



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

**“APLICACIÓN DE UN MODELO MURINO PARA EL ESTUDIO DE
ASPECTOS DE LA PATOGENIA DE LA MUERTE EMBRIONARIA EN LA
TRITRICHOMONOSIS BOVINA”**

Méd. Vet. WOULDWYK, Mariana Andrea

DIRECTOR: Prof. Dr. BARBEITO, Claudio Gustavo

CODIRECTORA: Prof. Dra. MONTEAVARO, Cristina Esther

LUGAR DE TRABAJO

Cátedra de Histología y Embriología. FCV. UNLP.

Laboratorio de Microbiología Clínica y Experimental. SAMP. FCV. UNCPBA

MIEMBROS DEL JURADO:

Prof. Dr. **BASSO**, Walter U.

Prof. Dr. **CAMPERO**, Carlos M.

Prof. Dra. **MASSONE**, Adriana R.

2013

Dedico este trabajo

a mi hijita, Juana

a la memoria de mi padre

a mi amor, Mauricio

a mi madre

a mi hermana

Quisiera agradecer:

a mi director, Claudio Barbeito, por ser mi guía y ejemplo,

a mi codirectora, Cristina Monteavaro, por su ayuda y gran hospitalidad,

a mi marido, por su incondicionalidad, sostén y eterna paciencia,

a mis padres y a mi hermana, por acompañarme siempre y apoyarme,

a mis amigos y compañeros de Histología por las enseñanzas, el aliento y el día a día. En particular, a Carolina Zanuzzi, por su predisposición y gran colaboración con las técnicas de lectinahistoquímica e inmunohistoquímica, a Rubén Mario por enseñarme a trabajar en el laboratorio de histología y por realizar los cortes utilizados en esta tesis y a Norma González por prestarme su microscopio óptico,

a los Dres. Eduardo Gimeno y Enrique Portiansky por permitirme disponer del laboratorio de Patología General y de los insumos que hicieron posible la realización de diversas técnicas,

al personal del Laboratorio de Microbiología Clínica y Experimental (SAMP) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de Tandil por permitirme disponer de las instalaciones, insumos y equipamientos para realizar el trabajo experimental con animales,

a la Dra. Ana Claudia Zenclussen directora del Laboratorio de Ginecología y Obstetricia Experimental de la Universidad Otto von-Guericke de Magdeburg, Alemania por haberme aceptado como becaria del Servicio Alemán de Intercambio

Académico (DAAD) y por brindarme el equipamiento e insumos necesarios para el desarrollo del plan de trabajo,

a todo el personal del Laboratorio de Ginecología y Obstetricia Experimental de la Universidad Otto von-Guericke de Magdeburg quienes me enseñaron, me ayudaron e hicieron muy grata mi estadía en Alemania.

Citas bibliográficas correspondientes a las publicaciones parciales del trabajo de tesis

Publicación en revistas

** De trabajo completo*

Barbeito C, Woudwyk M, Cacciato C, Soto P, Portiansky E, Catena M, Echeverría H, Gimeno E, Monteavaro C. *Tritrichomonas foetus*: Experimental Infection in Pregnant BALB/c Mice. *Exp Parasitol*. 2008; 120: 156–160.

Woudwyk MA, Monteavaro CE, Jensen F, Soto P, Barbeito CG, Zenclussen AC. Study of the Uterine Local Immune Response in a Murine Model of Embryonic Death Due to *Tritrichomonas foetus*. *Am J Reprod Immunol*. 2012; 68 (2): 128–137.

Woudwyk MA, Gimeno EJ, Soto P, Barbeito CG, Monteavaro CE. Lectin Binding Pattern in the Uterus of Pregnant Mice Infected with *Tritrichomonas foetus*. *J Comp Path*. 2013; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcpa.2012.12.004>.

** De resumen*

Woudwyk M, Barbeito C, Cacciato C, Soto P, Gimeno E, Monteavaro C. Embryonic death in a mouse model of bovine tritrichomonosis. Relation with the endometrial changes. *Biocell*. 2008; 32(1): 152. Presentado en: I Reunión Conjunta de las Sociedades de Biología de la República Argentina. Huerta Grande. Córdoba. Agosto de 2007.

Woudwyk M, Monteavaro C, Cacciato C, Soto P, Catalano V, Barbeito C. Granulated metrial gland cells in a mouse model of bovine tritrichomonosis. *Placenta*. 2008; 29: 102-133. Presentado en: III Latin American Symposium on Maternal-Fetal Interaction and Placenta: Basic and Clinical Research. Los Cocos. Córdoba. Noviembre de 2007.

Woudwyk M, Monteavaro C, Soto P, Zenclussen A, Barbeito C. Embryonic death due to *Tritrichomonas foetus* is associated with increased TH17 and diminished HO-1 levels in a murine model. *Placenta*. 2010; 31: A116. Res [P3.37]. ISSN 0143-4004. Presentado en: IFPA meeting 2010. Fetus and Placenta: A Perfect Harmony. Santiago. Chile. Octubre de 2010.

Publicación en actas de Congresos** De resumen*

Woudwyk M, Monteavaro C, Cacciato C, Soto P, Catalano V, Echevarría H, Catena M, Portiansky E, Gimeno E, Barbeito C. Células granulares metriales en la decidua de ratones infectados con *Tritrichomonas foetus*. Un estudio cuantitativo. Presentado en: VIII Congreso de Ciencias Morfológicas y 5^{tas} Jornadas de Educación Sociedad de Ciencias Morfológicas de La Plata. La Plata. Noviembre de 2006.

Woudwyk M, Monteavaro C, Cacciato C, Soto P, Catalano V, Echevarría H, Catena M, Gimeno E, Barbeito C. Estudio cuantitativo de los mastocitos en cuernos uterinos de ratones preñados infectados con *Tritrichomonas foetus*. Presentado en: IX Congreso de Ciencias Morfológicas y 6^{tas} Jornadas de Educación de la Sociedad de Ciencias Morfológicas de La Plata. La Plata. Agosto de 2007.

Woudwyk MA, Monteavaro CE, Soto P, Gimeno EJ, Zenclussen AC, Barbeito CG. Estudio de la respuesta inmune uterina en un modelo de tritrichomonosis bovina en ratonas BALB/c preñadas. Presentado en: VII Reunión Argentina de Patología Veterinaria (RAPAVE). IV Seminario Argentino de la Fundación Charles Louis Davis. Buenos Aires. Julio de 2010.

Woudwyk MA, Monteavaro CE, Gimeno EJ, Soto P, Barbeito CG. Lectin binding pattern in the uterus of pregnant mice infected with *Tritrichomonas foetus*. Presentado en: XV ENAPAVE (Encuentro Nacional de Patología Veterinaria) .Goiânia. Brasil. Septiembre de 2011.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	PÁGINA
RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
<i>Tritrichomonas foetus</i>	8
Mecanismos patogénicos.....	11
Características generales de la tritrichomonosis bovina.....	14
Respuesta inmune en la tritrichomonosis bovina.....	19
Desarrollo del modelo murino.....	23
Implantación y placentación en el ratón.....	27
Principales acontecimientos del desarrollo embrionario del ratón.....	34
Proliferación y muerte celular durante la implantación y la placentación murina.....	36
Inmunología de la gestación.....	38
Relación Th1/Th2.....	40
Células T reguladoras.....	43
Células T <i>helper</i> 17.....	46
Hemooxigenasa-1.....	48
Indolamina 2,3 dioxigenasa.....	49
Otros mecanismos.....	50
Células <i>natural killer</i> uterinas.....	51

Mastocitos.....	55
HIPÓTESIS MÁS RELEVANTES.....	57
OBJETIVOS.....	58
Objetivos generales	
Objetivos específicos	
MATERIALES Y MÉTODOS.....	60
Animales de experimentación.....	60
Sincronización y determinación del estro.....	61
Inóculo.....	63
Diseño experimental.....	63
Obtención de muestras.....	65
Técnicas histológicas.....	66
Lectinahistoquímica.....	67
Inmunohistoquímica.....	69
Recuentos celulares.....	71
RT-PCR en tiempo real.....	72
CAPÍTULO 1: HALLAZGOS DE NECROPSIA E HISTOPATOLOGÍA.	
Objetivo específico.....	74
Hipótesis.....	74
Resultados.....	74
Discusión.....	83
CAPÍTULO 2: LECTINHISTOQUÍMICA.	

Objetivo específico.....	86
Hipótesis.....	86
Resultados.....	86
Discusión.....	95
CAPÍTULO 3: PROLIFERACIÓN Y MUERTE CELULAR.	
Objetivo específico.....	98
Hipótesis.....	98
Resultados.....	98
Discusión.....	107
CAPÍTULO 4: INMUNOLOGÍA Parte I: células <i>natural killer</i> uterinas y mastocitos.	
Objetivo específico.....	111
Hipótesis.....	111
Resultados.....	111
Discusión.....	121
CAPÍTULO 5: INMUNOLOGÍA Parte II: células T reguladoras, células T <i>helper</i> 17 y expresión de citoquinas.	
Objetivo específico.....	124
Hipótesis.....	124
Resultados.....	124
Discusión.....	131
CONCLUSIONES FINALES.....	140

BIBLIOGRAFÍA.....	142
ANEXO.....	173
Hematoxilina y eosina.....	173
Ácido peryódico-Schiff (PAS).....	174
Azul de toluidina.....	176
Lectinahistoquímica.....	177
Inmunohistoquímica.....	180
Aislamiento de ARN a partir de muestras de tejidos.....	185
Síntesis de ADN complementario.....	186
<i>Real time</i> RT-PCR: secuencias de <i>primers</i> y sondas.....	188

ABREVIATURAS

ADNc: ADN complementario	GMG: células glandulares granulares metriales (células uNK)
ARNm: ARN mensajero	H-E: Hematoxilina y eosina
AT: Azul de toluidina	HO-1: hemooxigenasa-1
BE: 3-benzoato de β estradiol	HOs: hemooxigenasas
BSA: albúmina sérica bovina	IA: inseminación artificial
Cb: grupo control con servicio	Ib: grupo infectado con servicio
CO: monóxido de carbono	IDO: indolamina 2, 3 deoxigenasa
DAB: 3-3'diaminobenzidina	IFN: interferón
dNTPs: desoxiribonucleótidos	Ig: inmunoglobulina
dpc: días post coito	IgA-S: inmunoglobulina A secretoria
FasL: ligando Fas	IgE: inmunoglobulina E
Foxp3: <i>forkhead box transcription factor</i>	IgG: inmunoglobulina G
Fuc: fucosa	IgM: inmunoglobulina M
Gal: galactosa	IHQ: Inmunohistoquímica
GalNAc: N-acetilgalactosamina	IL: interleuquina
Glc: glucosa	IM: intramuscular
GlcNAc: N-acetilglucosamina	

IMC: índice de muerte celular

IP: índice de proliferación celular

IV: intravaginal

LHQ: Lectinahistoquímica

LIF: factor inhibidor de la leucemia

Man: manosa

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad

MLAp: agregado linfoideo mesometrial de la preñez

MN: células mononucleares (linfocitos y macrófagos)

NeuNAc: ácido N-acetil neuramínico

NK: células *natural killer*

ON: óxido nítrico

PAS: técnica histoquímica del ácido peryódico de Schiff para mucopolisacáridos

PBS: solución de buffer fosfato tamponada

PCNA: antígeno nuclear de proliferación celular

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PMN: células polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos y basófilos)

RORyt: *related orphan receptor*

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

TB: Tritrichomonosis bovina

T. foetus: *Tritrichomonas foetus*

Tf: *Tritrichomonas foetus*

TGF: factor de crecimiento transformante

Th: linfocitos T colaboradores (*T helper*)

TNF: factor de necrosis tumoral

Treg: linfocitos T reguladores

TYM: medio de Diamond con triptosa, extracto de levadura y maltosa

uNK: células *natural killer* uterinas

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular

**APLICACIÓN DE UN MODELO MURINO PARA EL ESTUDIO DE ASPECTOS
DE LA PATOGENIA DE LA MUERTE EMBRIONARIA EN LA
TRITRICHOMONOSIS BOVINA**

PALABRAS CLAVE: *Tritrichomonas foetus*. Modelo murino. Muerte embrionaria. Citoquinas.

RESUMEN

La tritrichomonosis bovina (TB) es una enfermedad de transmisión sexual causada por el protozoo *Tritrichomonas foetus* que produce muerte embrionaria, piómetra y abortos esporádicos.

El objetivo de esta tesis fue estudiar los mecanismos involucrados en la pérdida del *conceptus* en un modelo murino de TB.

Se infectaron ratonas BALB/c con *T. foetus*, que fueron apareadas con machos sanos. Se utilizaron técnicas histológicas para estudiar los cambios endometriales en las ratonas infectadas y analizar el número y distribución de las células *natural killer* uterinas y de los mastocitos. Mediante lectinahistoquímica e inmunohistoquímica se analizaron los carbohidratos y la muerte y proliferación del epitelio uterino, respectivamente. Con *real time* RT-PCR se estudió la expresión de citoquinas, hemooxigenasa-1 (HO-1) e indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO) y a las células T reguladoras (Treg) y T *helper* 17 (Th17), en el útero.

