Las dosis fueron administradas cada 3 semanas, colocando 50 µg de ADNp, 5 µg de proteína recombinante por vía subcutánea formulada con Lp con inmunoestimulantes (4 mM Lp - 400 µM de Gem o 4 mM Lp - 7,5 µM de CpG), y 2,5 µg de proteína recombinante por vía nasal formulada con Lp (4 mM) sin inmunoestimulantes. En la Tabla 12 se describen los grupos experimentales y los inóculos administrados.

**Tabla 12.** Grupos experimentales e inóculos

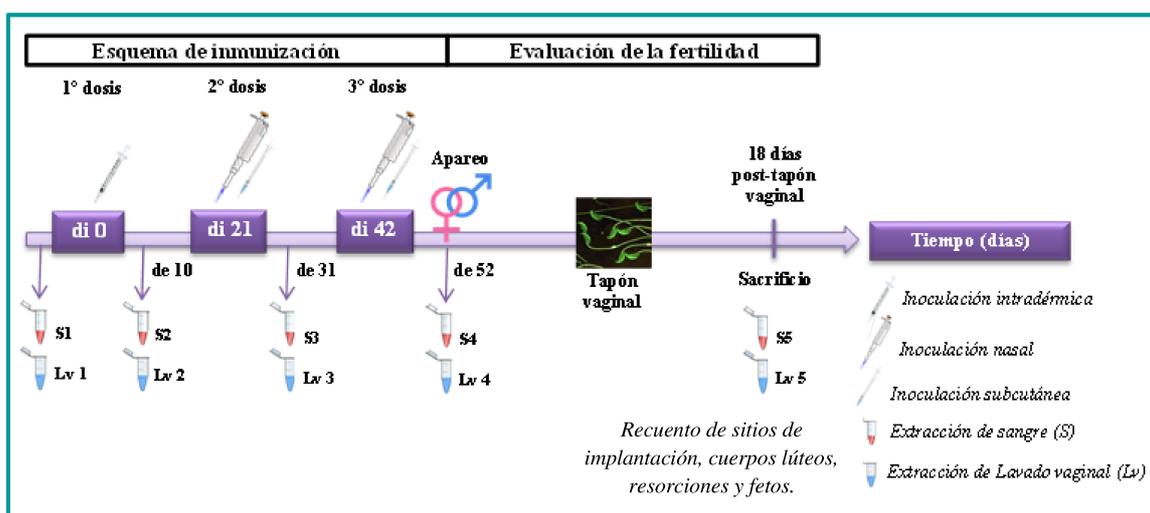
<b>Grupos experimentales</b> / <b>Dosis</b>	<b><u>1era dosis:</u></b> <i>Vía intradérmica</i>	<b><u>2da y 3era dosis:</u></b> <i>Vía subcutánea</i>	<b><u>2da y 3era dosis:</u></b> <i>Vía nasal</i>
<b>Grupo 1: Pmp D (n=5)</b>	pVAX1-GSF2-F2PmpD	rF2PmpD	rF2PmpD
<b>Grupo 2: PmpD-Lp-Gem (n=5)</b>	pVAX1-GSF2-F2PmpD	rF2PmpD-Lp-Gem	rF2PmpD-Lp
<b>Grupo 3: Lp-Gem (n=5)</b>	pVAX1	Lp-Gem	Lp
<b>Grupo 4: PmpD-Lp-CpG (n=5)</b>	pVAX1-GSF2-F2PmpD	rF2PmpD-Lp-CpG	rF2PmpD-Lp
<b>Grupo 5: Lp-CpG (n=5)</b>	pVAX1	Lp-CpG	Lp

Grupo 1: animales que recibieron el fragmento F2 de PmpD sin adyuvantes. Grupo 2: animales que recibieron el fragmento F2 de PmpD con liposomas (Lp) y *gemi* (Gem) como adyuvantes. Grupo 3:

animales controles que recibieron sólo adyuvantes, liposomas (Lp) y *gemini* (Gem). Grupo 4: animales que recibieron el fragmento de F2 de PmpD con liposomas (Lp) y CpG como adyuvantes. Grupo 5: animales controles que recibieron sólo adyuvantes, liposomas (Lp) y CpG.

Previo a la primera dosis (pre-inmune) y diez días posteriores a cada inoculación, se obtuvo una muestra de sangre por punción de la vena de la cola y muestras de exudados vaginales mediante lavados con PBS estéril. Las muestras de sangre obtenidas fueron centrifugadas para la obtención del suero, los cuales se conservaron a -20 °C, mientras que las muestras de lavado vaginal fueron centrifugadas y se conservó el sobrenadante con inhibidores de proteasas (cocktail Set I. Merck, Darmstadt, Alemania) a -80 °C hasta su utilización.

El apareo de los animales se realizó diez días posteriores a la última dosis. La evaluación de la fertilidad *in vivo* fue realizada como se describe en el punto 4. En la Figura 22 se representa el esquema de inmunización y de evaluación de la fertilidad realizado.



**Figura 22.** Esquema de inmunización y de evaluación de la fertilidad. Se señalan los días en los que los animales fueron inoculados (di), en los que se realizaron las extracciones (de) de sangre (S) (para la obtención de los sueros) y la extracción de lavados vaginales (Lv), y el día de sacrificio. (La foto de microscopía de fluorescencia de espermatozoides de ratón fue extraída de <https://www.infobioquimica.com/new/2016/03/07/demasiada-competencia-empeora-la-calidad-del-semen/>).

### 3. Evaluación de anticuerpos anti-rF2PmpD

#### 3.1 Evaluación de anticuerpos anti-rF2PmpD, IgG, IgG1 e IgG2a, en suero.

Para evaluar si los animales respondieron a la inmunización se empleó un ensayo de ELISA utilizando como antígeno el producto de expresión de F2 de PmpD recombinante (rF2PmpD) obtenido como se describe en el inciso 1.3. Se evaluaron los sueros extraídos diez días

posteriores a cada dosis. Asimismo, en algunos animales, se evaluaron los anticuerpos específicos en suero obtenido el día del sacrificio.

Placas de 96 pocillos de fondo plano, con alta capacidad de unión (Microlon™ 600, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) se sensibilizaron por incubación de 1 µg de rF2PmpD en 100 µL de *buffer* carbonato pH 9,6 durante 1 hs a 37 °C y luego 16 hs a 4°C. Posteriormente, las placas fueron lavadas tres veces con PBS con *Tween* 20 0,05 % (PBS-T 0,05%) e incubadas a 37 °C con PBS con leche descremada (PBS-L) 5% durante 1 hora, para bloquear los sitios libres, evitando así uniones inespecíficas. Se lavó nuevamente como se indicó anteriormente para eliminar el exceso del agente bloqueante y luego se procedió a colocar los sueros (por duplicado) diluidos 1:100 en PBS-L 1% durante 1 hora a 37 °C. Posterior al lavado se agregaron los siguientes anticuerpos conjugados: anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (anti-IgG-Px) (Jackson, Baltimore, MD, EE.UU.), alternativamente, anti-IgG1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA, EE.UU.) o anti-IgG2a (Abcam Inc. Cambridge, MA, EE.UU.) de ratón, conjugados con peroxidasa. Estos anticuerpos se emplearon diluidos 1:10000 en PBS-L 1% y se incubaron 1 hora a 37 °C. Posteriormente, se agregaron 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TMB (Single Solution (blue) Zymed, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU) durante 15 minutos. Para detener el desarrollo de la reacción de color se emplearon 50 µL de ácido sulfúrico 2 N. Se procedió a medir la DO a 450 nm en un lector de ELISA (Emax Precision Microplate Reader, Beckman Coulter, Fullerton, CA, EE.UU.). Asimismo, se evaluó el diluyente (PBS-L 1%) empleado para diluir los sueros (blanco de reacción) y los sueros pre-inmunes, extraídos antes de la primera dosis (controles negativos). Los resultados fueron expresados como la media ± error estándar de la media (*Standard error mean*: SEM) de las DO a 450 nm para cada grupo experimental.

### 3.1.1 Titulación de los anticuerpos anti-rF2PmpD IgG, IgG1 e IgG2a en suero.

Teniendo en cuenta que las DO obtenidas diez días posteriores a la última dosis superaban valores de 2, se titularon los sueros de cada animal de los grupos experimentales que recibieron proteína. Para ello, el ensayo de ELISA descrito en el inciso 3.1 fue realizado utilizando siete diluciones seriadas al cuarto a partir de 1:1000 (1:1000-1:4096000), además de la dilución anteriormente evaluada 1:100. Para la determinación del título se calculó un *cut-off* el cual se determinó como el promedio de las DO obtenidas para las 8 diluciones de una mezcla de sueros de los grupos controles (Lp-Gem, Lp-CPG) y de los sueros pre-inmunes más tres desviaciones estándares. De este modo, el título fue calculado como la última dilución que dio un valor de DO superior al del *cut-off*. El *cut-off* obtenido para IgG fue 0,095, para IgG1 fue 0,07 y para IgG2a fue 0,099. Los resultados fueron expresados como la mediana y rango intercuartil del cociente 1: dilución para cada muestra.

### 3.2. Evaluación de anticuerpos anti-rF2PmpD IgG e IgA en lavado vaginal.

Para evaluar si los animales generaron una respuesta humoral en la mucosa genital se evaluaron anticuerpos anti-rF2PmpD en lavado vaginal obtenidos diez días posteriores a cada dosis. Las condiciones adoptadas en dicho ensayo fueron las descritas en 3.1 a excepción de la muestra a ensayar, la cual consistió en 50  $\mu$ L de lavado y 25  $\mu$ L de PBS-L 1%. Asimismo, se emplearon los anticuerpos conjugados anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (anti-IgG-Px) (Jackson, Baltimore, MD, EE.UU.) y anti-IgA de ratón conjugado con peroxidasa (anti-IgA-Px) (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE. UU.) ambos diluidos 1:10000. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  SEM de la DO para cada grupo experimental.

### 3.3. Análisis estadísticos

Para la representación y análisis de los datos se empleó el programa GraphPad versión 5.00 para Windows (San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) [362].

Los datos de DO obtenidos a distintos tiempos para los 5 grupos experimentales se comportan como una distribución normal según el test de normalidad Kolmogorow-Smirnov por lo tanto fueron analizados con la prueba paramétrica ANOVA de dos factores (con pos-test de Bonferroni). Los valores de DO obtenidos al punto final (10 días pos última dosis) fueron analizados estadísticamente con un ANOVA de un factor (con pos-test de Bonferroni).

El resto de los resultados no se ajusta a una distribución normal, por lo tanto se emplearon las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis (con pos-test de Dunn) y de Mann-Whitney según corresponda. Los valores de p menores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

## 4. Evaluación de la fertilidad *in vivo* de los animales inmunizados mediante el apareo con machos de fertilidad comprobada.

Como se enunció anteriormente, diez días posteriores a la última dosis y habiendo verificado la presencia de anticuerpos anti-rF2PmpD, se controlaron los ciclos estrales de las hembras por extendidos vaginales realizados mediante lavados con PBS estéril. La tarde del proestro (período donde las hembras están receptivas) fueron colocadas en apareo con machos sin inmunizar de la misma cepa y edad, y de fertilidad comprobada. Al día siguiente se controló la presencia de tapón vaginal o de espermatozoides en extendidos vaginales. Ante evidencia de apareo (día 0), las hembras fueron separadas y mantenidas hasta el día 18 de preñez. Ese día fueron sacrificadas por punción cardíaca bajo anestesia, utilizando la combinación de Ketamina (Hollyday-Scott S. A. Beccar, BA, Argentina) y Xilacina (Richmond, Grand Bourg, BA, Argentina) a una dosis de 100 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente, y se recolectaron los úteros para el recuento de sitios de implantación, resorciones, fetos vivos y muertos, y los ovarios para el

recuento de cuerpos lúteos. Con estos datos se calcularon los siguientes parámetros según Perobelli y colaboradores, 2012 [576].

Potencial de fertilidad (eficiencia de implantación):  $\frac{\text{Número de sitios de implantación}}{\text{Número de cuerpos lúteos}} \times 100$

Tasa de pérdida de pre-implantación:  $\frac{\text{Número de cuerpos lúteos} - \text{Número de sitios de implantación}}{\text{Número de cuerpos lúteos}} \times 100$

Tasa de pérdida pos-implantación:  $\frac{\text{Número de sitios de implantación} - \text{Número de fetos vivos}}{\text{Número de sitios de implantación}} \times 100$

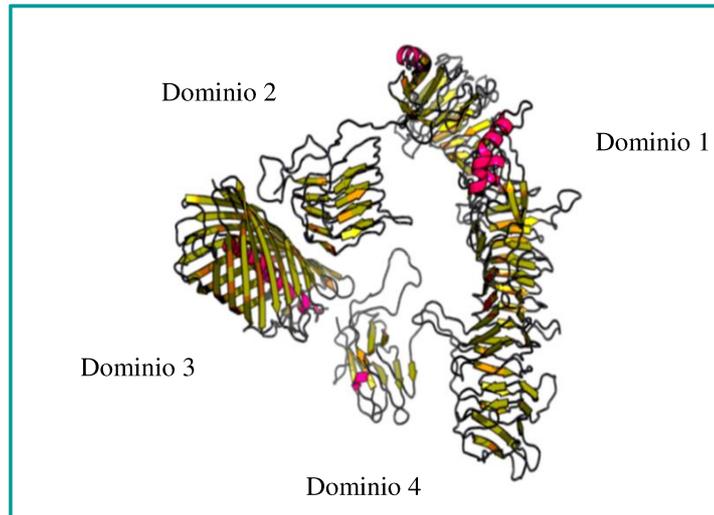
## Resultados

### 1. Diseño de diferentes formulaciones basadas en ADN plasmídico/proteína para inducir inmunidad hacia Pmp D de *Chlamydia trachomatis*.

#### 1.1. Predicción de la estructura 3D

El modelado de PmpD se realizó usando Raptor X, que realiza alineamientos entre una secuencia diana y una o varias plantillas de proteínas distantemente relacionadas [548]. El software Raptor X modeló 1398 residuos de 1530 (91%) de la secuencia de PmpD e identificó cuatro dominios (Figura 23). Para modelar los dominios 1 y 4, Raptor X utilizó como plantilla el dominio pasajero del autotransportador EspP de *E. coli* (entrada PDB: 3szeA), como plantilla del dominio 2 empleó la ramnogalacturonasa A de *Aspergillus aculeatus* (entrada PDB: 1rmg A), y como plantilla del dominio 3, el autotransportador EstA de *Pseudomonas aeruginosa* (entrada PDB: 3kvn A), el cual corresponde al dominio conformado por el barril de láminas  $\beta$ . El software predice que la proteína tiene láminas  $\beta$  (31%), estructuras de hélices  $\alpha$  (9%) y bucles (58%) (Figura 23). Según la predicción, un 34% de PmpD está expuesto a la superficie, mientras que un 22% de PmpD está expuesto parcialmente y un 43% está oculto. El modelo es de buena calidad según lo sugerido por los puntajes de confianza asignados por el software: P-value =  $2,59 \times 10^{-17}$ , y uGDT = 409. El modelado por homología también se realizó con los softwares Phyre [577] y Swiss-Model [578]. Sin embargo, a diferencia de Raptor X, estos predijeron un solo dominio, particularmente el del barril  $\beta$  (datos no mostrados).

Se realizó una evaluación adicional de la calidad del modelo con ANOLEA y RAMPAGE. El análisis ANOLEA indicó que el 45% de los aminoácidos modelados por Raptor X tienen alta energía. La gráfica de Ramachandran mostró que el 91,3% de los residuos (1300 aa) en el modelo de PmpD se encontraban dentro de las regiones más favorecidas (conformaciones estables) y el 5,8% (83 aa) de los residuos en la región permitida (conformaciones moderadamente estables).



**Figura 23.** Estructura 3D de PmpD. Modelo molecular obtenido con Raptor X.

## 1.1.2. Predicción de epitopes de linfocitos B

### 1.1.2.1. Predicción de epitopes lineales de linfocitos B

Bepipred predijo 48 epitopes lineales de LB (que tienen más de cuatro residuos) con una sensibilidad y una especificidad del 75% y del 50%, respectivamente. Como se puede ver en la Figura 24, estos epitopes son abundantes y están distribuidos homogéneamente a lo largo de la secuencia de la proteína (resaltados en gris). Cuarenta motivos característicos de las Pmp, particularmente 21 GGA (subrayados) y 19 FxxN (en negrita) están presentes en la secuencia de aminoácidos, diez de ellos están incluidos en las regiones de los epitopes.

```

MSSEKDIKSTCSKFSLSVVAAILASVGLASCVDLHAGGQSVNELVYVGPQAVLLLDQIRDLFVGSKDSQAEGQ
YRLIVGDPSSFQEKDADTLPGKVEQSTLFSVTNPVVFQGVDDQDQVSSQGLICSFTSSNLDSPRDGESFLGIAFVG
DSSKAGITLTDVKASLSGAALYSTEDLIFEKIKGGLEFASCSSLEQGGACAAQSILIHDCQGLQVKHCTTAVNAE
GSSANDHLGFGGGAFFVTGSLSGEKSLYMPAGDMVVANCDGAISFEGNSANFANGGAIAASGKVLVANDKK
TSFIENRALSGGAIAASSDIAFQNCALVFKGNCAIGTEDKGSLLGGGAISSLGTVLLQGNHGITCDKNESASQGG
AIFGKNCQISDNEGPVFRDSTACLGGGAIAAQEIVSIQNNQAGISFEGGKASFGGGIACGSFSSAGGASVLGTIDI
SKNLGAISFSRTLCTTSDLGQMEYQGGGALFGENISLSENAGVLTFKDNIVKTFASNGKILGGGAILATGKVEIT
NNSGGISFTGNARAPQALPTQEEFPLFSKKEGRPLSSGYSGGGAILGREVAILHNAAVVFEQNRLQCSEEEATLL
GCCGGGAVHGMDSTSIVGNSSVRFGNNYAMGQGVSGGALLSKTVQLAGNGSVDFSRNIASLGGGALQASEGN
CELVDNQYVLFNRDNRGRVYGGAISCLRGDVVISGNKGRVEFKDNIATRLYEETVEKVEEVEPAPEQKDNNEL
SFLGSVEQSFITANQALFASDGDLSPESSISSEELAKRRECAGGAIFAKRVRIVDNQEAUVFSNNFSDIYGGAI
TGLSREEDKLDGQIPEVLISGNAGDVVFSGNSSKRDEHLPHTGGGAICTQNLTISQNTGNVLFYNNVACSGGAV
RIEDHGNVLEAFGGDIVFKGNSSFRAQGSDAIYFAGKESHITALNATEGHAIVFHDALVFENLKERKSAEVLLI
NSRENPGYTGSIRFLEAESKVPQCIHVQQSLELLNGATLCSYGFQDAGAKLVLAAGSKLKILDSTGTPVQGHAI
SKPEAEIESSEPEGASLWIAKNAQTTVPMVDIHTISVDLASFSSSQEGTVEAPQVIVPGGSYVRSGELNLELV
NTTGTGYENHALLKNEAKVPLMSFVASSDEASAEISNLSVSDLQIHVATPEIEEDTYGHMGDWSEAKIQDGTLVI
NWNPTGYRLDPQKAGALVFNALWEEGAVLSALKNARFAHNLTQRMEFDYSTNVWGFAGGGFRTLSAENLV
AIDGYKGAYGGASAGVDIQLMEDFVLGVSGAAFLGKMDSQKFDAEVSRKGVVGSVYTGFLAGSWFFKGYSL
GETQNDMKTRYGVLGESSASWTSRGLADALVEYRSLVGPVRPTFYALHFNPHYVEVSYASMKFPGFTEQGREA
RSFEDASLNTIPLGMKFEAFIKGQFSEVNSLGSYAWAYRKVEGGAVQLLEAGFDWEGAPMDLPRQELRV
ALENNTEWSSYFSTVLGLTAFCGGFTSTDSKLGYEANAGRLIF

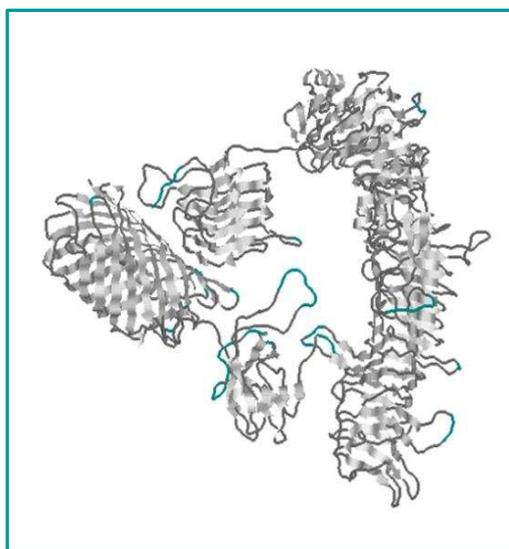
```

**Figura 24.** Secuencia de aminoácidos PmpD. Bepipred predijo 48 epitopes lineales de LB (resaltados en gris). Los motivos FxxN se indican en negrita y las secuencias GGA, subrayadas.

### 1.1.2.2. Epitopes discontinuos de linfocitos B

Discotope identificó 57 residuos como parte de regiones de epitopes (Figura 25). Se predijeron epitopes discontinuos de LB con una especificidad del 75% y una sensibilidad del 47%. Como predice la teoría, los epitopes conformacionales se observaron en bucles, principalmente en las regiones no incluidas en el dominio del barril  $\beta$  (C-terminal) (Figura 18).

Aunque las puntuaciones de confianza asignadas por Raptor X indicaban un modelo de buena calidad, la fiabilidad del modelo 3D se analizó adicionalmente en la localización de los epitopes conformacionales predichos. El análisis realizado por ANOLEA indicó que el 85% de los 57 residuos tienen alta energía. El gráfico de Ramachandran mostró que el 86% de los residuos de los epitopes se incluyen en regiones favorables y el 12,3% en regiones permitidas.



**Figura 25.** Epitopes de LB conformacionales predichos por Discotope (regiones celestes).

### 1.1.3. Predicción de epitopes de linfocitos T

La capacidad de un epítoto para unirse a moléculas de MHC se expresa como valor de IC50 (concentración requerida [nM] para inhibir un 50% la unión de un péptido usado como sonda). Los péptidos de unión fuerte (UF) tienen un valor de IC50 por debajo de 50 nM, y péptidos de unión débil (UD) un valor de IC50 entre 50-500 nM. La ubicación de los epitopes de LT con afinidad fuerte y débil para los alelos MHC-I y MHC-II humanos se predijo utilizando el recurso IEDB.

Como se puede ver en la Tabla 13, NetMHC predijo 271 epitopes de LT de diferentes longitudes (9 aa, 10 aa, 11 aa, 12 aa) con afinidad débil a moléculas de MHC I y 70 epitopes de LT de diferentes longitudes (9 aa, 10 aa, 11 aa, 12 aa) con gran afinidad por las moléculas de MHC I (Tabla 13A). Por otro lado, NetMHCII predijo 2903 epitopes de LT de 15 aa con afinidad débil y 742 epitopes de LT de 15 aa con gran afinidad por las moléculas de MHC clase II para los alelos de

MHC más frecuentes en Argentina [562] (Tabla 13B). Estos epitopes son abundantes y se distribuyen homogéneamente a lo largo de la secuencia de la proteína. Múltiples alelos de MHC Clase II son capaces de unirse al mismo epítotope. Esto se observó con varios epitopes.

**Tabla 13A.** Número de epitopes de LT para MHC clase I de diferentes longitudes (9, 10, 11, 12 aminoácidos)

Predicción de MHC clase I	9aa		10aa		11aa		12aa	
	UF	UD	UF	UD	UF	UD	UF	UD
<b>HLA-A*02:01</b>	14	25	4	20	1	15	7	21
<b>HLA-B*35:01</b>	9	33	1	17	10	26	10	22
<b>HLA-B*35:03</b>	1	0	0	1	0	0	0	1
<b>HLA-C*07:01</b>	2	15	3	11	3	12	4	6
<b>HLA-C*07:02</b>	0	10	0	10	1	12	0	14

HLA: Antígenos leucocitarios humanos; UF: unión fuerte; UD: unión débil

**Tabla 13B.** Número de epitopes de LT para MCH de clase II de 15aa

Predicción de MHC clase II	15aa	
	UF	UD
<b>HLA-DRβ1*01:01</b>	375	619
<b>HLA-DRβ1*04:01</b>	39	479
<b>HLA-DRβ1*04:04</b>	40	442
<b>HLA-DRβ1*04:05</b>	47	365
<b>HLA-DRβ1*07:01</b>	99	402
<b>HLA-DRβ1*11:01</b>	20	264
<b>HLA-DRβ1*13:02</b>	122	332

UF: unión fuerte; UD: unión débil

#### 1.1.4. Candidatos para vacunas

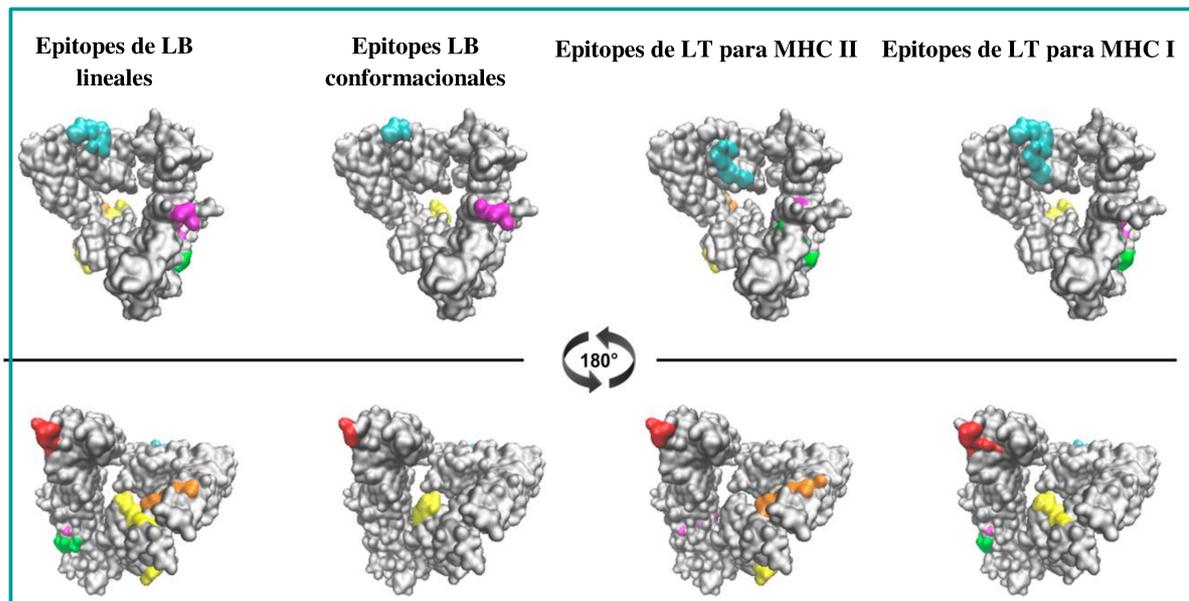
PmpD tiene abundantes epitopes de LB y LT distribuidos a lo largo de toda la secuencia. Por lo tanto, podrían seleccionarse numerosos fragmentos como candidatos para el diseño de una vacuna. La información obtenida permite identificar los epitopes de LB y LT como candidatos para generar una vacuna que induzca tanto respuesta humoral como celular.

A partir de esto, se realizó un análisis más exhaustivo para identificar regiones que comprenden ambos tipos de epitopes. El análisis consistió en comparar simultáneamente los resultados obtenidos por los predictores. Como se muestra en la Tabla 14, los residuos de varios epitopes se han identificado simultáneamente por los cuatro predictores: Bepipred (epitopes B lineales), Discotope (epitopes B conformacionales), NetMHC (epitopes T para MHCI) y NetMHCII (epitopes T para MHCII). Los datos indican que hay seis regiones R con epitopes predichos por al menos dos predictores (Tabla 14, Figura 26). Un análisis adicional de la

conservación de la secuencia de mostró que estas regiones se conservan entre serotipos, con la excepción del aa 782 (V en serotipos A-C, y A en serotipos D-L).

**Tabla 14.** Los epitopes de LB y LT resaltados en negrita incluyen residuos predichos simultáneamente por al menos dos predictores. Los residuos subrayados corresponden a los aminoácidos centrales de los péptidos MHC II.

R	Epitopes de LB Lineales	Epitopes de LB Conformacionales	Epitopes de LT para MHC II (UF)	Epitopes LT para MHC I (UD)
1	<b>PSSFQEKDADTLPGKVE</b> (82-98)	<b>FQEKD</b> (85-89)	HLA-DRβ1*13:02 <b>GKVEQSTLFSVTNPV</b> (95-109)	HLA-B*35:01 LIVGDPSSF (77-85), HLA-B*35:01 <b>LPGKVEQSTLF</b> (93-103) HLA-A*02:01 <b>KVEQSTLFSV</b> (96-105) HLA-C*07:02 <b>SFQEKDADTL</b> (84-93)
2	<b>NNQAGISFEGGKASFG</b> (412-427)	<b>GIS</b> (416-418) <b>E</b> (420)	HLA-DRβ1*01:01 <b>AGISFEGGKASFGGG</b> (415-429)	HLA-B*35:01 VSIQNNQAGISF (408-419)
3	<b>FASEDGDLSPESISSEELA</b> (763-782)	<b>SEELAL</b> (778-783)	HLA-DRβ1*01:01 <u>FITAANQALFA</u> SEEDG (754-768)	HLA-B*35:01 <b>FASEDGDLSPES</b> (763-774)
4	<b>LREEDKLDGQ</b> (825-834)		HLA-DRβ1*13:02 <b>GQIPEVLISGNAGDV</b> (833-848)	HLA-A*02:01 <b>KLDGQIPEVLI</b> (830-840)
5	<b>PEIEEDTYGHMGDWSEAKIQ</b> (1171-1190)	<b>IHVATPEI</b> (1166-1173)	HLA-DRβ1*01:01 <b>WSEAKIQDGLVINW</b> (1184-1198)	HLA-B*35:01 <b>TPEIEEDTY</b> (1170-1178)
6	<b>LGESSASWT</b> (1353-1361)		HLA-DRβ1*01:01 <b>RYGVLGESSASWTSR</b> (1349-1363)	



**Figura 26.** Regiones que contienen epitopes B y T predichas simultáneamente por más de un predictor. Las regiones se resaltan en diferentes colores: 1: celeste, 2: rojo, 3: magenta, 4: verde, 5: amarillo y 6: anaranjado.

## 1.2. Selección de los fragmentos

Teniendo en cuenta los resultados del análisis *in silico* y las diferentes regiones funcionales de la proteína descritas previamente [536], [579], [580] se seleccionaron y clonaron dos fragmentos con abundantes epitopes B y T para ser evaluados como inmunógenos.

El fragmento F1 seleccionado posee 671 aminoácidos (aa 68-739) y corresponde a la región N-terminal de PmpD que además de tener epitopes T y B contiene una región RGD: motivo de unión a integrina descrita por Wehrl y colaboradores [578], la cual podría tener una función adhesina. Asimismo, mediante el análisis *in silico* se pudo comprobar que varios de los epitopes incluidos en el fragmento F1 contienen motivos GGA y FxxN. Diversos autores enuncian que estos motivos son altamente inmunogénicos y que podrían llegar a tener función de adhesión en células eucariotas [259], [536].

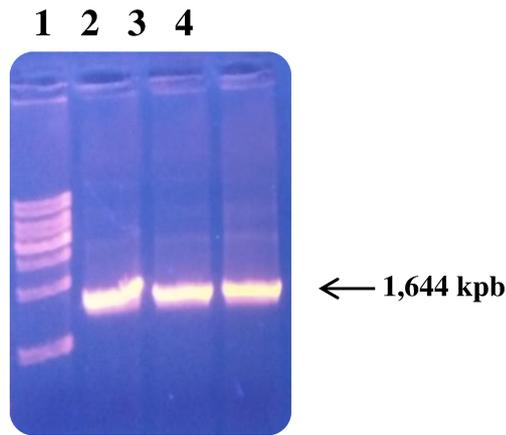
El fragmento F2 tiene un tamaño de 547 aminoácidos (aa 693-1240) y contiene una región común al fragmento F1, que incluye la región RGD. Asimismo, posee epitopes T y B que corresponden a tres regiones predichas simultáneamente por los predictores y otra región descrita por Swanson y colaboradores, KRRECAGGAIFAKRVR que correspondería a una señal putativa de localización nuclear [536].

### 1.2.1. Clonados de F1, F2, GSF1, GSF2 en el Vector pGEM®-T Easy

Las secuencias codificantes de los fragmentos seleccionados F1 y F2, así como los genes sintéticos GSF1 y GSF2 fueron insertadas en el vector pGEM®-T Easy. A partir del ADNp obtenido por minipreparación de ADNp, se realizó una PCR con oligonucleótidos específicos. La presencia e identidad del inserto fueron analizadas por PCR y secuenciación, respectivamente. Los resultados mostraron que las secuencias obtenidas estaban completas y correctas con un 98-99% de identidad en la mayoría de los clones secuenciados corroborados con la herramienta BLAST-n disponible *on line* [353].

### 1.2.2. Clonado de F2 en pET32a para expresión del fragmento de PmpD

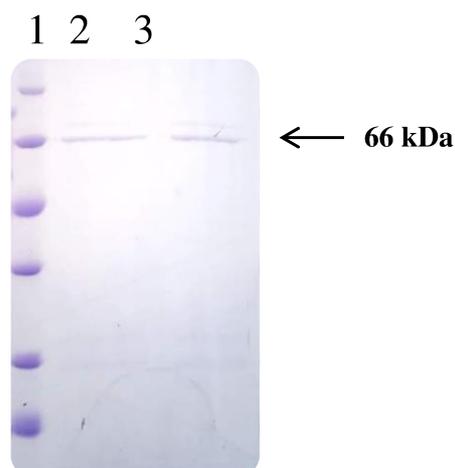
Como se enunció en el apartado materiales y métodos se decidió continuar con el fragmento F2. El mismo, se pudo clonar exitosamente en el vector de expresión pET32a. A partir del ADNp obtenido por minipreparación de ADNp de las colonias recuperadas de la placa de transformación, se realizó una PCR con oligonucleótidos específicos. Mediante electroforesis en gel de agarosa se verificó la presencia del inserto ya que se observaron bandas correspondientes al tamaño molecular del producto de amplificación (Figura 27). La identidad e integridad de la secuencia de interés fueron verificadas por secuenciación.



**Figura 27.** Electroforesis en gel de agarosa 2%. Calle 1: marcador de peso molecular cuyas bandas corresponden a los siguientes tamaños: 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2, y 1 kpb. Calles 2, 3, 4: se observan las bandas correspondientes al producto amplificado de F2 de PmpD cuyo tamaño es 1,644 kpb a partir de 3 clones de bacterias transformadas.

### 1.2.3. Obtención de la proteína recombinante

La inducción de la expresión de la proteína en *E.coli* así como el proceso de purificación fueron optimizados. A partir de un cultivo de 800 mL se obtuvieron 4 mL de rF2PmpD en una concentración 0,5 mg/mL. La misma fue verificada por SDS-PAGE observándose la banda correspondiente al peso molecular de la proteína recombinante expresada, 66 kDa (Figura 28). La presencia de la proteína recombinante fue verificada mediante Western-Blot utilizando un anticuerpo anti-His-Tag. La proteína (rF2PmpD) fue utilizada posteriormente para los ensayos de inmunización y para la evaluación de la respuesta inmune mediante ELISA.

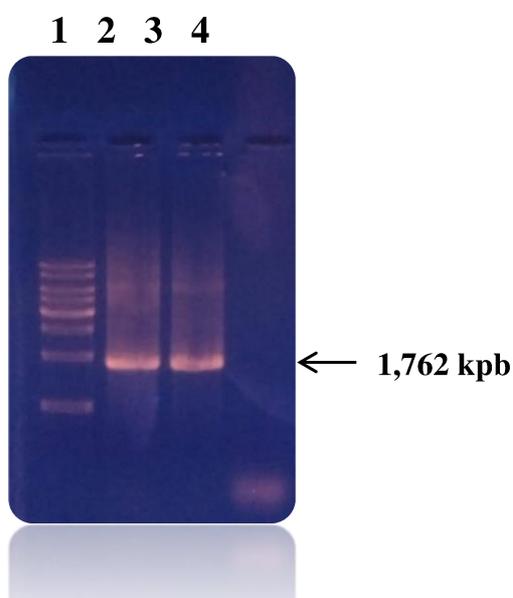


**Figura 28.** SDS-PAGE 15% donde se observan bandas correspondientes a F2 de PmpD recombinante, cuyo PM es 66 kDa. Calle 1: marcador de peso molecular: 116 kDa, 66,2 kDa, 45

kDa, 35 kDa, 25 kDa, 18,4 kDa, 14,4 kDa. Calles 2 y 3: fracciones recuperadas con imidazol 100mM.

#### 1.2.4. Clonado de GSF2-F2 en pVAX1 para inmunización génica

Se pudo clonar exitosamente el fragmento GSF2-F2 en el vector para inmunización génica pVAX1. El ADNp recuperado de las colonias de la placa de transformación fue sometido a PCR con oligonucleótidos específicos y se corroboró la presencia del inserto, debido a que se observaron bandas correspondientes al peso molecular del fragmento (Figura 29). Asimismo, se volvió a chequear la identidad de la secuencia de interés y su correcta inserción, por secuenciación. El fragmento se encontró completo y correctamente incorporado al vector. Se detectaron 3 mutaciones puntuales en 3 pb de las cuales sólo una cambia un aminoácido (particularmente una valina (aa 57) por una alanina), el cual no pertenece a ninguno de los epitopes predichos.



**Figura 29.** Electroforesis en gel de agarosa 2%. Calle 1: marcador de peso molecular cuyas bandas corresponden a los siguientes tamaños: 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2, y 1 kpb. Calles 2 y 3 producto amplificado de GSF2-F2 de PmpD cuyo tamaño es 1,762 kpb a partir de 2 clones. Calle 4: control de reactivos de la PCR.

#### 1.2.5. Maxipreparación de pVAX1-GSF2-F2PmpD.

Una vez obtenida la construcción plasmídica correcta, se procedió a obtener el ADNp en cantidad y calidad suficientes para el protocolo de inmunización génica.

A partir de un cultivo de 200 mL se obtuvieron 200  $\mu$ L de pVAX1-GSF2-F2PmpD con una concentración de 19,8  $\mu$ g/ $\mu$ L. El plásmido fue chequeado por electroforesis en gel de agarosa donde no se observó presencia de ADNg ni restos de ARN (Figura 30). Asimismo, se obtuvo una relación 260/280 de 1,9 lo que indica que tiene una pureza adecuada.



**Figura 30.** Electroforesis en gel de agarosa 1%. Calle 1: marcador de peso molecular cuyas bandas corresponden a los siguientes tamaños: 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2, y 1kpb. Calles 2, 3 y 4: producto de la maxi preparación de ADNp obtenido (pVAX1-GSF2-F2PmpD) puro, diluido 1/100 y 1/1000 respectivamente.

## 2. Inmunización de ratones hembras con las diferentes formulaciones vacunales

Como se detalla en el apartado materiales y métodos, se evaluó la estrategia de inmunización *prime-boost*. La misma consistió en realizar una primera dosis por vía intradérmica con el plásmido para la inmunización génica con la secuencia codificante del gen sintético y el fragmento F2 de PmpD para los grupos tratados (pVAX1-GSF2-F2PmpD) y sin ella para los controles (pVAX1). Luego se realizaron dos dosis simultáneas de rF2PmpD con liposomas por vía nasal y con liposomas (Lp) e inmunoestimulantes (Gem o CpG) por vía subcutánea. Los grupos controles fueron inoculados con las formulaciones sin la proteína.

### 2.1 Evaluación de anticuerpos anti-rF2PmpD, IgG e IgA en lavados vaginales y en suero

Teniendo en cuenta que la respuesta humoral tanto sistémica como local (en mucosas) es una de las características fundamentales que debe tener la vacuna contra *C. trachomatis*, se evaluaron anticuerpos específicos contra rF2PmpD en los ratones inmunizados con las diferentes formulaciones tanto en suero como en lavado vaginal.

#### 2.1.1 Evaluación de anticuerpos anti-rF2PmpD en suero

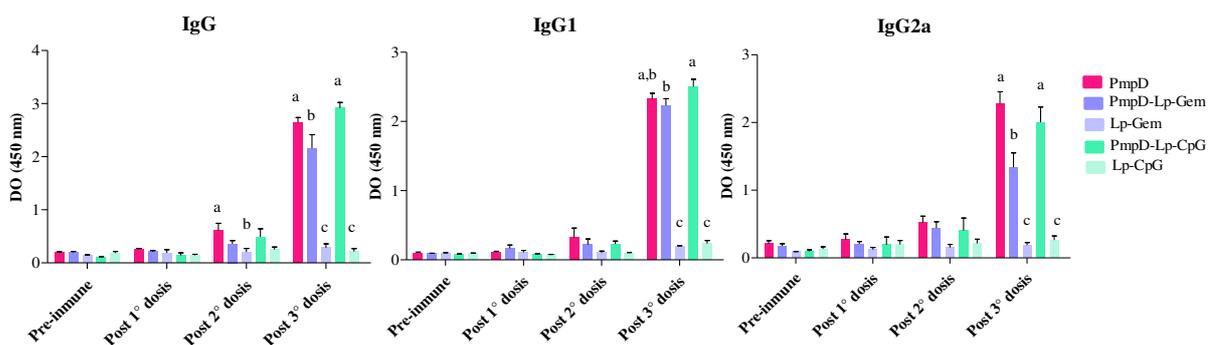
La Figura 31 muestra la evolución en el tiempo de los niveles de anticuerpos específicos de tipo IgG (A), IgG1 (B) e IgG2a (C) para cada grupo experimental.

Resulta interesante observar que después de la tercera dosis los tres grupos experimentales PmpD, PmpD-Lp-Gem, PmpD-Lp-CpG presentaron un aumento significativo de los niveles de IgG totales, IgG1 e IgG2a anti-rF2PmpD en suero respecto a los grupos controles (Lp-Gem, Lp-CpG) ( $p < 0,001$ ). En ese tiempo, entre los tres grupos experimentales que recibieron proteína se destacan los grupos PmpD y PmpD-Lp-CpG debido a que presentaron un aumento significativo de IgG e IgG2a específicas respecto a PmpD-Lp-Gem (IgG:  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ , respectivamente; IgG2a: ( $p < 0,001$ )). En cuanto a los anticuerpos de isotipo IgG1 se destaca el grupo PmpD-Lp-CpG ya que presentó un incremento significativo en los niveles de anticuerpos específicos respecto al grupo PmpD-Lp-Gem ( $p < 0,05$ ).

Después de la segunda dosis se observa un aumento significativo entre el grupo PmpD respecto al grupo control Lp-Gem ( $p < 0,05$ ).

Por último, es importante resaltar, que no se encontraron anticuerpos específicos IgG, IgG1 e IgG2a en el suero preinmune en ninguno de los grupos inmunizados, ni en los grupos de controles (Lp-Gem, Lp-CpG) en ninguno de los tiempos evaluados, como era de esperar.

Por otro lado, es importante mencionar que en los animales evaluados a los 30 días luego de la tercer dosis, los niveles de anti-PmpD en suero se mantuvieron en un 40-76% IgG totales, en un 44-77% IgG1 y 32-67% IgG2a en los animales inmunizados con PmpD sin inmunestimulantes y en un 95% IgG totales, y en un 93% IgG1 y sorpresivamente un aumento del 233% de IgG2a en los animales inmunizados con PmpD-Lip-CpG respecto a los niveles de anticuerpos observados 10 días pos tercera dosis.



**Figura 31.** Evaluación de la respuesta inmune humoral. Se representan los niveles de IgG (A), IgG1 (B) e IgG2a (C) anti-rF2PmpD en suero (dilución 1/100), a diferentes tiempos: pre-inmune, pos 1° (día 10), pos 2° (día 31) y pos 3° dosis (día 52), expresados como valores de DO a 450 nm. Diferentes letras muestran diferencias significativas, ANOVA de dos factores con pos-test de Bonferroni.

**Tabla 15.** Media  $\pm$  SEM de los niveles de IgG (A), IgG1 (B), IgG2a (C) obtenidos para cada grupo experimental a distintos tiempos, pre inmune, pos 1° dosis (día 10), pos 2° dosis (día 31), pos 3° dosis (día 52).

A

Grupos Experimentales	IgG			
	Pre-inmune	pos 1° dosis	pos 2° dosis	pos 3° dosis
<b>PmpD</b>	0,19 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,02	0,60 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	2,64 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>
<b>PmpD-Lp-Gem</b>	0,19 $\pm$ 0,02	0,20 $\pm$ 0,02	0,35 $\pm$ 0,05	2,15 $\pm$ 0,25 <sup>b</sup>
<b>Lp-Gem</b>	0,14 $\pm$ 0,01	0,18 $\pm$ 0,06	0,20 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	0,28 $\pm$ 0,07 <sup>c</sup>
<b>PmpD-Lp-CpG</b>	0,09 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,04	0,48 $\pm$ 0,15	2,91 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>
<b>Lp-CpG</b>	0,18 $\pm$ 0,02	0,14 $\pm$ 0,01	0,25 $\pm$ 0,04	0,21 $\pm$ 0,05 <sup>c</sup>

B

Grupos Experimentales	IgG1			
	Pre-inmune	pos 1° dosis	pos 2° dosis	pos 3° dosis
<b>PmpD</b>	0,10 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,01	0,32 $\pm$ 0,13	2,32 $\pm$ 0,08 <sup>a,b</sup>
<b>PmpD-Lp-Gem</b>	0,08 $\pm$ 0,009	0,16 $\pm$ 0,04	0,21 $\pm$ 0,08	2,22 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>
<b>Lp-Gem</b>	0,09 $\pm$ 0,008	0,10 $\pm$ 0,02	0,1 $\pm$ 0,02	0,19 $\pm$ 0,007 <sup>c</sup>
<b>PmpD-Lp-CpG</b>	0,07 $\pm$ 0,009	0,08 $\pm$ 0,006	0,22 $\pm$ 0,04	2,50 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>
<b>Lp-CpG</b>	0,08 $\pm$ 0,009	0,07 $\pm$ 0,004	0,09 $\pm$ 0,008	0,23 $\pm$ 0,04 <sup>c</sup>

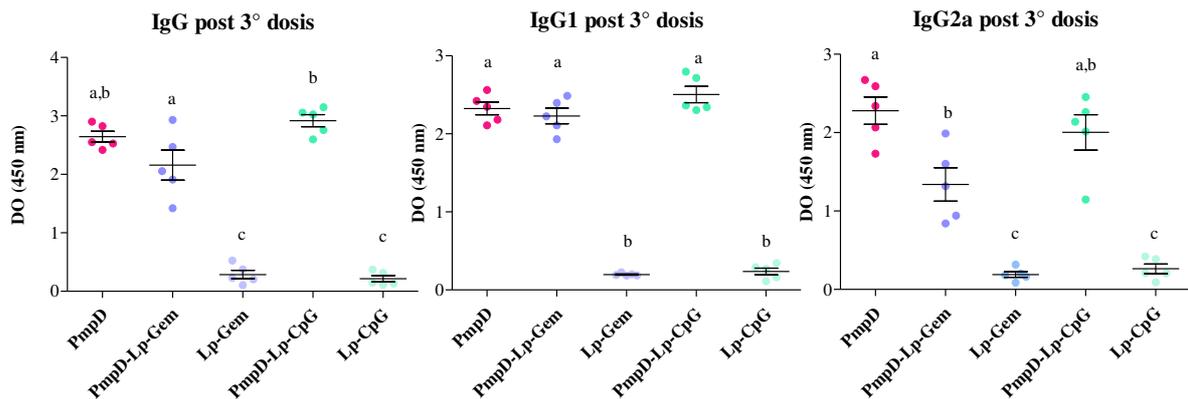
C

Grupos Experimentales	IgG2a			
	Pre-inmune	pos 1° dosis	pos 2° dosis	pos 3° dosis
<b>PmpD</b>	0,21 $\pm$ 0,04	0,26 $\pm$ 0,08	0,51 $\pm$ 0,09	2,28 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>
<b>PmpD-Lp-Gem</b>	0,17 $\pm$ 0,03	0,20 $\pm$ 0,03	0,44 $\pm$ 0,09	1,33 $\pm$ 0,21 <sup>b</sup>
<b>Lp-Gem</b>	0,09 $\pm$ 0,003	0,12 $\pm$ 0,03	0,15 $\pm$ 0,04	0,18 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup>
<b>PmpD-Lp-CpG</b>	0,095 $\pm$ 0,023	0,19 $\pm$ 0,11	0,40 $\pm$ 0,18	2,00 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>
<b>Lp-CpG</b>	0,13 $\pm$ 0,03	0,19 $\pm$ 0,05	0,21 $\pm$ 0,06	0,26 $\pm$ 0,06 <sup>c</sup>

Diferentes letras muestran diferencias significativas, ANOVA de dos factores con pos-test de Bonferroni.

Para poder visualizar mejor los niveles de anticuerpos que presentaron cada uno de los animales se muestran las DO obtenidas pos 3° dosis mediante un gráfico de puntos (Figura 32). Como se observó anteriormente los tres grupos experimentales PmpD, PmpD-Lp-Gem, Pmp-Lp-CpG presentaron niveles significativamente más altos de anticuerpos anti-rF2PmpD IgG, IgG1 e

IgG2a en suero respecto a los grupos de controles ( $p < 0,001$ ). De las dos formulaciones con inmunostimulantes el grupo PmpD-Lp-CpG presentó niveles más altos de IgG respecto a PmpD-Lp-Gem ( $p < 0,01$ ), aunque cabe mencionar que este último grupo presenta mayor dispersión entre animales. Asimismo, de los tres grupos experimentales que recibieron proteína se destacan los grupos PmpD y PmpD-Lp-CpG ya que presentaron niveles más altos de IgG2a respecto a PmpD-Lp-Gem ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ , respectivamente).

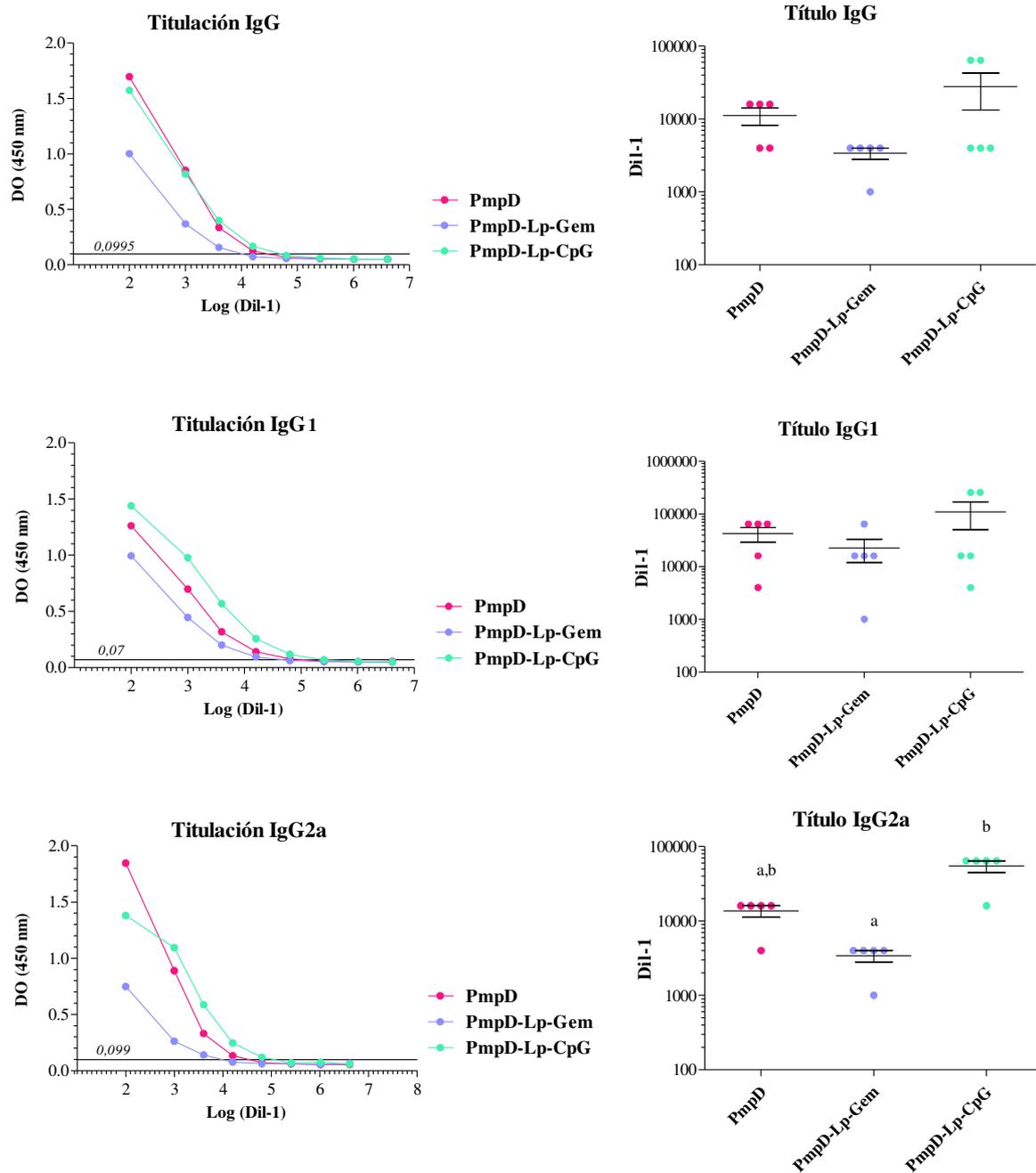


**Figura 32.** Evaluación de la respuesta inmune humoral. Se representan los niveles de IgG totales (A), IgG1 (B) e IgG2a (C) anti-rF2PmpD en suero (dilución 1/100) del día 52 (pos 3° dosis), expresado como valores de DO a 450 nm. Diferentes letras muestran diferencias significativas, ANOVA de un factor con post-test de Bonferroni.

#### 2.1.1.2. Titulación de los anticuerpos anti-F2PmpD IgG, IgG1 e IgG2a en suero.

Teniendo en cuenta que se detectaron altos niveles de anticuerpos específicos diez días pos última dosis, se titularon los sueros de los animales. En la Figura 33 se observan las curvas de titulación y los títulos obtenidos para cada animal según el valor de *cut-off* para los anticuerpos IgG totales, IgG1 e IgG2a, respectivamente. En todos los casos se observa que la curva del grupo PmpD-Lp-Gem presenta menores DO respecto a los otros dos grupos experimentales, cuyas curvas fueron similares.

Todas las formulaciones presentaron títulos similares de anticuerpos IgG totales e IgG1. Sin embargo, el grupo PmpD-Lp-CpG presentó títulos superiores de anticuerpos IgG2a respecto al al grupo PmpD-Lp-Gem ( $p < 0,001$ ). En la Tabla 16 se muestran la mediana y el rango intercuartil de los títulos obtenidos para cada grupo experimental.



**Figura 33.** Curva de titulación y títulos de anticuerpos específicos IgG, IgG1, IgG2a en suero pos 3° dosis. El *cut off* es representado con la línea horizontal y su valor está indicado sobre la línea correspondiente. Para la curva de titulación los resultados fueron expresados como la media de las DO a 450nm para cada grupo experimental en función del logaritmo de 1: dilución. Diferentes letras muestran diferencias significativas, Kruskal-Wallis con pos-test de Dunn.

**Tabla 16.** Mediana y rango intercuartil de los títulos de IgG, IgG1, IgG2a obtenidos para cada grupo experimental 10 días pos 3° dosis.

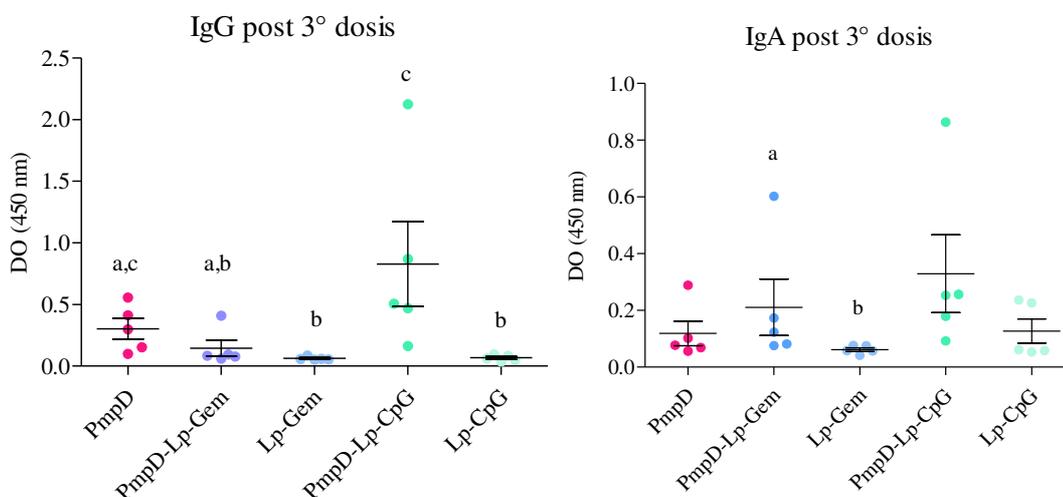
Grupos Experimentales	IgG	IgG1	IgG2a
<b>PmpD</b>	16000 (4000-16000)	64000 (1000-64000)	16000 (10000-16000) <sup>a,b</sup>
<b>PmpD-Lp-CpG</b>	4000 (4000-64000)	16000 (10000-256000)	64000 (40000-64000) <sup>a</sup>
<b>PmpD-Lp-Gem</b>	4000 (2500-4000)	16000 (8500-40000)	4000 (2500-4000) <sup>b</sup>

Diferentes letras muestran diferencias significativas, Kruskal-Wallis con pos-test de Dunn.

### 2.1.2 Evaluación de anticuerpos anti-F2PmpD IgG e IgA en lavados vaginales

Con el objeto de evaluar la respuesta inmune humoral en mucosa vaginal se determinaron los niveles de anticuerpos específicos IgG e IgA. Si bien se realizaron las evaluaciones a todos los tiempos sólo se grafican los resultados obtenidos pos 3° dosis ya que en las dosis anteriores no se observaron niveles relevantes de anticuerpos en mucosa vaginal.

En la Figura 34 se puede observar que los grupos PmpD y PmpD-Lp-CpG presentaron un aumento significativo de IgG anti-PmpD en lavado vaginal respecto a los grupos controles (Lp-Gem, Lp-CpG) ( $p < 0,01$ ). Entre los tres grupos experimentales que recibieron proteína, se observaron niveles significativamente mayores de IgG específicos en el grupo PmpD-Lp-CpG respecto al grupo PmpD-Lp-Gem ( $p < 0,05$ ). Sin embargo el grupo PmpD-Lp-Gem fue el único que presentó niveles de IgA específica mayores respecto al grupo control (Lp-Gem) ( $p < 0,05$ ). Asimismo, es importante mencionar que no se encontraron anticuerpos específicos en lavados vaginales preinmunes. En la Tabla 17 se muestran los valores de la media  $\pm$  SEM de las DO obtenidas para cada grupo experimental.



**Figura 34.** Evaluación de la respuesta inmune humoral. Niveles de IgG e IgA anti-rF2PmpD en lavados vaginales pos 3° dosis. Diferentes letras muestran diferencias significativas, Mann Whitney.

**Tabla 17.** Media  $\pm$  SEM de los niveles de IgG e IgA obtenidos para cada grupo experimental pos 3<sup>o</sup> dosis.

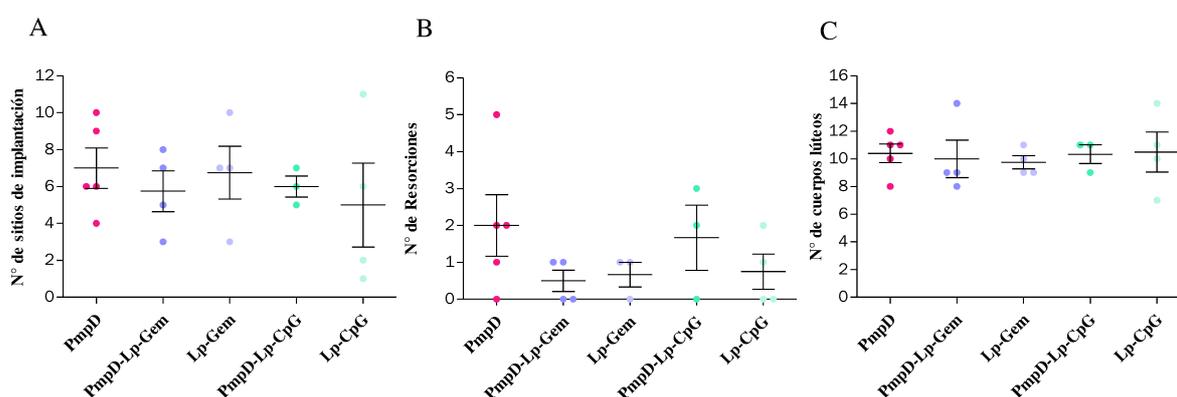
Grupos Experimentales	IgG	IgA
PmpD	0,30 $\pm$ 0,08 <sup>a,c</sup>	0,11 $\pm$ 0,04
PmpD-Lp-Gem	0,14 $\pm$ 0,06 <sup>a,b</sup>	0,21 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>
Lp-Gem	0,06 $\pm$ 0,006 <sup>b</sup>	0,06 $\pm$ 0,006 <sup>b</sup>
PmpD-Lp-CpG	0,82 $\pm$ 0,34 <sup>c</sup>	0,32 $\pm$ 0,13
Lp-CpG	0,06 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,12 $\pm$ 0,04

Diferentes letras muestran diferencias significativas, Mann Whitney.