En el grupo de ratonas infectadas, la muerte embrionaria se produjo en las fases temprana y media de la gestación, asociada a endometritis y cambios en el patrón de

carbohidratos y en los índices de proliferación y muerte celular del epitelio uterino. El ARNm de TNF- α , IL-10 e IL-4 aumentó en el grupo infectado. La expresión de Foxp3, un gen relacionado con las células Treg, y ROR γ t, marcador de células Th17, fue mayor en el útero de las ratonas infectadas. Los niveles de ARNm de HO-1 disminuyeron en las ratonas que sufrieron pérdida embrionaria.

Los cambios en el patrón de carbohidratos y en los índices de muerte y proliferación celular, así como las respuestas T de tipo 1 y 17 podrían estar involucradas en la muerte embrionaria producida durante la infección con *T. foetus*. Estas respuestas alterarían los mecanismos protectores de la preñez como HO-1. El aumento de las células Treg promovería la persistencia de la infección por su acción inmunosupresora. De esta manera, en el modelo de ratonas preñadas, se caracterizaron mecanismos inmunológicos relacionados con la muerte embrionaria temprana en la TB.

STUDY OF SOME ASPECTS OF THE PATHOGENESIS OF THE EMBRYONIC DEATH IN A MURINE MODEL OF BOVINE TRITRICHOMONOSIS

KEY WORDS: *Tritrichomonas foetus*. Murine model. Embryonic death. Cytokines.

SUMMARY

Bovine tritrichomonosis (BT) is a sexually transmitted disease caused by the protozoan *Tritrichomonas foetus*, characterized by embryonic death, pyometra and sporadic abortions.

The aim of this thesis was to study the mechanisms involved in the *conceptus* loss in a murine model of tritrichomonosis.

We infected BALB/c female mice with a pathogenic strain of *T. foetus* and paired them with healthy males. We used histological techniques to study the endometrial changes in the infected group, the uterine natural killer cells and the mast cells. By lectin histochemistry and immunohistochemistry carbohydrates and uterine epithelial cell death and proliferation, were respectively analyzed. Using real-time RT-PCR we studied the expression of cytokines, heme oxygenase 1 (HO-1) and indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) and markers for regulatory T cells (Treg) and T helper 17 (Th17) in the uterus.

In the infected group, the embryonic death occurred in the early and middle phases of pregnancy, associated with endometritis, changes in the carbohydrate pattern and changes in cell proliferation and cell death in the uterine epithelium. Moreover, we found that the mRNA levels of TNF- α , IL-10 and IL-4 were up-regulated in the infected group when compared with controls. Foxp3, a Treg cells associated gene, and ROR γ t, a reliable

marker of Th17 cells, were higher expressed in the uteri of the infected mice. In mice that have lost their *conceptus* after the infection, haem-oxygenase-1 mRNA levels were strongly decreased.

The changes in the pattern of carbohydrates and the cell death and cell proliferation rates as well as the T effector responses of type 1 and 17 may be involved in the embryonic death produced during infection with *T. foetus*. These responses alter the protective mechanisms of pregnancy as HO-1. The increase of Treg cells may promote the persistence of infection by their immunosuppressive action.

This pregnant mouse model allowed us to characterize some immunological mechanisms that conduce to the embryonic death in the BT.

INTRODUCCIÓN

La tritrichomonosis bovina (TB) es una enfermedad de transmisión sexual, producida por el protozoo flagelado *Tritrichomonas foetus* (*T. foetus*) cuyo hospedador natural es el bovino. Este protozoo coloniza la mucosa de los órganos reproductores femeninos y ocasiona repetición de celo e infertilidad temporaria, debida principalmente a la muerte embrionaria temprana. En algunos casos, se producen abortos en estadios más avanzados de la preñez y piómetras esporádicas. En las hembras infectadas, la enfermedad produce vaginitis, cervicitis, endometritis, salpingitis y placentitis de diferentes grados (Parsonson y col., 1976; Rhyan y col., 1988). Ocasionalmente, se puede observar piómetra, asociada con un cuerpo lúteo persistente. En el macho, la infección usualmente es asintomática y crónica, sin afectar su fertilidad (Rhyan y col., 1988).

La Oficina Internacional de Epizootias (OIE), actualmente denominada Organización Mundial de la Salud Animal, presentó en la reunión anual del 2005 la nueva lista de enfermedades de notificación obligatoria aprobada por los países miembros. Anteriormente, existían la lista "A" y la lista "B" en las que se incluían aquellas enfermedades contagiosas con amplio potencial de diseminación entre países y con serias repercusiones económicas, para la salud pública y para el comercio internacional de animales y sus productos. La TB estaba incluida en la lista B de la OIE, por ser una enfermedad transmisible de importancia socioeconómica en los países con producción de alimentos de origen animal. Por acuerdo de los países que conforman la OIE, se propuso una única lista de enfermedades notificables. Actualmente, la TB se encuentra entre las enfermedades de la mencionada lista de la OIE (<http://www.oie.int/es/>).

La TB es cosmopolita y endémica en los países donde la ganadería tiene características extensivas o semi-extensivas, con servicio natural.

Las enfermedades de los animales domésticos que producen la pérdida del embrión o del feto durante el desarrollo ontogénico son de gran importancia económica, independientemente de las alteraciones que desencadenen en los animales adultos. En el caso de la TB, la mayoría de las pérdidas embrionarias ocurren durante el primer trimestre de la preñez y, como se mencionó anteriormente, generan infertilidad temporaria y repetición de celos. El impacto de la tritrichomonosis radica, por lo tanto, en la temprana pérdida de la preñez, lo que causa severos perjuicios económicos en los rodeos que utilizan servicio natural. Los signos de la enfermedad en el rodeo incluyen baja tasa de preñez, repetición de servicios con celos irregulares, preñeces no uniformes y abundantes preñeces tardías (Campero y Cobo, 2006).

La enfermedad ha sido erradicada en países que implementan estrictas metodologías reproductivas como la inseminación artificial (IA), el control sanitario del semen y el descarte de aquellos animales infectados. Sin embargo, en aquellos países donde las condiciones de cría son extensivas con servicio natural, la tritrichomonosis sigue siendo una enfermedad endémica. Su presencia ha sido comunicada en los últimos años no solo en nuestro país sino también en España, Canadá, México, Costa Rica, Australia y Estados Unidos (Campero y Cobo, 2006).

La tritrichomonosis está ampliamente diseminada en los rodeos de la Argentina en general y de la región pampeana en particular. Sin embargo, no existen datos de relevamiento con respecto a la prevalencia de la TB en nuestro país, sino que es estimada por la información proveniente de laboratorios privados de diagnóstico veterinario. Estos laboratorios estiman incidencias variables según la zona. Por otro lado, cabe destacar que esta información es sesgada, ya que el seguimiento anual de los

rodeos se realiza en un 50-55% de los casos. Una revisión realizada en el año 2002 (Cobo y Campero, 2002), indica que en la Argentina la infección con *T. foetus* alcanza entre el 7,1 y el 14,5% de los rodeos y entre el 1 y el 2,1% de los toros. Estos porcentajes se elevan al 16 y al 4,5% respectivamente, cuando consideramos las provincias de Buenos Aires, La Pampa y Río Negro.

La provincia de Buenos Aires tiene una superficie de 31 millones de hectáreas, de las cuales aproximadamente el 60% son destinadas a la ganadería. Esta amplia extensión, sumada a la gran aptitud de los suelos, la convierten en el área de mayor producción de ganadería bovina de la República Argentina (<http://www.maa.gba.gov.ar/2010/subsecretarias/PlanGanadero/plan.php>). En la provincia de Buenos Aires, se calcula que un 10% de las pérdidas en la producción son debidas a enfermedades de la reproducción. La prevalencia de la tritrichomonosis en esta provincia en el año 2006 oscilaba desde un 7% hasta un 25% de los rodeos infectados y desde un 1% hasta un 6% de toros infectados (Campero y Cobo., 2006). En los últimos años, el avance de la agricultura y la sequía provocaron una migración de la ganadería hacia otras zonas como el noroeste argentino (NOA) y el noreste argentino (NEA). En estas regiones, la información existente con respecto a la TB es muy pobre y variable; faltan medidas sanitarias en muchos rodeos y en dichas regiones el diagnóstico de las enfermedades de transmisión sexual es escaso.

Los mecanismos involucrados en la patogenia de la TB no están totalmente aclarados. Debido a la importancia que reviste esta enfermedad, es esencial comprender la patogenia de la muerte embrionaria temprana durante la infección con *T. foetus*. La comprensión de la misma contribuirá a la generación de medidas profilácticas y terapéuticas con beneficios económicos para la producción bovina.

Tritrichomonas foetus

Tritrichomonas foetus es un protozoo piriforme con un tamaño de 9 a 18 x 4 a 8 µm. Sin embargo, debido a la plasticidad de su citoplasma, adopta diversas formas según los requerimientos fisiológicos y las condiciones ambientales. Presenta 3 flagelos anteriores y uno posterior. Los primeros miden de 11 a 17 µm de largo y el flagelo posterior, de 16 µm, acompaña a la membrana ondulante que recorre todo el soma celular formando 5 a 6 ondulaciones y lo abandona en una porción libre (Figura 1).

Actualmente, este protozoo se ubica en el Dominio Eukarya, Reino EXCAVATA (Cavalier-Smith, 1993, enmendado por Simpson, 2003), *Phylum* PARABASALIA, Orden Trichomonadida, Familia *Trichomonadidae*, Subfamilia *Tritrichomonadinae* (Kleina y col., 2004; Adl y col., 2005).

T. foetus no tiene vida libre ni hospedadores intermediarios. Sus hospedadores naturales son los bovinos, tanto *Bos taurus* como *Bos indicus*, aunque puede ocasionalmente colonizar otras especies como búfalo, equino, cerdo, algunos roedores e inclusive seres humanos (McCool y col., 1987; BonDurant y Honigberg, 1994; Felleisen, 1999; Honigberg, 1978; Okamoto y col., 1998). En gatos, *T. foetus* ha sido ampliamente estudiado como agente causal de diarrea crónica por afección del intestino grueso (Kuehner y col., 2011). Sin embargo, recientemente, Walden y col. (2013) sugirieron que el agente que causa tritrichomonosis en el gato sería una especie distinta y propusieron el nombre de *Tritrichomonas blagburni*, debido a que encontraron diferencias en la patogenicidad y en la secuenciación génica entre *Tritrichomonas* aisladas de bovinos y felinos.

Estudios de filogenia molecular demostraron que los organismos denominados anteriormente *T. suis*, *T. foetus* y, posiblemente, *T. mobilensis* constituyen una única especie perteneciente a la subfamilia *Tritrichomonadinae* y a la familia *Trichomonadidae* (Kleina y col., 2004). Algunos investigadores han encontrado que *Tritrichomonas* aisladas a partir de los tractos nasal y digestivo de porcinos, causaron infecciones aparentes en los bovinos cuando fueron inoculadas intravaginalmente (Fitzgerald y col., 1958). Sin embargo, en otro trabajo realizado con una cepa de *T. suis*, no se logró infectar a vaquillonas (Cobo y col., 2001). Felleisen y col. (1998) propusieron que las *Tritrichomonas* aisladas de bovinos y de porcinos representan variantes de la misma especie con diferencias en los mecanismos de patogenicidad y en el rango de hospedadores a los que afectan.

Estos microorganismos son eucariotas, por lo tanto poseen un núcleo verdadero que usualmente es elíptico u ovoide y se encuentra en posición excéntrica. Presentan un complejo de Golgi bien desarrollado que se asocia con las raicillas de los flagelos. Aunque carecen de mitocondrias y peroxisomas, poseen unos orgánulos característicos, revestidos por una doble membrana, que se denominan hidrogenosomas. Los hidrogenosomas se dividen por fisión. Estas organelas les permiten sobrevivir en condiciones de anaerobiosis porque en ellas ocurren la glucólisis y la producción de ATP a partir del piruvato y malato. A diferencia de las mitocondrias, los hidrogenosomas carecen de genoma propio, cadena respiratoria y citocromos (Honigberg y col., 1984; Benchimol y col., 1993).

Otra organela característica de *T. foetus* es el complejo blefaroplasto, formado por los gránulos basales, denominados kinetosomas, de los cuales se originan los flagelos. Desde el blefaroplasto surge el axostilo, estructura hialina que se curva alrededor del núcleo y emerge a través de una corta proyección posterior. La membrana ondulante se

extiende a lo largo del protozoo siguiendo el recorrido de la costa, un cuerpo basal de estructura fibrilar (Benchimol y col., 1993).

Los *Trichomonadida* se dividen por mitosis, pero sus husos mitóticos son extranucleares (Cavalier-Smith, 1993).

Se identificaron dos formas de *T. foetus*: una denominada trofozoito, caracterizada por su forma elongada y que constituye la mayor parte de la población en condiciones normales; y otra, denominada pseudoquistica, redondeada e inmóvil, por invaginación de los flagelos, que aparece cuando el medio ambiente es desfavorable (Pereira-Neves y col., 2011).