### 3. Evaluación de la fertilidad de los animales inmunizados mediante el apareo con machos de fertilidad comprobada.

Uno de los principales problemas que generan las vacunas contra *C. trachomatis* son las respuestas inmunes patológicas y, como se describió previamente, la infección por este patógeno está asociada a patologías reproductivas. Por este motivo, la fertilidad de las hembras inmunizadas fue evaluada mediante apareo con machos de fertilidad comprobada.

En la Figura 35 se representan el número de sitios de implantación (A), resorcciones (B) y cuerpos lúteos (C). No se observan diferencias estadísticas entre los grupos experimentales. Asimismo, en todos los grupos, a excepción del grupo que no recibió adyuvantes ni inmunostimulantes (PmpD), un animal no fue preñado en el período evaluado (3 semanas).



**Figura 35.** Se representan el número de sitios de implantación (A), resorcciones (B) y cuerpos lúteos (C) para cada grupo experimental. No se observan diferencias significativas entre los grupos inmunizados con proteína y sus respectivos controles (Mann Whitney).

En la Tabla 18 se muestran la mediana y rango intercuartil de los parámetros de fertilidad evaluados para cada grupo experimental. No se encontraron diferencias significativas en el

potencial de fertilidad ni en la tasa de pérdida de pre-implantación ni en la tasa de pérdida pos-implantación entre los grupos experimentales.

**Tabla 18.** Potencial de Fertilidad, Tasa de pérdida de pre-implantación, Tasa de pérdida de pos-implantación expresados en porcentajes. Se muestra la mediana y entre paréntesis el rango intercuartil.

<b>Grupos experimentales</b>	<b>Potencial de Fertilidad (%)</b>	<b>Tasa de pérdida pre-implantación (%)</b>	<b>Tasa de pérdida pos-implantación (%)</b>
<b>PmpD</b>	46,15 (38,46 - 73,08)	40 (17,42 - 47,73)	33,33 (5,55 - 41,67)
<b>PmpD-Lp-Gem</b>	46,15 (26,92 - 59,62)	43,75 (17,71 - 62,50)	7,14(0 - 18,57)
<b>Lp-Gem</b>	53,85 (30,77 - 71,15)	22,22 (5,55 - 60,10)	7,14 (0 - 28,57)
<b>PmpD-Lp-CpG</b>	46,15 (38,46 - 53,85)	36,36 (33,33 - 54,55)	28,57 (0 - 50)
<b>Lp-CpG</b>	30,77 (9,61 - 75,00)	58,44 (27,44 - 85,36)	16,67 (0 - 83,33)

Los resultados obtenidos sugieren que las formulaciones ensayadas son capaces de inducir la producción de anticuerpos específicos y no exhibirían trastornos en la fertilidad. Sin embargo es necesario destacar que los resultados de fertilidad son preliminares debido al escaso número de animales empleados para la prueba.

## Discusión

### *PmpD de Chlamydia trachomatis es un potencial candidato vacunal*

Las vacunas contra las ITS son una prioridad para contribuir al control global sostenible de las ITS. La infección por *C. trachomatis* es un problema de salud pública en todo el mundo por lo tanto una vacuna que estimule una respuesta inmune protectora y que no genere consecuencias inmunopatológicas es la mejor solución para controlar esta ITS. Se han evaluado varios diseños de vacunas, pero hasta el momento no existe una estrategia inmunoproláctica efectiva a pesar de los muchos esfuerzos realizados a lo largo de los años. Muchos investigadores sugieren que una vacuna exitosa debe ser capaz de generar tanto inmunidad humoral como mediada por células. Por este motivo, un diseño racional de una vacuna requiere la identificación de epitopes tanto de LB como de LT. Por lo tanto, el primer paso fue realizar predicciones *in silico* de epitopes dentro de la secuencia aminoacídica de PmpD.

La secuencia completa de aminoácidos de PmpD se adquirió a partir de la base de datos del NCBI [545] y fue la correspondiente al serotipo L2 de PmpD, la cual es una de las proteínas más conservadas entre los serotipos de *C. trachomatis* [540]. Asimismo mediante una alineación múltiple con Clustal Omega se confirmó que todos los serotipos (del A al L) comparten entre el 99% y el 100% de identidad de secuencia de aminoácidos. Teniendo en cuenta que PmpD desempeña un papel crítico en la biología y patogénesis de *C. trachomatis*, particularmente en la interacción con las células huésped [581], resulta interesante determinar la presencia y localización de epitopes de LB.

En la presente tesis se predijeron los epitopes de LB con una sensibilidad y una especificidad del 75% y el 50%, respectivamente, empleando dos algoritmos, BepiPred para epitopes lineales y DiscoTope para epitopes conformacionales. BepiPred predijo 48 epitopes de LB lineales mientras que DiscoTope identificó 57 residuos que podrían formar parte de 12 epitopes de LB conformacionales. Respecto a epitopes lineales, diez de los motivos GGA y FxxN están incluidos en las regiones identificadas como epitopes. Estos motivos pueden modular la conformación de la proteína implicada en la adhesión o pueden modular la interacción con los receptores de las células eucariotas [259].

Teniendo en cuenta que los epitopes conformacionales se predicen utilizando un modelo 3D, la confiabilidad del modelo debe ser tomada en cuenta, particularmente en las regiones pronosticadas como epitopes de LB conformacionales. Según los parámetros brindados por Raptor X se sugiere que la calidad del modelo predicho es buena. Asimismo, otro programa RAMPAGE, indicó que una alta proporción (86%) de los residuos que forman parte de los epitopes de LB se encuentran en regiones favorecidas. Por otro lado, el análisis con ANOLEA indicó que el 45% de aminoácidos modelados por RaptorX y el 85% de los residuos de los epitopes conformacionales

tienen alta energía. Esto no es sorprendente dado que la mayoría de los epitopes conformacionales fueron predichos en bucles, que son un gran reto en el modelado de proteínas porque a menudo representan inserciones o deleciones en proteínas homólogas, las cuales están menos confinadas por las restricciones derivadas de la alineación [549], y son usualmente estructuras con energía positiva como lo indicado por ANOLEA u otros servidores [582], [583].

Resulta interesante destacar que 9 epitopes fueron predichos simultáneamente por ambos predictores, BepiPred y DiscoTope. Por lo tanto, el análisis realizado utilizando un enfoque bioinformático contribuyó a identificar numerosos epitopes de LB lineales y conformacionales, y esto está en concordancia con estudios previos en los que se describieron anticuerpos anti-Pmp en suero de pacientes infectados con *C. trachomatis* [259]. Por otra parte, Tan y colaboradores 2009, indicaron que algunas Pmp, incluyendo PmpD, pueden ser expresadas abundantemente o estar específicamente más expuestas en la superficie de *C. trachomatis* ya que observaron que provocan una respuesta robusta de anticuerpos en adolescentes con y sin EIP [287]. Varios investigadores también han demostrado la capacidad neutralizante de los anticuerpos anti-PmpD [486], [536], [579], los cuales, según un ensayo *in vitro*, tendrían mayor efectividad aquellos anticuerpos generados por los serotipos Ba, D, L2, E respecto a los generados por los serotipos A, C, F, G y K [486]. Si bien hay un alto porcentaje de similitud entre secuencias, estas diferencias podrían estar relacionadas con pequeños cambios en un aminoácido específico. Por lo tanto resulta interesante definir epitopes incluidos en regiones que se conserven simultáneamente para seleccionar aquellos capaces de inducir anticuerpos neutralizantes contra todos los serotipos. A partir de esto, en la presente tesis, se identificaron seis regiones que contienen epitopes de LB y de LT, que además se conservan entre todos los serotipos (A-L). Además de ser útil para el diseño de vacunas, la predicción de epitopes de LB puede contribuir al diseño de métodos de diagnóstico.

Por otro lado, es necesario remarcar que una respuesta humoral adecuada depende de la respuesta apropiada de los LT CD4+. Asimismo, las vacunas que inducen respuestas inmunitarias celulares son esenciales para las infecciones causadas por patógenos intracelulares, como lo es *C. trachomatis*. Uno de los principales impedimentos para el desarrollo de vacunas incluye la dificultad para identificar antígenos de LT relevantes que provoquen inmunidad celular protectora [584]. La inmunidad mediada por LT CD4+ y, en menor grado LT CD8+, es un componente importante de la defensa del huésped contra la infección por *C. trachomatis* [212]. Estos LT reconocen antígenos de *C. trachomatis* específicos en moléculas de MHCII y MCHI, respectivamente [259]. La identificación de epitopes presentados por las moléculas del MHC permite el desarrollo de una respuesta eficaz de LT contra *C. trachomatis*. En la presente tesis, se emplearon los programas NetMHC y NetMHCII para la predicción de epitopes de LT. NetMHC predijo 271 epitopes de LT de diferentes longitudes (9aa, 10aa, 11aa, 12aa) con afinidad débil a las moléculas MHC I y 70 epitopes de LT de diferentes longitudes (9aa, 10aa, 11aa, 12aa) con fuerte

afinidad a las moléculas MHC I. Por otra parte, NetMHCII predijo 742 epitopes de LT de 15aa con fuerte afinidad y 2903 epitopes de LT de 15aa con débil afinidad por las moléculas de MHC de clase II para los alelos MHC más prevalentes, tanto en Argentina según Perusco y colaboradores 2014 [562] como en Norteamérica y Europa [585]. Estos epitopes son abundantes y se distribuyen homogéneamente a lo largo de la secuencia de la proteína. Múltiples alelos de MHC Clase II son capaces de unirse al mismo epitope, este comportamiento fue observado para varios epitopes. Las respuestas inmunes mediadas por LT CD4+ y CD8+ en humanos y ratones son inducidas por la infección por *C. trachomatis*, sin embargo el papel de los LT CD8+ en la inmunidad protectora no está claro. En el modelo murino, los LT CD8+ contribuyen significativamente a la patología en el tracto genital superior [286] e infertilidad, pero los LT CD8+ no son necesarias para eliminar la infección del tracto genital o para proteger contra la reinfección [276]. Por lo tanto, los resultados obtenidos a partir de este análisis son prometedores debido al hecho de que se encontraron más epitopes capaces de vincularse con una fuerte afinidad a moléculas del MHC de clase II con respecto a los epitopes predichos que se unirán a moléculas del MHC de clase I, que son menores y con una afinidad débil. A partir de los resultados es posible elegir una secuencia de PmpD que contenga una fuerte afinidad por las moléculas del MHC de clase II, lo que favorecería una respuesta contra *C. trachomatis* de tipo T CD4+.

Los análisis comparativos realizados por los predictores simultáneamente permitieron identificar seis regiones que tienen epitopes de LB lineales y conformacionales y de LT con afinidad por las moléculas MHC I (interacción débil) y por las moléculas MHC II (interacción fuerte). Estos resultados son muy valiosos ya que permiten delinear una serie de estrategias de inmunización, incluyendo la síntesis de epitopes individuales que podrían administrarse como únicos o en combinación, el diseño de una molécula quimérica multiepitope o la selección de fragmentos que contienen varias regiones inmunogénicas.

Teniendo en cuenta los resultados del análisis *in silico* y las regiones funcionales de la proteína, descritas previamente [536], [579], [580], se seleccionaron y clonaron dos fragmentes con abundantes epitopes B y T para ser evaluados como inmunógenos. El fragmento F1 seleccionado posee 671 aminoácidos (68-739 aa) corresponde a la región N-terminal de PmpD que además de tener epitopes de LT y de LB contiene una región RGD: motivo de unión a integrina descrita por Wehrl y colaboradores, la cual podría tener una función adhesina [579]. Asimismo mediante el análisis *in silico* se comprobó que varios de los epitopes incluidos en el fragmento F1 contienen motivos GGA y FxxN. Diversos autores enuncian que son altamente inmunogénicos y que podrían llegar a tener función de adhesión en células eucariotas [259], [536]. El fragmento F2 tiene un tamaño menor, de 547 aminoácidos (693-1240 aa) y contiene una región común al fragmento F1 la cual contiene la región RGD. Asimismo, posee epitopes de LT y LB que corresponden a tres regiones predichas simultáneamente por los predictores y otra región descrita

por Swanson y colaboradores KRRECAGGAIFAKRVR que correspondería a una señal putativa de localización nuclear [536].

En este trabajo se decidió comenzar por la evaluación del F2. Según la bibliografía consultada, si bien se han evaluado regiones similares a F1 [586] no se encontraron trabajos que evalúen la región C-terminal de PmpD. Por lo tanto, en un primer momento resulta interesante comenzar con la evaluación de F2 de PmpD y posteriormente evaluar F1. Asimismo, se plantea la posibilidad de formular una vacuna que contenga ambos fragmentos.

### ***Potenciales alternativas basadas en la estrategia prime-boost para inducir inmunidad hacia PmpD de Chlamydia trachomatis***

Para el diseño racional de una vacuna, además del antígeno resulta necesario definir la estrategia de inmunización mediante del empleo de adyuvantes y/o sistemas *delivery*, así como las rutas de inoculación.

En la presente tesis se decidió emplear la estrategia de *prime-boost* debido a que es un método que ha demostrado ser eficaz para inducir y mejorar respuestas inmunes tanto humorales como celulares [587], [588]. Estas estrategias se han aplicado para el desarrollo de vacunas contra enfermedades infecciosas y se ha comprobado que son enfoques prometedores y exitosos en ensayos preclínicos y clínicos [588]. La razón principal para usar esta estrategia es desarrollar la capacidad para estimular o reforzar el sistema inmunológico de diferentes maneras durante la vacunación. Una vacuna a ADNp induce respuestas inmunes mediadas por células y también son altamente efectivas en inducir LB de memoria específicos del antígeno. Por otra parte, las vacunas proteicas suelen ser eficientes para generar respuestas inmunes humorales, pero generalmente resultan ineficientes para provocar una inmunidad mediada por células, la cual es importante para la protección contra patógenos intracelulares [589], [590]. Así, la estrategia de *prime-boost* utilizando ADNp y proteína puede generar respuestas complementarias que mejoren los resultados obtenidos con cada una de las estrategias individuales [591]. Según la bibliografía consultada, existen pocos trabajos que evalúen vacunas contra *C. trachomatis* que empleen la estrategia de *prime-boost*. Las publicaciones encontradas son recientes y evalúan esta estrategia empleando como antígeno MOMP [592] y el sistema de secreción tipo III (T3SS) [593], cuya función principal es trasladar proteínas efectoras a la célula huésped para la manipulación de procesos celulares eucarióticos [594].

Existe un repertorio de trabajos que evalúan potenciales vacunas para *Chlamydia* empleando como inmunoestimulante CpG en sus formulaciones por diversas rutas de administración, en su mayoría intramuscular y en algunos casos intranasal, las cuales coinciden en la respuesta inmune que generan más allá del antígeno que emplean. En todos los trabajos emplean proteínas recombinantes y/o subunidades purificadas e interesantemente observan una respuesta

inmune característica del perfil Th1 particularmente un aumento de anticuerpos de isotipo IgG2, aumento de IFN- $\gamma$  y en algunos casos de TNF- $\alpha$  [595], [596], [597]. En estos trabajo se han evaluado los ODN sintéticos que contienen motivos CpG modificados con fosfotioato (PS-ODN) como adyuvantes [572], [598], los cuales son resistentes a la actividad de nucleasas. Sin embargo, otros estudios han informado que ratones tratados con PS-ODN podrían presentar efectos secundarios, como esplenomegalia transitoria, destrucción de folículos linfoides, artritis y producción de IgM específica de PS-ODN [599]. Particularmente, un trabajo reciente demostró que PS-ODN 1826 puede agravar las lesiones tisulares inducidas por *C. muridarum* [600]. En consecuencia, el uso de CpG con enlaces fosfodiéster (PO-ODN) como contraparte natural de PS-ODN podría representar una alternativa para mejorar una respuesta inmune sin generar efectos secundarios severos. Asimismo se ha demostrado que agregar CpG a antígenos proteicos convencionales mejora la producción de anticuerpos específicos. Sin embargo, la vida media de CpG es inferior a 60 minutos, incluso utilizando PS-ODN, debido a la rápida eliminación por adsorción a proteínas del suero; por lo tanto, es necesario prolongar su biodisponibilidad [507], [601]. El uso de liposomas para co-encapsular el CpG y un antígeno proteico es un método válido para elevar la vida media del oligonucleótido y permitir que las CPA capturen ambas moléculas, lo que podría aumentar las posibilidades de mejorar las respuestas inmunes [602], [603].

Los CpG que se evalúan en la presente tesis, además de presentar enlaces fosfodiéster, tienen la ventaja de estar co-encapsulados con liposomas, los cuales podrían estimular la activación de diferentes células inmunes por vías independientes a TLR-9 conduciendo al incremento de moléculas co-estimuladoras tales como CD40 y CD69 [604]. La formulación que contiene liposomas y CpG evaluada en la presente tesis ya ha sido previamente valuada por el grupo de investigación del Laboratorio de Inmunología Experimental en diversas oportunidades en modelos murinos empleando, como antígeno modelo, albúmina sérica bovina y antígenos de *Staphylococcus aureus*. Ambos estudios mostraron la generación de una respuesta inmune humoral con altos títulos de anticuerpos, de la subclase IgG2a y estimulación de respuesta celular con producción de IFN- $\gamma$  y carencia de efectos adversos cuando las formulaciones se administraron por vía subcutánea o intraperitoneal [508]. Estos resultados previos son alentadores ya que la presencia de este inmunoestimulante estaría generando el perfil inmune necesario para una vacuna contra *C. trachomatis*. Por otro lado, es importante mencionar que en la mayoría de los estudios sobre vacunas para *C. trachomatis* evalúan MOMP como antígeno y no se ha descrito hasta el momento la inmunización utilizando PmpD con CpG. Por lo tanto, la evaluación de la formulación planteada en la presente tesis resulta original ya que contiene PmpD formulada con liposomas catiónicos y CpG.

Las formulaciones basadas en *gemini* han sido exploradas ampliamente debido a sus propiedades fisicoquímicas y potenciales aplicaciones en el área de la biología [510], [511], [605].

Particularmente han atraído gran interés como agentes para el *delivery* de drogas y para terapia génica. Asimismo, han mostrado resultados prometedores como aditivos sintéticos en formulaciones de liposomas para la administración de fármacos ya que mejoran la fusión con la membrana celular, la captación celular, la selectividad, la eficiencia de la transfección y la baja toxicidad [605]. Los surfactantes *gemini* derivados de aminoácidos naturales son biocompatibles y biodegradables, lo que hace que cumplan con los requisitos tanto de compatibilidad biológica como ecológica. En particular aquellos que incluyen cisteína en su estructura y que están siendo estudiados intensamente en los últimos 5 años, se forman por dimerización espontánea en solución a pH fisiológico a partir de estructuras monoméricas, dando lugar a la formación de sistemas supramoleculares estables capaces de englobar ADN o ARN, proteínas y drogas de uso terapéutico. Particularmente, el *gemini* que se evalúa en una de las formulaciones vacunales en la presente tesis es 100% biocompatible e incluye cisteína en su estructura por lo tanto tiene la capacidad de englobar a la proteína. Otros *gemini* obtenidos, con variaciones en la secuencia peptídica y/o en el largo de la región hidrofóbica, han sido evaluados como agentes de transfección celular. Algunos de ellos presentaron una actividad similar y hasta mejorada en relación a los comerciales disponibles en el mercado como Lipofectamina 2000 y PEI [606]. A pesar de la potencialidad de estas moléculas, su aplicación para el *delivery* de fármacos está todavía en una etapa temprana de desarrollo. En nuestro conocimiento, la capacidad adyuvante de los *gemini* aún no ha sido explorada en potenciales vacunas.

En cuanto a las rutas de inmunización, como se nombró en la introducción, es necesario lograr una respuesta tanto sistémica como local en el sitio de las mucosas genitales. Si bien la vacunación parenteral puede generar una inmunidad sistémica eficaz contra muchos patógenos, a menudo induce poca o ninguna protección en las mucosas [607]. Las vacunas parenterales actúan en los ganglios linfáticos periféricos para inducir células de memoria mientras que la exposición a vacunas en la mucosa genera una respuesta en el tejido linfoide asociado a la mucosa lo cual enfoca la respuesta de memoria hacia las superficies de la mucosa [608]. Stary y colaboradores, demostraron que si bien el subconjunto de células memoria en circulación contribuye a la respuesta contra *C. trachomatis*, su papel protector es subóptimo en ausencia de LTmr. Sin embargo, pocas vacunas administradas por la vía de las mucosas están actualmente disponibles para uso en humanos, y la mayoría de estas vacunas están constituidas por microorganismos atenuados, que a su vez pueden causar infecciones en personas vulnerables [609]. Particularmente, se ha demostrado que la inmunización intranasal puede inducir inmunidad en las mucosas genitales [529], [610], aunque la evidencia también sugiere que la inmunización sublingual también induciría una respuesta inmune en mucosas genitales [611]. Sin embargo, resulta prometedor emplear la vía nasal, ya que este compartimento tiene un tejido linfoide asociado a la nariz, con sitios inductores responsables de estimular inmunidad en los respectivos compartimentos mucosos [612], [613].

Considerando que el tracto genital carece de estos sitios inductores inmunes [613], se seleccionó la inmunización alternativa (nasal) que utiliza sus propios sitios inductores para promover la inmunidad local del tracto genital. Es importante mencionar que la potencial vacuna para *C. trachomatis* que está en fase clínica I utiliza las rutas de administración simultáneas, intramuscular y nasal [488]. Existen estudios recientes que evalúan potenciales vacunas para *Chlamydia* spp. combinando la vía parenteral con la de mucosas (genital, nasal o sublingual) [521], [524], [614] aunque ninguno de ellos evalúa PmpD como antígeno vacunal.

### ***La estrategia de prime-boost genera una respuesta inmune humoral sistémica y local en mucosas***

La estrategia de inmunización *prime-boost* con F2 de PmpD sola o formulada con liposomas e inmunoestimulantes fue capaz de generar una respuesta inmune humoral tanto sistémica, en suero, como en mucosa vaginal. Un buen diseño de la estrategia de *prime-boost* puede ampliar el alcance de las respuestas inmunitarias. Varios trabajos han demostrado que mejora cualitativamente y cuantitativamente las respuestas inmunes celulares y la protección contra patógenos [615], [616], [617]. Otros autores demostraron que el *prime* con ADNp, indujo preferentemente respuestas inmunitarias celulares de tipo Th1, mientras que el *booster* con la proteína recombinante, indujo principalmente respuestas sesgadas de tipo Th2, por lo que estos autores sugieren que la estrategia de *prime boost* condujo a un aumento significativo de anticuerpos, activación de diferentes perfiles de LT y producción de citoquinas [618]. Otra ventaja de la estrategia de *prime-boost* es que puede mejorar la efectividad de las vacunas existentes, principalmente la respuesta humoral. Particularmente, diversos autores han observado que la estrategia de *prime-boost* genera respuestas robustas y homogéneas, con altos títulos de anticuerpos y de larga duración comparado con estrategias homólogas en las que se administra sólo la proteína recombinante [619], [620], [621]. Como se enunció anteriormente la estrategia de *prime-boost* ha sido evaluada para *C. trachomatis* en pocos trabajos recientes empleando antígenos diferentes a PmpD [592], [593]. Es interesante destacar que en ambos estudios, la estrategia de *prime-boost* incrementó los niveles de anticuerpos séricos, respecto a estrategias homólogas, con títulos aproximados de IgG 1:1000, los cuales tenían capacidad neutralizante. Asimismo, se observó que el *prime* con ADNp incrementa los niveles de IgG2a en comparación a IgG1, lo cual resultaría beneficioso para la protección contra *C. trachomatis* [592].

Los resultados hallados en la presente tesis son alentadores ya que demuestran que la estrategia de *prime-boost* generó una respuesta humoral sistémica con títulos de anticuerpos IgG totales entre 1:1000 y 1:64000 tanto en el grupo que recibió PmpD sola como los que recibieron las formulaciones con liposomas e inmunoestimulantes. Entre los tres grupos que presentaron anticuerpos específicos no se observaron diferencias en los niveles de anticuerpos IgG e IgG1

séricos. Los títulos hallados para IgG1 fueron entre 1:1000 y 1:256000. Sin embargo, es interesante destacar que entre las formulaciones con y sin inmunoestimulantes se observaron diferencias en los niveles de anticuerpos IgG2a séricos. La formulación que presentó mayores títulos de IgG2a fue la que contenía F2PmpD acompañada de liposomas con CpG (1:16000-1:64000), en segundo lugar la proteína sola (1:4000-1:16000), mientras que la que indujo menor título fue la formulación que contenía F2PmpD acompañada con liposomas y *gemin*i con títulos entre 1:1000-1:4000. Varios autores han descrito que niveles elevados de anticuerpos IgG2a específicos para *Chlamydia* spp. se asocian con la protección frente a la infección con este patógeno [592], [593], [622]. Teniendo en cuenta que el switch o cambio de clase a IgG2a estaría mediado por IFN- $\gamma$  [586], esta respuesta puede asociarse a respuestas celulares de perfil Th1, lo cual, como se ha descrito en introducción, sería efectivo para conferir protección contra *C. trachomatis*.

Además de considerar los niveles e isotipos de anticuerpos es importante evaluar la capacidad neutralizante. En el trabajo de Badamichi-Zedek y colaboradores donde evalúan la estrategia de *prime-boost*, demostraron que sueros de ratones inmunizados con MOMP diluidos 1:512 fueron capaces de neutralizar hasta el 90% la infectividad de EB *in vitro*, mientras que diluciones menores neutralizaron un 100% [592]. Por lo tanto, los resultados obtenidos respecto a la respuesta inmune humoral inducida por la estrategia de *prime-boost* son alentadores debido a que los anticuerpos tienen un papel fundamental en el diseño de vacunas para *C. trachomatis*, sin embargo en futuros ensayos deberá evaluarse la capacidad de neutralización de los anticuerpos generados. Algunos autores han descrito que los anticuerpos son fundamentales para brindar protección frente a re-infecciones [276], [283], [472], [623] y juegan un papel determinante en la resolución de infecciones primarias actuando cooperativamente con los LT CD4+ [534], [624] para la eliminación de *Chlamydia* spp. Asimismo, varios estudios han relacionado la presencia de anticuerpos con la protección frente a patologías del tracto genital superior [521], [625].

Los mecanismos por los que los anticuerpos median la resistencia aún no son tan claros [626]. La disminución de la infección o la eliminación temprana a re-infecciones por *Chlamydia* spp. podrían estar mediadas por las funciones efectoras de los anticuerpos. En este sentido, varios trabajos han descrito que anticuerpos específicos de isotipo IgG2a median funciones efectoras incluida la ADCC [593], [627]. El mecanismo de ADCC amplifica las funciones de las CPA y mejora la presentación de antígenos potenciando las respuestas de los LT CD4+ [484]. No obstante, también se ha descrito que la opsonización de EB por algunos isotipos de IgG podría afectar la captación de *Chlamydia* por las células [628]. Específicamente, un estudio ha demostrado que los sueros policlonales anti-MOMP con predominio de isotipo IgG1 respecto a los niveles IgG2a aumentan la infección en una línea celular a través de la captación mediada por FcRn de los EB recubiertos con IgG, lo que sugiere un papel negativo para los anticuerpos IgG1, específicos de MOMP [629]. Posiblemente esta función efectora podría estar relacionada con lo que indican

algunos estudios epidemiológicos que asocian los altos títulos de anticuerpos con infertilidad y no con la resolución de la infección o el control del ascenso del patógeno al tracto genital superior [630].

En un trabajo reciente de Paes y colaboradores evalúan un fragmento de PmpD recombinante de 65 kDa, específicamente entre el aminoácido 68 y 698 por vía subcutánea con un adyuvante lipídico de segunda generación (SLA) agonista de TLR-4. Cabe recordar que en la presente tesis se evaluó otro fragmento correspondiente a la región media y C-terminal particularmente entre los aa 693 y 1240 [586]. Estos autores obtuvieron títulos séricos aproximados de 1:10000 para anticuerpos específicos de isotipo IgG1, sin presencia de anticuerpos IgG2a cuando evaluaron la proteína sola, y títulos de anticuerpos específicos incrementados aproximados de 1:1000000 para IgG1 y 1:100000 para IgG2c cuando inocularon la formulación con el adyuvante (cabe aclarar que emplearon ratones de la cepa C57BL/6). Sorpresivamente tanto la formulación con PmpD sola como con adyuvantes disminuyeron la carga bacteriana sin presentar diferencia significativa entre los grupos pese a la diferencia en los títulos de anticuerpos hallados, aunque las formulaciones con adyuvantes resolvieron en menor tiempo la infección.

Si bien los datos obtenidos sobre los niveles de anticuerpos detectados el día del sacrificio son preliminares, resulta interesante discutir esos resultados. Particularmente porque se observó que empleando la proteína sola los niveles de anticuerpos de isotipo IgG totales, IgG1 e IgG2a se mantuvieron (al menos pos 30 días de la última dosis) en un 32-77 %, aproximadamente. Sin embargo, se observó que los anticuerpos generados por la formulación que contiene liposomas y CpG se mantuvieron en un 95 % para IgG totales y 93 % para IgG1 e interesantemente se incrementaron al menos un 200 % los niveles de anticuerpos específicos de isotipo IgG2a. Es un dato muy interesante que sugiere que los liposomas podrían estar realizando una liberación controlada de la proteína lo que conduce al mantenimiento y aumento de los niveles de anticuerpos séricos. Como se nombró anteriormente, CpG es un inmunoestimulante que, en formulaciones vacunales contra *Chlamydia*, es capaz de generar una respuesta inmune celular con perfil Th1, aumento de IFN- $\gamma$  y predominio de anticuerpos de isotipo IgG2a [595], [596], [597]. Como se mencionó previamente, este perfil es similar al observado por nuestro grupo, utilizando la combinación de liposomas y CpG con otros antígenos. En ensayos futuros, será interesante evaluar los niveles de anticuerpos séricos a largo plazo. Algunos estudios han descrito una respuesta inmune protectora pero que es de corta duración o que no es capaz de evitar la re-infección [466], [631]. En humanos, la re-infección es común después del tratamiento, y ocurre en aproximadamente 10% a 20% de los pacientes dentro de los 12 meses [632], [633], [634]. Por lo tanto, los resultados obtenidos respecto a los niveles séricos de anticuerpos al día del sacrificio resultan muy valiosos debido a que uno de los desafíos para el diseño de una vacuna contra *C.*

*trachomatis* es generar una respuesta duradera y de memoria, particularmente local mediada por los LTrm.

Respecto a la respuesta inmune humoral local se obtuvieron resultados alentadores ya que en los tres grupos de animales que se inmunizaron con PmpD mediante la estrategia de *prime-boost* (ya sea sola o formulada con adyuvantes e inmunoestimulantes) fueron capaces de generar una respuesta humoral en mucosa genital. Existen evidencias claras que los anticuerpos de isotipo IgA e IgG presentes en la mucosa representan una contribución importante en la protección inmune contra la infección genital por *C. trachomatis* [521], [629], [635]. En la presente tesis se observó que el grupo que recibió la proteína sola o acompañada de la formulación que contenía liposomas y CpG fue capaz de generar un incremento en los niveles de anticuerpos específicos de isotipo IgG. En contraste, el grupo que recibió la proteína acompañada de liposomas y *gemin*i fue el único grupo experimental capaz de generar un incremento significativo de anticuerpos específicos de isotipo IgA respecto al grupo control. En mucosa vaginal el isotipo IgA ha atraído recientemente la atención debido al rol que se le atribuye en la inmunidad protectora contra *C. trachomatis* [629], [635]. Específicamente, la IgA secretora (sIgA) puede ser de particular importancia debido a sus capacidades neutralizantes y antiinflamatorias, en comparación con IgA monomérica e IgG [636], [637]. Esta ventaja permitiría evitar la inflamación excesiva y por lo tanto las patologías inmunológicas. Asimismo sIgA es más resistente a proteólisis por enzimas respecto a anticuerpos de isotipo IgG, y es hasta 10 veces más eficaz que IgA monomérica para neutralizar patógenos [638]. Por otro lado, se ha demostrado en humanos que la concentración de IgA en el endocervix se correlaciona inversamente con la carga de *C. trachomatis* [638]. Por lo mencionado anteriormente, es que los protocolos de vacunación que tienen la capacidad de dirigir las respuestas inmunes en las mucosas y favorecer la producción de sIgA son objeto de intensa investigación [521], [639]. Por lo tanto, en futuros ensayos sería interesante investigar si los anticuerpos IgA detectados en el presente estudio son sIgA.

Diversos trabajos demostraron que la vía intranasal induce una respuesta humoral en el tracto genital de isotipo IgA con una rápida eliminación de la infección por *C. trachomatis* [524]. Aún no está claro si las células plasmáticas productoras de IgA se encuentran en el tracto genital debido a las inmunizaciones intranasal y solo se activan en presencia del antígeno durante la infección, o si las células plasmáticas secretoras de IgA necesitan migrar a la mucosa del tracto genital después de la infección [524]. Sary y colaboradores demostraron que el establecimiento de los LTrm es necesario para una óptima protección contra las infecciones genitales por *C. trachomatis* [527]. Por otro lado, otros estudios indican que tanto IgG como IgA vaginal tienen un potencial rol protector contra *C. trachomatis* [524], [640].

Teniendo en cuenta el rol que cumplen los subtipos de IgG séricos como los isotipos de inmunoglobulinas en mucosa vaginal frente a la protección contra *C. trachomatis* resulta

interesante seguir evaluando tanto la formulación que contiene F2 de PmpD sola como las que están acompañadas con liposomas e inmunoestimulantes debido a que las tres generan respuestas inmunes humorales sistémicas y locales prometedoras. La próxima etapa consistirá en evaluar la capacidad de neutralización de la infección de *C. trachomatis* que poseen los anticuerpos que generan las formulaciones evaluadas.

### ***La estrategia de prime-boost empleando F2PmpD no produciría alteraciones en la fertilidad***

Tanto las infecciones por *C. trachomatis* como las potenciales vacunas presentan una compleja interacción de respuestas inmunes que influyen tanto en la protección inmunitaria como en la patología [485]. Por lo tanto, generar una vacuna contra *C. trachomatis* sin causar patologías colaterales es un gran desafío. Los resultados respecto a la evaluación de fertilidad son alentadores debido a que ninguno de los grupos experimentales, ni los tratados con F2PmpD ni los controles, exhibieron alteraciones en la fertilidad.

Ninguna de las tres formulaciones con F2PmpD formulada con adyuvantes e inmunoestimulantes o sin ellos, fue capaz de generar alteraciones en la eficacia de implantación, también denominado potencial de fertilidad, ni en la tasa de pérdida pre-implantación ni en la tasa de pérdida pos-implantación. Estos resultados son prometedores debido a que en los tres casos se observaron respuestas inmunes humorales, tanto sistémicas como en mucosa genital. No obstante, es necesario reproducir el estudio de fertilidad, por un lado, porque hubo una considerable dispersión en los porcentajes de respuesta por lo tanto debería incrementarse el número de animales empleados para el ensayo de fertilidad. Por otro lado, debido a que hubo un animal por cada grupo que recibió adyuvantes con inmunoestimulantes (ya sea con o sin F2PmpD) que no fue preñado en el período evaluado (3 semanas). Varios estudios han observado que algunas potenciales vacunas, si bien generan una respuesta inmune que parece prometedora, en muchos casos también generan secuelas patológicas en el oviducto [597]. Por lo tanto, resulta interesante en un futuro complementar con estudios de histología de los ovarios y cuernos uterinos. Sin embargo, como se enunció anteriormente el CpG empleado como inmunoestimulante en la presente tesis presenta enlaces fosfodiéster y según la bibliografía consultada y los resultados obtenidos no genera efectos adversos. Estos resultados son alentadores debido a que uno de los grandes desafíos que presentan las formulaciones vacunales contra *C. trachomatis* es la generación de una respuesta inmune protectora sin efectos patológicos. Para evaluar la efectividad de las tres potenciales formulaciones vacunales se prevé realizar un desafío con *C. trachomatis* en modelo murino.

## Conclusiones

Respecto al análisis *in silico*, se concluye que PmpD tiene abundantes epitopes de LB y epitopes de LT distribuidos a lo largo de toda la secuencia. Se podrían seleccionar numerosos fragmentos como candidatos para el diseño de una vacuna contra *C. trachomatis*. Con este fin, en este estudio se identificaron seis regiones que contienen epitopes de LB lineales y conformacionales y epitopes de LT, principalmente con fuerte afinidad para las moléculas del MHC de clase II, que pueden usarse para generar respuestas humorales y celulares principalmente T CD4+, respectivamente. Estos péptidos antigénicos pueden ser valiosos candidatos para el diagnóstico, así como para vacunas preventivas y terapéuticas contra *C. trachomatis*. Este estudio permitió definir dos fragmentos para ser usados en ensayos de inmunización de ratones.

Se logró obtener el plásmido para la inmunización génica con uno de los fragmentos (F2) de PmpD con el agregado de un péptido señal. Asimismo, se logró expresar y purificar la proteína recombinante F2 de PmpD, la cual además de ser empleada para el análisis de anticuerpos específicos por ELISA se empleó para la inmunización con la estrategia seleccionada *prime-boost*.

Se realizó un diseño original y racional de una potencial vacuna para *C. trachomatis* donde se consideraron diversos aspectos. Particularmente, además de analizar rigurosamente la elección y selección de un fragmento del antígeno (PmpD) y la selección de estrategias para el esquema de inmunización (*prime-boost*), se consideraron las vías de administración (subcutánea-nasal) y adyuvantes a emplear (liposomas catiónicos conjugados con inmunestimulantes: CpG o *gemini*). Las formulaciones vacunales diseñadas pudieron ser obtenidas exitosamente para la evaluación de la respuesta inmune humoral y la fertilidad.

El fragmento 2 de PmpD es un candidato atractivo para el diseño de una vacuna. La estrategia de *prime-boost* empleando todas las formulaciones (con y sin el uso de liposomas con adyuvantes e inmunoestimulantes) generó una respuesta humoral, tanto sistémica como local (en mucosa vaginal) en un modelo murino. Particularmente la formulación que contenía la proteína acompañada de liposomas catiónicos y CpG generó altos niveles de anticuerpos IgG2a séricos específicos lo que sugiere que este inmunoestimulante dirige la respuesta hacia un perfil Th1 el cual es adecuado para una vacuna contra *C. trachomatis*. Asimismo, la formulación que contenía CpG indujo anticuerpos específicos de isotipo IgG en la vagina. Por otro lado la formulación que contenía la proteína acompañada de liposomas con el inmunoestimulante *gemini* condujo a la producción de anticuerpos de isotipo IgA en vagina, los cuales son prometedores debido a su capacidad neutralizante y potencialmente antiinflamatoria. Las formulaciones evaluadas mediante

la estrategia de *prime-boost* no generan alteraciones en los parámetros de fertilidad evaluados (potencial de fertilidad, tasa de pérdida pre- y pos- implantación).

Las tres formulaciones que contienen F2PmpD con o sin el agregado de adyuvantes son buenos candidatos vacunales y los resultados obtenidos justifican la evaluación en profundidad de su uso aplicando *prime-boost*. Particularmente, sería interesante evaluar la capacidad neutralizante de los anticuerpos séricos y de mucosa genital y conocer la respuesta celular generada por cada formulación con F2PmpD, además de realizar el desafío para corroborar la capacidad de protección frente a *C. trachomatis*.

## CONCLUSIONES GENERALES

El presente trabajo de tesis permitió por un lado comprender los factores locales que regulan la inmunidad de las mucosas en pacientes infértiles con y sin infecciones genitales y por el otro diseñar, optimizar, desarrollar y evaluar diversas formulaciones vacunales para lograr inmunidad protectora contra *C. trachomatis* sin alterar la fertilidad.

Se concluye que la infertilidad en pacientes femeninos y masculinos, tanto en presencia como en ausencia de infecciones genitales, es potencialmente generada debido al desequilibrio de factores inmunológicos, evidenciado por alteraciones de citoquinas y factores de transcripción maestros principales de linfocitos T *helper*.

Estos resultados ponen en evidencia la dificultad de lograr inducir una respuesta inmune que resulte protectora de la infección y que, a la vez, no comprometa la fertilidad. En este sentido, también subrayan la importancia de realizar un diseño racional de vacunas, incluyendo una cuidadosa selección del antígeno, de los adyuvantes y del esquema de vacunación. Las diversas formulaciones vacunales conteniendo F2 de PmpD son prometedoras, como agentes para inducir inmunidad contra la infección por *C. trachomatis*, debido a que generan una respuesta inmune humoral sistémica y en mucosa vaginal y no producirían alteraciones en los parámetros de fertilidad.

El presente trabajo de investigación aporta información valiosa para dilucidar posibles mecanismos de infertilidad en pacientes, contribuyendo a un mejor diagnóstico y tratamiento de este trastorno. Asimismo, las alteraciones de los factores inmunológicos halladas en pacientes para cada infección resultan interesantes para contribuir al diseño de estrategias terapéuticas e inmunoproliféricas frente a infecciones de transmisión sexual.

Por otro lado se avanzó en el desarrollo de posibles estrategias vacunales preventivas contra *Chlamydia trachomatis*, cuya experiencia e información obtenidas a partir de un modelo murino podrían ser aplicables al diseño, optimización y desarrollo de estrategias preventivas y/o terapéuticas para otros patógenos causales de infecciones de transmisión sexual.

En conjunto, la presente tesis brinda elementos para una mejor comprensión de los trastornos reproductivos y aporta posibles herramientas para la prevención de una infección de transmisión sexual con gran impacto en la salud reproductiva y neonatal.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] F Zegers-Hochschild, GD Adamson, J de Mouzon, O Ishihara, R Mansour, K Nygren, E Sullivan, S Vanderpoel (2009) International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Fertil Steril* 92 (5):1520-1524.
- [2] F Zegers-Hochschild, GD Adamson, S Dyer, C Racowsky, J de Mouzon, R Sokol, L Rienzi, A Sunde, L Schmidt, ID Cooke, JL Simpson, S van der Poel (2017) The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Fertil Steril* 108 (3):393-406.
- [3] J Boivin, L Bunting, JA Collins, KG Nygren (2007) International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod* 22 (6):1506-1512.
- [4] MN Mascarenhas, SR Flaxman, T Boerma, S Vanderpoel, GA Stevens (2012) National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med* 9 (12):e1001356.
- [5] A Ancer-Arellano, J Ancer-Rodríguez, D Hardisson, A Niderhauser-Garcia, J Sanchez-Hernández, S Cuevas, MG Gallegos-Avila (2017) Chapter 9 Infection by Human Papillomavirus (HPV), Chlamydia trachomatis and Ureaplasma urealyticum, in Relation with Reproductive Failure. *Fundamentals of Sexually Transmitted Infections*. Ed. Zekayi Kutlubay. IntechOpen, p.181-206.
- [6] J Liu, Q Wang, X Ji, S Guo, Y Dai, Z Zhang, L Jia, Y Shi, S Tai, Y Lee (2014) Prevalence of Ureaplasma urealyticum, Mycoplasma hominis, Chlamydia trachomatis infections, and semen quality in infertile and fertile men in China. *J Urol* 83 (4):795-799.
- [7] FJ Broekmans, EA Knauff, ER te Velde, NS Macklon, BC Fauser (2007) Female reproductive ageing: current knowledge and future trends. *Trends Endocrinol and Metab* 18 (2):58-65.
- [8] O Djahanbakhch, M Ezzati, A Zosmer (2007) Reproductive ageing in women. *J Pathol* 211 (2):219-231.
- [9] M Carolan, D Frankowska (2011) Advanced maternal age and adverse perinatal outcome: a review of the evidence. *Midwifery* 27 (6):793-801.

- [10] U Waldenstrom, V Aasheim, AB Nilsen, S Rasmussen, HJ Pettersson, E Schytt (2014) Adverse pregnancy outcomes related to advanced maternal age compared with smoking and being overweight. *Obstet Gynecol* 123 (1):104-112.
- [11] J Balasch, E Gratacos (2011) Delayed childbearing: effects on fertility and the outcome of pregnancy. *Fetal Diagn Ther* 29 (4):263-273.
- [12] MA Hassan, SR Killick (2003) Effect of male age on fertility: evidence for the decline in male fertility with increasing age. *Fertil Steril* 79 (3):1520-1527.
- [13] DB Dunson, DD Baird, B Colombo (2004) Increased infertility with age in men and women. *Obstet Gynecol* 103 (1):51-56.
- [14] M Macaluso, TJ Wright-Schnapp, A Chandra, R Johnson, CL Satterwhite, A Pulver, SM Berman, RY Wang, SL Farr, LA Pollack (2010) A public health focus on infertility prevention, detection, and management. *Fertil Steril* 93 (1):16.e11-10.
- [15] FR Ochsendorf (2008) Sexually transmitted infections: impact on male fertility. *Andrologia* 40 (2):72-75.
- [16] AM Lintsen, PC Pasker-de Jong, EJ de Boer, CW Burger, CA Jansen, DD Braat, FE van Leeuwen (2005) Effects of subfertility cause, smoking and body weight on the success rate of IVF. *Hum Reprod* 20 (7):1867-1875.
- [17] J Eggert, H Theobald, P Engfeldt (2004) Effects of alcohol consumption on female fertility during an 18-year period. *Fertil Steril* 81 (2):379-383.
- [18] MA Hassan, SR Killick (2004) Negative lifestyle is associated with a significant reduction in fecundity. *Fertil Steril* 81 (2):384-392.
- [19] K Ohwaki, F Endo, E Yano (2009) Relationship between body mass index and infertility in healthy male Japanese workers: a pilot study. *Andrologia* 41 (2):100-104.
- [20] GF Homan, M Davies, R Norman (2007) The impact of lifestyle factors on reproductive performance in the general population and those undergoing infertility treatment: a review. *Hum Reprod Update* 13 (3):209-223.
- [21] A Wdowiak, L Wdowiak, H Wiktor (2007), *Evaluation of the effect of using mobile phones on male fertility. Ann Agric Environ Med.* 14(1):169-172.

- [22] A Agarwal, F Deepinder, RK Sharma, G Ranga, J Li (2008) Effect of cell phone usage on semen analysis in men attending infertility clinic: an observational study. *Fertil Steril* 89 (1):124-128.
- [23] C Avendano, A Mata, CA Sanchez Sarmiento, GF Doncel (2012) Use of laptop computers connected to internet through Wi-Fi decreases human sperm motility and increases sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* 97 (1):39-45.e32.
- [24] K Anderson, V Nisenblat, R Norman (2010) Lifestyle factors in people seeking infertility treatment: a review. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 50 (1):8-20.
- [25] R Sharma, KR Biedenharn, JM Fedor, A Agarwal (2013) Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. *Reprod Biol Endocrinol* 11:66.
- [26] S Smith, SM Pfeifer, JA Collins (2003) Diagnosis and management of female infertility. *Jama* 290 (13):1767-1770.
- [27] A Ray, A Shah, A Gudi, R Homburg (2012) Unexplained infertility: an update and review of practice. *Reprod Biomed online* 24 (6):591-602.
- [28] A Pellicer, C Albert, A Mercader, F Bonilla-Musoles, J Remohi, C Simon (1998) The follicular and endocrine environment in women with endometriosis: local and systemic cytokine production. *Fertil Steril* 70 (3):425-431.
- [29] DK Hickey, MV Patel, JV Fahey, CR Wira (2011) Innate and adaptive immunity at mucosal surfaces of the female reproductive tract: stratification and integration of immune protection against the transmission of sexually transmitted infections. *J Reprod Immunol* 88 (2):185-194.
- [30] CD Blaskewicz, J Pudney, DJ Anderson (2011) Structure and function of intercellular junctions in human cervical and vaginal mucosal epithelia. *Biol Reprod* 85 (1):97-104.
- [31] VH Ferreira, JK Kafka, C Kaushic (2014) Influence of common mucosal co-factors on HIV infection in the female genital tract. *Am J Reprod Immunol* 71 (6):543-554.
- [32] PV Nguyen, JK Kafka, VH Ferreira, K Roth, C Kaushic (2014) Innate and adaptive immune responses in male and female reproductive tracts in homeostasis and following HIV infection. *Cell Mol Immunol* 11 (5):410-427.

- [33] J Pudney, AJ Quayle, DJ Anderson (2005) Immunological microenvironments in the human vagina and cervix: mediators of cellular immunity are concentrated in the cervical transformation zone. *Biol Reprod* 73 (6):1253-1263.
- [34] CR Wira, JV Fahey, M Ghosh, MV Patel, DK Hickey, DO Ochiel (2010) Sex hormone regulation of innate immunity in the female reproductive tract: the role of epithelial cells in balancing reproductive potential with protection against sexually transmitted pathogens. *Am J Reprod Immunol* 63 (6):544-565.
- [35] CR Wira, M Rodriguez-Garcia, MV Patel (2015) The role of sex hormones in immune protection of the female reproductive tract. *Nat Rev Immunol* 15 (4):217-230.
- [36] DO Ochiel, JV Fahey, M Ghosh, SN Haddad, CR Wira (2008) Innate Immunity in the Female Reproductive Tract: Role of Sex Hormones in Regulating Uterine Epithelial Cell Protection Against Pathogens. *Curr Women's Health Rev* 4 (2):102-117.
- [37] P Mirmonsef, D Gilbert, MR Zariffard, BR Hamaker, A Kaur, AL Landay, GT Spear (2011) The effects of commensal bacteria on innate immune responses in the female genital tract. *Am J Reprod Immunol* 65 (3):190-195.
- [38] RM Brotman, J Ravel, PM Bavoil, PE Gravitt, KG Ghanem (2014) Microbiome, sex hormones, and immune responses in the reproductive tract: challenges for vaccine development against sexually transmitted infections. *Vaccine* 32 (14):1543-1552.
- [39] CR Wira, JV Fahey (2004) The innate immune system: gatekeeper to the female reproductive tract. *Immunol* 111 (1):13-15.
- [40] C Wira, J V Fahey, C L Sentman, P Pioli, L Shen (2005) Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. *Immunol Rev* 206:306-335.
- [41] JV Fahey, JA Wright, L Shen, JM Smith, M Ghosh, RM Rossoll, CR Wira (2008) Estradiol selectively regulates innate immune function by polarized human uterine epithelial cells in culture. *Mucosal Immunol* 1 (4):317-325.
- [42] J Mestecky, ME Lamm, JE McGhee, J Bienenstock, L Mayer, W Strober (2005) 3<sup>rd</sup> edition *Mucosal Immunology*. Ed. J Mestecky. El sevier, p. 1-2064.
- [43] JV Fahey, TM Schaefer, CR Wira (2006) Sex hormone modulation of human uterine epithelial cell immune responses. *Integr Comp Biol* 46 (6):1082-1087.

- [44] L Ming, P Xiaoling, L Yan, W Lili, W Qi, Y Xiyong, W Boyao, H Ning (2007) Purification of antimicrobial factors from human cervical mucus. *Hum Reprod* 22 (7):1810-1815.
- [45] J Ravel, P Gajer, Z Abdo, GM Schneider, SS Koenig, SL McCulle, S Karlebach, R Gorle, J Russell, CO Tacket, RM Brotman, CC Davis, K Ault, L Peralta, LJ Forney (2011) Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (1):4680-4687.
- [46] SS Witkin, IM Linhares, P Giraldo (2007) Bacterial flora of the female genital tract: function and immune regulation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 21 (3):347-354.
- [47] AE King, AW Horne, S Hombach-Klonisch, JI Mason, HO Critchley (2009) Differential expression and regulation of nuclear oligomerization domain proteins NOD1 and NOD2 in human endometrium: a potential role in innate immune protection and menstruation. *Molecular Hum Reprod* 15 (5):311-319.
- [48] TM Schaefer, K Desouza, JV Fahey, KW Beagley, CR Wira (2004) Toll-like receptor (TLR) expression and TLR-mediated cytokine/chemokine production by human uterine epithelial cells. *Immunol* 112 (3):428-436.
- [49] TM Schaefer, JV Fahey, JA Wright, CR Wira (2005) Innate immunity in the human female reproductive tract: antiviral response of uterine epithelial cells to the TLR3 agonist poly(I:C). *J Immunol* 174 (2):992-1002.
- [50] MM Herbst-Kralovetz, AJ Quayle, M Ficarra, S Greene, WA Rose, 2nd, R Chesson, RA Spagnuolo, RB Pyles (2008) Quantification and comparison of toll-like receptor expression and responsiveness in primary and immortalized human female lower genital tract epithelia. *Am J Reprod Immunol* 59 (3):212-224.
- [51] RT Trifonova, J Lieberman, D van Baarle (2014) Distribution of immune cells in the human cervix and implications for HIV transmission. *Am J Reprod Immunol* 71 (3):252-264.
- [52] J Banchereau, RM Steinman (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392 (6673):245-252.
- [53] F Sallusto, A Lanzavecchia (2002) The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. *Arthritis Res* 4 (3):127-132.
- [54] A Iwasaki (2007) Mucosal dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 25:381-418.
- [55] C Reis e Sousa (2006) Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* 6 (6):476-483.

- [56] N Iijima, MM Linehan, M Zamora, D Butkus, R Dunn, MR Kehry, TM Laufer, A Iwasaki (2008) Dendritic cells and B cells maximize mucosal Th1 memory response to herpes simplex virus. *J Exp Med* 205 (13):3041-3052.
- [57] DO Ochiel, M Ghosh, JV Fahey, PM Guyre, CR Wira (2010) Human uterine epithelial cell secretions regulate dendritic cell differentiation and responses to TLR ligands. *J Leukoc Biol* 88 (3):435-444.
- [58] AS MacDonald, AD Straw, B Bauman, EJ Pearce (2001) CD8- dendritic cell activation status plays an integral role in influencing Th2 response development. *J Immunol* 167 (4):1982-1988.
- [59] D Jankovic, MC Kullberg, P Caspar, A Sher (2004) Parasite-induced Th2 polarization is associated with down-regulated dendritic cell responsiveness to Th1 stimuli and a transient delay in T lymphocyte cycling. *J Immunol* 173 (4):2419-2427.
- [60] AM Patterson, V Taciak, J Lovchik, RE Fox, AB Campbell, RM Viscardi (1998) *Ureaplasma urealyticum* respiratory tract colonization is associated with an increase in interleukin 1-beta and tumor necrosis factor alpha relative to interleukin 6 in tracheal aspirates of preterm infants. *Pediatr Infect Dis J* 17 (4):321-328.
- [61] AK Ildgruben, IM Sjoberg, ML Hammarstrom (2003) Influence of hormonal contraceptives on the immune cells and thickness of human vaginal epithelium. *Obstet Gynecol* 102 (3):571-582.
- [62] G Pepe, M Locati, S Della Torre, F Mornata, A Cignarella, A Maggi, E Vegeto (2018) The estrogen-macrophage interplay in the homeostasis of the female reproductive tract. *Hum Reprod Update* 24 (6):652-672.
- [63] TA Wynn, KM Vannella (2016) Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity* 44 (3):450-462.
- [64] CM Minutti, LH Jackson-Jones, B Garcia-Fojeda (2017) Local amplifiers of IL-4Ralpha-mediated macrophage activation promote repair in lung and liver. *Science* 356 (6342):1076-1080.
- [65] J Xue, SV Schmidt, J Sander, A Draffehn, W Krebs, I Quester, D De Nardo, TD Gohel, M Emde, L Schmidleithner, H Ganesan, A Nino-Castro, MR Mallmann, L Labzin, H Theis, M Kraut, M Beyer, E Latz, TC Freeman, T Ulas, JL Schultze (2014) Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity* 40 (2):274-288.

- [66] BA Croy, MJ van den Heuvel, AM Borzychowski, C Tayade (2006) Uterine natural killer cells: a specialized differentiation regulated by ovarian hormones. *Immunolo Rev* 214:161-185.
- [67] AL Givan, HD White, JE Stern, E Colby, EJ Gosselin, PM Guyre, CR Wira (1997) Flow cytometric analysis of leukocytes in the human female reproductive tract: comparison of fallopian tube, uterus, cervix, and vagina. *Am J Reprod Immunol* 38 (5):350-359.
- [68] R Jacobs, G Hintzen, A Kemper, K Beul, S Kempf, G Behrens, KW Sykora, RE Schmidt (2001) CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur J Immunol* 31 (10):3121-3127.
- [69] M Eriksson, SK Meadows, CR Wira, CL Sentman (2004) Unique phenotype of human uterine NK cells and their regulation by endogenous TGF-beta. *J Leukoc Biol* 76 (3):667-675.
- [70] N Acar, I Ustunel, R Demir (2011) Uterine natural killer (uNK) cells and their missions during pregnancy: a review. *Acta Histochem* 113 (2):82-91.
- [71] SA Robertson (2007) Seminal fluid signaling in the female reproductive tract: lessons from rodents and pigs. *J Anim Sci* 85 (13):36-44.
- [72] J Wiesner, A Vilcinskas (2010) Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence* 1 (5):440-464.
- [73] M Ghosh, Z Shen, JV Fahey, S Cu-Uvin, K Mayer, CR Wira (2010) Trappin-2/Elafin: a novel innate anti-human immunodeficiency virus-1 molecule of the human female reproductive tract. *Immunol* 129 (2):207-219.
- [74] L Aboud, TB Ball, A Tjernlund, A Burgener (2014) The role of serpin and cystatin antiproteases in mucosal innate immunity and their defense against HIV. *Am J Reprod Immunol* 71 (1):12-23.
- [75] VL Yarbrough, S Winkle, MM Herbst-Kralovetz (2015) Antimicrobial peptides in the female reproductive tract: a critical component of the mucosal immune barrier with physiological and clinical implications. *Hum Reprod Update* 21 (3):353-377.
- [76] S Scherjon, L Lashley, ML van der Hoorn, F Claas (2011) Fetus specific T cell modulation during fertilization, implantation and pregnancy. *Placenta* 32 (4):291-297.
- [77] VR Aluvihare, M Kallikourdis, AG Betz (2004) Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol* 5 (3):266-271.

- [78] S Jiang, C Dong (2013) A complex issue on CD4(+) T-cell subsets. *Immunol Rev* 252 (1):5-11.
- [79] L Svensson, M Arvola, MA Sallstrom, R Holmdahl, R Mattsson (2001) The Th2 cytokines IL-4 and IL-10 are not crucial for the completion of allogeneic pregnancy in mice. *J Reprod Immunol* 51 (1):3-7.
- [80] AC Zenclussen (2013) Adaptive immune responses during pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 69 (4):291-303.
- [81] EL Johansson, A Rudin, L Wassen, J Holmgren (1999) Distribution of lymphocytes and adhesion molecules in human cervix and vagina. *Immunol* 96 (2):272-277.
- [82] CR Wira, JV Fahey (2004) The innate immune system: gatekeeper to the female reproductive tract. *Immunol* 111 (1):13-15.
- [83] BR Kamat, PG Isaacson (1987) The immunocytochemical distribution of leukocytic subpopulations in human endometrium. *Am J Pathol* 127 (1):66-73.
- [84] GR Yeaman, PM Guyre, MW Fanger, JE Collins, HD White, W Rathbun, KA Orndorff, J Gonzalez, JE Stern, CR Wira (1997) Unique CD8+ T cell-rich lymphoid aggregates in human uterine endometrium. *J Leukoc Biol* 61 (4):427-435.
- [85] J Mestecky, Z Moldoveanu, PD Smith, Z Hel, RC Alexander (2009) Mucosal immunology of the genital and gastrointestinal tracts and HIV-1 infection. *J Reprod Immunol* 83 (1-2):196-200.
- [86] TB Geijtenbeek, R Torensma, SJ van Vliet, GC van Duijnhoven, GJ Adema, Y van Kooyk, CG Figdor (2000) Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100 (5):575-585.
- [87] GR Yeaman, JE Collins, MW Fanger, CR Wira, PM Lydyard (2001) CD8+ T cells in human uterine endometrial lymphoid aggregates: evidence for accumulation of cells by trafficking. *Immunol* 102 (4):434-440.
- [88] HD White, KM Crassi, AL Givan, JE Stern, JL Gonzalez, VA Memoli, WR Green, CR Wira (1997) CD3+ CD8+ CTL activity within the human female reproductive tract: influence of stage of the menstrual cycle and menopause. *J Immunol* 158 (6):3017-3027.
- [89] H Jiang, L Chess (2004) An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest* 114 (9):1198-1208.