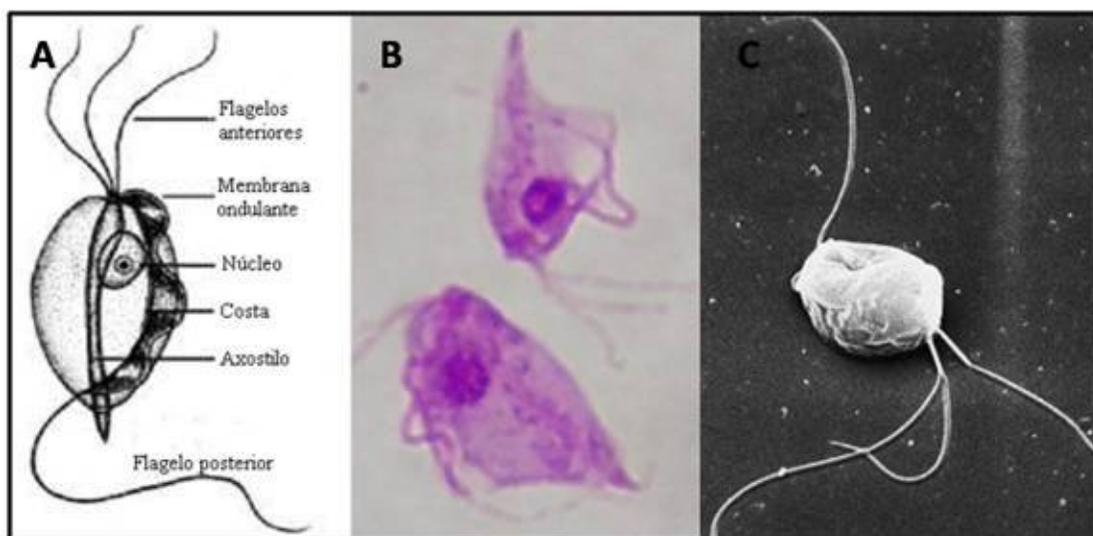


Figura 1: *Tritrichomonas foetus*. A) Esquema del protozoo en el que se indican sus estructuras más características (www.k-state.edu). B) Microfotografía de *T. foetus*. Microscopio óptico (400X). C) Microfotografía electrónica de barrido (www.marvistavet.com).

Mecanismos patogénicos

Los mecanismos patogénicos de *T. foetus* involucran la adhesión al epitelio de los órganos genitales, la consecuente colonización y el efecto citotóxico. La adhesión inicial está determinada por el reconocimiento entre las moléculas de la membrana plasmática del protozoo y las células epiteliales del hospedador (Corbeil y col., 1989; Felleisen, 1999; Singh y col., 1999). Diferentes tipos de moléculas podrían estar involucradas en la adhesión de *T. foetus* a las células epiteliales del tracto genital de los bovinos como: 1) la adhesina Tf190, una molécula de 190 kDa presente en la membrana del protozoo; 2) los receptores para laminina y fibronectina, proteínas de la matriz extracelular del hospedador; 3) las lectinas parasitarias y los carbohidratos presentes en la membrana de las células del hospedador (Felleisen, 1999; Benchimol y de Souza, 1995).

T. foetus no es capaz de sintetizar algunas macromoléculas fundamentales como el colesterol y otros componentes de la membrana (BonDurant y Honigberg, 1994). Por este motivo, este parásito extracelular depende de la disponibilidad de estos compuestos a partir de las células lisadas del hospedador. En el caso de los toros infectados, el protozoo obtiene los mencionados nutrientes a partir de la lisis de las células del prepucio (BonDurant, 1997). En la hembra, también se conoce el efecto citotóxico de *T. foetus* sobre las células epiteliales del endometrio, pero probablemente este no sea el principal mecanismo de interrupción de la preñez.

No se conoce la patogenia de la muerte embrionaria temprana en la infección con *T. foetus*, habiéndose postulado la importancia de algunos mecanismos como la secreción de cistein-proteasas producidas por el protozoo (BonDurant, 1997). Se han propuesto varias funciones biológicas para estas enzimas, incluyendo la evasión de la respuesta inmune y la adquisición de nutrientes a partir de las células del hospedador. Además, alterarían las moléculas de adhesión del trofoblasto (Thomford y col., 1996). Las

cistein-proteasas extracelulares, a pH fisiológico, son activas contra una amplia variedad de proteínas del hospedador relacionadas con la respuesta inmune, tanto innata como adquirida. Entre sus sustratos se incluyen las inmunoglobulinas, el fibrinógeno, la fibronectina, la albúmina, la transferrina y la lactoferrina (Talbot y col., 1991; Thomford y col., 1996; Felleisen, 1999). Las inmunoglobulinas IgG1 e IgG2 permiten el control de la infección mediante la unión del sistema del complemento. El clivaje de estas inmunoglobulinas mediado por las cistein-proteasas secretadas por el protozoo es un mecanismo de evasión inmune (Felleisen, 1999). La degradación de la fibronectina podría colaborar con la desintegración de la matriz extracelular, alterar la integridad de los tejidos del hospedador y promover la invasión. Por otro lado, la degradación de la transferrina y la lactoferrina está relacionada con la adquisición del hierro ya que *T. foetus* obtiene el hierro que necesita, principalmente, a partir de la fracción del metal que está unida a la transferrina y a la lactoferrina del hospedador (Tachezy y col., 1998).

En estudios *in vitro*, Singh y col. (2004) observaron que *T. foetus* es citotóxica para las células del epitelio vaginal de bovino por acción de una cistein-proteasa denominada CP30 la cual induce la apoptosis de las células epiteliales vaginales bovinas *in vitro*. Recientemente, Chaves Vilela y Benchimol (2012) demostraron que *T. foetus* también es capaz de adherirse a células musculares lisas y fibroblastos en cultivo y ejercer sobre ellas su citotoxicidad.

T. foetus produce además otras enzimas de tipo hidrolíticas como la β -glucosidasa, la β -N-acetilglucosaminidasa y la α -manosidasa, secretadas profusamente en cultivos *in vitro* durante el crecimiento exponencial del parásito (Felleisen, 1999). Estas enzimas actúan sobre el mucus protector de los órganos genitales y generan un medio hostil que podría favorecer la patogénesis (Felleisen, 1999). Además, estas proteínas destruyen sustancias antimicrobianas como fracciones del complemento permitiendo la evasión de los mecanismos de inmunidad innata (Kania y col., 2001).

Otra enzima importante en la patogenia de la TB es la neuraminidasa ubicada en la membrana plasmática del parásito y en vesículas cerca de la superficie celular. Esta enzima es capaz de remover el ácido siálico de las células de mamíferos (Babál y Russel, 1999). Hidroliza la unión glicosídica α -2,3 entre el ácido siálico y los glicoconjugados de superficie exponiendo los glicoconjugados más internos. Esta remoción del ácido siálico permitiría la adhesión celular inicial de *T. foetus* para continuar luego con la degradación de glicoconjugados por parte de otras glicosidasas o proteasas parasitarias (Babál y Russel, 1999; Campero y Cobo, 2006). La variación en la expresión de glicoconjugados en el útero podría ser un factor de importancia en la susceptibilidad a la infección ya que el protozoo podría aprovechar estos cambios para favorecer su propia adhesión y posterior colonización.

Algunas de las enzimas mencionadas previamente al modificar a los carbohidratos, podrían ser las responsables de los cambios en el patrón de unión a lectinas en los órganos genitales femeninos encontrados en el bovino (Cobo y col., 2004) y en el ratón (Monteavaro y col., 2008). En el microambiente útero-trofoblástico, son fundamentales las moléculas de adhesión y reconocimiento celular. Estas sustancias poseen carbohidratos y de sus modificaciones a lo largo del ciclo sexual depende la receptividad del útero para las células trofoblásticas del blastocisto que va a implantarse (Carson y col., 1998).

En nuestro laboratorio, analizamos mediante lectinahistoquímica, el patrón de carbohidratos superficiales de diferentes aislamientos de *T. foetus* obtenidos a partir de muestreos prepuciales. Se encontraron importantes variaciones en la marcación de la membrana ondulante, el citoplasma y la membrana celular entre las distintas muestras de *T. foetus*, que podrían estar relacionadas con diferencias en la patogenicidad (Monteavaro y col., resultados no publicados).

La variación antigénica es un importante mecanismo de evasión de la respuesta inmune utilizado por algunos agentes patógenos. *T. foetus*, luego de una prolongada exposición a anticuerpos, es capaz de modificar la expresión de epitopes y antígenos superficiales. En las sucesivas generaciones, *T. foetus* modifica la composición química de los glúcidos que forman parte de las glicoproteínas de superficie. Así, cambia su identidad antigénica y, en consecuencia, la especificidad de los anticuerpos producidos por el hospedador resulta ineficiente (Corbeil, 1994). Ikeda y col. (1993) observaron cierta variación del antígeno superficial protector Tf1.17. Además, Shaia y col. (1998) encontraron variabilidad en la expresión de epitopes del complejo de adhesión Tf190, en estudios con los respectivos anticuerpos monoclonales.

El enmascaramiento antigénico es otra forma de evasión de la respuesta inmune que se observa en *T. foetus*. El protozoo cubre sus epitopes con proteínas propias del hospedador debido a que posee receptores para fibronectina, fibrinógeno y laminina. De esta manera, impide ser reconocido como un agente extraño por el sistema inmune del hospedador (Corbeil, 1994).

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA TRITRICHOMONOSIS BOVINA

La tritrichomonosis bovina se transmite por vía sexual, tanto por servicio natural como por IA (Cobo y Campero, 2002). Esta última vía es posible debido a que el protozoo permanece viable en el semen congelado (Eaglesome y García, 1992). Sin embargo, es menos frecuente la infección por IA debido a que los toros utilizados para la obtención de semen deben ser rigurosamente examinados y muestreados para la detección de *T. foetus* (Taylor y col., 1994).

La fertilidad de las hembras bovinas infectadas con *T. foetus*, se encuentra temporariamente afectada, por presentar, durante dos o tres ciclos estrales, pérdidas embrionarias tempranas sin retención placentaria. La pérdida embrionaria o fetal temprana ocurre frecuentemente entre el reconocimiento materno (14 a 18 días post servicio) y el 5º mes de gestación (BonDurant, 1985). Si la muerte embrionaria ocurre antes del día 16, el ciclo estral prosigue con normalidad. Por el contrario, si ocurre luego, conduce a un intervalo interestros prolongado con ciclos irregulares (BonDurant, 1997).

Dentro de las categorías de hembras bovinas, las vaquillonas son las más susceptibles. Con respecto a la cinética de la infección, el estro es la fase del ciclo en la cual se dan las condiciones óptimas para la adherencia del protozoo al tracto genital y posterior colonización (Corbeil y col., 1989). Durante esta fase, el elevado nivel de estrógenos inhibe la expresión de un factor quimiotáctico de neutrófilos en las células del epitelio vaginal. Por lo tanto, el mecanismo primario de fagocitosis se encuentra disminuido durante el estro, favoreciendo así la colonización del tracto reproductor por agentes infecciosos, como sucede en la TB y otras enfermedades de transmisión sexual (Jungi y col., 1977). En el inicio de la infección genital se observa proliferación de *T. foetus* en la vagina donde genera una respuesta inflamatoria leve caracterizada por proliferación de linfocitos, macrófagos y células plasmáticas en la lámina propia vaginal (Anderson y col., 1996). El número de protozoos disminuye en la vagina hacia los 20-30 días post infección para localizarse en el útero, en especial en la luz de las glándulas endometriales o entre los placentomas en caso de existir preñez (Anderson y col., 1996; Parsonson y col., 1976).

Las lesiones que se asocian a los signos clínicos mencionados anteriormente incluyen, al principio de la enfermedad, vaginitis y luego cervicitis, endometritis, salpingitis y ocasionalmente piómetra. Todas estas lesiones son inespecíficas y se acompañan con descarga vulvar de intensidad y frecuencia variables (Campero y col., 1992; Jubb y col.,

1993), que puede persistir por 13 a 28 semanas (Campero y Cobo, 2006). A veces, se observa solo una leve vaginitis pero la fertilización y el desarrollo embrionario temprano no se encuentran afectados (Parsonson y col., 1976). En algunos casos, se producen abortos en etapas más avanzadas de la gestación (Felleisen, 1999), que inclusive pueden ocurrir hasta en el 7º mes (Parsonson y col., 1976). En ciertas ocasiones, el animal puede llegar a término con su gestación y parir un ternero normal. Estos animales se denominan vacas *carrier* o portadoras crónicas ya que mantienen al agente en el rodeo y constituyen una fuente potencial para la infección del mismo (Parsonson y col., 1976; Mancebo y col., 1995; BonDurant, 1997).

Los efectos de la infección con *T. foetus* sobre los órganos reproductores de los bovinos abarcan desde la ausencia de lesiones, hasta inflamación generalizada, aguda o crónica, del tracto genital de la hembra (Parsonson y col., 1976). En el análisis histopatológico de los órganos afectados, se observa un infiltrado perivascular de células mononucleares en la vagina; en el útero se puede observar desde endometritis intercotiledonaria, en el caso de hembras preñadas, con abundantes polimorfonucleares y macrófagos, hasta inflamación crónica con agregados linfocitos e infiltrado de células mononucleares, especialmente alrededor de vasos y glándulas. Con respecto a la placenta, los placentomas se infiltran con polimorfonucleares neutrófilos y macrófagos y se observa edema en el tejido mesenquimático del corion (Parsonson y col., 1976; Anderson y col., 1996).

En los machos *T. foetus* coloniza solamente los estratos superficiales de las mucosas peneana y prepucial, incluyendo el fórnix y la parte distal de la uretra. Microscópicamente, se observó que el protozoo no invade el epitelio (Rae y Crews, 2006). La infección es más frecuente en los toros adultos y viejos que en los toros jóvenes debido al incremento de los pliegues o criptas epiteliales existentes en la mucosa peneana y prepucial con la edad (BonDurant, 1997). La mayor profundidad de las criptas

proporciona un ambiente microaerófilo que favorece el establecimiento de la infección crónica (Rae y Crews, 2006). En los machos, la infección con *T. foetus* no altera ni la espermatogénesis ni la libido y suele ser asintomática, aunque en algunos casos, puede producir una balanopostitis de corta duración (Rhyan y col., 1988; Rhyan y col., 1995^a; Cobo y Campero, 2002). En general, los signos desaparecen dentro de las dos semanas post-infección y los portadores son usualmente asintomáticos (Felleisen, 1999). La característica más importante de la infección con *T. foetus* en los toros es la capacidad de actuar como portadores crónicos del parásito.

En los fetos abortados (5-7 meses de gestación), las lesiones macroscópicas pueden ser inaparentes, pero también pueden detectarse hepatomegalia y bullas enfisematosas subpleurales y peritoneales. Microscópicamente, se observa bronconeumonía piogranulomatosa y enteritis necrosante (Rhyan y col., 1995^a; Rhyan y col., 1995^b; Cobo y Campero, 2002). Ocasionalmente, presentan necrosis hepática centrolobulillar, probablemente originada por la hipoxia fetal prolongada (Rhyan y col., 1988). Mediante inmunohistoquímica (IHQ) se han detectado los protozoos en el tejido pulmonar del feto, tanto en forma libre en bronquios, bronquiólos y alvéolos como en el interior de macrófagos y células gigantes (Rhyan y col., 1995^b). El feto es expulsado aunque esporádicamente puede ser retenido, momificarse o macerarse y originar una piómetra (Parsonson y col., 1976).

El diagnóstico de la infección con *T. foetus* requiere del aislamiento e identificación de protozoos viables y móviles a partir de las secreciones genitales (BonDurant, 1997). Los protozoos pueden ser observados mediante examen microscópico de la muestra. Un método más sensible para su detección es la siembra de la muestra en un medio específico cultivándola durante 1 a 7 días realizando observaciones diarias para detectar el desarrollo. *T. foetus* es identificada por su morfología y por su motilidad características. Existen numerosos medios de cultivo, los

más utilizados por los laboratorios de diagnóstico son, entre otros, el medio de Plastridge, el caldo infusión hígado y el medio de Diamond (Tym) (Campero, 1992; BonDurant, 1997; Campero y Cobo, 2006).

La mayoría de los toros infectados mantienen la infección durante casi toda su vida. En las hembras la infección es temporaria. Por este motivo, es más probable obtener el diagnóstico de TB de un rodeo infectado muestreando los toros que tengan al menos un mes de descanso sexual.

En los toros, se obtienen muestras de esmegma prepucial utilizando el método del raspado prepucial, aspiración por pipeta de Cassou o de IA o lavaje prepucial (Terzolo y col., 1992). En las hembras, si se diagnostica piómetra, *T. foetus* puede detectarse en la descarga vulvar o en aspirados obtenidos a partir del útero con una pipeta de IA. En la mayoría de los casos, en los que no existe piómetra, el protozoo puede ser cultivado a partir del mucus cervico-vaginal (BonDurant, 1997).

El diagnóstico de aborto inducido por *T. foetus* se realiza a partir de la observación e identificación microscópica del protozoo en fluidos placentarios frescos, exudados uterinos, contenido abomasal del feto, o en cultivos inoculados a partir de estas muestras (BonDurant, 1990).

El control efectivo de la TB se logra mediante el manejo adecuado de los rodeos. Con la práctica de la IA y con un estricto seguimiento de los toros utilizados para la obtención de semen, se controló la enfermedad en varios países. Estas medidas, sin embargo, son difíciles de aplicar en las regiones donde las condiciones naturales de cría extensiva son predominantes. Además, no existe un agente quimioterápico aprobado para el tratamiento de la enfermedad (Felleisen, 1999). Por ejemplo, los quimioterápicos nitroimidazólicos, como el metronidazol, se han utilizado para el tratamiento de la TB, pero no son totalmente eficaces debido a la existencia de cepas resistentes.

A continuación, se enumeran algunas pautas de manejo para reducir el riesgo de introducir la enfermedad en el rodeo (Rae y Crews, 2006):

- Controlar el movimiento de animales y mantener los alambrados en buenas condiciones.
- Realizar los reemplazos de animales con vaquillonas y toros vírgenes.
- Respetar la cuarentena de los toros antes de introducirlos al rodeo.
- Realizar 2-3 muestreos prepucciales a todos los toros.
- Venta a faena de los toros infectados.
- Muestrear a las hembras vacías en el momento del control de preñez.
- Utilizar toros jóvenes controlados.
- Estacionar los servicios.
- Inmunizar contra otras enfermedades que causan mortalidad embrionaria y/o abortos.

RESPUESTA INMUNE EN LA TRITRICHOMONOSIS BOVINA

T. foetus es un protozoo mucosa-dependiente y no invasivo. Puede causar inflamación de media a moderada en la vagina, cérvix, útero y oviducto. Este parásito, por ser de transmisión sexual y afectar al útero gestante, accede al tracto genital en la fase estrogénica del ciclo estral, pero luego expresa su patogenicidad en un ambiente que se encuentra bajo los efectos de la progesterona (Campero y Cobo, 2006).

La respuesta inmune de la mucosa genital es el principal mecanismo defensivo del hospedador para controlar la colonización y favorecer la eliminación de *T. foetus*. Las hembras infectadas desarrollan una respuesta inmune mediada por anticuerpos contra diversos antígenos del protozoo, tanto a nivel sistémico como a nivel local en la vagina y el útero (BonDurant, 1997). Los antígenos de *T. foetus* son captados y presentados por células epiteliales, macrófagos o células de Langerhans en la mucosa de la vagina o del útero. Allí, se forman agregados linfoides en los que se produce una respuesta inmune adaptativa (Corbeil y col., 1998). Los linfocitos B son estimulados y se diferencian a células plasmáticas productoras de IgA secretoria e IgG1 específicas. La IgA es originada localmente y persiste en las secreciones genitales hasta 170 días post infección e inclusive luego de eliminado el parásito (Skirrow y BonDurant, 1990). La IgG1 alcanza la luz de los órganos genitales desde la circulación sistémica y su función primaria es opsonizar al protozoo y facilitar su fagocitosis por los macrófagos y polimorfonucleares neutrófilos, aunque los niveles que alcanza esta Ig son bajos para generar una respuesta efectiva.

La respuesta inmune local inducida por *T. foetus* se desarrolla tardíamente y por ende, es ineficiente para prevenir las pérdidas reproductivas. Por lo tanto, la presencia del parásito en el tracto genital luego de los 70 días post infección está correlacionada positivamente con las pérdidas fetales (Anderson y col., 1996).

La respuesta inmune sistémica generada por *T. foetus* se caracteriza por bajos niveles de IgG1 e IgG2 séricas, los cuales no tienen efecto preventivo ni curativo para evitar las pérdidas reproductivas (Soto y Parma, 1989). La respuesta inmune que se desarrolla en las hembras infectadas con *T. foetus* no persiste más de 15 meses post infección y no permite prevenir reinfecciones (Clark y col., 1983).

En el modelo murino utilizado por Agnew y col. (2008), los niveles de IgG e IgA *T. foetus*-específicos se encontraron elevados en la vagina, como ocurre en los bovinos infectados. Sin embargo, la respuesta mediada por anticuerpos no eliminó la infección. Los animales que se negativizaron lo hicieron antes de que fuera inducida la respuesta inmune adquirida. Esto indica que el sistema inmune innato tiene un importante rol en el control de la infección durante los primeros estadios.

En el macho, *T. foetus* induce un incremento local de IgG1, IgG2, IgM e IgA en las mucosas peneana y prepucial. Esta respuesta carece de efecto protector o curativo y el protozoo puede habitar el tracto genital del macho por años o incluso toda la vida, especialmente en animales viejos. La falta de efecto de los anticuerpos y la consecuente infección persistente se deben a la acción superficial del protozoo y a la ausencia de invasión del epitelio que provocan una estimulación antigénica insuficiente (BonDurant, 1997).

El antígeno superficial Tf1.17 ha sido extensamente utilizado como antígeno modelo para el estudio de la respuesta inmune hacia *T. foetus* (Singh y col., 2001). Los anticuerpos monoclonales contra Tf1.17 fueron capaces de inmovilizar y aglutinar al protozoo, mediar la unión del sistema del complemento y prevenir la adhesión a células epiteliales vaginales *in vitro* (Hodgson y col., 1990).

Con respecto a la respuesta inmune mediada por células en la infección con *T. foetus*, la información existente es escasa. Los neutrófilos se acumulan en los sitios de inflamación en estadios tempranos de la infección y representan la primera línea de defensa contra el parásito (Felleisen, 1999). Además, en un estudio de microscopía electrónica realizado por Monteavaro y col. (2005), se observó fagocitosis y destrucción de *T. foetus* por parte de los eosinófilos. Por otro lado, en el citoplasma de macrófagos vaginales de vaquillonas infectadas, se reconocieron, mediante inmunohistoquímica,

antígenos de *T. foetus* (Cobo y col., 2004). Esto implica que *T. foetus* es fagocitada por los macrófagos para luego realizar la presentación antigénica a los linfocitos. Mecanismos similares fueron descritos en los pulmones fetales (Rhyan y col., 1995^b) y en el tejido subcutáneo de ratón (Campero y col., 1989). Sin embargo, para dilucidar el rol de estos y otros leucocitos como efectores inmunes en la TB *in vivo*, se requieren más estudios.

DESARROLLO DEL MODELO MURINO

La importancia de las pérdidas económicas generadas por la infección con *T. foetus* ha llevado al estudio de diversos aspectos de la enfermedad, especialmente aquellos referidos a la inmunidad y a la patogenia.

El estudio de las enfermedades que producen muerte embrionaria o fetal en bovinos se encuentra obstaculizado por los elevados costos que implica el mantenimiento de bovinos como animales de experimentación, la dificultad de su manejo y la imposibilidad de controlar las condiciones medio-ambientales. Esto es especialmente importante si es necesario abarcar un período prolongado de la preñez para realizar el seguimiento. Estas dificultades han determinado la búsqueda de modelos experimentales alternativos para reproducir enfermedades como la tritrichomonosis bovina.

El uso de animales de laboratorio permite desarrollar estudios extrapolables en muchos casos, a los hospedadores naturales, reduciendo el número de experimentos a realizar en estos últimos. La gestación de 21 días de duración, el bajo costo de mantenimiento, las características genéticas definidas y el número creciente de herramientas moleculares, que incluye a los ratones *knock-out*, determinan que el ratón sea un modelo ideal para la realización de estos estudios. Esta especie se ha empleado satisfactoriamente como modelo experimental en la tritrichomonosis, así como en otras enfermedades que afectan el desarrollo embrionario temprano. Sin embargo, antes de establecerse el modelo murino se realizaron ensayos con distintas especies. Así, en la búsqueda del modelo animal adecuado para la TB, MacDonald y col. (1948) infectaron conejos con *T. foetus* pero los resultados obtenidos no fueron satisfactorios, pues la incidencia, la duración y el curso de la infección fueron irregulares e impredecibles. Palladino y col. (1982) infectaron transitoriamente a hembras de hámster vírgenes para

estudiar fenómenos de quimioresistencia en diferentes cepas de *T. foetus*. Kulda (1990) trabajó con hámsters a los cuales inoculó *T. foetus* vía intravaginal, pero los animales estaban contaminados con tritrichomonas de origen intestinal. Maestrone y Semar (1967) inocularon *T. foetus* en cobayos, vía intravaginal. Esta especie presentó un alto grado de infectividad, sin embargo, debió ser estrogenizada semanalmente con estradiol para mantener la infección y recibir además un tratamiento con acetato de triamcinolona, por su efecto anti-inflamatorio. Tanto los estrógenos como los glucocorticoides influyen en la respuesta inmune del hospedador; por lo tanto, el cobayo no sería un modelo apropiado para el estudio de la inmunopatogenia de la enfermedad. Hook y col. (1997), analizaron la infección con *T. foetus* en diferentes cepas de ratones como CD1, BALB/c y C57BL/6N. Dichos autores hallaron diferencias en la persistencia de la infección y en la susceptibilidad de las distintas cepas estudiadas. La cepa de ratón BALB/c resultó la más adecuada para el estudio de la infección producida por *T. foetus*. St. Claire y col. (1994) observaron que ratonas tratadas con estrógenos tuvieron un porcentaje de infección con *T. foetus* significativamente más elevado que los controles no tratados.