- [90] M Allez, L Mayer (2004) Regulatory T cells: peace keepers in the gut. *Inflamm Bowel Dis* 10 (5):666-676.
- [91] L Arruvito, M Sanz, AH Banham, L Fainboim (2007) Expansion of CD4+CD25+and FOXP3+ regulatory T cells during the follicular phase of the menstrual cycle: implications for human reproduction. *J Immunol* 178 (4):2572-2578.
- [92] T Suzuki, K Hiromatsu, Y Ando, T Okamoto, Y Tomoda, Y Yoshikai (1995) Regulatory role of gamma delta T cells in uterine intraepithelial lymphocytes in maternal antifetal immune response. *J Immunol* 154 (9):4476-4484.
- [93] LR McKinnon, B Nyanga, D Chege, P Izulla, M Kimani, S Huibner, L Gelmon, KE Block, C Cicala, AO Anzala, J Arthos, J Kimani, R Kaul (2011) Characterization of a human cervical CD4+ T cell subset coexpressing multiple markers of HIV susceptibility. *J Immunol* 187 (11):6032-6042.
- [94] S Robertson, J Prins, D Sharkey, L Moldenhauer (2013) Seminal Fluid and the Generation of Regulatory T Cells for Embryo Implantation. *Am J Reprod Immunol*. 69(4):315-30.
- [95] SA Robertson, LR Guerin, JJ Bromfield, KM Branson, AC Ahlstrom, AS Care (2009) Seminal fluid drives expansion of the CD4+CD25+ T regulatory cell pool and induces tolerance to paternal alloantigens in mice. *Biol Reprod* 80 (5):1036-1045.
- [96] A Nakashima, M Ito, T Shima, ND Bac, T Hidaka, S Saito (2010) Accumulation of IL-17-positive cells in decidua of inevitable abortion cases. *Am J Reprod Immunol* 64 (1):4-11.
- [97] AM Scurlock, LC Frazer, CW Andrews, Jr., CM O'Connell, IP Foote, SL Bailey, K Chandra-Kuntal, JK Kolls, T Darville (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.
- [98] C Kaushic, F Zhou, AD Murdin, CR Wira (2000) Effects of estradiol and progesterone on susceptibility and early immune responses to *Chlamydia trachomatis* infection in the female reproductive tract. *Infect Immun* 68 (7):4207-4216.
- [99] CM Gockel, S Bao, MK Holland, KW Beagley (2003) Influence of the murine oestrous cycle on the induction of mucosal immunity. *Am J Reprod Immunol* 50 (5):369-379.
- [100] F Fettke, A Schumacher, SD Costa, AC Zenclussen (2014) B cells: the old new players in reproductive immunology. *Front Immunol* 5:285.

- [101] RL Gendron, FP Nestel, WS Lapp, MG Baines (1990) Lipopolysaccharide-induced fetal resorption in mice is associated with the intrauterine production of tumour necrosis factor-alpha. *J Reprod Fertil* 90 (2):395-402.
- [102] K Haller-Kikkatalo, A Salumets, R Uiibo (2012) Review on autoimmune reactions in female infertility: antibodies to follicle stimulating hormone. *Clin Dev Immunol* 2012:762541.
- [103] WH Kutteh, J Mestecky (1994) Secretory immunity in the female reproductive tract. *Am J Reprod Immunol* 31 (1):40-46.
- [104] PA Crowley-Nowick, M Bell, RP Edwards, D McCallister, H Gore, A Kanbour-Shakir, J Mestecky, EE Partridge (1995) Normal uterine cervix: characterization of isolated lymphocyte phenotypes and immunoglobulin secretion. *Am J Reprod Immunol* 34 (4):241-247.
- [105] WH Kutteh, SJ Prince, KR Hammond, CC Kutteh, J Mestecky (1996) Variations in immunoglobulins and IgA subclasses of human uterine cervical secretions around the time of ovulation. *Clin Exp Immunol* 104 (3):538-542.
- [106] J Mestecky, PN Fultz (1999) Mucosal immune system of the human genital tract. *J Infect Dis* 179 (3):470-474.
- [107] MW Russell, J Mestecky (2002) Humoral immune responses to microbial infections in the genital tract. *Microbes Infect* 4 (6):667-677.
- [108] A Quesnel, S Cu-Uvin, D Murphy, RL Ashley, T Flanigan, MR Neutra (1997) Comparative analysis of methods for collection and measurement of immunoglobulins in cervical and vaginal secretions of women. *J Immunol Methods* 202 (2):153-161.
- [109] DA Sullivan, GS Richardson, DT MacLaughlin, CR Wira (1984) Variations in the levels of secretory component in human uterine fluid during the menstrual cycle. *J Steroid Biochem* 20 (1):509-513.
- [110] WH Kutteh, Z Moldoveanu, J Mestecky (1998) Mucosal immunity in the female reproductive tract: correlation of immunoglobulins, cytokines, and reproductive hormones in human cervical mucus around the time of ovulation. *AIDS Res Hum Retroviruses* 14 (1):51-55.
- [111] J Pudney, D Anderson (2011) Innate and acquired immunity in the human penile urethra. *J Reprod Immunol* 88 (2):219-227.
- [112] Ross-Pawlina (2007) Quinta edición Cap. 22 Aparato genital masculino. “*Histología Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular*” Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.

- [113] A Filippini, A Riccioli, F Padula, P Lauretti, A D'Alessio, P De Cesaris, L Gandini, A Lenzi, E Ziparo (2001) Control and impairment of immune privilege in the testis and in semen. *Hum Reprod Update* 7 (5):444-449.
- [114] R Bronson (2011) Biology of the Male Reproductive Tract: Its Cellular and Morphological Considerations. *Am J Reprod Immunol* 65(3):212-9.
- [115] MP Hedger (2011) Immunophysiology and pathology of inflammation in the testis and epididymis. *J Androl* 32 (6):625-640.
- [116] M Johansson, NY Lycke (2003) Immunology of the human genital tract. *Curr Opin Infect Dis* 16 (1):43-49.
- [117] P Mital, BT Hinton, JM Dufour (2011) The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. *Biol Reprod* 84 (5):851-858.
- [118] S Mueller, TA Rosenquist, Y Takai, RA Bronson, E Wimmer (2003) Loss of nectin-2 at Sertoli-spermatid junctions leads to male infertility and correlates with severe spermatozoan head and midpiece malformation, impaired binding to the zona pellucida, and oocyte penetration. *Biol Reprod* 69 (4):1330-1340.
- [119] PR Sanberg, CV Borlongan, S Saporta, DF Cameron (1996) Testis-derived Sertoli cells survive and provide localized immunoprotection for xenografts in rat brain. *Nat Biotechnol* 14 (13):1692-1695.
- [120] MP Hedger, A Meinhardt (2000) Local regulation of T cell numbers and lymphocyte-inhibiting activity in the interstitial tissue of the adult rat testis. *J Reprod Immunol* 48 (2):69-80.
- [121] A Le Tortorec, N Dejuq-Rainsford (2010) HIV infection of the male genital tract: consequences for sexual transmission and reproduction. *Int J Androl* 33 (1):e98-108.
- [122] G Verhoeven, E Hoeben, K De Gendt (2000) Peritubular cell-Sertoli cell interactions: factors involved in PmodS activity. *Andrologia* 32 (1):42-45.
- [123] C Schell, M Albrecht, C Mayer, JU Schwarzer, MB Frungieri, A Mayerhofer (2008) Exploring human testicular peritubular cells: identification of secretory products and regulation by tumor necrosis factor-alpha. *Endocrinology* 149 (4):1678-1686.
- [124] N Li, T Wang, D Han (2012) Structural, cellular and molecular aspects of immune privilege in the testis. *Front Immunol* 3:152-152.

- [125] A Meinhardt, MP Hedger (2011) Immunological, paracrine and endocrine aspects of testicular immune privilege. *Mol Cell Endocrinol* 335 (1):60-68.
- [126] Z Moldoveanu, WQ Huang, R Kulhavy, MS Pate, J Mestecky (2005) Human male genital tract secretions: both mucosal and systemic immune compartments contribute to the humoral immunity. *J Immunol* 175 (6):4127-4136.
- [127] Y Fujita, T Mihara, T Okazaki, M Shitanaka, R Kushino, C Ikeda, H Negishi, Z Liu, JS Richards, M Shimada (2011) Toll-like receptors (TLR) 2 and 4 on human sperm recognize bacterial endotoxins and mediate apoptosis. *Hum Reprod* 26 (10):2799-2806.
- [128] JE Girling, MP Hedger (2007) Toll-like receptors in the gonads and reproductive tract: emerging roles in reproductive physiology and pathology. *Immunol Cell Biol* 85 (6):481-489.
- [129] CL Russo, S Spurr-Michaud, A Tisdale, J Pudney, D Anderson, IK Gipson (2006) Mucin gene expression in human male urogenital tract epithelia. *Hum Reprod* 21 (11):2783-2793.
- [130] G Theodoropoulos, KL Carraway (2007) Molecular signaling in the regulation of mucins. *J Cell Biochem* 102 (5):1103-1116.
- [131] E Porter, H Yang, S Yavagal, GC Preza, O Murillo, H Lima, S Greene, L Mahoozi, M Klein-Patel, G Diamond, S Gulati, T Ganz, PA Rice, AJ Quayle (2005) Distinct defensin profiles in *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* urethritis reveal novel epithelial cell-neutrophil interactions. *Infect Immun* 73 (8):4823-4833.
- [132] T Ganz (2003) Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3 (9):710-720.
- [133] PF Tauber, LJ Zaneveld, D Propping, GF Schumacher (1976) Components of human split ejaculates. II. Enzymes and proteinase inhibitors. *J Reprod Fertil* 46 (1):165-171.
- [134] K Ohlsson, A Bjartell, H Lilja (1995) Secretory leucocyte protease inhibitor in the male genital tract: PSA-induced proteolytic processing in human semen and tissue localization. *J Androl* 16 (1):64-74.
- [135] SH Hall, KG Hamil, FS French (2002) Host defense proteins of the male reproductive tract. *J Androl* 23 (5):585-597.
- [136] H Wu, H Wang, W Xiong, S Chen, H Tang, D Han (2008) Expression patterns and functions of toll-like receptors in mouse sertoli cells. *Endocrinology* 149 (9):4402-4412.

- [137] B Sun, N Qi, T Shang, H Wu, T Deng, D Han (2010) Sertoli cell-initiated testicular innate immune response through toll-like receptor-3 activation is negatively regulated by Tyro3, Axl, and mer receptors. *Endocrinology* 151 (6):2886-2897.
- [138] MP Hedger (2002) Macrophages and the immune responsiveness of the testis. *J Reprod Immunol* 57 (1-2):19-34.
- [139] S Kern, S Maddocks (1995) Indomethacin blocks the immunosuppressive activity of rat testicular macrophages cultured in vitro. *J Reprod Immunol* 28 (3):189-201.
- [140] S Kern, SA Robertson, VJ Mau, S Maddocks (1995) Cytokine secretion by macrophages in the rat testis. *Biol Reprod* 53 (6):1407-1416.
- [141] C Rival, MS Theas, MO Suescun, P Jacobo, V Guazzone, N van Rooijen, L Lustig (2008) Functional and phenotypic characteristics of testicular macrophages in experimental autoimmune orchitis. *J Pathol* 215 (2):108-117.
- [142] O Gerdprasert, MK O'Bryan, DJ Nikolic-Paterson, K Sebire, DM de Kretser, MP Hedger (2002) Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage colony-stimulating factor in normal and inflamed rat testis. *Mol Hum Reprod* 8 (6):518-524.
- [143] S Bhushan, A Meinhardt (2017) The macrophages in testis function. *J Reprod Immunol* 119:107-112.
- [144] A Meinhardt, M Bacher, C Metz, R Bucala, N Wreford, H Lan, R Atkins, M Hedger (1998) Local regulation of macrophage subsets in the adult rat testis: examination of the roles of the seminiferous tubules, testosterone, and macrophage-migration inhibitory factor. *Biol Reprod* 59 (2):371-378.
- [145] JF Sanchez, DR Crooks, CT Lee, CJ Schoen, R Amable, X Zeng, T Florival-Victor, N Morales, ME Truckenmiller, DR Smith, WJ Freed (2006) GABAergic lineage differentiation of AF5 neural progenitor cells in vitro. *Cell Tissue Res* 324 (1):1-8.
- [146] M Fijak, S Bhushan, A Meinhardt (2011) Immunoprivileged sites: the testis. *Methods Mol Biol* 677:459-470.
- [147] R Aguilar, F Anton, C Bellido, E Aguilar, F Gaytan (1995) Testicular serotonin is related to mast cells but not to Leydig cells in the rat. *J Endocrinol* 146 (1):15-21.

- [148] M Abe, M Kurosawa, O Ishikawa, Y Miyachi, H Kido (1998) Mast cell tryptase stimulates both human dermal fibroblast proliferation and type I collagen production. *Clin Exp Allergy* 28 (12):1509-1517.
- [149] J Pudney, DJ Anderson (1995) Immunobiology of the human penile urethra. *Am J Pathol* 147 (1):155-165.
- [150] JA Politch, L Tucker, FP Bowman, DJ Anderson (2007) Concentrations and significance of cytokines and other immunologic factors in semen of healthy fertile men. *Hum Reprod* 22 (11):2928-2935.
- [151] G Skibinski, RW Kelly, CM Harrison, LA McMillan, K James (1992) Relative immunosuppressive activity of human seminal prostaglandins. *J Reprod Immunol* 22 (2):185-195.
- [152] RW Kelly, HO Critchley (1997) A T-helper-2 bias in decidua: the prostaglandin contribution of the macrophage and trophoblast. *J Reprod Immunol* 33 (3):181-187.
- [153] RW Kelly (1997) Prostaglandins in primate semen: biasing the immune system to benefit spermatozoa and virus? *Prostaglandins, leukot Essent Fatty Acids* 57 (2):113-118.
- [154] SA Robertson, WV Ingman, S O'Leary, DJ Sharkey, KP Tremellen (2002) Transforming growth factor beta--a mediator of immune deviation in seminal plasma. *J Reprod Immunol* 57 (1-2):109-128.
- [155] SA Robertson (2005) Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. *Cell Tissue Res* 322 (1):43-52.
- [156] S Gutsche, M von Wolff, T Strowitzki, CJ Thaler (2003) Seminal plasma induces mRNA expression of IL-1beta, IL-6 and LIF in endometrial epithelial cells in vitro. *Mol Hum Reprod* 9 (12):785-791.
- [157] DJ Sharkey, AM Macpherson, KP Tremellen, SA Robertson (2007) Seminal plasma differentially regulates inflammatory cytokine gene expression in human cervical and vaginal epithelial cells. *Mol Hum Reprod* 13 (7):491-501.
- [158] R Alexander, J Mestecky (2007) Neutralizing antibodies in mucosal secretions: IgG or IgA? *Curr HIV Res* 5 (6):588-593.
- [159] SL Young (2016) Introduction: Reproductive immunology: checkered past and bright future. *Fertil Steril* 106 (3):497-498.

- [160] A Agenor, S Bhattacharya (2015) Infertility and miscarriage: common pathways in manifestation and management. *Women's Health* 11 (4):527-541.
- [161] MH Vazquez-Levin, CI Marin-Briggiler, C Veaute (2014) Antisperm antibodies: invaluable tools toward the identification of sperm proteins involved in fertilization. *Am J Reprod Immunol* 72 (2):206-218.
- [162] DG Dimitrov, V Urbanek, J Zverina, J Madar, K Nouza, R Kinsky (1994) Correlation of asthenozoospermia with increased antisperm cell-mediated immunity in men from infertile couples. *J Reprod Immunol* 27 (1):3-12.
- [163] DA Ohl, RK Naz (1995) Infertility due to antisperm antibodies. *Urology* 46 (4):591-602.
- [164] S Mazumdar, AS Levine (1998) Antisperm antibodies: etiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Fertil Steril* 70 (5):799-810.
- [165] RA Bronson (1999) Antisperm antibodies: a critical evaluation and clinical guidelines. *J Reprod Immunol* 45 (2):159-183.
- [166] WW Chiu, LW Chamley (2004) Clinical associations and mechanisms of action of antisperm antibodies. *Fertil Steril* 82 (3):529-535.
- [167] J Kremer, S Jager (1992) The significance of antisperm antibodies for sperm-cervical mucus interaction. *Hum Reprod* 7 (6):781-784.
- [168] MC Mahony, PF Blackmore, RA Bronson, NJ Alexander (1991) Inhibition of human sperm-zona pellucida tight binding in the presence of antisperm antibody positive polyclonal patient sera. *J Reprod Immunol* 19 (3):287-301.
- [169] H Shibahara, M Shigeta, M Inoue, A Hasegawa, K Koyama, NJ Alexander, S Isojima (1996) Diversity of the blocking effects of antisperm antibodies on fertilization in human and mouse. *Hum Reprod* 11 (12):2595-2599.
- [170] K Nakagawa, S Yamano, M Kamada, M Maegawa, A Tokumura, M Irahara, H Saito (2004) Sperm-immobilizing antibodies suppress an increase in the plasma membrane fluidity of human spermatozoa. *Fertil Steril* 82 (3):1054-1058.
- [171] RA Bronson, GW Cooper, DL Rosenfeld (1982) Correlation between regional specificity of antisperm antibodies to the spermatozoan surface and complement-mediated sperm immobilization. *Am J Reprod Immunol* 2 (4):222-224.

- [172] OJ D'Cruz, GG Haas, Jr., BL Wang, LE DeBault (1991) Activation of human complement by IgG antisperm antibody and the demonstration of C3 and C5b-9-mediated immune injury to human sperm. *J Immunol* 146 (2):611-620.
- [173] DA Clark (1999) T cells in pregnancy: illusion and reality. *Am J Reprod Immunol* 41 (4):233-238.
- [174] M Mustafa, C Vingsbo, T Olsson, A Ljungdahl, B Hojeberg, R Holmdahl (1993) The major histocompatibility complex influences myelin basic protein 63-88-induced T cell cytokine profile and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 23 (12):3089-3095.
- [175] LH Elson, M Calvopina, W Paredes, E Araujo, JE Bradley, RH Guderian, TB Nutman (1995) Immunity to onchocerciasis: putative immune persons produce a Th1-like response to *Onchocerca volvulus*. *J Infect Dis* 171 (3):652-658.
- [176] JA Hill, K Polgar, DJ Anderson (1995) T-helper 1-type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion. *Jama* 273 (24):1933-1936.
- [177] BM Mahdi (2011) Role of some cytokines on reproduction. *Middle East Fertil Soc J* 16 (3):220-223.
- [178] A Trunov, O Obukhova, O Gorbenko, A Shvayk, L Trunova (2016) Cytokines and Infertility Influence of Cytokines and Local Inflammation in Women of Reproductive Age with Infertility. *J Cytokine Biol.* 1(1): 102.
- [179] KL Loveland, B Klein, D Poeschl, S Indumathy, M Bergmann, BE Loveland, MP Hedger, HC Schuppe (2017) Cytokines in Male Fertility and Reproductive Pathologies: Immunoregulation and Beyond. *Front Endocrinol* 8:307.
- [180] L Szereday, P Varga, J Szekeres-Bartho (1997) Cytokine production by lymphocytes in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 38 (6):418-422.
- [181] R Raghupathy, M Makhseed, F Azizieh, A Omu, M Gupta, R Farhat (2000) Cytokine production by maternal lymphocytes during normal human pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod* 15 (3):713-718.
- [182] R Romero, F Gotsch, B Pineles, JP Kusanovic (2007) Inflammation in pregnancy: its roles in reproductive physiology, obstetrical complications, and fetal injury. *Nutr Rev* 65 (12 Pt 2):194-202.

- [183] R Milewski, AJ Milewska, J Czerniecki, M Lesniewska, S Wolczynski (2013) [Analysis of the demographic profile of patients treated for infertility using assisted reproductive techniques in 2005-2010]. *Ginekol polska* 84 (7):609-614.
- [184] WHO (2016) *Infecciones de Transmisión Sexual*. [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-\(stis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-(stis)) Accessed 2018.
- [185] WHO (2016) *WHO guidelines for the treatment of Chlamydia trachomatis*. <https://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/chlamydia-treatment-guidelines/en/> Accessed 2018
- [186] ALR Goundry, ER Finlay, CD Llewellyn (2013) Talking about links between sexually transmitted infections and infertility with college and university students from SE England, UK: a qualitative study. *Reprod Health* 10:47-47.
- [187] R Sleha, V Bostikova, R Hampl, M Salavec, P Halada, M Stepan, S Novotna, R Kukla, E Slehova, M Kacerovsky, P Bostik Prevalence of Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum in women undergoing an initial infertility evaluation. *Epidemiol, Mikrobiol, Imunol* 65 (4):232-237.
- [188] C Keck, C Gerber-Schafer, A Clad, C Wilhelm, M Breckwoldt (1998) Seminal tract infections: impact on male fertility and treatment options. *Hum Reprod Update* 4 (6):891-903.
- [189] C Brookings, D Goldmeier, H Sadeghi-Nejad (2013) Sexually transmitted infections and sexual function in relation to male fertility. *Korean J Urol* 54 (3):149-156.
- [190] Novy , DA Eschenbach, SS Witkin (2008) Infections as a Cause of Infertility. *Chlamydia*. Ed. P Dadelszen. Global Women's Medicine, Kings College, London, p.1-29.
- [191] S Menon, P Timms, JA Allan, K Alexander, L Rombauts, P Horner, M Keltz, J Hocking, WM Huston (2015) Human and Pathogen Factors Associated with Chlamydia trachomatis-Related Infertility in Women. *Clin Microbiol Rev.* 28 (4):969-985.
- [192] AP Murtha, JM Edwards (2014) The role of Mycoplasma and Ureaplasma in adverse pregnancy outcomes. *Obstet Gynecol Clin North Am* 41 (4):615-627.
- [193] QZ Xie, WM Xu, QR Qi, ZL Luo, L Dong (2016) Patients with cervical Ureaplasma Urealyticum and Chlamydia Trachomatis infection undergoing IVF/ICSI-ET: The need for new paradigm. *J Huazhong Uni Sci Technolog Med Sci* 36 (5):716-722.

- [194] L Newman, J Rowley, S Vander Hoorn, NS Wijesooriya, M Unemo, N Low, G Stevens, S Gottlieb, J Kiarie, M Temmerman (2015) Global Estimates of the Prevalence and Incidence of Four Curable Sexually Transmitted Infections in 2012 Based on Systematic Review and Global Reporting. *PloS One* 10 (12):e0143304.
- [195] F kong, G James, Z Ma, S Gordon, W Bin, GL Gilbert (1999) Phylogenetic analysis of *Ureaplasma urealyticum*: support for the establishment of a new species, *Ureaplasma parvum*. *Int J Syst Bacteriol* 49 Pt 4:1879-1889.
- [196] FT Andrade-Rocha (2003) *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in men attending for routine semen analysis. Prevalence, incidence by age and clinical settings, influence on sperm characteristics, relationship with the leukocyte count and clinical value. *Urol Int* 71 (4):377-381.
- [197] Y Wang, CL Liang, JQ Wu, C Xu, SX Qin, ES Gao (2006) Do *Ureaplasma urealyticum* infections in the genital tract affect semen quality? *Asian J Androl* 8 (5):562-568.
- [198] NA Al-Sweih, AH Al-Fadli, AE Omu, VO Rotimi (2012) Prevalence of *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, and *Ureaplasma urealyticum* infections and seminal quality in infertile and fertile men in Kuwait. *J Androl* 33 (6):1323-1329.
- [199] M Castellano-Gonzalez, M Ginestre-Perez, A Perozo-Mena, F Alana, M Fernandez-Bravo, G Rincon-Villalobos (2007) [Vaginal colonization by genital mycoplasmas in pregnant and non-pregnant women]. *Inv Clin* 48 (4):419-429.
- [200] I Mylonas (2012) Female genital *Chlamydia trachomatis* infection: where are we heading? *Arch Gynecol Obstet* 285 (5):1271-1285.
- [201] RS Stephens, R Sanchez-Pescador, EA Wagar, C Inouye, MS Urdea (1987) Diversity of *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes. *J Bacteriol* 169 (9):3879-3885.
- [202] W Baehr, YX Zhang, T Joseph, H Su, FE Nano, KD Everett, HD Caldwell (1988) Mapping antigenic domains expressed by *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (11):4000-4004.
- [203] K Millman, CM Black, RE Johnson, WE Stamm, RB Jones, EW Hook, DH Martin, G Bolan, S Tavaré, D Dean (2004) Population-based genetic and evolutionary analysis of *Chlamydia trachomatis* urogenital strain variation in the United States. *J Bacteriol* 186 (8):2457-2465.
- [204] A Luján, S Fili, M T Damiani (2016) Female Infertility Associated to *Chlamydia trachomatis* Infection. *Genital infection and Infertility*. Ed. A Darwish. IntechOpen, p. 135-158.

- [205] VS Monroy, JDA Villalba-Magdaleno (2012) Molecular Epidemiology of Chlamydia trachomatis Urogenital Infection. *Chlamydia*. Ed: M Mares. InTechOpen, p. 3-24.
- [206] DE Nelson, DP Virok, H Wood, C Roshick, RM Johnson, WM Whitmire, DD Crane, O Steele-Mortimer, L Kari, G McClarty, HD Caldwell (2005) Chlamydial IFN- $\gamma$  immune evasion is linked to host infection tropism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (30):10658-10663.
- [207] V Borges, A Nunes, R Ferreira, MJ Borrego, JP Gomes (2012) Directional evolution of Chlamydia trachomatis towards niche-specific adaptation. *J Bacteriol* 194 (22):6143-6153.
- [208] BM Jeffrey, RJ Suchland, KL Quinn, JR Davidson, WE Stamm, DD Rockey (2010) Genome sequencing of recent clinical Chlamydia trachomatis strains identifies loci associated with tissue tropism and regions of apparent recombination. *Infect Immun* 78 (6):2544-2553.
- [209] JF Peipert (2003) Clinical practice. Genital chlamydial infections. *N Engl J Med* 349 (25):2424-2430.
- [210] N Ziklo, WM Huston, JS Hocking, P Timms (2016) Chlamydia trachomatis Genital Tract Infections: When Host Immune Response and the Microbiome Collide. *Trends Microbiol* 24 (9):750-765.
- [211] P Oakeshott, S Kerry, H Atherton, A Aghaizu, S Hay, D Taylor-Robinson, I Simms, P Hay (2008) Community-based trial of screening for Chlamydia trachomatis to prevent pelvic inflammatory disease: the POPI (prevention of pelvic infection) trial. *Trials* 9:73.
- [212] RC Brunham, J Rey-Ladino (2005) Immunology of Chlamydia infection: implications for a Chlamydia trachomatis vaccine. *Nat Rev Immunol* 5 (2):149-161.
- [213] D Scott Lamontagne, K Baster, L Emmett, T Nichols, S Randall, L McLean, P Meredith, V Harindra, JM Tobin, GS Underhill, W Graham Hewitt, J Hopwood, T Gleave, AK Ghosh, H Mallinson, AR Davies, G Hughes, KA Fenton (2007) Incidence and reinfection rates of genital chlamydial infection among women aged 16-24 years attending general practice, family planning and genitourinary medicine clinics in England: a prospective cohort study by the Chlamydia Recall Study Advisory Group. *Sex Transm Infect* 83 (4):292-303.
- [214] E Lanjouw, S Ouburg, HJ de Vries, A Stry, K Radcliffe, M Unemo (2016) 2015 European guideline on the management of Chlamydia trachomatis infections. *Int J STD AIDS* 27 (5):333-348.
- [215] CL Haggerty, SL Gottlieb, BD Taylor, N Low, F Xu, RB Ness (2010) Risk of sequelae after Chlamydia trachomatis genital infection in women. *J Infect Dis* 201 (2):134-155.

- [216] J Paavonen, W Eggert-Kruse (1999) Chlamydia trachomatis: impact on human reproduction. *Hum Reprod Update* 5 (5):433-447.
- [217] M Dan, Z Samra, YI Siegel, D Korczak, A Lindner (1991) Isolation of Chlamydia trachomatis from prostatic tissue of patients undergoing transurethral prostatectomy. *Infection* 19 (3):162-163.
- [218] WE Stamm, LA Koutsky, JK Benedetti, JL Jourden, RC Brunham, KK Holmes (1984) Chlamydia trachomatis urethral infections in men. Prevalence, risk factors, and clinical manifestations. *Ann Intern Med* 100 (1):47-51.
- [219] G Bezold, JA Politch, NB Kiviat, JM Kuypers, H Wolff, DJ Anderson (2007) Prevalence of sexually transmissible pathogens in semen from asymptomatic male infertility patients with and without leukocytospermia. *Fertil Steril* 87 (5):1087-1097.
- [220] G Gallegos, B Ramos, R Santiso, V Goyanes, J Gosalvez, JL Fernandez (2008) Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection by Chlamydia trachomatis and Mycoplasma. *Fertil Steril* 90 (2):328-334.
- [221] T Cengiz, L Aydoganli, M Baykam, NA Mungan, E Tuncbilek, M Dincer, K Yakupoglu, Z Akalin (1997) Chlamydial infections and male infertility. *Int Urol Nephrol* 29 (6):687-693.
- [222] I Gunyeli, F Abike, I Dunder, C Aslan, OL Tapisiz, O Temizkan, A Payasli, E Erdemoglu (2011) Chlamydia, Mycoplasma and Ureaplasma infections in infertile couples and effects of these infections on fertility. *Arch Gynecol Obstet* 283 (2):379-385.
- [223] DR Stothard, G Boguslawski, RB Jones (1998) Phylogenetic analysis of the Chlamydia trachomatis major outer membrane protein and examination of potential pathogenic determinants. *Infect Immun* 66 (8):3618-3625.
- [224] WJ Brown, DD Rockey (2000) Identification of an antigen localized to an apparent septum within dividing chlamydiae. *Infect Immun* 68 (2):708-715.
- [225] S Dougan, BG Evans, J Elford (2007) Sexually transmitted infections in Western Europe among HIV-positive men who have sex with men. *Sex Transm Dis* 34 (10):783-790.
- [226] NHN de Vrieze, B Versteeg, SM Bruisten, MS van Rooijen, JJ van der Helm, HJC de Vries (2017) Low Prevalence of Urethral Lymphogranuloma Venereum Infections Among Men Who Have Sex With Men: A Prospective Observational Study, Sexually Transmitted Infection Clinic in Amsterdam, the Netherlands. *Sex Transm Dis* 44 (9):547-550.

- [227] Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación (2018) *Alerta Epidemiológica: Casos de linfogranuloma venéreo (LGV) en Argentina*. [https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/alerta\\_linfogranuloma\\_venereo\\_se332018.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/alerta_linfogranuloma_venereo_se332018.pdf) Accessed 2018.
- [228] BP Stoner, SE Cohen (2015) Lymphogranuloma Venereum 2015: Clinical Presentation, Diagnosis, and Treatment. *Clin Infect Dis* 61 (8):865-873.
- [229] JS Wilson, E Honey, A Templeton, J Paavonen, PA Mardh, B Stray-Pedersen (2002) A systematic review of the prevalence of Chlamydia trachomatis among European women. *Hum Reprod Update* 8 (4):385-394.
- [230] S Sripada, MR Amezaga, M Hamilton, H McKenzie, A Templeton, S Bhattacharya (2010) Absence of chlamydial deoxyribonucleic acid from testicular and epididymal samples from men with obstructive azoospermia. *Fertil Steril* 93 (3):833-836.
- [231] M de Jesus De Haro-Cruz, I Deleon-Rodriguez, MR Escobedo-Guerra, M Lopez-Hurtado, G Arteaga-Troncoso, FJ Ortiz-Ibarra, FM Guerra-Infante (2011) Genotyping of Chlamydia trachomatis from endocervical specimens of infertile Mexican women. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 29 (2):102-108.
- [232] R Gdoura, W Kchaou, L Ammar-Keskes, N Chakroun, A Sellemi, A Znazen, T Rebai, A Hammami (2008) Assessment of Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum, Mycoplasma hominis, and Mycoplasma genitalium in semen and first void urine specimens of asymptomatic male partners of infertile couples. *J Androl* 29 (2):198-206.
- [233] NS de Lima Freitas, CM Borborema-Santos, D Barroso Serrao das Neves, CM Costa de Oliveira, JR Dutra Ferreira, S Astolfi-Filho (2011) High prevalence detection of Chlamydia trachomatis by polymerase chain reaction in endocervical samples of infertile women attending university hospital in Manaus-Amazonas, Brazil. *Gynecol Obstet Inv* 72 (4):220-226.
- [234] RM MS Monetti, P Estofan, MC Frutos, AX Kiguen, RF Venezuela (2013) Distribution of Chlamydia trachomatis Genotypes in Infertile Patients of Córdoba, Argentina. *Int J Virol Mol Biol* 2 (1):1-6.
- [235] RS Stephens (2003) The cellular paradigm of chlamydial pathogenesis. *Trends Microbiol* 11 (1):44-51.
- [236] SJ Rasmussen, L Eckmann, AJ Quayle, L Shen, YX Zhang, DJ Anderson, J Fierer, RS Stephens, MF Kagnoff (1997) Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in

response to Chlamydia infection suggests a central role for epithelial cells in chlamydial pathogenesis. *J Clin Inv* 99 (1):77-87.