A partir de estos antecedentes, Van Andel y col. (1996) infectaron con *T. foetus* ratonas de la cepa BALB/c previamente estrogenizadas y describieron las lesiones producidas por el protozoo. El estro, fase del ciclo estral que reúne las condiciones favorables para la colonización y la adhesión, es muy breve en el ratón, ya que tiene una duración aproximada de 24 h. Por lo tanto, es necesaria la inducción previa del estro, por las ventajas que esta fase representa para el establecimiento de la infección en los órganos genitales de la hembra. El tratamiento con estrógenos induce y mantiene el estro durante más tiempo. Así, estos autores consiguieron mantener animales infectados durante más de 26 semanas utilizando implantes subcutáneos que contenían 15 µg de 17β-estradiol para inducir el estro. Los resultados de estos ensayos demostraron que las lesiones vaginales y uterinas en los ratones BALB/c se asemejan a las descritas en

bovinos. Sin embargo, el tratamiento prolongado con estrógenos produce descarga vulvar y lesiones como hiperqueratosis vaginal, abscesos perivulvares e hidrómetra (St. Claire y col., 1994). Además, la respuesta inmune del aparato reproductor se encuentra regulada por las hormonas sexuales, las cuales pueden alterar la interacción entre el hospedador y *T. foetus* (Rutkowski y Harmsen, 2007). La administración subcutánea de estrógenos resulta en la supresión de las respuestas inflamatorias y en la reducción de la circulación de polimorfonucleares neutrófilos y eosinófilos. Además, producen la disminución de estas células en los órganos genitales (Rutkowski y col., 2007). Como consecuencia, las modificaciones en los niveles de estrógenos alteran los resultados de los experimentos. Sin embargo, la sincronización del estro y su prolongación durante 3 a 4 días en los modelos experimentales de TB es importante para obtener una mayor persistencia de los protozoos en la vagina. Esto se debe a que en el bovino, el ciclo estral tiene una duración de 21 días y el período de mayor susceptibilidad a la infección con *T. foetus* es de aproximadamente 5 días (3 del proestro y 2 del estro). En cambio, en el ratón, el ciclo estral dura entre 5 y 7 días en total, de los cuales 2 días corresponden al proestro y al estro. Luego, se produce una importante infiltración de neutrófilos en la vagina (Allen, 1922).

El modelo de Van Andel fue posteriormente modificado por Soto y col. (2005), quienes lograron reproducir la enfermedad utilizando bajas dosis de estrógenos para inducir el estro, reduciendo así los efectos colaterales generados por dichas hormonas en los órganos reproductores. En este modelo, se utiliza el estradiol para sincronizar el ciclo sexual de las hembras y facilitar así la infección. Estos autores lograron obtener una infección persistente (34 semanas) con una única administración de β -estradiol. También demostraron que la cinética y la patogenia de la infección en el modelo de TB en ratón BALB/c son similares a las que ocurren en la enfermedad del ganado bovino (Monteavaro, 2004). Además, analizaron las relaciones entre el parásito y las células

inmunes del hospedador y reconocieron la fagocitosis de los protozoos por parte de los polimorfonucleares eosinófilos mediante el empleo de la microscopía electrónica (Monteavaro y col., 2005). Utilizando este modelo, también hemos logrado, por primera vez, preñar ratonas BALB/c previamente infectadas con *T. foetus*, tratadas con bajas dosis de estrógenos. En este caso, se estudió la cinética de la tritrichomonosis en el ratón a lo largo de la preñez y se observó que la muerte embrionaria ocurre entre los 5 y 11 días post coito (dpc) en ratonas infectadas, es decir que la mayoría de las pérdidas del *conceptus* se produjeron entre las etapas temprana y media de la preñez (Barbeito y col., 2008). Poco tiempo después, Agnew y col. (2008) también utilizaron un modelo de TB en ratonas BALB/c preñadas para el estudio de la patogenia de la enfermedad. Las lesiones que pueden observarse en ratonas experimentalmente infectadas se asemejan a aquellas descritas en la infección natural en bovinos por Parsonson y col. (1976). Estos hallazgos sugieren que el ratón puede ser un modelo adecuado para el estudio de la patogenia de la enfermedad.

Cuando se utiliza al ratón BALB/c como modelo experimental de enfermedades que provocan muerte embrionaria, se debe considerar que naturalmente existe un 20% de infertilidad por causas genéticas y por factores ambientales (Bronson y col., 1964). El mayor porcentaje de pérdidas embrionarias en esta cepa ocurre en etapas previas a la implantación (desde la fecundación hasta el día 5 de gestación) y en los 3 días posteriores, período que corresponde al reconocimiento materno de la preñez e interacción madre-*conceptus* (Rugh, 1968).

IMPLANTACIÓN Y PLACENTACIÓN EN EL RATÓN

La implantación consiste en la unión entre el embrión y el útero y es el paso previo a la placentación. El momento en el cual la implantación del embrión ha finalizado se denomina nidación.

En el ratón, el blastocisto se implanta en el útero aproximadamente a los 4,5 dpc (Rugh, 1968). En esta especie, la implantación es de tipo excéntrica, es decir que ocurre en una pequeña invaginación de la luz uterina denominada cripta, ubicada del lado antimesometrial del endometrio. Durante los pasos iniciales de la implantación murina, las células del epitelio de las criptas mueren por apoptosis en respuesta a la interacción con el trofoblasto (Parr y col., 1987). Al mismo tiempo, las células trofoblásticas proliferan, e invaden al endometrio. El tejido conjuntivo del endometrio en estos animales responde también a ese trofoblasto altamente invasivo, transformándose en un tejido especializado denominado decidua. Los cambios endometriales que ocurren en respuesta a la implantación constituyen la reacción decidual o decidualización. Esta reacción es particularmente evidente en la placenta de los roedores y de muchos primates, incluyendo al ser humano. La decidua actúa como soporte nutricional del embrión o feto y lo protege de la reacción inmunológica materna. Además, produce hormonas, como la prolactina. Contiene una amplia variedad de células que incluye: células deciduales ricas en glucógeno (diferenciadas a partir de fibroblastos de la lámina propia del endometrio), macrófagos y células *natural killer* (Croy y col., 2006).

En el útero de una ratona preñada, la reacción decidual comienza en la pared antimesometrial, en cada sitio de implantación y a las 48 horas aproximadamente, incorpora a las regiones laterales y a la región mesometrial. A los 6 dpc la luz del útero se

cierra debido a la marcada reacción decidual. Las células deciduales rodean entonces a cada *conceptus*.

La decidua antimesometrial alcanza su desarrollo máximo hacia el 10° dpc. Luego regresa y forma la *decidua capsularis*. La región de la decidua que se encuentra en relación al mesometrio se denomina decidua mesometrial. Ésta alcanza su máximo desarrollo el día 12 de la gestación y comienza a regresar el día 14. En ese momento pasa a denominarse *decidua basalis*. Esta última es la zona de la decidua más desarrollada (Figura 2) y persiste hasta el final de la preñez (Gu y col., 1994).

Se denomina trofoblasto a la capa celular más externa del blastocisto. Las células trofoblásticas tienen las siguientes funciones:

- Transportan nutrientes y oxígeno al feto.
- Remueven productos de desecho.
- Producen y secretan hormonas y otras proteínas placentarias.
- Conforman una barrera física entre las circulaciones materna y fetal.
- Son el sitio de contacto entre el sistema inmune materno y el *conceptus*.
- Participan en la transferencia de inmunoglobulinas maternas hacia el feto.
- Fagocitan glóbulos rojos para adquirir hierro.

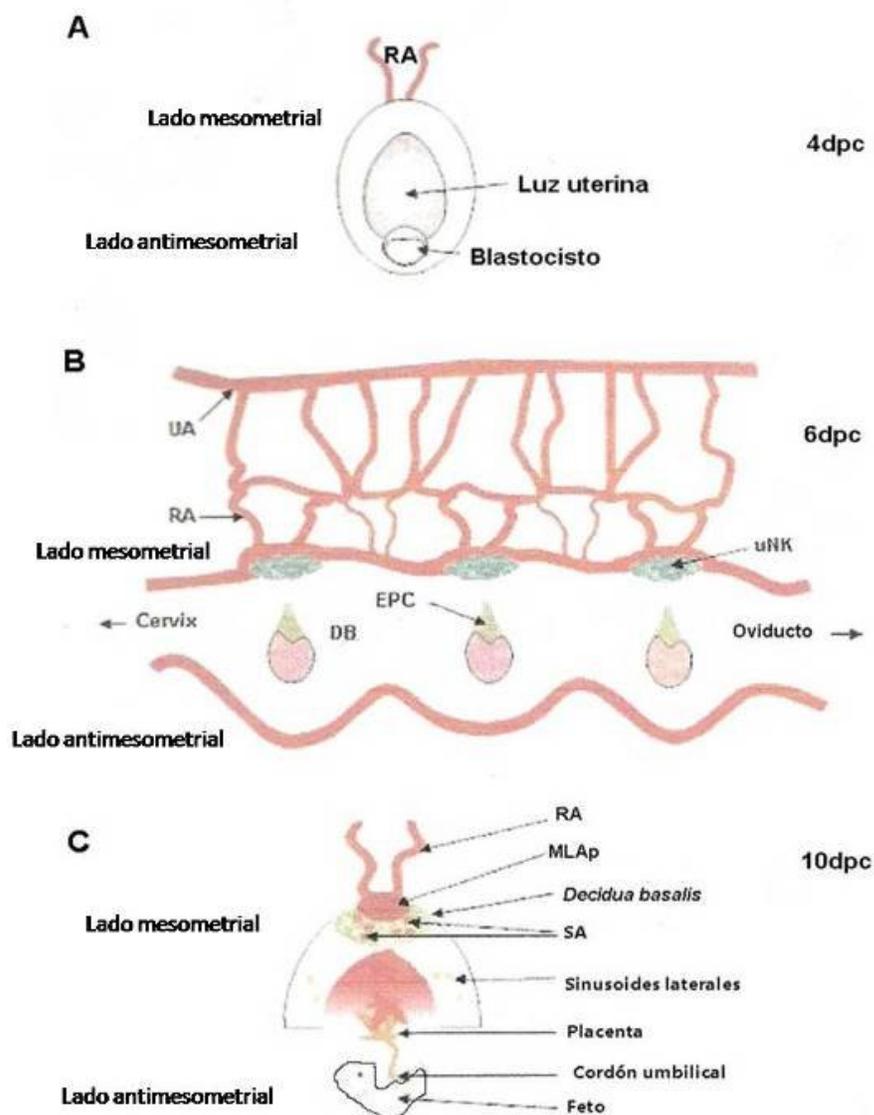


Figura 2: Primeros cambios en el útero murino asociados a la implantación y a la preñez. Las ramas de la arteria uterina (UA) denominadas arteria radial (RA) y arterias espirales (SA) ingresan al útero del lado mesometrial. A) El blastocisto se implanta en la pared antimesometrial del útero al 4° dpc. B) Se ilustran 3 sitios de implantación correspondientes a los 6 dpc. Se observa el cono ectoplacentario constituido por células trofoblásticas (EPC), que corresponde al primordio de la placenta. C) Se muestra un sitio de implantación de la etapa media de la gestación (10 dpc). Dpc: días post coito. DB: *decidua basalis*. uNK: células *natural killer* uterinas. MLAp: triángulo mesometrial. (Modificado de Croy y col., 2006).

La placenta es un órgano transitorio formado por tejidos embrionarios o fetales y tejidos maternos, que permite intercambios fisiológicos, produce numerosas hormonas y minimiza las posibilidades de rechazo del embrión por el sistema inmune materno.

Durante los primeros estadios del desarrollo, en los roedores aparece un tipo de placenta denominada vitelina invertida (Figura 3), en la que no participa el corion. Posteriormente, se desarrolla una placenta de tipo corioalantoidea, que es la variedad definitiva (Stewart y col., 2000). Según la distribución de las vellosidades coriónicas, la placenta corioalantoidea del ratón es de tipo discoidea (Figura 3). El corion está constituido por el trofoblasto y tejido mesenquimático derivado de la hoja parietal del mesoderma extraembrionario.