[237] R Jha, P Srivastava, S Salhan, A Finckh, C Gabay, A Mittal, S Bas (2011) Spontaneous secretion of interleukin-17 and -22 by human cervical cells in Chlamydia trachomatis infection. *Microb Infect* 13 (2):167-178.

[238] GT Spear, SR Kendrick, HY Chen, TT Thomas, M Bahk, R Balderas, S Ghosh, A Weinberg, AL Landay (2011) Multiplex immunoassay of lower genital tract mucosal fluid from women attending an urban STD clinic shows broadly increased IL1ss and lactoferrin. *PloS One* 6 (5):e19560.

[239] N Low, M Egger, JA Sterne, RM Harbord, F Ibrahim, B Lindblom, B Herrmann (2006) Incidence of severe reproductive tract complications associated with diagnosed genital chlamydial infection: the Uppsala Women's Cohort Study. *Sex Transm Infect* 82 (3):212-218.

[240] T Agrawal, R Gupta, R Dutta, P Srivastava, AR Bhengraj, S Salhan, A Mittal (2009) Protective or pathogenic immune response to genital chlamydial infection in women--a possible role of cytokine secretion profile of cervical mucosal cells. *Clin Immunol* 130 (3):347-354.

[241] T Darville, TJ Hiltke (2010) Pathogenesis of genital tract disease due to Chlamydia trachomatis. *J Infect Dis* 201 (2):114-125.

[242] N Mozzato-Chamay, OS Mahdi, O Jallow, DC Mabey, RL Bailey, DJ Conway (2000) Polymorphisms in candidate genes and risk of scarring trachoma in a Chlamydia trachomatis: endemic population. *J Infect Dis* 182 (5):1545-1548.

[243] T Darville, JM O'Neill, CW Andrews, Jr., UM Nagarajan, L Stahl, DM Ojcius (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.

[244] A Natividad, MJ Holland, KA Rockett, J Forton, N Faal, HM Joof, DCW Mabey, RL Bailey, DP Kwiatkowski (2008) Susceptibility to sequelae of human ocular chlamydial infection associated with allelic variation in IL10 cis-regulation. *Hu Mol Genet* 17 (2):323-329.

[245] S Sakaguchi (2003) Regulatory T cells: mediating compromises between host and parasite. *Nat Immunol* 4 (1):10-11.

[246] A O'Garra, PL Vieira, P Vieira, AE Goldfeld (2004) IL-10-producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage. *J Clin Inv* 114 (10):1372-1378.

- [247] R Fernandez-Boyanapalli, KA McPhillips, SC Frasch, WJ Janssen, MC Dinauer, DW Riches, PM Henson, A Byrne, DL Bratton (2010) Impaired phagocytosis of apoptotic cells by macrophages in chronic granulomatous disease is reversed by IFN-gamma in a nitric oxide-dependent manner. *J Immunol* 185 (7):4030-4041.
- [248] GM Zhong, LM de la Maza (1988) Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro or in vivo by recombinant murine gamma interferon inhibits the growth of *Chlamydia trachomatis* serovar L1. *Infect Immun* 56 (12):3322-3325.
- [249] SY Ryu, KS Jeong, BN Kang, SJ Park, WK Yoon, SH Kim, TH Kim (2000) Modulation of transferrin synthesis, transferrin receptor expression, iNOS expression and NO production in mouse macrophages by cytokines, either alone or in combination. *Anticancer Res* 20 (5a):3331-3338.
- [250] HM Al-Younes, T Rudel, V Brinkmann, AJ Szczepek, TF Meyer (2001) Low iron availability modulates the course of *Chlamydia pneumoniae* infection. *Cell Microbiol* 3 (6):427-437.
- [251] JC Akers, M Tan (2006) Molecular mechanism of tryptophan-dependent transcriptional regulation in *Chlamydia trachomatis*. *J Bacteriol* 188 (12):4236-4243.
- [252] T Agrawal, AR Bhengraj, V Vats, A Mittal (2013) *Chlamydia trachomatis*: TLR4-mediated recognition by human dendritic cells is impaired following oestradiol treatment. *British J Biomed Sci* 70 (2):51-57.
- [253] B Datta, F Njau, J Thalmann, H Haller, AD Wagner (2014) Differential infection outcome of *Chlamydia trachomatis* in human blood monocytes and monocyte-derived dendritic cells. *BMC Microbiol* 14:209.
- [254] JA Herweg, T Rudel (2016) Interaction of *Chlamydiae* with human macrophages. *FEBS J* 283 (4):608-618.
- [255] M Zuck, TC Ellis, A Venida, K Hybiske (2016) Extrusions promote engulfment and *Chlamydia* survival within macrophages. *Cell Microbiol* 19(4):e12683.
- [256] RM Vabulas, P Ahmad-Nejad, C da Costa, T Miethke, CJ Kirschning, H Hacker, H Wagner (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.

- [257] S Prebeck, H Brade, CJ Kirschning, CP da Costa, S Dürr, H Wagner, T Miethke (2003) The Gram-negative bacterium *Chlamydia trachomatis* L2 stimulates tumor necrosis factor secretion by innate immune cells independently of its endotoxin. *Microb Infect* 5 (6):463-470.
- [258] P Massari, DN Toussi, DF Tifrea, LM de la Maza (2013) Toll-like receptor 2-dependent activity of native major outer membrane protein proteosomes of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 81 (1):303-310.
- [259] S Vasilevsky, M Stojanov, G Greub, D Baud (2016) Chlamydial polymorphic membrane proteins: regulation, function and potential vaccine candidates. *Virulence* 7 (1):11-22.
- [260] KW Beagley, WM Huston, PM Hansbro, P Timms (2009) Chlamydial infection of immune cells: altered function and implications for disease. *Crit Rev Immunol* 29 (4):275-305.
- [261] S Bas, L Neff, M Vuillet, U Spenato, T Seya, M Matsumoto, C Gabay (2008) The proinflammatory cytokine response to *Chlamydia trachomatis* elementary bodies in human macrophages is partly mediated by a lipoprotein, the macrophage infectivity potentiator, through TLR2/TLR1/TLR6 and CD14. *J Immunol* 180 (2):1158-1168.
- [262] AN Yilma, SR Singh, SJ Fairley, MA Taha, VA Dennis (2012) The anti-inflammatory cytokine, interleukin-10, inhibits inflammatory mediators in human epithelial cells and mouse macrophages exposed to live and UV-inactivated *Chlamydia trachomatis*. *Mediators Inflamm* 2012:520174.
- [263] S Vasilevsky, G Greub, D Nardelli-Haeffliger, D Baud (2014) Genital *Chlamydia trachomatis*: understanding the roles of innate and adaptive immunity in vaccine research. *Clin Microbiol Rev* 27 (2):346-370.
- [264] VL Crotzer, JS Blum (2009) Autophagy and its role in MHC-mediated antigen presentation. *J Immunol* 182 (6):3335-3341.
- [265] MC Jendro, T Deutsch, B Korber, L Kohler, JG Kuipers, B Krausse-Opatz, J Westermann, E Raum, H Zeidler (2000) Infection of human monocyte-derived macrophages with *Chlamydia trachomatis* induces apoptosis of T cells: a potential mechanism for persistent infection. *Infect Immun* 68 (12):6704-6711.
- [266] MC Jendro, F Fingerle, T Deutsch, A Liese, L Kohler, JG Kuipers, E Raum, M Martin, H Zeidler (2004) *Chlamydia trachomatis*-infected macrophages induce apoptosis of activated T cells by secretion of tumor necrosis factor- $\alpha$  in vitro. *Med Microbiol Immunol* 193 (1):45-52.

- [267] H Shegarfi, K Sydnnes, M Lovik, M Inngjerdingen, B Rolstad, C Naper (2009) The role of natural killer cells in resistance to the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes* in rats. *Scandinavian J Immunol* 70 (3):238-244.
- [268] M Cheng, Y Chen, W Xiao, R Sun, Z Tian (2013) NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cell Mol Immunol* 10 (3):230-252.
- [269] L Zhao, X Gao, Y Peng, AG Joyee, H Bai, S Wang, J Yang, W Zhao, X Yang (2011) Differential modulating effect of natural killer (NK) T cells on interferon-gamma production and cytotoxic function of NK cells and its relationship with NK subsets in *Chlamydia muridarum* infection. *Immunol* 134 (2):172-184.
- [270] H Wang, L Zhao, Y Peng, J Liu, M Qi, Q Chen, X Yang, W Zhao (2012) Protective role of alpha-galactosylceramide-stimulated natural killer T cells in genital tract infection with *Chlamydia muridarum*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 65 (1):43-54.
- [271] L Bilenki, S Wang, J Yang, Y Fan, AG Joyee, X Yang (2005) NK T cell activation promotes *Chlamydia trachomatis* infection in vivo. *J Immunol* 175 (5):3197-3206.
- [272] EY Bragina, MA Gomberg, GA Dmitriev (2001) Electron microscopic evidence of persistent chlamydial infection following treatment. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 15 (5):405-409.
- [273] A Kokab, R Jennings, A Eley, AA Pacey, NA Cross (2010) Analysis of modulated gene expression in a model of Interferon-gamma-induced persistence of *Chlamydia trachomatis* in HEp-2 cells. *Microb Pathog* 49 (5):217-225.
- [274] RK Benwell, DR Lee (2010) Essential and synergistic roles of IL1 and IL6 in human Th17 differentiation directed by TLR ligand-activated dendritic cells. *Clin Immunol* 134 (2):178-187.
- [275] CP O'Meara, CW Armitage, MC Harvie, DW Andrew, P Timms, NY Lycke, KW Beagley (2014) Immunity against a *Chlamydia* infection and disease may be determined by a balance of IL-17 signaling. *Immunol Cell Biol* 92 (3):287-297.
- [276] SG Morrison, H Su, HD Caldwell, RP Morrison (2000) Immunity to murine *Chlamydia trachomatis* genital tract reinfection involves B cells and CD4(+) T cells but not CD8(+) T cells. *Infect Immun* 68 (12):6979-6987.
- [277] WP Loomis, MN Starnbach (2002) T cell responses to *Chlamydia trachomatis*. *Curr Opin Microbiol* 5 (1):87-91.

- [278] JL Cocchiario, Y Kumar, ER Fischer, T Hackstadt, RH Valdivia (2008) Cytoplasmic lipid droplets are translocated into the lumen of the *Chlamydia trachomatis* parasitophorous vacuole. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (27):9379-9384.
- [279] DC Gondek, NR Roan, MN Starnbach (2009) T cell responses in the absence of IFN-gamma exacerbate uterine infection with *Chlamydia trachomatis*. *J Immunol* 183 (2):1313-1319.
- [280] RA Hawkins, RG Rank, KA Kelly (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.
- [281] T Agrawal, V Vats, S Salhan, A Mittal (2009) Determination of chlamydial load and immune parameters in asymptomatic, symptomatic and infertile women. *FEMS Immunol Med Microbiol* 55 (2):250-257.
- [282] RD Vicetti Miguel, SA Harvey, WA LaFramboise, SD Reighard, DB Matthews, TL Chernes (2013) Human female genital tract infection by the obligate intracellular bacterium *Chlamydia trachomatis* elicits robust Type 2 immunity. *PloS One* 8 (3):e58565.
- [283] SG Morrison, RP Morrison (2005) A predominant role for antibody in acquired immunity to chlamydial genital tract reinfection. *J Immunol* 175 (11):7536-7542.
- [284] CV Nogueira, X Zhang, N Giovannone, EL Sennott, MN Starnbach (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.
- [285] S Manam, BJ Nicholson, AK Murthy (2013) OT-1 mice display minimal upper genital tract pathology following primary intravaginal *Chlamydia muridarum* infection. *Pathog Dis* 67 (3):221-224.
- [286] KR Vlcek, W Li, S Manam, B Zanotti, BJ Nicholson, KH Ramsey, AK Murthy (2016) The contribution of *Chlamydia*-specific CD8(+) T cells to upper genital tract pathology. *Immunol Cell Biol* 94 (2):208-212.
- [287] C Tan, RC Hsia, H Shou, CL Haggerty, RB Ness, CA Gaydos, D Dean, AM Scurlock, DP Wilson, PM Bavoil (2009) *Chlamydia trachomatis*-infected patients display variable antibody profiles against the nine-member polymorphic membrane protein family. *Infect Immun* 77 (8):3218-3226.
- [288] P Joki-Korpela, N Sahrakorpi, M Halttunen, HM Surcel, J Paavonen, A Tiitinen (2009) The role of *Chlamydia trachomatis* infection in male infertility. *Fertil Steril* 91 (4):1448-1450.

- [289] T Agrawal, V Vats, S Salhan, A Mittal (2007) Mucosal and peripheral immune responses to chlamydial heat shock proteins in women infected with *Chlamydia trachomatis*. *Clin Exp Immunol* 148 (3):461-468.
- [290] JU Igietseme, FO Eko, Q He, CM Black (2004) Antibody regulation of Tcell immunity: implications for vaccine strategies against intracellular pathogens. *Expert Rev Vaccines* 3 (1):23-34.
- [291] J Barenfanger, AB MacDonald (1974) The role of immunoglobulin in the neutralization of trachoma infectivity. *J Immunol* 113 (5):1607-1617.
- [292] AK Murthy, BK Chaganty, W Li, MN Guentzel, JP Chambers, J Seshu, G Zhong, BP Arulanandam (2009) A limited role for antibody in protective immunity induced by rCPAF and CpG vaccination against primary genital *Chlamydia muridarum* challenge. *FEMS Immunol Med Microbiol* 55 (2):271-279.
- [293] P Srivastava, R Jha, S Bas, S Salhan, A Mittal (2008) In infertile women, cells from *Chlamydia trachomatis* infected sites release higher levels of interferon-gamma, interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha upon heat-shock-protein stimulation than fertile women. *Reprod Biol Endocrinol* 6:20.
- [294] P Kokkayil, B Dhawan (2015) Ureaplasma: current perspectives. *Indian J Med Microbiol* 33 (2):205-214.
- [295] S Razin (2006) The Genus *Mycoplasma* and Related Genera (Class Mollicutes). *The Prokaryotes*. Ed. M Dworkin, S Falkow, E Rosenberg, KH Schleifer, E Stackebrandt. Springer, p. 836-904.
- [296] W Krause (2008) Male accessory gland infection. *Andrologia* 40 (2):113-116.
- [297] C Zotta, D Gómez, S Lavayén, MG Galeano (2013) Sexually-transmitted infections in *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis*. *Salud y Ciencia* 20:37-40.
- [298] X Guo, Z Ye, R Deng (2004) Male urogenital tract mycoplasma infection and drug-resistance evolution. *Natl J Androl* 10 (2):122-124.
- [299] CRG C Ramírez Isarraraz , Menocal , OIF Tobías G, Ahued Ahued R (2004) Prevalencia de la infección cervico vaginal por *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* en pacientes ginecológicas del Instituto Nacional de Perinatología. *Enf Inf Microbiol* 24 (1).

- [300] F Djigma, C Ouedraogo, T Sagna, D Ouermi, K Sanogo, C Bisseye, A Kabre, V Pietra, J Simpire, JB Nikiema, S Musumeci (2011) HIV-infected women of Burkina Faso: a "reservoir" of mycoplasma infection. *J Infect Dev Ctries* 5 (3):176-181.
- [301] J Atashili, C Poole, PM Ndumbe, AA Adimora, JS Smith (2008) Bacterial vaginosis and HIV acquisition: a meta-analysis of published studies. *AIDS* 22 (12):1493-1501.
- [302] RM Brotman, MA Klebanoff, TR Nansel, KF Yu, WW Andrews, J Zhang, JR Schwebke (2010) Bacterial vaginosis assessed by gram stain and diminished colonization resistance to incident gonococcal, chlamydial, and trichomonal genital infection. *J Infect Dis* 202 (12):1907-1915.
- [303] Y Aydin, A Atis, F Ocer, R Isenkul (2010) Association of cervical infection of Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis with peritoneum colonisation in pregnancy. *J Obstet Gynaecol* 30 (8):809-812.
- [304] BD Taylor, T Darville, CL Haggerty (2013) Does bacterial vaginosis cause pelvic inflammatory disease? *Sex Transm Dis* 40 (2):117-122.
- [305] GB Campos, TN Lobao, NN Selis, AT Amorim, HB Martins, MS Barbosa, TH Oliveira, DB dos Santos, TB Figueiredo, L Miranda Marques, J Timenetsky (2015) Prevalence of Mycoplasma genitalium and Mycoplasma hominis in urogenital tract of Brazilian women. *BMC Infect Dis* 15:60.
- [306] C Huang, X Long, S Jing, L Fan, K Xu, S Wang, W Zhu (2016) Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis infections and semen quality in 19,098 infertile men in China. *World J Urol* 34 (7):1039-1044.
- [307] JM Potts, R Sharma, F Pasqualotto, D Nelson, G Hall, A Agarwal (2000) Association of ureaplasma urealyticum with abnormal reactive oxygen species levels and absence of leukocytospermia. *J Urol* 163 (6):1775-1778.
- [308] K Scott, M Manunta, C Germain, P Smith, M Jones, P Mitchell, D Dessi, K Branigan Bamford, RI Lechler, PL Fiori, GR Foster, G Lombardi (2005) Qualitatively distinct patterns of cytokines are released by human dendritic cells in response to different pathogens. *Immunol* 116 (2):245-254.
- [309] ME Truchetet, L Beven, H Renaudin, I Douchet, C Ferandon, A Charron, P Blanco, T Schaefferbeke, C Contin-Bordes, C Bebear (2011) Potential role of Mycoplasma hominis in

interleukin (IL)-17-producing CD4+ T-cell generation via induction of IL-23 secretion by human dendritic cells. *J Infect Dis* 204 (11):1796-1805.

[310] J Goret, L Beven, B Faustin, C Contin-Bordes, C Le Roy, S Claverol, H Renaudin, C Bebear, S Pereyre (2017) Interaction of *Mycoplasma hominis* PG21 with Human Dendritic Cells: Interleukin-23-Inducing Mycoplasmal Lipoproteins and Inflammasome Activation of the Cell. *J Bacteriol* 199 (15).

[311] KS Wise (1993) Adaptive surface variation in mycoplasmas. *Trends Microbiol* 1 (2):59-63.

[312] JI Glass, EJ Lefkowitz, JS Glass, CR Heiner, EY Chen, GH Cassell (2000) The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum*. *Nature* 407 (6805):757-762.

[313] GY Ye, KY Wang, QD Gui, M Wang (2018) *Ureaplasma urealyticum*-derived lipid-associated membrane proteins introduce IL-6, IL-8, and TNF-alpha cytokines into human amniotic epithelial cells via Toll-like receptor 2. *J Zhejiang Univ Sci* 19 (8):654-661.

[314] KB Waites, B Katz, RL Schelonka (2005) Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clin Microbiol Rev* 18 (4):757-789.

[315] T Volgmann, R Ohlinger, B Panzig (2005) *Ureaplasma urealyticum*-harmless commensal or underestimated enemy of human reproduction? A review. *Arch Gynecol Obstet* 273 (3):133-139.

[316] B Hunjak, I Sabol, G Vojnovic, I Fistic, AB Erceg, Z Persic, M Grce (2014) *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* in women of reproductive age. *Arch Gynecol Obstet* 289 (2):407-412.

[317] RL Schelonka, KB Waites (2007) *Ureaplasma* infection and neonatal lung disease. *Semin Perinatol* 31 (1):2-9.

[318] F Namba, T Hasegawa, M Nakayama, T Hamanaka, T Yamashita, K Nakahira, A Kimoto, M Nozaki, M Nishihara, K Mimura, M Yamada, H Kitajima, N Suehara, I Yanagihara (2010) Placental features of chorioamnionitis colonized with *Ureaplasma* species in preterm delivery. *Pediatr Res* 67 (2):166-172.

[319] A Gupta, A Gupta, S Gupta, A Mittal, P Chandra, AK Gill (2009) Correlation of mycoplasma with unexplained infertility. *Arch Gynecol Obstet* 280 (6):981-985.

[320] B Dhawan, N Malhotra, V Sreenivas, J Rawre, N Khanna, R Chaudhry, S Mittal (2012) *Ureaplasma* serovars & their antimicrobial susceptibility in patients of infertility & genital tract infections. *Indian J Med Res* 136 (6):991-996.

- [321] D Taylor-Robinson (1996) Infections due to species of *Mycoplasma* and *Ureaplasma*: an update. *Clin Infect Dis* 23 (4):671-682; quiz 683-674.
- [322] Z Chang-tai, H Zhong-yi, D Chun-lei, Z Chang-song, W Mei-zhen, L Yang (2011) Investigation of *Ureaplasma urealyticum* biovars and their relationship with antimicrobial resistance. *Indian J Med Microbiol* 29 (3):288-292.
- [323] X Zhu, M Li, H Cao, X Yang, C Zhang (2016) Epidemiology of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in the semen of male outpatients with reproductive disorders. *Exp Ther Med* 12 (2):1165-1170.
- [324] RB Kundsinn, SG Driscoll, PL Ming (1967) Strain of mycoplasma associated with human reproductive failure. *Science* 157 (3796):1573-1574.
- [325] A Uuskula, PK Kohl (2002) Genital mycoplasmas, including *Mycoplasma genitalium*, as sexually transmitted agents. *Int J STD AIDS* 13 (2):79-85.
- [326] J Friberg, H Gnarpe (1974) Mycoplasmas in semen from fertile and infertile men. *Andrologia* 6 (1):45-52.
- [327] CL Knox, JA Allan, JM Allan, WR Edirisinghe, D Stenzel, FA Lawrence, DM Purdie, P Timms (2003) *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* are detected in semen after washing before assisted reproductive technology procedures. *Fertil Steril* 80 (4):921-929.
- [328] Y Heng Zhou, H Xia Ma, X Xing Shi, Y Liu (2017), *Ureaplasma spp. in male infertility and its relationship with semen quality and seminal plasma components*. *J Microbiol Immunol Infect* 51(6):778-783
- [329] S Dieterle (2008) Urogenital infections in reproductive medicine. *Andrologia* 40 (2):117-119.
- [330] D Sanocka-Maciejewska, M Ciupinska, M Kurpisz (2005) Bacterial infection and semen quality. *J Reprod Immunol* 67 (1-2):51-56.
- [331] FM Meseguer, P Caballero (1990) *Recent advances in mycoplasmaology*. Ed: Gerold Stanek. Stuttgart, G. Fischer p. 1-962.
- [332] H Zeighami, SN Peerayeh, RS Yazdi, R Sorouri (2009) Prevalence of *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* in semen of infertile and healthy men. *Int J STD AIDS* 20 (6):387-390.

- [333] Y Soffer, R Ron-El, A Golan, A Herman, E Caspi, Z Samra (1990) Male genital mycoplasmas and Chlamydia trachomatis culture: its relationship with accessory gland function, sperm quality, and autoimmunity. *Fertil Steril* 53 (2):331-336.
- [334] Q Zhang, Y Xiao, W Zhuang, B Cheng, L Zheng, Y Cai, H Zhou, Q Wang (2014) Effects of biovar I and biovar II of ureaplasma urealyticum on sperm parameters, lipid peroxidation, and deoxyribonucleic acid damage in male infertility. *Urology* 84 (1):87-92.
- [335] K Glaser, CP Speer (2015) Neonatal CNS infection and inflammation caused by Ureaplasma species: rare or relevant? *Exp Rev Anti Infect Ther* 13 (2):233-248.
- [336] GGG Donders, K Ruban, G Bellen, L Petricevic (2017) Mycoplasma/Ureaplasma infection in pregnancy: to screen or not to screen. *J Perinat Med* 45 (5):505-515.
- [337] EL Sweeney, SJ Dando (2017) The Human Ureaplasma Species as Causative Agents of Chorioamnionitis. *Clin Microbiol Rev* 30 (1):349-379.
- [338] E Normann, T Lacaze-Masmonteil, F Eaton, L Schwendimann, P Gressens, B Thebaud (2009) A novel mouse model of Ureaplasma-induced perinatal inflammation: effects on lung and brain injury. *Pediat Res* 65 (4):430-436.
- [339] M von Chamier, A Allam, MB Brown, MK Reinhard, L Reyes (2012) Host genetic background impacts disease outcome during intrauterine infection with Ureaplasma parvum. *PLoS One* 7 (8):e44047.
- [340] P SenthamaraiKannan, P Presicce, CM Rueda, G Maneenil, AF Schmidt, LA Miller, KB Waites, AH Jobe, SG Kallapur, CA Chougnet (2016) Intra-amniotic Ureaplasma parvum-Induced Maternal and Fetal Inflammation and Immune Responses in Rhesus Macaques. *J Infect Dis* 214 (10):1597-1604.
- [341] G Arango Duque, A Descoteaux (2014) Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol* 5:491.
- [342] DJ Dowling, O Levy (2014) Ontogeny of early life immunity. *Trends Immunol* 35 (7):299-310.
- [343] K Glaser, C Silwedel, M Fehrholz, AM Waaga-Gasser, B Henrich, H Claus, CP Speer (2017) Ureaplasma Species Differentially Modulate Pro- and Anti-Inflammatory Cytokine Responses in Newborn and Adult Human Monocytes Pushing the State Toward Pro-Inflammation. *Front Cell Infect Microbiol* 7:484.

- [344] WM Manimtim, JD Hasday, L Hester, KD Fairchild, JC Lovchik, RM Viscardi (2001) *Ureaplasma urealyticum* modulates endotoxin-induced cytokine release by human monocytes derived from preterm and term newborns and adults. *Infect Immun* 69 (6):3906-3915.
- [345] YH Li, A Brauner, B Jonsson, I van der Ploeg, O Soder, M Holst, JS Jensen, H Lagercrantz, K Tullus (2000) *Ureaplasma urealyticum*-induced production of proinflammatory cytokines by macrophages. *Pediatr Res* 48 (1):114-119.
- [346] J Shi, Z Yang, M Wang, G Cheng, D Li, Y Wang, Y Zhou, X Liu, C Xu (2007) Screening of an antigen target for immunocontraceptives from cross-reactive antigens between human sperm and *Ureaplasma urealyticum*. *Infect Immun* 75 (4):2004-2011.
- [347] X-W Cao, K Lin, C-Y Li, C-W Yuan (2011) *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen*. <https://www.who.int/reproductivehealth/publications/infertility/9789241547789/en/> Accessed 2018.
- [348] LC de Brito, FR Teles, RP Teles, PM Nogueira, LQ Vieira, AP Ribeiro Sobrinho (2015) Immunological profile of periapical endodontic infections from HIV- and HIV+ patients. *Int Endod J* 48 (6):533-541.
- [349] P Berger, PO Girodet, H Begueret, O Ousova, DW Perng, R Marthan, AF Walls, JM Tunon de Lara (2003) Tryptase-stimulated human airway smooth muscle cells induce cytokine synthesis and mast cell chemotaxis. *FASEB J* 17 (14):2139-2141.
- [350] SH Cho, SY Park, EJ Lee, YH Cho, HS Park, SH Hong, WJ Kim (2015) Regulation of CYP1A1 and Inflammatory Cytokine by NCOA7 Isoform 4 in Response to Dioxin Induced Airway Inflammation. *Tuberc Respir Dis* 78 (2):99-105.
- [351] P Stordeur, LF Poulin, L Craciun, L Zhou, L Schandene, A de Lavareille, S Goriely, M Goldman (2002) Cytokine mRNA quantification by real-time PCR. *J Immunol Methods* 259 (1-2):55-64.
- [352] K Chao, S Zhang, J Yao, Y He, B Chen, Z Zeng, B Zhong, M Chen (2014) Imbalances of CD4(+) T-cell subgroups in Crohn's disease and their relationship with disease activity and prognosis. *J Gastroenterol Hepatol* 29 (10):1808-1814.
- [353] US National Library of Medicine *Blast-n*. [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=MegaBlast&PROGRAM=blastn&BLAST\\_PROGR](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=MegaBlast&PROGRAM=blastn&BLAST_PROGR)

AMS=megaBlast&PAGE\_TYPE=BlastSearch&BLAST\_SPEC=blast2seq&DATABASE=n/a&QUERY=&SUBJECTS= Accessed 2017

[354] MW Pfaffl (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29 (9):e45.

[355] J Zhang, SH Snyder (1992) Nitric oxide stimulates auto-ADP-ribosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (20):9382-9385.

[356] P Bhatia, WR Taylor, AH Greenberg, JA Wright (1994) Comparison of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 28S-ribosomal RNA gene expression as RNA loading controls for northern blot analysis of cell lines of varying malignant potential. *Anal Biochem* 216 (1):223-226.

[357] J Bereta, M Bereta (1995) Stimulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA levels by endogenous nitric oxide in cytokine-activated endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 217 (1):363-369.

[358] TJ Chang, CC Juan, PH Yin, CW Chi, HJ Tsay (1998) Up-regulation of beta-actin, cyclophilin and GAPDH in N1S1 rat hepatoma. *Oncol Rep* 5 (2):469-471.

[359] O Thellin, W Zorzi, B Lakaye, B De Borman, B Coumans, G Hennen, T Grisar, A Igout, E Heinen (1999) Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 75 (2-3):291-295.

[360] CL Andersen, JL Jensen, TF Orntoft (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64 (15):5245-5250.

[361] KJ Livak, TD Schmittgen (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25 (4):402-408.

[362] H Motulsky (1989) Graphpad *Prism*. [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com) Accessed 2015.

[363] J Di Rienzo, F Casanoves, M Balzarini, L Gonzalez, M Tablada, C Robledo (2012) *Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina*. <http://www.infostat.com.ar> Accessed 2018.

[364] LB Fernandes, JT Arruda, MS Approbato, MT Garcia-Zapata (2014) Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae infection: factors associated with infertility in women treated at a human reproduction public service. *Rev Bras Ginecol Obstet* 36 (8):353-358.

- [365] OMS (2016) *Estrategia Mundial del Sector de la Salud contra las Infecciones de Transmisión Sexual, 2016-2021. Hacia el fin de las IST*. <https://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/ghss-stis/es/> Accessed 2018.
- [366] JA Land, JE Van Bergen, SA Morre, MJ Postma (2010) Epidemiology of Chlamydia trachomatis infection in women and the cost-effectiveness of screening. *Hum Reprod Update* 16 (2):189-204.
- [367] MA Guven, U Dilek, O Pata, S Dilek, P Ciragil (2007) Prevalance of Chlamydia trochomatis, Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis infections in the unexplained infertile women. *Arch Gynecol Obstet* 276 (3):219-223.
- [368] AN Imudia, L Detti, EE Puscheck, FD Yelian, MP Diamond (2008) The prevalence of ureaplasma urealyticum, mycoplasma hominis, chlamydia trachomatis and neisseria gonorrhoeae infections, and the rubella status of patients undergoing an initial infertility evaluation. *J Assist Reprod Genet* 25 (1):43-46.
- [369] A Tomusiak, PB Heczko, J Janeczko, P Adamski, M Pilarczyk-Zurek, M Strus (2013) Bacterial infections of the lower genital tract in fertile and infertile women from the southeastern Poland. *Ginekol Polska* 84 (5):352-358.
- [370] M Seifoleslami, A Safari, M Khayyat Khameneie (2015) Prevalence of Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis in High Vaginal Swab Samples of Infertile Females. *Iranian Red Crescent Med J* 17 (12):e16823.
- [371] XP Ma, XQ Gao (2017) The effect of Ureaplasma urealyticum on the level of P34H expression, the activity of hyaluronidase, and DNA fragmentation in human spermatozoa. *Am J Reprod Immunol* 77 (1).
- [372] L Zhang, KP Zhang, CZ Liang (2016) Ureaplasma urealyticum in male genital tract: a hidden risk factor for male infertility. *Andrologia* 48 (10):1077-1079.
- [373] F Milanezi, A Falconi, B Schnabel, L R. Ricardi, P M. Monfredini, A T. Ziliotto, V F. Lopes, S A. Machado, M J. Oliveira, C C. Centrone, V Nakano (2016) Prevalence of Mycoplasma hominis and Ureaplasma spp. in Routine Gynecological Care in Sao Paulo City, Brazil. *Arch Clin Infect Dis*. 11(3):e36668.
- [374] MH Ahmadi, A Mirsalehian, A Bahador (2016) Prevalence of Urogenital Mycoplasmas in Iran and Their Effects on Fertility Potential: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Iranian J Public Health* 45 (4):409-422.

- [375] S Saito, A Nakashima, T Shima, M Ito (2010) Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 63 (6):601-610.
- [376] JE Allen, RM Maizels (1997) Th1-Th2: reliable paradigm or dangerous dogma? *Immunol Today* 18 (8):387-392.
- [377] ME Ward (1999) Chapter 7 Mechanisms of chlamydia-induced disease. *Chlamydia: intracellular biology, pathogenesis, and immunity*. Ed. RS Stephens. American Society for Microbiology, Washington, p. 171-181.
- [378] KK Ryckman, SM Williams, J Kalinka (2008) Correlations of selected vaginal cytokine levels with pregnancy-related traits in women with bacterial vaginosis and mycoplasmas. *J Reprod Immunol* 78 (2):172-180.
- [379] BS Reddy, S Rastogi, B Das, S Salhan, S Verma, A Mittal (2004) Cytokine expression pattern in the genital tract of Chlamydia trachomatis positive infertile women: implication for T-cell responses. *Clin Exp Immunol* 137 (3):552-558.
- [380] R Raghupathy (2013) Cytokines as key players in the pathophysiology of preeclampsia. *Med Princ Pract* 22 (1):8-19.
- [381] P Conti, D Kempuraj, K Kandere, M Di Gioacchino, RC Barbacane, ML Castellani, M Felaco, W Boucher, R Letourneau, TC Theoharides (2003) IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always. *Immunol Lett* 86 (2):123-129.
- [382] O Sarkar, J Bahrainwala, S Chandrasekaran, S Kothari, PP Mathur, A Agarwal (2011) Impact of inflammation on male fertility. *Front Biosci* 3:89-95.
- [383] GX Zhu, C Lu, CJ Chen, PY Feng, H Ma, RB Lu, YL Yuan (2011) Pathogenicity of Ureaplasma urealyticum and Ureaplasma parvum in the lower genital tract of female BALB/c mice. *Can J Microbiol* 57 (12):987-992.
- [384] LW Cheng LP, Chen GJ, Zhu YF Chin (1996) The effect of Ureaplasma urealyticum on the production of IFN-gamma by mouse T lymphocyte. *J Androl* 10:65-67.
- [385] CG Li WY, Cheng LP, Zhu YF, Xu Chen, Wang YF (1996) The effect of Ureaplasma urealyticum on the production of TNF-a by mouse macrophage. *Reprod Contracept* 16:55-58.
- [386] Y Wang, ZW Wu, LF Zhang, XK Wu, L Yi, X Han (2010) Effects of Ureaplasma urealyticum infection on the male reproductive system in experimental rats. *Andrologia* 42 (5):297-301.

- [387] BG Bachir, K Jarvi (2014) Infectious, inflammatory, and immunologic conditions resulting in male infertility. *Urol Clin North Am* 41 (1):67-81.
- [388] RM Viscardi, J Kaplan, JC Lovchik, JR He, L Hester, S Rao, JD Hasday (2002) Characterization of a murine model of *Ureaplasma urealyticum* pneumonia. *Infect Immun* 70 (10):5721-5729.
- [389] RM Viscardi, WM Manimtim, CC Sun, L Duffy, GH Cassell (2002) Lung pathology in premature infants with *Ureaplasma urealyticum* infection. *Pediatric Dev Pathol* 5 (2):141-150.
- [390] G Chaouat, E Menu, DA Clark, M Dy, M Minkowski, TG Wegmann (1990) Control of fetal survival in CBA x DBA/2 mice by lymphokine therapy. *J Reprod Fertil* 89 (2):447-458.
- [391] J Yui, M Garcia-Lloret, TG Wegmann, LJ Guilbert (1994) Cytotoxicity of tumour necrosis factor-alpha and gamma-interferon against primary human placental trophoblasts. *Placenta* 15 (8):819-835.
- [392] M Makhseed, R Raghupathy, S El-Shazly, F Azizieh, JA Al-Harmi, MM Al-Azemi (2003) Pro-inflammatory maternal cytokine profile in preterm delivery. *Am J Reprodu Immunol* 49 (5):308-318.
- [393] L Sykes, DA MacIntyre, XJ Yap, TG Teoh, PR Bennett (2012) The Th1:th2 dichotomy of pregnancy and preterm labour. *Mediators Inflamm* 2012:967629.
- [394] R Raghupathy, M Makhseed, S El-Shazly, F Azizieh, R Farhat, L Ashkanani (2001) Cytokine patterns in maternal blood after premature rupture of membranes. *Obstet Gynecol* 98 (1):122-126.
- [395] Y Belkaid (2007) Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol* 7 (11):875-888.
- [396] B Refaat, A Ashshi, S Abdullah Batwa, J Ahmad, S Idris, S Yahia Kutbi, F Ahmed Malibary, F Fayez Kamfar (2016) The prevalence of *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma genitalium* tubal infections and their effects on the expression of interleukin-6 and leukaemia inhibitory factor in Fallopian tubes with and without an ectopic pregnancy. *Innate Immun* 22(7):534-45.
- [397] T Agrawal, V Vats, PK Wallace, S Salhan, A Mittal (2008) Role of cervical dendritic cell subsets, co-stimulatory molecules, cytokine secretion profile and beta-estradiol in development of sequelae to *Chlamydia trachomatis* infection. *Reprod Biol Endocrinol* 6:46.

- [398] P Prasad, N Singh, B Das, S Raisuddin, M Dudeja, S Rastogi (2017) Differential expression of circulating Th1/ Th2/ Th17 cytokines in serum of Chlamydia trachomatis-infected women undergoing incomplete spontaneous abortion. *Microb Pathog* 110:152-158.
- [399] Y Hattori, T Nakanishi, Y Ozaki, K Nozawa, T Sato, M Sugiura-Ogasawara (2007) Uterine cervical inflammatory cytokines, interleukin-6 and -8, as predictors of miscarriage in recurrent cases. *Am J Reprod Immunol* 58 (4):350-357.
- [400] B Fu, Z Tian, H Wei (2014) TH17 cells in human recurrent pregnancy loss and pre-eclampsia. *Cell Mol Immunol* 11 (6):564-570.
- [401] AK Murthy, J Sharma, JJ Coalson, G Zhong, BP Arulanandam (2004) Chlamydia trachomatis pulmonary infection induces greater inflammatory pathology in immunoglobulin A deficient mice. *Cell Immunol* 230 (1):56-64.
- [402] P Mpiga, S Mansour, R Morisset, R Beaulieu, M Ravaoarino (2006) Sustained interleukin-6 and interleukin-8 expression following infection with Chlamydia trachomatis serovar L2 in a HeLa/THP-1 cell co-culture model. *Scandinavian J Immunol* 63 (3):199-207.
- [403] SJ Szabo, ST Kim, GL Costa, X Zhang, CG Fathman, LH Glimcher (2000) A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100 (6):655-669.
- [404] SY Pai, ML Truitt, IC Ho (2004) GATA-3 deficiency abrogates the development and maintenance of T helper type 2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (7):1993-1998.
- [405] JD Fontenot, JP Rasmussen, LM Williams, JL Dooley, AG Farr, AY Rudensky (2005) Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 22 (3):329-341.
- [406] XO Yang, BP Pappu, R Nurieva, A Akimzhanov, HS Kang, Y Chung, L Ma, B Shah, AD Panopoulos, KS Schluns, SS Watowich, Q Tian, AM Jetten, C Dong (2008) T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity* 28 (1):29-39.
- [407] LR Guerin, JR Prins, SA Robertson (2009) Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment? *Hum Reprod Update* 15 (5):517-535.
- [408] J Zhu, WE Paul (2008) CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112 (5):1557-1569.

- [409] L Xu, A Kitani, I Fuss, W Strober (2007) Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J Immunol* 178 (11):6725-6729.
- [410] SG Zheng (2013) Regulatory T cells vs Th17: differentiation of Th17 versus Treg, are the mutually exclusive? *Am J Clin Exp Immunol* 2 (1):94-106.
- [411] L Zhou, JE Lopes, MMW Chong, II Ivanov, R Min, GD Victora, Y Shen, J Du, YP Rubtsov, AY Rudensky, SF Ziegler, DR Littman (2008) TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function. *Nature* 453 (7192):236-240.
- [412] SF Ziegler, JH Buckner (2009) FOXP3 and the regulation of Treg/Th17 differentiation. *Microb Infect* 11 (5):594-598.
- [413] T Agrawal, V Vats, S Salhan, A Mittal (2009) The mucosal immune response to Chlamydia trachomatis infection of the reproductive tract in women. *J Reprod Immunol* 83 (1-2):173-178.
- [414] S Seshadri, M Bates, G Vince, DI Jones (2009) The role of cytokine expression in different subgroups of subfertile men. *Am J Reprod Immunol* 62 (5):275-282.
- [415] F Lotti, M Maggi (2013) Interleukin 8 and the male genital tract. *J Reprod Immunol* 100 (1):54-65.
- [416] M Huleihel, E Lunenfeld, A Levy, G Potashnik, M Glezerman (1996) Distinct expression levels of cytokines and soluble cytokine receptors in seminal plasma of fertile and infertile men. *Fertil Steril* 66 (1):135-139.
- [417] MS Gruschwitz, R Brezinschek, HP Brezinschek (1996) Cytokine levels in the seminal plasma of infertile males. *J Androl* 17 (2):158-163.
- [418] Y Pannekoek, JW Trum, OP Bleker, F van der Veen, L Spanjaard, J Dankert (2000) Cytokine concentrations in seminal plasma from subfertile men are not indicative of the presence of Ureaplasma urealyticum or Mycoplasma hominis in the lower genital tract. *J Med Microbiol* 49 (8):697-700.
- [419] Z Kopa, J Wenzel, GK Papp, G Haidl (2005) Role of granulocyte elastase and interleukin-6 in the diagnosis of male genital tract inflammation. *Andrologia* 37 (5):188-194.

- [420] E Martinez-Prado, MI Camejo Bermudez (2010) Expression of IL-6, IL-8, TNF-alpha, IL-10, HSP-60, anti-HSP-60 antibodies, and anti-sperm antibodies, in semen of men with leukocytes and/or bacteria. *Am J Reprod Immunol* 63 (3):233-243.
- [421] L Dehghan Marvast, A Aflatoonian, AR Talebi, J Ghasemzadeh, AA Pacey (2016) Semen inflammatory markers and Chlamydia trachomatis infection in male partners of infertile couples. *Andrologia* 48 (7):729-736.
- [422] EA Wohlfert, JR Grainger, N Bouladoux, JE Konkell, G Oldenhove, CH Ribeiro, JA Hall, R Yagi, S Naik, R Bhairavabhotla, WE Paul, R Bosselut, G Wei, K Zhao, M Oukka, J Zhu, Y Belkaid (2011) GATA3 controls Foxp3(+) regulatory T cell fate during inflammation in mice. *J Clin Inv* 121 (11):4503-4515.
- [423] AC Nsonwu-Anyanwu, MA Charles-Davies, FA Bello, VO Taiwo, L Bin, AA Oni (2016) Cytokine profile in Nigerians with tubal infertility. *Central-European J Immunol* 41 (1):101-106.
- [424] B Duell, C Tan, A Carey, F Wu, A Cripps, G Ulett (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.
- [425] Y Omosun, D McKeithen, K Ryans, C Kibakaya, U Blas-Machado, D Li, R Singh, K Inoue, ZG Xiong, F Eko, C Black, J Igietseme, Q He (2015) Interleukin-10 modulates antigen presentation by dendritic cells through regulation of NLRP3 inflammasome assembly during Chlamydia infection. *Infect Immun* 83 (12):4662-4672.
- [426] MJ Holland, RL Bailey, DJ Conway, F Culley, G Miranpuri, GI Byrne, HC Whittle, DC Mabey (1996) T helper type-1 (Th1)/Th2 profiles of peripheral blood mononuclear cells (PBMC); responses to antigens of Chlamydia trachomatis in subjects with severe trachomatous scarring. *Clin Exp Immunol* 105 (3):429-435.
- [427] MT Mascellino, P Boccia, A Oliva (2011) Immunopathogenesis in Chlamydia trachomatis Infected Women. *Obstet Gynecol* 2011:436936.
- [428] The Human Protein Atlas *GATA3*. <https://www.proteinatlas.org/search/GATA3> Accessed 2017
- [429] J Debattista, P Timms, J Allan, J Allan (2003) Immunopathogenesis of chlamydia trachomatis infections in women. *Fertil Steril* 79 (6):1273-1287.
- [430] S Tchiokadze, G Galdava (2015) Clinical and anamnestic characteristics of development of antisperm immunity in infertile men. *Georgian Med News* (246):18-22.

- [431] LW Chamley, GN Clarke (2007) Antisperm antibodies and conception. *Semin Immunopathol* 29 (2):169-184.
- [432] F Francavilla, R Santucci, A Barbonetti, S Francavilla (2007) Naturally-occurring antisperm antibodies in men: interference with fertility and clinical implications. An update. *Front Biosci* 12:2890-2911.
- [433] SS Witkin (1996) Circulating antibodies to Chlamydia trachomatis in women: relationship to antisperm and antichlamydial antibodies in semen of male partners. *Hum Reprod* 11 (8):1635-1637.
- [434] D Dimitrova, S Kalaydjiev, L Hristov, K Nikolov, T Boyadjiev, L Nakov (2004) Antichlamydial and antisperm antibodies in patients with chlamydial infections. *Am J Reprod Immunol* 52 (5):330-336.
- [435] S Naaby-Hansen, JC Herr (2010) Heat shock proteins on the human sperm surface. *J Reprod Immunol* 84 (1):32-40.
- [436] P Giraldo, A Neuer, IL Korneeva, A Ribeiro-Filho, JA Simoes, SS Witkin (1999) Vaginal heat shock protein expression in symptom-free women with a history of recurrent vulvovaginitis. *Am J Obstet Gynecol* 180 (3 Pt 1):524-529.
- [437] E Padmini, V Uthra (2012) Role of Ureaplasma urealyticum in altering the endothelial metal concentration during preeclampsia. *Placenta* 33 (4):304-311.
- [438] DB Jones, AF Coulson, GW Duff (1993) Sequence homologies between hsp60 and autoantigens. *Immunol today* 14 (3):115-118.
- [439] G Wick, M Knoflach, Q Xu (2004) Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *Ann Rev Immunol* 22:361-403.
- [440] RC Brunham, R Peeling, I Maclean, ML Kosseim, M Paraskevas (1992) Chlamydia trachomatis-associated ectopic pregnancy: serologic and histologic correlates. *J Infect Dis* 165 (6):1076-1081.
- [441] B Toye, Laferri, xe, C re, P Claman, P Jessamine, R Peeling (1993) Association between Antibody to the Chlamydial Heat-Shock Protein and Tubal Infertility. *J Infect Dis* 168 (5):1236-1240.

- [442] SS Witkin, KM Sultan, GS Neal, J Jeremias, JA Grifo, Z Rosenwaks (1994) Unsuspected Chlamydia trachomatis infection and in vitro fertilization outcome. *Am J Obstet Gynecol* 171 (5):1208-1214.
- [443] MG Munoz, J Jeremias, SS Witkin (1996) The 60 kDa heat shock protein in human semen: relationship with antibodies to spermatozoa and Chlamydia trachomatis. *Hum Reprod* 11 (12):2600-2603.
- [444] D Miller, S Brough, O al-Harbi (1992) Characterization and cellular distribution of human spermatozoal heat shock proteins. *Hum Reprod* 7 (5):637-645.
- [445] T Diemer, P Huwe, HW Michelmann, F Mayer, HG Schiefer, W Weidner (2000) Escherichia coli-induced alterations of human spermatozoa. An electron microscopy analysis. *Int J Androl* 23 (3):178-186.
- [446] X Kang, Q Xie, X Zhou, F Li, J Huang, D Liu, T Huang (2012) Effects of hepatitis B virus S protein exposure on sperm membrane integrity and functions. *PloS One* 7 (3):e33471.
- [447] M Reichart, I Kahane, B Bartoov (2000) In vivo and in vitro impairment of human and ram sperm nuclear chromatin integrity by sexually transmitted Ureaplasma urealyticum infection. *Biol Reprod* 63 (4):1041-1048.
- [448] M Fraczek, A Szumala-Kakol, P Jedrzejczak, M Kamieniczna, M Kurpisz (2007) Bacteria trigger oxygen radical release and sperm lipid peroxidation in in vitro model of semen inflammation. *Fertil Steril* 88 (4):1076-1085.
- [449] S Bhushan, HC Schuppe, M Fijak, A Meinhardt (2009) Testicular infection: microorganisms, clinical implications and host-pathogen interaction. *J Reprod Immunol* 83 (1-2):164-167.
- [450] S La Vignera, E Vicari, RA Condorelli, R D'Agata, AE Calogero (2011) Male accessory gland infection and sperm parameters. *Int J Androl* 34 (5 Pt 2):e330-347.
- [451] T Domes, KC Lo, ED Grober, JB Mullen, T Mazzulli, K Jarvi (2012) The incidence and effect of bacteriospermia and elevated seminal leukocytes on semen parameters. *Fertil Steril* 97 (5):1050-1055.
- [452] M Maegawa, M Kamada, M Irahara, S Yamamoto, S Yoshikawa, Y Kasai, Y Ohmoto, H Gima, CJ Thaler, T Aono (2002) A repertoire of cytokines in human seminal plasma. *J Reprod Immunol* 54 (1-2):33-42.

- [453] D Sanocka, P Jedrzejczak, A Szumala-Kaekol, M Fraczek, M Kurpisz (2003) Male genital tract inflammation: The role of selected interleukins in regulation of pro-oxidant and antioxidant enzymatic substances in seminal plasma. *J Androl* 24 (3):448-455.
- [454] D Sanocka, M Fraczek, P Jedrzejczak, A Szumala-Kakol, M Kurpisz (2004) Male genital tract infection: an influence of leukocytes and bacteria on semen. *J Reprod Immunol* 62 (1-2):111-124.
- [455] Y Zhou, KA Mihindukulasuriya, H Gao, PS La Rosa, KM Wylie, JC Martin, K Kota, WD Shannon, M Mitreva, E Sodergren, GM Weinstock (2014) Exploration of bacterial community classes in major human habitats. *Genome Biol* 15 (5):R66.
- [456] S Dasari, SK Anandan, W Rajendra, L Valluru (2016) Role of microbial flora in female genital tract: A comprehensive review. *Asian Pac J Trop Dis* 6 (11):909-917.
- [457] DA Eschenbach (1993) History and review of bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 169 (2 Pt 2):441-445.
- [458] SL Hillier (1993) Diagnostic microbiology of bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 169 (2 Pt 2):455-459.
- [459] SD Spandorfer, A Neuer, PC Giraldo, Z Rosenwaks, SS Witkin (2001) Relationship of abnormal vaginal flora, proinflammatory cytokines and idiopathic infertility in women undergoing IVF. *J Reprod Med* 46 (9):806-810.
- [460] T Kurki, A Sivonen, OV Renkonen, E Savia, O Ylikorkala (1992) Bacterial vaginosis in early pregnancy and pregnancy outcome. *Obstet Gynecol* 80 (2):173-177.
- [461] SL Hillier, RP Nugent, DA Eschenbach, MA Krohn, RS Gibbs, DH Martin, MF Cotch, R Edelman, JG Pastorek, 2nd, AV Rao, et al. (1995) Association between bacterial vaginosis and preterm delivery of a low-birth-weight infant. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group. *N Engl J Med* 333 (26):1737-1742.
- [462] R Rodriguez, R Hernandez, F Fuster, A Torres, P Prieto, J Alberto (2001) Genital infection and infertility. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 19 (6):261-266.
- [463] P Andreeva, A Dimitrov (2002) The microorganisms associated with bacterial vaginosis as a cause of tubal sterility. *Akush Ginekol* 41 (4):35-39.
- [464] S Srinivasan, NG Hoffman, MT Morgan, FA Matsen, TL Fiedler, RW Hall, FJ Ross, CO McCoy, R Bumgarner, JM Marrazzo, DN Fredricks (2012) Bacterial communities in women with

bacterial vaginosis: high resolution phylogenetic analyses reveal relationships of microbiota to clinical criteria. *PloS One* 7 (6):e37818.

[465] D Hellberg, S Nilsson, PA Mardh (2001) The diagnosis of bacterial vaginosis and vaginal flora changes. *Arch Gynecol Obstet* 265 (1):11-15.

[466] TB Poston, T Darville (2018) Chlamydia trachomatis: Protective Adaptive Responses and Prospects for a Vaccine. *Curr Top Microbiol Immunol* 412:217-237.

[467] M Gencay, M Koskiniemi, P Saikku, M Puolakkainen, K Raivio, P Koskela, A Vaheri (1995) Chlamydia trachomatis seropositivity during pregnancy is associated with perinatal complications. *Clin Infect Dis* 21 (2):424-426.

[468] LR Buckner, AM Amedee, HL Albritton, PA Kozlowski, N Lacour, CL McGowin, DJ Schust, AJ Quayle (2016) Chlamydia trachomatis Infection of Endocervical Epithelial Cells Enhances Early HIV Transmission Events. *PloS One* 11 (1):e0146663.

[469] J Sexton, G Garnett, JA Rottingen (2005) Metaanalysis and metaregression in interpreting study variability in the impact of sexually transmitted diseases on susceptibility to HIV infection. *Sex Transm Dis* 32 (6):351-357.

[470] C Liu, Y Zhang, S Kong (2014) Applications and therapeutic actions of complementary and alternative medicine for women with genital infection. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014:658624.

[471] RG Rank, JA Whittum-Hudson (2010) Protective immunity to chlamydial genital infection: evidence from animal studies. *J Infect Dis* 201 (2):168-177.

[472] H Yu, KP Karunakaran, X Jiang, RC Brunham (2016) Subunit vaccines for the prevention of mucosal infection with Chlamydia trachomatis. *Exp Rev Vaccines* 15 (8):977-988.

[473] K Hybiske, RS Stephens (2007) Mechanisms of Chlamydia trachomatis entry into nonphagocytic cells. *Infect Immun* 75 (8):3925-3934.

[474] JL Cocchiaro, RH Valdivia (2009) New insights into Chlamydia intracellular survival mechanisms. *Cell Microbiol* 11 (11):1571-1578.

[475] JC Chen, RS Stephens (1997) Chlamydia trachomatis glycosaminoglycan-dependent and independent attachment to eukaryotic cells. *Microb Pathog* 22 (1):23-30.

[476] A Dautry-Varsat, A Subtil, T Hackstadt (2005) Recent insights into the mechanisms of Chlamydia entry. *Cell Microbiol* 7 (12):1714-1722.

- [477] S Abromaitis, RS Stephens (2009) Attachment and entry of Chlamydia have distinct requirements for host protein disulfide isomerase. *PLoS Pathog* 5 (4):e1000357.
- [478] B Su, M Karin (1996) Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Curr Opin Immunol* 8 (3):402-411.
- [479] K Molleken, E Schmidt, JH Hegemann (2010) Members of the Pmp protein family of Chlamydia pneumoniae mediate adhesion to human cells via short repetitive peptide motifs. *Mol Microbiol* 78 (4):1004-1017.
- [480] FD Menozzi, K Pethe, P Bifani, F Soncin, MJ Brennan, C Locht (2002) Enhanced bacterial virulence through exploitation of host glycosaminoglycans. *Mol Microbiol* 43 (6):1379-1386.
- [481] S Fadel, A Eley (2007) Chlamydia trachomatis OmcB protein is a surface-exposed glycosaminoglycan-dependent adhesin. *J Med Microbiol* 56 (Pt 1):15-22.
- [482] MT Damiani, J Gambarte Tudela, A Capmany (2014) Targeting eukaryotic Rab proteins: a smart strategy for chlamydial survival and replication. *Cell Microbiol* 16 (9):1329-1338.
- [483] J Gambarte Tudela, A Capmany, M Romao, C Quintero, S Miserey-Lenkei, G Raposo, B Goud, MT Damiani (2015) The late endocytic Rab39a GTPase regulates the interaction between multivesicular bodies and chlamydial inclusions. *J Cell Sci* 128 (16):3068-3081.
- [484] CM Farris, RP Morrison (2011) Vaccination against Chlamydia genital infection utilizing the murine *C. muridarum* model. *Infect Immun* 79 (3):986-996.
- [485] J Rey-Ladino, AG Ross, AW Cripps (2014) Immunity, immunopathology, and human vaccine development against sexually transmitted Chlamydia trachomatis. *Hum Vaccines Immunotherap* 10 (9):2664-2673.
- [486] DD Crane, JH Carlson, ER Fischer, P Bavoil, RC Hsia, C Tan, CC Kuo, HD Caldwell (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.
- [487] WM Huston, M Harvie, A Mittal, P Timms, KW Beagley (2012) Vaccination to protect against infection of the female reproductive tract. *Exp Rev Clin Immunol* 8 (1):81-94.
- [488] US National Library of Medicine (2016) *Chlamydia trachomatis* vaccine. *Safety of Chlamydia Vaccine CTH522 in Healthy Women Aged 18 to 45 Years*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02787109> Accessed 2018

- [489] S Pal, KM Barnhart, Q Wei, AM Abai, EM Peterson, LM de la Maza (1999) Vaccination of mice with DNA plasmids coding for the Chlamydia trachomatis major outer membrane protein elicits an immune response but fails to protect against a genital challenge. *Vaccine* 17 (5):459-465.
- [490] W Xu, J Liu, W Gong, J Chen, S Zhu, L Zhang (2011) Protective immunity against Chlamydia trachomatis genital infection induced by a vaccine based on the major outer membrane multi-epitope human papillomavirus major capsid protein L1. *Vaccine* 29 (15):2672-2678.
- [491] K Schautteet, E De Clercq, D Vanrompay (2011) Chlamydia trachomatis vaccine research through the years. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2011:963513.
- [492] MA Liu (2011) DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunol Rev* 239 (1):62-84.
- [493] US National Library of Medicine. *DNA vaccine*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=DNA+vaccine&term=&cntry=&state=&city=&dist=> Accessed 2018
- [494] J Aviles, A Bello, G Wong, H Fausther-Bovendo, X Qiu, G Kobinger (2015) Optimization of Prime-Boost Vaccination Strategies Against Mouse-Adapted Ebolavirus in a Short-Term Protection Study. *J Infect Dis* 212 (2):389-397.
- [495] K Radosevic, A Rodriguez, A Lemckert, J Goudsmit (2009) Heterologous prime-boost vaccinations for poverty-related diseases: advantages and future prospects. *Exp Rev Vaccines* 8 (5):577-592.
- [496] A Roldao, MC Mellado, LR Castilho, MJ Carrondo, PM Alves (2010) Virus-like particles in vaccine development. *Exp Rev Vaccines* 9 (10):1149-1176.
- [497] EM Plummer, M Manchester (2011) Viral nanoparticles and virus-like particles: platforms for contemporary vaccine design. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 3 (2):174-196.
- [498] N Kushnir, SJ Streatfield, V Yusibov (2012) Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine* 31 (1):58-83.
- [499] JF Correia-Pinto, N Csaba, MJ Alonso (2013) Vaccine delivery carriers: insights and future perspectives. *Int J Pharm* 440 (1):27-38.
- [500] ML Mbow, E De Gregorio, NM Valiante, R Rappuoli (2010) New adjuvants for human vaccines. *Curr Opin Immunol* 22 (3):411-416.

- [501] L Zhao, A Seth, N Wibowo, CX Zhao, N Mitter, C Yu, AP Middelberg (2014) Nanoparticle vaccines. *Vaccine* 32 (3):327-337.
- [502] E De Gregorio, E Caproni, JB Ulmer (2013) Vaccine adjuvants: mode of action. *Front Immunol* 4:214-214.
- [503] D O'Hagan (2007) New Generation Vaccine Adjuvants. *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd.
- [504] G Gregoriadis (1990) Immunological adjuvants: a role for liposomes. *Immunol Today* 11 (3):89-97.
- [505] L Leserman (2004) Liposomes as protein carriers in immunology. *J Liposome Res* 14 (3-4):175-189.
- [506] AM Krieg (2003) CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts? *Nat Med* 9 (7):831-835.
- [507] D Kim, S Kwon, JW Rhee, KD Kim, YE Kim, CS Park, MJ Choi, JG Suh, DS Kim, Y Lee, HJ Kwon (2011) Production of antibodies with peptide-CpG-DNA-liposome complex without carriers. *BMC Immunol* 12:29.
- [508] I Reidel, I García, V González, A Giorello, L Calvinho, A Gennaro, C Veaute (2017) Effects of the liposomal co-encapsulation of antigen and PO-CpG oligonucleotide on immune response in mice. *Int J Res App Nat Sci* 3(6):1-19.
- [509] K Rosen MJ, JT (2012) *Surfactants and Interfacial*. John Wiley & Sons, New Jersey. p.1-600.
- [510] AR Tehrani-Bagha, H Oskarsson, CG van Ginkel, K Holmberg (2007) Cationic ester-containing gemini surfactants: chemical hydrolysis and biodegradation. *J Colloid Interface Sci* 312 (2):444-452.
- [511] P Clapés, M Rosa Infante (2002) Amino Acid-based Surfactants: Enzymatic Synthesis, Properties and Potential Applications. *Biocatal Biotransformation* 20 (4):215-233.
- [512] L Pinheiro, C Faustino (2017) Chapter 7 Amino Acid-Based Surfactants for Biomedical Applications. *Application and Characterization of Surfactants*. Ed. Reza Najjar. IntechOpen p. 207-232.
- [513] M Aresta Branco, L Pinheiro, C Faustino (2014) Amino acid-based cationic gemini surfactant-protein interactions. *Colloids and Surf A Physicochem Eng Asp* 480. *El Sevier*, p. 105-112.