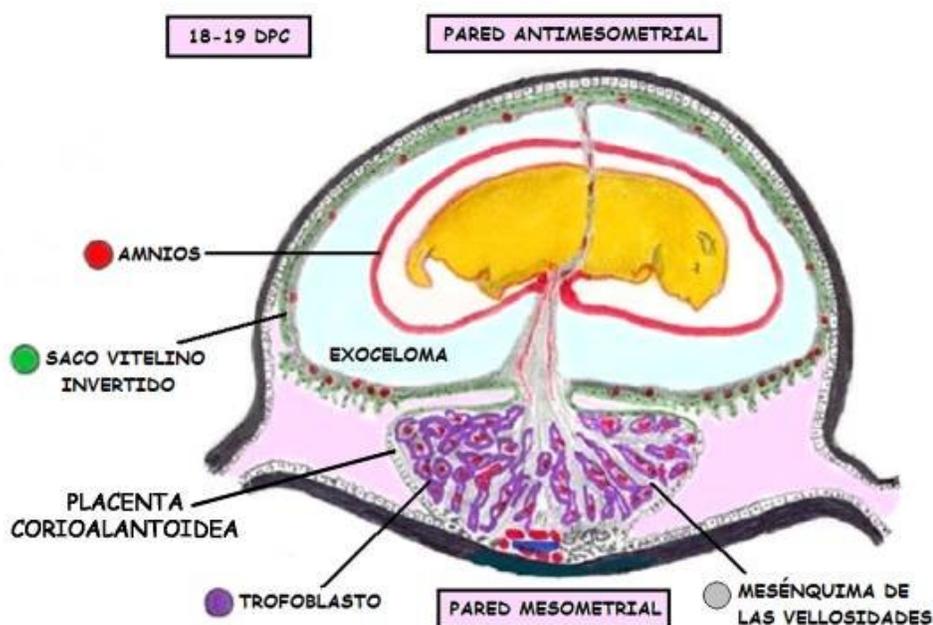


Figura 3: Placenta de ratón en una gestación de 18-19 días. El anexo embrionario más externo es el saco vitelino, que en el ratón rodea al saco fetal y constituye parte de la placenta vitelina invertida. Las vellosidades coriónicas quedan restringidas a una pequeña zona conformando la placenta corioalantoidea de tipo discoidea. Dpc: días post coito.

La clasificación histológica de las placentas se basa en la cantidad de capas que conforman la barrera placentaria entre la sangre materna y la sangre fetal. De acuerdo con esta clasificación, la placenta murina es de tipo hemocorial porque se pierden todas las capas maternas y existe contacto directo del epitelio coriónico (trofoblasto) con el lecho sanguíneo materno. Pese a que en las placentas hemocoriales la sangre materna contacta siempre con el trofoblasto, el número de capas de trofoblasto que separan la sangre materna de la fetal es variable. En el ratón y la rata existen tres capas de trofoblasto en contacto con la sangre materna (placenta trihemocorial), a diferencia de lo que ocurre en la placenta humana y del cobayo en las que solamente una capa de trofoblasto contacta con la sangre (monohemocorial) (Moffet y Loke, 2006). Esta característica coloca a la placenta murina en un sitio intermedio entre la placenta humana y la placenta sinepiteliocorial de los rumiantes.

En resumen, las capas que presenta la barrera placentaria murina, desde el feto hacia la madre, son las siguientes:

- 1) Endotelio de los vasos fetales. Estos vasos provienen del alantoides.
- 2) Mesénquima: constituye el mesoderma extraembrionario del alantoides.
- 3) Tres capas de trofoblasto.

La sangre materna baña a las vellosidades coriónicas, formadas por tejido mesénquimático rodeado de células trofoblásticas, en algunos casos pueden observarse vasos maternos.

Luego de la implantación, el trofoblasto prolifera y se diferencia en 3 zonas:

- 1) El ectoderma extraembrionario: delimita el exoceloma y se expande para originar el corion, anexo extraembrionario que posteriormente va a formar parte del laberinto placentario.

- 2) El cono ectoplacentario: originado a partir de las células trofoblásticas que recubren al embrioblasto en el estadio de blastocisto.
- 3) Las células gigantes: son células poliploides que se originan por endorreducción, es decir, que replican su ADN pero no realizan mitosis. Derivan de las células más externas del cono ectoplacentario y rodean por completo al *conceptus*.

A los 8,5 dpc, el alantoides se fusiona con el corion y constituyen la membrana corioalantoidea. Luego, en el epitelio del corion comienzan a aparecer pliegues que marcan los sitios donde se van a introducir los vasos sanguíneos fetales provenientes del alantoides (Rossant y Cross, 2001). Posteriormente, el corion junto a los vasos mencionados comienzan a experimentar una extensa ramificación para formar la zona de la placenta denominada laberinto (Figura 4).

Mientras se desarrolla el laberinto, entre éste y la decidua, existe una zona de soporte estructural que se denomina espongiotrofoblasto. Esta zona de la placenta deriva del cono ectoplacentario y, junto a las células gigantes, producen hormonas, como el lactógeno placentario, factores angiogénicos y metaloproteinasas. Los vasos sanguíneos maternos, que provienen de la decidua, atraviesan el espongiotrofoblasto para llegar al laberinto. Durante su trayecto por el espongiotrofoblasto, el endotelio es reemplazado por tres capas de células trofoblásticas (placenta trihemocorial) (Rossant y Cross, 2001).

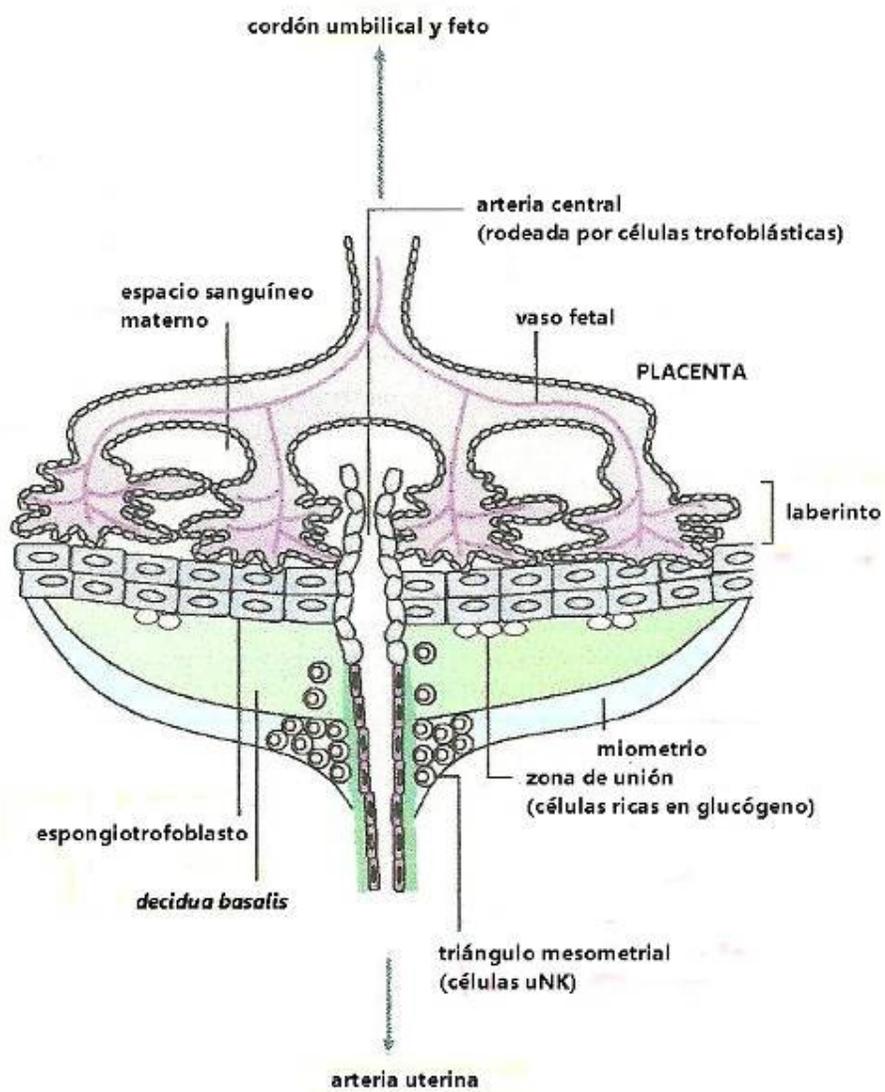


Figura 4: Placenta de ratón a los 13 dpc. (Modificado de Moffet y Loke, 2006).

PRINCIPALES ACONTECIMIENTOS DEL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL RATÓN

Días de gestación	Acontecimiento
1	Embrión de 1 a 2 células en la ampolla de la trompa uterina.
2	Embrión de 2 a 16 células (mórula) en tránsito a través del oviducto hacia el útero.
3	La mórula ingresa al útero. Comienza a formarse el blastocele.
4	Ruptura de la zona pelúcida y eclosión del blastocisto. Los blastocistos se encuentran libres en el útero.
4,5	Implantación. Se diferencian el embrioblasto y el cono ectoplacentario o trofoblástico.
5	El embrioblasto se curva hacia el blastocele. Se forman la cavidad proamniótica y la línea primitiva. Gastrulación. Aparecen las células gigantes.
6	Finaliza la implantación. Inicio del desarrollo de los anexos extraembrionarios. Reacción decidual.
7	Pliegues amnióticos. Desarrollo del corazón.
7,5	Néurula temprana. Aparece la placa neural. Lordosis embrionaria. Desarrollo del alantoides, exoceloma y cavidad amniótica. Comienza la diferenciación de las somitas.

8	Aparece la membrana de Reichert. Aparece el arco visceral I. Somitas 1 a 4.
9	Arco visceral II. Somitas 5 a 12. Inicio de la placentación. El embrión comienza a revertir la lordosis. Desarrollo del hígado.
9,5	Somitas 21 a 25. Migración de las células germinales primordiales. Desaparece la línea primitiva. Inicio del desarrollo de miembros, pulmones, riñones y cola.
10	Arco visceral III. Somitas 26 a 28. Desarrollo del tracto gastrointestinal.
11	Somitas 29 a 42. Hernia umbilical. Inicio del desarrollo del páncreas. Aparecen el meso y metanefros.
12	Somitas 43 a 48. Continúa la organogénesis.
13	Somitas 49 a 60. Diferenciación del cerebro. Circulación activa y completa. Histogénesis de las gónadas.
14	Somitas 61 a 63. 9,6 mm de longitud. Retrocede la hernia umbilical. El metanefros comienza a ser funcional. Diafragma completo.
15	Somitas 64 a 65. Desarrollo de folículos pilosos.
16	Todas las somitas formadas. Osificación. 16 mm de longitud. Estadio fetal.
17	Los anexos extraembrionarios alcanzan su máximo desarrollo.
19 a 20	Nacimiento.

Traducido y adaptado de Rugh, 1968.

PROLIFERACIÓN Y MUERTE CELULAR DURANTE LA IMPLANTACIÓN Y LA PLACENTACIÓN MURINA

El embrión murino se implanta en el útero a los 4,5 dpc. Durante la adhesión inicial entre el blastocisto y el epitelio uterino, las células epiteliales que se encuentran cercanas al embrión experimentan muerte celular por apoptosis (Parr y col., 1987). La muerte celular del epitelio es inducida por las células del trofoblasto (Schlafke y Enders, 1975). Luego, el trofoblasto prolifera y comienza a invadir el endometrio hasta alcanzar la sangre materna. Las células del epitelio uterino y las células deciduales regulan la invasión trofoblástica por medio de la inducción de la muerte celular.

Una vez que ha finalizado la implantación, ocurren la regresión y la reorganización de la decidua. La decidua antimesometrial, que es la primera en formarse, también es la primera en degenerar y, finalmente, se convierte en una delgada capa de tejido (*decidua capsularis*). La muerte celular ocurre más tarde en la decidua mesometrial (*decidua basalis*), la cual se vuelve más delgada en la medida que progresa la preñez (Bell, 1983). La regresión de la decidua se debe a la muerte por apoptosis de las células deciduales, la cual ocurre en momentos diferentes y con distinta intensidad en las dos zonas de decidua (Gu y col., 1994).

Correia-da-Silva y col. (2004) demostraron, mediante inmunohistoquímica, que desde el inicio de la decidualización hasta el día 12 post coito, las células deciduales de rata son intensamente positivas para el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). Luego del día 12 de gestación, la marcación disminuye abruptamente. Por otro lado, utilizaron las técnicas de TUNEL e IHQ anti-caspasa 3 activa para detectar las células apoptóticas. Encontraron células positivas en la decidua mesometrial a partir del día 12 post coito, las cuales aumentaron hacia los días 14 a 16. En la decidua antimesometrial,

observaron células apoptóticas a partir del día 12, mientras que a partir del día 13 post coito, encontraron neutrófilos y detritos celulares, lo que indica también la presencia de necrosis en esta región.

Durante la gestación, el balance entre la proliferación y la muerte celular es esencial para la implantación del blastocisto y el mantenimiento de la preñez.

INMUNOLOGÍA DE LA GESTACIÓN

La inmunología de la gestación es un área de la inmunología cuyo objetivo principal es descifrar los mecanismos por los cuales una preñez llega a término con éxito sin que el sistema inmune materno rechace al embrión o feto. El embrión o feto y sus anexos son considerados como un semi-aloinjerto porque presentan antígenos tanto de origen materno como de origen paterno. Estos últimos se comportan como aloantígenos, por tal motivo deberían ser reconocidos como extraños por la madre y, en consecuencia, rechazados. Sin embargo, durante la gestación normal esto no ocurre, a pesar del contacto estrecho que existe entre los antígenos de origen paterno y las células del sistema inmune de la madre. El feto representa un desafío a las reglas inmunológicas del rechazo y es tolerado por el sistema inmune materno. Existen, por lo tanto, varios mecanismos que permiten que el útero gestante sea considerado un sitio inmunoprivilegiado y que el embrión o feto pueda desarrollarse normalmente y concluir con éxito la gestación. En el sistema inmune materno se induce un estado de tolerancia en lugar de desarrollar una respuesta efectora como ocurriría frente a un tumor, una infección parasitaria o un injerto. A diferencia de lo que ocurre en un trasplante de órgano, el útero se encuentra pre-acondicionado para aceptar al blastocisto. Este estado, en el que existe un perfil determinado y específico de citoquinas en el microambiente uterino, se denomina “ventana de implantación” (Chaouat y col., 2002). La ventana de implantación representa el período de máxima receptividad uterina para la implantación del blastocisto (Duc-Goiran y col., 1999).

Los cambios hormonales preceden a la implantación y persisten durante toda la gestación. Los niveles de progesterona regulan negativamente la capacidad citotóxica del sistema reproductor femenino (Piccini y Romagnani, 1996). Las prostaglandinas del

semen también favorecerían una gestación exitosa al promover un estado de inmunosupresión en las mucosas del tracto reproductor femenino (Yranzo, 2004). Existe además, una baja respuesta o anergia hacia los antígenos de histocompatibilidad paternos (Davies, 2007).

El éxito reproductivo de los mamíferos euterios depende de los mecanismos que regulan al sistema inmune materno, potencialmente hostil para el embrión o feto. Durante muchos años, se consideró que en el útero gestante se producía una inmunosupresión local que permitía el desarrollo del *conceptus*. Pero la mayoría de los investigadores prefieren hablar de un estado de tolerancia debido a que la respuesta inmune contra agentes infecciosos no se encuentra afectada durante la gestación.

La gran pregunta que intenta responder la inmunología de la gestación es: ¿Por qué no se induce una respuesta nociva por parte del sistema inmune materno hacia los aloantígenos que el feto hereda del padre? Varios investigadores han intentado responder a este interrogante.

Peter Medawar, premio Nobel de Medicina, es considerado un pionero de los estudios sobre transplante y rechazo. Sus trabajos son la base del conocimiento actual sobre la inmunología de la gestación. En 1953 planteó por primera vez los mecanismos de tolerancia inmune materna hacia el feto, considerando a este último como un semi-aloinjerto (Medawar, 1953).

Los tres mecanismos planteados por Medawar para explicar la ausencia de rechazo de la madre hacia el feto se enumeran a continuación:

- La placenta se comporta como una barrera. Supone que hay una separación física entre la madre y el feto a través de una barrera impermeable y, por lo tanto, no hay contacto directo entre los antígenos fetales y las células del sistema inmune materno.

- El feto es antigénicamente inmaduro, es decir, desde el punto de vista inmunogénico es neutro y no puede estimular a las células inmunes de la madre.
- Las células inmunes maternas son tolerantes. El sistema inmune de la madre es inerte hacia los antígenos fetales.

Si bien en la actualidad se considera que ninguno de los tres mecanismos es totalmente correcto, las hipótesis de Medawar han sido la base para muchas investigaciones.

Hoy se sabe que en realidad no existe una barrera totalmente impermeable al pasaje de células entre la madre y el feto. Incluso, existen células fetales (trofoblásticas) que circulan en el torrente sanguíneo materno. Además, el contacto íntimo entre las células del sistema inmune materno y las células de origen fetal no solo se produce en la interfase materno-fetal, sino que las células fetales migran hacia los linfonodos maternos drenantes en donde presentan los aloantígenos fetales a las células T maternas. Este mecanismo sería importante en la inducción del estado de tolerancia en la madre hacia los antígenos de origen paterno (Yranzo, 2004).

La relación materno-fetal no es simplemente la tolerancia materna hacia un “tejido extraño”, sino que una serie de intrincadas interacciones entre la madre y el feto, mediadas por citoquinas, regulan la inmunidad selectiva y además controlan eventos como la implantación y la vascularización.

Relación Th1/Th2

Desde principios de la década de 1990 el paradigma para explicar la regulación inmune de la gestación fue la relación entre linfocitos CD4⁺ T *helper* 1 (Th1) y T *helper* 2 (Th2) (Wegmann y col., 1993). Según este modelo, las citoquinas producidas por los

linfocitos Th1 y Th2 tienen funciones antagónicas. Las citoquinas Th1 como la interleuquina-2 (IL-2), el interferón-gamma (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) pueden llevar a la muerte embrionaria y/o fetal por activar la inmunidad específica mediada por células. Dichas citoquinas estimulan a los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos y aparecen en concentraciones muy bajas en el útero gestante (Wegman y col., 1993). La respuesta Th1 además, es efectiva en el control de infecciones intracelulares y es indispensable para activar el rechazo de injertos. En contraste, las citoquinas Th2, como IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13, generan un microambiente adecuado y protector para el desarrollo embrionario y fetal. Estas citoquinas, participan en el control de parásitos extracelulares, estimulan la inmunidad mediada por anticuerpos y favorecen la proliferación y función de los polimorfonucleares eosinófilos (Wegman y col., 1993; Saito, 2000). Además, las respuestas en las que participan los linfocitos Th2 protegen del rechazo a los tejidos injertados. En resumen, según la relación Th1/Th2 existen citoquinas beneficiosas para el mantenimiento de la gestación que favorecen el crecimiento fetal y su supervivencia, y citoquinas deletéreas las cuales pueden comprometer la gestación causando la muerte embrionaria o fetal. Durante la preñez, por lo tanto, las citoquinas Th2 inhiben las respuestas Th1, permitiendo un normal desarrollo fetal, pero aumentando la susceptibilidad a ciertas infecciones intracelulares (Wegmann y col., 1993).

La desviación de la respuesta inmune hacia el tipo Th2 está regulada por las hormonas que predominan durante la gestación. La progesterona, por ejemplo, es una de las principales inductoras de IL-10, citoquina beneficiosa para el mantenimiento de la gestación (Entrican, 2002). Por otro lado, dicha hormona inhibe la secreción de TNF- α y la actividad de las células *natural killer* uterinas (uNK). A su vez, las hormonas esteroides tienen un efecto inmunosupresor local no específico. La inducción de un perfil de

respuesta Th2, por acción de la progesterona, evita la activación de una respuesta citotóxica (Margni y col., 2004).

En general, las respuestas Th1 inducen muerte embrionaria o aborto. Por ejemplo, en la neosporosis, enfermedad producida por el protozoo intracelular *Neospora caninum*, se genera un aumento significativo de citoquinas Th1, como el IFN- γ , que sería muy importante en la patogenia del aborto. Esta respuesta inmune es inducida por antígenos del protozoo presentes en las células del hospedador (Quinn y col., 2002).

Por otro lado, muchos de los anticuerpos que se producen durante la gestación son asimétricos y univalentes por presentar una glicosilación asimétrica en una de sus regiones Fab. Esta glicosilación es consecuencia de una modificación postraducciona que consiste en la inserción de un oligosacárido de tipo manosa y está regulada, en forma dosis dependiente, por la IL-6 de origen placentario. Niveles bajos de IL-6 inducen la producción de anticuerpos asimétricos, los cuales protegen a los aloantígenos paternos del feto. Sin embargo, un aumento de IL-6 es deletéreo para la gestación humana y murina por activar a los linfocitos T citotóxicos y promover la producción de anticuerpos simétricos no glicosilados. Los anticuerpos asimétricos son bloqueantes y protectores del antígeno por ser incapaces de desencadenar las respuestas típicas, como la activación del complemento (Margni y Zenclussen, 2001; Zenclussen y col., 2001).

Si bien en la actualidad la relación entre citoquinas Th1 y Th2 se sigue considerando como un factor importante en el mantenimiento de la gestación, limitar el efecto del sistema inmune a esta relación es una sobresimplificación (Margni y Zenclussen, 2001; Chaouat y col., 2002). Esto es porque la relación Th1/Th2 no contempla la importancia de células de la inmunidad innata como las uNK o los macrófagos, ni a las citoquinas producidas por otras poblaciones celulares de origen no inmune como el trofoblasto, las células deciduales y el epitelio uterino. Además, durante

la gestación, ocurren ciertos hechos que son incompatibles con los clásicos paradigmas de la inmunología; la relación materno-fetal no debe compararse con la relación hospedador-parásito, hospedador-tumor, ni hospedador-injerto. Si bien existe cierta tendencia a la inmunosupresión local uterina o a la tolerancia, en determinados momentos de la gestación, especialmente durante la preñez temprana, son necesarias moléculas pro-inflamatorias o incluso, citoquinas Th1. Por ejemplo, en la implantación, intervienen moléculas pro-inflamatorias como la IL-11, el factor inhibidor de la leucemia (LIF), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y el IFN- γ . El LIF es producido por las células epiteliales endometriales, las células *natural killer* y las células T, principalmente células Th2 (Piccini y col., 1998). Esta citoquina parece ser indispensable para permitir la implantación y participa también en la creación del estado de tolerancia (Stewart y col., 1992; Kimber, 2005; Zenclussen y col., 2006^a). Los ratones *knock out* deficientes en LIF son fértiles, sus embriones son normales, pero no pueden implantarse en el endometrio (Stewart y col., 1992). El TGF- β es producido no solo por células del sistema inmune sino también por la decidua y el trofoblasto (Entrican, 2002). El IFN- γ a bajas concentraciones estimula la secreción del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en el trofoblasto y es necesario para una vascularización exitosa; sin embargo, a altas dosis, es abortígeno (Chaouat y col., 2002). Además, se demostró que los ratones *knock-out* genéticamente deficientes en las interleuquinas de tipo Th2 no presentaron alteraciones en la preñez, sugiriendo que las citoquinas Th2 no son esenciales para la preñez normal (Svensson y col., 2001) y que las células Th1 aloreactivas estarían reguladas de otra manera, por ejemplo por las células T reguladoras (Treg), un tipo especial de linfocitos T (Zenclussen, 2005).

Células T reguladoras

Las células Treg fueron descritas inicialmente como una subpoblación especializada de linfocitos T, responsable de la prevención de las reacciones autoinmunes por suprimir, activamente, la acción de los linfocitos autoreactivos (Sakaguchi y col., 1995). Estas células también tienen un rol importante en la tolerancia a órganos transplantados (Kingsley y col., 2002). Además, cumplen con funciones centrales en la inmunoregulación porque inhiben: la proliferación y la producción de citoquinas en las células T CD4⁺ y T CD8⁺, la producción de inmunoglobulinas en las células B, la actividad citotóxica de las células *natural killer* y la maduración de las células dendríticas, lo que en conjunto resulta en la inducción de un estado de tolerancia (Sakaguchi, 2005). El gen maestro para la diferenciación de las células Treg es el gen del factor de transcripción *forkhead box P3* (*foxp3*), fundamental para el desarrollo y las funciones de estas células (Sakaguchi y col., 2006).

Las células Treg se diferencian y maduran en el timo, pero además pueden tener un origen extra-tímico a partir de células T *náive*, luego de la exposición a antígenos en la periferia (Apostolou y col., 2002).

Las células Treg también están presentes en el útero gestante, donde generan un microambiente privilegiado que impide el rechazo inmunológico del embrión (Zenclussen, 2005; Zenclussen y col., 2006^a). El número de células Treg aumenta inmediatamente luego del establecimiento de la gestación en el útero de mujeres y ratonas normales. Luego de encontrarse en el tracto genital femenino con antígenos paternos presentes en el semen, la población de células Treg específicas se expande en los linfonódulos. Posteriormente, estas células migran hacia la interfase materno-fetal donde producen elevados niveles de moléculas protectoras (Zenclussen, 2006). Las células Treg se mantienen elevadas durante toda la gestación y comienzan a descender hasta alcanzar

niveles basales 7 días después del parto (Aluvihare y col., 2004; Zenclussen y col., 2005^a; Schumacher y col., 2007). En ratonas preñadas, las células Treg específicas hacia los antígenos paternos proliferan en los linfonódulos que drenan el útero 3 días luego del coito. Estas células Treg específicas, rápidamente se dirigen hacia el útero gestante y proliferan en él, lo que resulta en la inducción de un estado de tolerancia hacia los antígenos paternos durante la preñez temprana (Saito y col., 2010). Las células Treg protegen a las estructuras fetales del “ataque” de las células inmunes maternas y promueven un microambiente transitorio y tolerante en la interfase materno-fetal (Zenclussen y col., 2006^a). La deficiente actividad de estas células durante la gestación, conduce a la pérdida del *conceptus*. En un modelo murino de aborto bien establecido¹, las células Treg se encuentran disminuidas en número y función (Zenclussen, 2005). Se ha demostrado además, que la transferencia de células Treg, provenientes de ratonas normales preñadas, en ratonas predispuestas al aborto, pudo prevenir completamente el rechazo (Zenclussen y col., 2005^a).