[514] M Mondal, S Malik, A Roy, R Saha, B Saha (2015) Modernization of surfactant chemistry in the age of Gemini and bio- surfactants: a Review. *RSC Adv* 5: 92707.

[515] DK Hickey, FE Aldwell, KW Beagley (2010) Oral immunization with a novel lipid-based adjuvant protects against genital Chlamydia infection. *Vaccine* 28 (7):1668-1672.

[516] Q He, L Martinez-Sobrido, FO Eko, P Palese, A Garcia-Sastre, D Lyn, D Okenu, C Bandea, GA Ananaba, CM Black, JU Igietseme (2007) Live-attenuated influenza viruses as delivery vectors for Chlamydia vaccines. *Immunology* 122 (1):28-37.

[517] S Pal, CJ Luke, AG Barbour, EM Peterson, LM de la Maza (2003) Immunization with the Chlamydia trachomatis major outer membrane protein, using the outer surface protein A of Borrelia burgdorferi as an adjuvant, can induce protection against a chlamydial genital challenge. *Vaccine* 21 (13-14):1455-1465.

[518] FO Eko, E Ekong, Q He, CM Black, JU Igietseme (2011) Induction of immune memory by a multisubunit chlamydial vaccine. *Vaccine* 29 (7):1472-1480.

[519] P Ralli-Jain, D Tifrea, C Cheng, S Pal, LM de la Maza (2010) Enhancement of the protective efficacy of a Chlamydia trachomatis recombinant vaccine by combining systemic and mucosal routes for immunization. *Vaccine* 28 (48):7659-7666.

[520] JR Carmichael, S Pal, D Tifrea, LM de la Maza (2011) Induction of protection against vaginal shedding and infertility by a recombinant Chlamydia vaccine. *Vaccine* 29 (32):5276-5283.

[521] AW Olsen, F Follmann, K Erneholt, I Rosenkrands, P Andersen (2015) Protection Against Chlamydia trachomatis Infection and Upper Genital Tract Pathological Changes by Vaccine-Promoted Neutralizing Antibodies Directed to the VD4 of the Major Outer Membrane Protein. *J Infect Dis* 212 (6):978-989.

[522] W Li, AK Murthy, MN Guentzel, JP Chambers, TG Forsthuber, J Seshu, G Zhong, BP Arulanandam (2010) Immunization with a combination of integral chlamydial antigens and a defined secreted protein induces robust immunity against genital chlamydial challenge. *Infect Immun* 78 (9):3942-3949.

[523] E Marks, A Helgeby, JO Andersson, K Schon, NY Lycke (2011) CD4(+) T-cell immunity in the female genital tract is critically dependent on local mucosal immunization. *Eur J Immunol* 41 (9):2642-2653.

- [524] E Lorenzen, F Follmann, S Boje, K Erneholm, AW Olsen, JS Agerholm, G Jungersen, P Andersen (2015) Intramuscular Priming and Intranasal Boosting Induce Strong Genital Immunity Through Secretory IgA in Minipigs Infected with *Chlamydia trachomatis*. *Front Immunol* 6:628.
- [525] F Fiorino, E Pettini, G Pozzi, D Medaglini, A Ciabattini (2013) Prime-boost strategies in mucosal immunization affect local IgA production and the type of th response. *Front Immunol* 4:128.
- [526] N Iijima, A Iwasaki (2014) T cell memory. A local macrophage chemokine network sustains protective tissue-resident memory CD4 T cells. *Science* 346 (6205):93-98.
- [527] G Stry, A Olive, AF Radovic-Moreno, D Gondek, D Alvarez, PA Basto, M Perro, VD Vrbanc, AM Tager, J Shi, JA Yethon, OC Farokhzad, R Langer, MN Starnbach, UH von Andrian (2015) A mucosal vaccine against *Chlamydia trachomatis* generates two waves of protective memory T cells. *Science* 348 (6241):aaa8205.
- [528] A Ciabattini, E Pettini, S Arsenijevic, G Pozzi, D Medaglini (2010) Intranasal immunization with vaccine vector *Streptococcus gordonii* elicits primed CD4+ and CD8+ T cells in the genital and intestinal tracts. *Vaccine* 28 (5):1226-1233.
- [529] AW Olsen, M Theisen, D Christensen, F Follmann, P Andersen (2010) Protection against *Chlamydia* promoted by a subunit vaccine (CTH1) compared with a primary intranasal infection in a mouse genital challenge model. *PLoS One* 5 (5):e10768.
- [530] C Czerkinsky, J Holmgren (2012) Mucosal delivery routes for optimal immunization: targeting immunity to the right tissues. *Curr Top Microbiol Immunol* 354:1-18.
- [531] D Christensen, R Mortensen, I Rosenkrands, J Dietrich, P Andersen (2017) Vaccine-induced Th17 cells are established as resident memory cells in the lung and promote local IgA responses. *Mucosal Immunol* 10 (1):260-270.
- [532] DL Woodland, JE Kohlmeier (2009) Migration, maintenance and recall of memory T cells in peripheral tissues. *Nat Rev Immunol* 9 (3):153-161.
- [533] DL Farber, NA Yudanin, NP Restifo (2014) Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat Rev Immunol* 14 (1):24-35.
- [534] RM Johnson, H Yu, MS Kerr, JE Slaven, KP Karunakaran, RC Brunham (2012) PmpG303-311, a protective vaccine epitope that elicits persistent cellular immune responses in *Chlamydia muridarum*-immune mice. *Infect Immun* 80 (6):2204-2211.

- [535] KP Karunakaran, H Yu, X Jiang, Q Chan, KM Moon, LJ Foster, RC Brunham (2015) Outer membrane proteins preferentially load MHC class II peptides: implications for a Chlamydia trachomatis T cell vaccine. *Vaccine* 33 (18):2159-2166.
- [536] KA Swanson, LD Taylor, SD Frank, GL Sturdevant, ER Fischer, JH Carlson, WM Whitmire, HD Caldwell (2009) Chlamydia trachomatis polymorphic membrane protein D is an oligomeric autotransporter with a higher-order structure. *Infect Immun* 77 (1):508-516.
- [537] IR Henderson, AC Lam (2001) Polymorphic proteins of Chlamydia spp.--autotransporters beyond the Proteobacteria. *Trends Microbiol* 9 (12):573-578.
- [538] E Becker, JH Hegemann (2014) All subtypes of the Pmp adhesin family are implicated in chlamydial virulence and show species-specific function. *Microbiol Open* 3 (4):544-556.
- [539] HA Saka, JW Thompson, Y-S Chen, Y Kumar, LG Dubois, MA Moseley, RH Valdivia (2011) Quantitative proteomics reveals metabolic and pathogenic properties of Chlamydia trachomatis developmental forms. *Mol Microbiol* 82 (5):1185-1203.
- [540] JA Carrasco, C Tan, RG Rank, RC Hsia, PM Bavoil (2011) Altered developmental expression of polymorphic membrane proteins in penicillin-stressed Chlamydia trachomatis. *Cell Microbiol* 13 (7):1014-1025.
- [541] S Kalman, W Mitchell, R Marathe, C Lammel, J Fan, RW Hyman, L Olinger, J Grimwood, RW Davis, RS Stephens (1999) Comparative genomes of Chlamydia pneumoniae and C. trachomatis. *Nat Genet* 21 (4):385-389.
- [542] TD Read, RC Brunham, C Shen, SR Gill, JF Heidelberg, O White, EK Hickey, J Peterson, T Utterback, K Berry, S Bass, K Linher, J Weidman, H Khouri, B Craven, C Bowman, R Dodson, M Gwinn, W Nelson, R DeBoy, J Kolonay, G McClarty, SL Salzberg, J Eisen, CM Fraser (2000) Genome sequences of Chlamydia trachomatis MoPn and Chlamydia pneumoniae AR39. *Nucleic Acids Res* 28 (6):1397-1406.
- [543] TD Read, GS Myers, RC Brunham, WC Nelson, IT Paulsen, J Heidelberg, E Holtzapple, H Khouri, NB Federova, HA Carty, LA Umayam, DH Haft, J Peterson, MJ Beanan, O White, SL Salzberg, RC Hsia, G McClarty, RG Rank, PM Bavoil, CM Fraser (2003) Genome sequence of Chlamydomphila caviae (Chlamydia psittaci GPIC): examining the role of niche-specific genes in the evolution of the Chlamydiaceae. *Nucleic Acids Res* 31 (8):2134-2147.
- [544] V Forsbach-Birk, U Simnacher, KI Pfrepper, E Soutschek, AO Kiselev, MF Lampe, T Meyer, E Straube, A Essig (2010) Identification and evaluation of a combination of chlamydial

antigens to support the diagnosis of severe and invasive *Chlamydia trachomatis* infections. *Clin Microbiol Infect* 16 (8):1237-1244.

[545] NCBI National Center Biotechnology Information *Polymorphic membrane protein PmpD Chlamydia trachomatis* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide> Accessed 2018

[546] European bioinformatic institute EMBL-EBI (2017) *Clustal Omega*. <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> Accessed 2017.

[547] M Källberg, Sheng Wang, Jian Peng, Zhiyong Wang, Hui Lu & Jinbo Xu. *Raptor X*. <http://raptorx.uchicago.edu> Accessed 2017

[548] M Kallberg, H Wang, S Wang, J Peng, Z Wang, H Lu, J Xu (2012) Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nature Protocols* 7 (8):1511-1522.

[549] F Melo, D Devos, E Depiereux, E Feytmans (1997) ANOLEA: a www server to assess protein structures. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* 5:187-190.

[550] SC Lovell, IW Davis, WB Arendall, 3rd, PI de Bakker, JM Word, MG Prisant, JS Richardson, DC Richardson (2003) Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation. *Proteins* 50 (3):437-450.

[551] JE Larsen, O Lund, M Nielsen (2006) Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immun Res* 2:2.

[552] JM Parker, D Guo, RS Hodges (1986) New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochem J* 25 (19):5425-5432.

[553] PB Jespersen, MC Nielsen, M Marcatili. BepiPred. [www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred](http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred) Accessed 2017

[554] M Van Regenmortel, JV Ponomarenko (2009). Chapter 35 B-cell epitope prediction *Structural Bioinformatics, Second Edition*. Ed. J Gu and PE Bourne. John Wiley & Sons, Inc. p. 849-879.

[555] P Haste Andersen, M Nielsen, O Lund (2006) Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures. *Protein Sci* 15 (11):2558-2567.

[556] DTU bioinformatic Departmen of Bio and Health Informatic. DiscoTope. [www.cbs.dtu.dk/services/DiscoTope-2.0](http://www.cbs.dtu.dk/services/DiscoTope-2.0) Accessed 2017

- [557] M Nielsen, C Lundegaard, P Worning, SL Lauemoller, K Lamberth, S Buus, S Brunak, O Lund (2003) Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. *Protein Sci* 12 (5):1007-1017.
- [558] C Lundegaard, K Lamberth, M Harndahl, S Buus, O Lund, M Nielsen (2008) NetMHC-3.0: accurate web accessible predictions of human, mouse and monkey MHC class I affinities for peptides of length 8-11. *Nucleic Acids Res* 36:509-512.
- [559] C Lundegaard, O Lund, M Nielsen (2008) Accurate approximation method for prediction of class I MHC affinities for peptides of length 8, 10 and 11 using prediction tools trained on 9mers. *Bioinformatics* 24 (11):1397-1398.
- [560] M Nielsen, C Lundegaard, O Lund (2007) Prediction of MHC class II binding affinity using SMM-align, a novel stabilization matrix alignment method. *BMC Bioinformatics* 8:238.
- [561] M Nielsen, O Lund (2009) NN-align. An artificial neural network-based alignment algorithm for MHC class II peptide binding prediction. *BMC Bioinformatics* 10:296.
- [562] A Perusco, C Gamba, P Galarza, F Rojas, A Kalapodis, A Onofri, C Soratti, G Piccinelli (2014) HLA antigenic and haplotype frequencies estimated in hematopoietic progenitor cell donors from Argentina. *Transplant Proc* 46 (9):3064-3067.
- [563] Andreatta M, Nielsen MM NetMHC 4.0 Server. <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/> Accessed 2017.
- [564] KK Jensen, M Andreatta, P Marcatili, S Buus, JA Greenbaum, Z Yan, A Sette, B Peters, M Nielsen. *NetMHCII 2.3 Server*. <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCII/> Accessed 2017.
- [565] R Russi, MI Garcia, P Vignatti, MF Veiga, MH Vazquez-Levin, C Veaute (2016) Immune mediators associated to male infertility in a mouse model of DNA immunization with the sperm protease proacrosin. *J Reprod Immunol* 118:28-35.
- [566] NIH Biowulf 1999. DNAsworks. <https://hpcwebapps.cit.nih.gov/dnaworks/> Accessed 2017
- [567] DM Hoover, J Lubkowski (2002) DNAsWorks: an automated method for designing oligonucleotides for PCR-based gene synthesis. *Nucleic Acids Res* 30 (10):e43.
- [568] Y Zhang, U Werling, W Edelman (2012) SLiCE: a novel bacterial cell extract-based DNA cloning method. *Nucleic Acids Res* 40 (8):e55.
- [569] U H Nijveen (2006) <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi> Accessed 2017

- [570] T Maniatis, E F Fritsch, J Sambrook (2018) *Molecular cloning: a laboratory manual* / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis.
- [571] UK Laemmli (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259):680-685.
- [572] AM Krieg (2006) Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discovery* 5 (6):471-484.
- [573] A Wagner, M Platzgummer, G Kreismayr, H Quendler, G Stiegler, B Ferko, G Vecera, K Vorauer-Uhl, H Katinger (2006) GMP production of liposomes: a new industrial approach. *J Liposome Res* 16 (3):311-319.
- [574] S Yang, J Chen, D Zhao, D Han, X Chen (2012) Comparative study on preparative methods of DC-Chol/DOPE liposomes and formulation optimization by determining encapsulation efficiency. *Int J Pharm* 434 (1-2):155-160.
- [575] WP Chan WG (2000) Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach. Ed. WC Chan and PD White. BD Hames, p.1-376.
- [576] JE Perobelli, TR Alves, FC de Toledo, CD Fernandez, JA Anselmo-Franci, GR Klinefelter, G Kempinas Wde (2012) Impairment on sperm quality and fertility of adult rats after antiandrogen exposure during prepuberty. *Reprod Toxicol* 33 (3):308-315.
- [577] LA Kelley, MJ Sternberg (2009) Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protocols* 4 (3):363-371.
- [578] M Biasini, S Bienert, A Waterhouse, K Arnold, G Studer, T Schmidt, F Kiefer, T Gallo Cassarino, M Bertoni, L Bordoli, T Schwede (2014) SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res* 42:252-258.
- [579] W Wehrl, V Brinkmann, PR Jungblut, TF Meyer, AJ Szczepek (2004) From the inside out-processing of the Chlamydial autotransporter PmpD and its role in bacterial adhesion and activation of human host cells. *Mol Microbiol* 51 (2):319-334.
- [580] AO Kiselev, WE Stamm, JR Yates, MF Lampe (2007) Expression, processing, and localization of PmpD of *Chlamydia trachomatis* Serovar L2 during the chlamydial developmental cycle. *PloS One* 2 (6):e568.

- [581] L Kari, TR Southern, CJ Downey, HS Watkins, LB Randall, LD Taylor, GL Sturdevant, WM Whitmire, HD Caldwell (2014) Chlamydia trachomatis polymorphic membrane protein D is a virulence factor involved in early host-cell interactions. *Infect Immun* 82 (7):2756-2762.
- [582] ON Figueroa , MA Lejeune , KW Kaufmann , BM Dorr, A Matagne (2013) Octarellin VI: using rosetta to design a putative artificial (beta/alpha) 8 protein. *PLoS One* 8:e71858.
- [583] GA Chodanowski P, Feytmans E, Michielin O (2008) Local alignment refinement using structural assessment. *PLoS One* 3:e2645.
- [584] YH Karunakaran KP, Foster LJ, Brunham RC. (2010) Development of a Chlamydia trachomatis T cell vaccine. *Hum Vaccine* 6:676e80.
- [585] Allele Frequencies in worldwide population (2016) <http://www.allelefrequencies.net/>. Accessed 2017.
- [586] W Paes, N Brown, AM Brzozowski, R Coler, S Reed, D Carter, M Bland, PM Kaye, CJN Lacey (2016) Recombinant polymorphic membrane protein D in combination with a novel, second-generation lipid adjuvant protects against intra-vaginal Chlamydia trachomatis infection in mice. *Vaccine* 34 (35):4123-4131.
- [587] M Meng, A Zhou, G Lu, L Wang, G Zhao, Y Han, H Zhou, H Cong, Q Zhao, XQ Zhu, S He (2013) DNA prime and peptide boost immunization protocol encoding the Toxoplasma gondii GRA4 induces strong protective immunity in BALB/c mice. *BMC Infect Dis* 13:494.
- [588] K Kardani, A Bolhassani, S Shahbazi (2016) Prime-boost vaccine strategy against viral infections: Mechanisms and benefits. *Vaccine* 34 (4):413-423.
- [589] SJ Dunachie, AV Hill (2003) Prime-boost strategies for malaria vaccine development. *The J Exp Biol* 206 (Pt 21):3771-3779.
- [590] SSD Proll (2006) *Heterologous prime-boost immunisation regimens against infectious diseases*. Ed. Human Protection and Performance Division DSTO. Defence Science and Technology Organisation, Australia, p.1-32.
- [591] E Alekseeva, I Sominskaya, D Skrastina, I Egorova, E Starodubova, E Kushners, M Mihailova, N Petrakova, R Bruvere, T Kozlovskaya, M Isaguliants, P Pumpens (2009) Enhancement of the expression of HCV core gene does not enhance core-specific immune response in DNA immunization: advantages of the heterologous DNA prime, protein boost immunization regimen. *Genetic Vaccines Ther* 7:7.

- [592] A Badamchi-Zadeh, PF McKay, BT Korber, G Barinaga, AA Walters, A Nunes, JP Gomes, F Follmann, JS Tregoning, RJ Shattock (2016) A Multi-Component Prime-Boost Vaccination Regimen with a Consensus MOMP Antigen Enhances Chlamydia trachomatis Clearance. *Front Immunol* 7:162.
- [593] EA Koroleva, NV Kobets (2017) Chlamydial Type III Secretion System Needle Protein Induces Protective Immunity against Chlamydia muridarum Intravaginal Infection. *Biomed Res Int*. 2017:3865802.
- [594] HJ Betts-Hampikian, KA Fields (2010) The Chlamydial Type III Secretion Mechanism: Revealing Cracks in a Tough Nut. *Front Microbiol* 1:114.
- [595] C Cheng, I Bettahi, MI Cruz-Fisher, S Pal, P Jain, Z Jia, J Holmgren, AM Harandi, LM de la Maza (2009) Induction of protective immunity by vaccination against Chlamydia trachomatis using the major outer membrane protein adjuvanted with CpG oligodeoxynucleotide coupled to the nontoxic B subunit of cholera toxin. *Vaccine* 27 (44):6239-6246.
- [596] C Cheng, S Pal, I Bettahi, KL Oxford, PA Barry, LM de la Maza (2011) Immunogenicity of a vaccine formulated with the Chlamydia trachomatis serovar F, native major outer membrane protein in a nonhuman primate model. *Vaccine* 29 (18):3456-3464.
- [597] LW Murthy AK, Guentzel MN, Zhong G, Arulanandam BP (2011) Vaccination with the defined chlamydial secreted protein CPAF induces robust protection against female infertility following repeated genital chlamydial challenge. *Vaccine* 29:2519-2522.
- [598] ZK Ballas, AM Krieg, T Warren, W Rasmussen, HL Davis, M Waldschmidt, GJ Weiner (2001) Divergent therapeutic and immunologic effects of oligodeoxynucleotides with distinct CpG motifs. *J Immunol* 167 (9):4878-4886.
- [599] VH Shargh, MR Jaafari, A Khamesipour, I Jaafari, SA Jalali, A Abbasi, A Badiie (2012) Liposomal SLA co-incorporated with PO CpG ODNs or PS CpG ODNs induce the same protection against the murine model of leishmaniasis. *Vaccine* 30 (26):3957-3964.
- [600] T Muller, E Becker, S Stallmann, A Waldhuber, F Rommler-Dreher, S Albrecht, F Mohr, JH Hegemann, T Miethke (2017) Vaccination with the polymorphic membrane protein A reduces Chlamydia muridarum induced genital tract pathology. *Vaccine* 35 (21):2801-2810.
- [601] I Gursel, M Gursel, KJ Ishii, DM Klinman (2001) Sterically stabilized cationic liposomes improve the uptake and immunostimulatory activity of CpG oligonucleotides. *J Immunol* 167 (6):3324-3328.

- [602] Y Krishnamachari, AK Salem (2009) Innovative strategies for co-delivering antigens and CpG oligonucleotides. *Adv Drug Deliv Rev* 61 (3):205-217.
- [603] YC Song, HY Cheng, CH Leng, SK Chiang, CW Lin, P Chong, MH Huang, SJ Liu (2014) A novel emulsion-type adjuvant containing CpG oligodeoxynucleotides enhances CD8+ T-cell-mediated anti-tumor immunity. *J Controlled Release* 173:158-165.
- [604] K Yasuda, P Yu, CJ Kirschning, B Schlatter, F Schmitz, A Heit, S Bauer, H Hochrein, H Wagner (2005) Endosomal translocation of vertebrate DNA activates dendritic cells via TLR9-dependent and -independent pathways. *J Immunol* 174 (10):6129-6136.
- [605] C Bombelli, L Giansanti, P Luciani, G Mancini (2009) Gemini surfactant based carriers in gene and drug delivery. *Curr Med Chem* 16 (2):171-183.
- [606] L Grippo (2018) Compuestos biocompatibles como carriers biológicos. *Tesina de Biotecnología*. Directora: DM Müller. Co-directora: C Veaute.
- [607] J Holmgren, AM Svennerholm (2012) Vaccines against mucosal infections. *Curr Opin Immunol* 24 (3):343-353.
- [608] H Shin, A Iwasaki (2012) A vaccine strategy that protects against genital herpes by establishing local memory T cells. *Nature* 491 (7424):463-467.
- [609] N Lycke (2012) Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. *Nat Rev Immunol* 12 (8):592-605.
- [610] RK Naz (2012) Female genital tract immunity: distinct immunological challenges for vaccine development. *J Reprod Immunol* 93 (1):1-8.
- [611] H Kraan, H Vrieling, C Czerkinsky, W Jiskoot, G Kersten, JP Amorij (2014) Buccal and sublingual vaccine delivery. *J Controlled Release* 190:580-592.
- [612] G Dietrich, M Griot-Wenk, IC Metcalfe, AB Lang, JF Viret (2003) Experience with registered mucosal vaccines. *Vaccine* 21 (7-8):678-683.
- [613] PF Wright (2011) Inductive/effector mechanisms for humoral immunity at mucosal sites. *Am J Reproduc Immunol* 65 (3):248-252.
- [614] JE Wern, MR Sorensen, AW Olsen, P Andersen, F Follmann (2017) Simultaneous Subcutaneous and Intranasal Administration of a CAF01-Adjuvanted Chlamydia Vaccine Elicits Elevated IgA and Protective Th1/Th17 Responses in the Genital Tract. *Front Immunol* 8:569.

- [615] I Magalhaes, DR Sizemore, RK Ahmed, S Mueller, L Wehlin, C Scanga, F Weichold, G Schirru, MG Pau, J Goudsmit, S Kuhlmann-Berenzon, M Spangberg, J Andersson, H Gaines, R Thorstensson, YA Skeiky, J Sadoff, M Maeurer (2008) rBCG induces strong antigen-specific T cell responses in rhesus macaques in a prime-boost setting with an adenovirus 35 tuberculosis vaccine vector. *PloS One* 3 (11):e3790.
- [616] H Cai, DH Yu, XD Hu, SX Li, YX Zhu (2006) A combined DNA vaccine-prime, BCG-boost strategy results in better protection against *Mycobacterium bovis* challenge. *DNA Cell Biol* 25 (8):438-447.
- [617] QM Wang, SH Sun, ZL Hu, M Yin, CJ Xiao, JC Zhang (2004) Improved immunogenicity of a tuberculosis DNA vaccine encoding ESAT6 by DNA priming and protein boosting. *Vaccine* 22 (27-28):3622-3627.
- [618] JI Sin, M Bagarazzi, C Pachuk, DB Weiner (1999) DNA priming-protein boosting enhances both antigen-specific antibody and Th1-type cellular immune responses in a murine herpes simplex virus-2 gD vaccine model. *DNA Cell Biol* 18 (10):771-779.
- [619] S Biswas, GS Reddy, VA Srinivasan, PN Rangarajan (2001) Preexposure efficacy of a novel combination DNA and inactivated rabies virus vaccine. *Hum Gene Therapy* 12 (15):1917-1922.
- [620] JE Herrmann, S Wang, C Zhang, RG Panchal, S Bavari, CR Lyons, JA Lovchik, B Golding, J Shiloach, S Lu (2006) Passive immunotherapy of *Bacillus anthracis* pulmonary infection in mice with antisera produced by DNA immunization. *Vaccine* 24 (31-32):5872-5880.
- [621] S Lu (2009) Heterologous prime-boost vaccination. *Curr Opin Immunol* 21 (3):346-351.
- [622] S Pal, I Theodor, EM Peterson, LM de la Maza (2001) Immunization with the *Chlamydia trachomatis* mouse pneumonitis major outer membrane protein can elicit a protective immune response against a genital challenge. *Infect Immun* 69 (10):6240-6247.
- [623] RP Morrison, HD Caldwell (2002) Immunity to murine chlamydial genital infection. *Infect Immun* 70 (6):2741-2751.
- [624] LL Perry, K Feilzer, HD Caldwell (1997) Immunity to *Chlamydia trachomatis* is mediated by T helper 1 cells through IFN-gamma-dependent and -independent pathways. *J Immunol* 158 (7):3344-3352.

- [625] S Pal, OV Tatarenkova, LM de la Maza (2015) A vaccine formulated with the major outer membrane protein can protect C3H/HeN, a highly susceptible strain of mice, from a *Chlamydia muridarum* genital challenge. *Immunology* 146 (3):432-443.
- [626] RC Brunham (2013) Immunity to *Chlamydia trachomatis*. *J Infect Dis* 207 (12):1796-1797.
- [627] T Moore, GA Ananaba, J Bolier, S Bowers, T Belay, FO Eko, JU Igietseme (2002) Fc receptor regulation of protective immunity against *Chlamydia trachomatis*. *Immunology* 105 (2):213-221.
- [628] EM Peterson, X Cheng, VL Motin, LM de la Maza (1997) Effect of immunoglobulin G isotype on the infectivity of *Chlamydia trachomatis* in a mouse model of intravaginal infection. *Infect Immun* 65 (7):2693-2699.
- [629] CW Armitage, CP O'Meara (2014) Divergent outcomes following transcytosis of IgG targeting intracellular and extracellular chlamydial antigens. *Immunol Cell Biol* 92 (5):417-426.
- [630] AN Russell, X Zheng, CM O'Connell, BD Taylor, HC Wiesenfeld, SL Hillier, W Zhong, T Darville (2016) Analysis of Factors Driving Incident and Ascending Infection and the Role of Serum Antibody in *Chlamydia trachomatis* Genital Tract Infection. *J Infect Dis* 213 (4):523-531.
- [631] E De Clercq, B Devriendt, L Yin, K Chiers, E Cox, D Vanrompay (2014) The immune response against *Chlamydia suis* genital tract infection partially protects against re-infection. *Vet Res* 45:95.
- [632] EF Dunne, JB Chapin, CA Rietmeijer, CK Kent, JM Ellen, CA Gaydos, NJ Willard, R Kohn, L Lloyd, S Thomas, N Birkjukow, S Chung, J Klausner, JA Schillinger, LE Markowitz (2008) Rate and predictors of repeat *Chlamydia trachomatis* infection among men. *Sex Transm Dis* 35 (11):S40-44.
- [633] CB Hosenfeld, KA Workowski, S Berman, A Zaidi, J Dyson, D Mosure, G Bolan, HM Bauer (2009) Repeat infection with *Chlamydia* and gonorrhea among females: a systematic review of the literature. *Sex Transm Dis* 36 (8):478-489.
- [634] F Xu, BP Stoner, SN Taylor, L Mena, LH Tian, J Papp, K Hutchins, DH Martin, LE Markowitz (2011) Use of home-obtained vaginal swabs to facilitate rescreening for *Chlamydia trachomatis* infections: two randomized controlled trials. *Obstet Gynecol* 118 (2 Pt 1):231-239.
- [635] KA Cunningham, AJ Carey, JM Finnie, S Bao, C Coon, R Jones, O Wijburg, RA Strugnell, P Timms, KW Beagley (2008) Poly-immunoglobulin receptor-mediated transport of IgA into the

male genital tract is important for clearance of *Chlamydia muridarum* infection. *Am J Reprod Immunol* 60 (5):405-414.

[636] JM Woof, J Mestecky (2005) Mucosal immunoglobulins. *Immunol Rev* 206:64-82.

[637] V Snoeck, IR Peters, E Cox (2006) The IgA system: a comparison of structure and function in different species. *Vet Res* 37 (3):455-467.

[638] KB Renegar, GD Jackson, J Mestecky (1998) In vitro comparison of the biologic activities of monoclonal monomeric IgA, polymeric IgA, and secretory IgA. *J Immunol* 160 (3):1219-1223.

[639] L Hafner, K Beagley, P Timms (2008) *Chlamydia trachomatis* infection: host immune responses and potential vaccines. *Mucosal Immunol* 1 (2):116-130.

[640] S Boje, AW Olsen, K Erneholt, JS Agerholm, G Jungersen, P Andersen, F Follmann (2016) A multi-subunit *Chlamydia* vaccine inducing neutralizing antibodies and strong IFN-gamma(+) CMI responses protects against a genital infection in minipigs. *Immunol Cell Biol* 94 (2):185-195.