Se han postulado varios mecanismos por los cuales las células Treg inducen tolerancia. Como se mencionó anteriormente, las células Treg que participan en el mantenimiento de la gestación, son específicas para los antígenos MHC paternos. Este hallazgo indica que su función es proteger a las células fetales que contienen este tipo de antígenos del rechazo por parte del sistema inmune materno (Schumacher y col., 2007). En el modelo murino de aborto inmunológico, pudo determinarse que la transferencia de células Treg en ratonas preñadas predispuestas al aborto induce el aumento de ciertas citoquinas como TGF- β y LIF. Ambas sustancias poseen un efecto modulador sobre la expresión de algunos genes regulados por la progesterona. También aumenta la

¹ El modelo de aborto espontáneo en ratones, consiste en el apareamiento entre una hembra de la cepa CBA y un macho de la cepa DBA/2. Esta cruce específica genera, aproximadamente, un 35% de pérdida de los fetos de la camada (Clark y col., 2004). Este es un modelo genético de pérdida fetal en ratones muy utilizado en estudios de inmunología de la gestación.

expresión de hemoxigenasa-1 (HO-1), una enzima involucrada en la prevención del rechazo fetal (Zenclussen y col., 2006^a). Además, luego de la transferencia de Treg se produce un aumento de la secreción de IL-10 y su bloqueo resulta en un incremento de la cantidad de abortos (Schumacher y col., 2007).

Células T *helper* 17

Como se mencionó anteriormente, existen distintas subpoblaciones de linfocitos T; los más conocidos y mejor caracterizados son los Th1, Th2 y Treg. Recientemente se ha descrito una nueva subpoblación denominada T *helper* 17 (Th17) y caracterizada por la producción de una citoquina pro-inflamatoria, la IL-17. Las células Th17 murinas presentan una vía de señalización única, caracterizada por el factor de transcripción ROR γ t (*related orphan receptor*), que participa en la expansión de esta población celular y es fundamental para su reconocimiento. En las células Th17 humanas, el factor de transcripción que regula su diferenciación se denomina RORC (*retinoid orphan nuclear receptor C*) (Wang y col., 2010^a). Las células Th17 son potentes inductores de inflamación tisular y están relacionadas con la patogenia de ciertas enfermedades autoinmunes, respuestas de hipersensibilidad y rechazo de aloinjertos (Korn y col., 2009). Estas células son siempre efectoras y no se diferencian a células de memoria. La diferenciación de Th17 estaría mediada por IL-23 y TGF- β cuando actúan bajo determinadas condiciones (Yujing y col., 2007). Estas células además, están involucradas en la eliminación de organismos patógenos que no son controlados adecuadamente por las células Th1 o Th2. El principal rol de las células Th17 es proteger de las infecciones producidas por hongos y bacterias extracelulares (Aujla y col., 2007). Las funciones de las células efectoras Th17, al igual que la de las células Th1 y Th2, se encuentran

reguladas por las células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ descritas anteriormente (Saito y col., 2010).

En el contexto de la preñez murina, las células productoras de IL-17 se localizan en las glándulas endometriales y en la decidua *basalis* a partir del día 6,5 de preñez hasta el día 10,5. Alrededor del día 12,5, la decidua es negativa para la marcación de IL-17, sugiriendo que el número de células Th17 disminuye luego del día 12,5 en la interfase materno-fetal (Ostojic y col., 2003).

Wang y col. (2010^a) demostraron que la proporción de células Th17 en la sangre periférica y en la decidua fue significativamente mayor en muestras provenientes de pacientes con abortos recurrentes inexplicables que en aquellas extraídas de mujeres con embarazos normales. Estas observaciones sugieren que las células Th17 podrían tener un rol clave en el rechazo fetal inmunológico.

Las células Th17 y Treg foxp3⁺ comparten algunas vías en su diferenciación. Ambas subpoblaciones celulares se diferencian a partir de precursores T CD4⁺, pero su diferenciación final depende del perfil de citoquinas del microambiente. Bajo la influencia de TGF- β , las células T CD4⁺ *naïve* originan células Treg, mientras que cuando son expuestas a TGF- β junto con la citoquina pro-inflamatoria IL-6 se diferencian a células Th17 (Veldhoen y col., 2006). En la patogenia de ciertas enfermedades autoinmunes se describe un desbalance entre células Th17 y Treg (Lohr y col., 2006), así como en la pre-eclampsia, uno de los desórdenes más prevalentes asociados al embarazo en humanos (Saito y col., 2011). Como se mencionó anteriormente, las células Treg son fundamentales para el normal desarrollo del embrión o feto. La secreción de IL-17 puede ser inhibida por las células Treg. Esta acción supresora de las células Treg sobre las células Th17 disminuyó en pacientes con abortos espontáneos recurrentes (Wang y col.,

2010^a). Así, el desbalance Treg/Th17 influye en el mantenimiento de la gestación (Wang y col., 2010^b).

Hemooxigenasa-1

Las hemooxigenasas (HOs) son enzimas microsomales que degradan el grupo hemo a bilirrubina y CO evitando la acumulación de hemo libre, el cual es citotóxico. Además, la bilirrubina y la biliverdina tienen funciones antioxidantes y protectoras, y el CO es un metabolito intermedio que estimula la relajación de los vasos sanguíneos (Zenclussen y col., 2007). Las HOs son enzimas citoprotectoras que tienen un rol importante en la aceptación de injertos (Soares y col., 1998). En mamíferos, se identificaron 3 isoformas de HOs (HO-1, HO-2 y HO-3). HO-1 puede ser inducida por diversos factores incluyendo algunas citoquinas pro-inflamatorias de tipo Th1, radiación ultravioleta, estrés oxidativo e hipoxia. En cambio, HO-2 es inducible en la placenta y la decidua y HO-3 tendría un rol regulador en los procesos celulares dependientes del grupo hemo (Zenclussen y col., 2003^a).

La hemooxigenasa-1 (HO-1) es una importante enzima protectora de la gestación que se expresa en las células endoteliales y en el trofoblasto. Previene la acumulación de grupos hemo libres que podrían ser perjudiciales para el *conceptus* (Zenclussen y col., 2011). La disminución de la expresión de HOs, especialmente de HO-1, lleva a un aumento de grupos hemo libres en la interfase materno-fetal, con lo cual aumentan los daños oxidativos, las moléculas de adhesión celular y la migración de las células inflamatorias (Vachharajani y col., 2000; Zenclussen y col., 2003^a; Zenclussen y col., 2005^b). Su expresión disminuye en la placenta y en la decidua de ratones y humanos que sufren aborto mediado por células y citoquinas Th1. Esto sugiere un importante rol protector de las hemooxigenasas en el mantenimiento de la gestación. En el modelo

murino de aborto resultante del apareamiento entre una hembra de la cepa CBA y un macho de la cepa DBA/2, los niveles de HO-1 en la interfase materno-fetal se encuentran disminuidos (Zenclussen y col., 2005^b).

Las células Treg inducen un aumento en la producción de HO-1 protectora en la decidua y la placenta (Zenclussen y col., 2006^a). Schumacher y col. (2012) observaron que el bloqueo de HO-1 anula el efecto protector de las células Treg. Además, la estimulación de HO-1 por medio de la terapia génica previene el rechazo fetal (Zenclussen y col., 2006^b).

Indolamina 2,3 dioxigenasa

La indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO) es una enzima que cataboliza al triptófano. Este aminoácido es un factor de crecimiento para los linfocitos T, fundamental para su activación y proliferación (Mellor y Munn, 2001). Se ha comprobado que durante la gestación aumenta la expresión de IDO en el trofoblasto y en la decidua, específicamente en las células trofoblásticas gigantes, macrófagos y células dendríticas presentadoras de antígenos. La expresión de IDO en las células mencionadas es estimulada por las células Treg (Fallarino y col., 2003). Por otra parte, por la acción de IDO, disminuyen los niveles de triptófano y se produce la anergia de los linfocitos T potencialmente perjudiciales para el mantenimiento de la gestación. (Munn y col., 1998). Por lo tanto, las células que expresan IDO son capaces de suprimir las respuestas T locales para promover la tolerancia inmune en diversas condiciones (King y Thomas, 2007). Sin embargo, en apareamientos murinos en los que ambos progenitores eran genéticamente deficientes en IDO, las preñeces resultaron completamente normales (Baban y col, 2004).

IDO no solo ha sido estudiada como una enzima protectora de la gestación sino que existen evidencias que también representa un importante mecanismo de control

inmune. La depleción local de L-triptófano, que resulta de la actividad enzimática, podría permitirle al hospedador inhibir el desarrollo de varios agentes patógenos *in vivo*. La actividad de IDO se encuentra incrementada en algunas condiciones patológicas, como por ejemplo, la infección con *Toxoplasma gondii* (Fujigaki y col., 2002).

Algunos autores sugieren un mecanismo alternativo en el cual los responsables de la acción inmunosupresora de IDO serían los metabolitos resultantes del catabolismo del triptófano y no las bajas concentraciones del aminoácido. Estas especulaciones se basan en los resultados de estudios *in vitro* que muestran que ciertos metabolitos del triptófano inhiben la proliferación de las células T (Frumento y col., 2002).

Otros mecanismos

Además de los mecanismos mencionados anteriormente, algunas células trofoblásticas y los tejidos fetales en ciertas especies, como los bovinos y los ovinos, no expresan antígenos de histocompatibilidad (MHC) clase I clásicos durante la gestación. En bovinos, la excepción a esta afirmación son los diplocariocitos que son células trofoblásticas binucleadas. Sin embargo, en ratones, la mayoría de las células trofoblásticas que entran en contacto directo con los linfocitos maternos expresan antígenos de histocompatibilidad clase I clásicos (Entrican, 2002). Los antígenos de histocompatibilidad clase I clásicos se encuentran presentes en todas las células nucleadas del organismo en la vida posnatal e inician respuestas de tipo citotóxicas activando a los linfocitos T CD8⁺. A pesar de la presencia de células T citotóxicas en la circulación materna, con receptores específicos que reconocen a los aloantígenos de origen paterno, el feto no es rechazado (Saito y col., 2007).

Los antígenos de histocompatibilidad clase II actúan en la iniciación de respuestas de tipo T CD4⁺ ya sean efectoras o de colaboración. Las células trofoblásticas murinas no

expresan antígenos clase II, evitando así la iniciación de este tipo de respuestas (Entrican, 2002).

Otro mecanismo involucrado en la protección del *conceptus* es el sistema Fas/FasL. Fas (CD95) y FasL (ligando Fas) son dos proteínas que se expresan en las membranas de las células. Al producirse la unión entre ambas moléculas se activa una vía de señalización que induce la apoptosis en la célula que posee Fas. El trofoblasto expresa FasL y los linfocitos T maternos su receptor Fas. La unión entre el ligando y el receptor desencadena la apoptosis de los linfocitos T, eliminando de esta manera a las células que reaccionarían contra el trofoblasto (Bamberger y col., 1997). Otras moléculas pro-apotóticas, como la galectina-1, podrían contribuir a ese fenómeno de privilegio inmunitario de la placenta (Yranzo, 2004).

Las células dendríticas también se incluyen en el grupo de células productoras de citoquinas importantes para la relación materno-fetal (Blois y col., 2005).

Células *natural killer* uterinas

Las células *natural killer* (NK) son un tipo especializado de linfocitos que se encuentran en la intersección entre la inmunidad innata y la inmunidad adquirida. Participan en la protección inmune temprana y sus principales funciones son la inducción de la lisis celular y la producción de citoquinas tales como el IFN- γ . En las hembras adultas de varias especies, incluyendo al ser humano, una subpoblación de células NK, denominadas uNK, aparece en el endometrio en determinadas fases del ciclo estral o menstrual y en la gestación temprana. Estas células son la principal población de células linfocíticas que se encuentran en el útero gestante y a diferencia de las funciones inmunológicas de las restantes células NK, las uNK tienen funciones especializadas en el establecimiento y mantenimiento de una gestación normal. Las uNK han sido estudiadas

en detalle en la decidua del ser humano, el ratón, la rata y el cerdo (Hunt y col., 2000; Wegman y col., 1993; Welsh y Enders, 1993; Croy y col., 2009).

Durante la preñez normal del ratón, se diferencian abundantes células uNK en los sitios de implantación (Peel, 1989). Estas células son muy importantes durante la primera mitad de la gestación en esta especie porque regulan la iniciación de los cambios estructurales en las arterias maternas de los sitios de implantación y el subsecuente desarrollo de la placenta. Las funciones de las células uNK durante la preñez murina han sido descubiertas gracias al uso de ratones *knock out*. Los ratones deficientes en células uNK presentan sitios de implantación anormales, los vasos arteriales poseen paredes gruesas y diámetros lumenales reducidos, la decidua presenta una escasa celularidad y hay una disminución marcada en el tamaño de la placenta (Croy y col., 2006).

Las células uNK producen citoquinas inmunomoduladoras como el IFN- γ (Ashkar y Croy, 1999), IL-18 e IL-27 (Croy y col., 2003). Una de sus principales funciones es regular la invasión trofoblástica del endometrio durante la implantación, limitándolo para evitar una invasión excesiva (Hunt y col., 2000). Además, remueven células trofoblásticas aberrantes (Stewart, 1991), también sintetizan y secretan TGF- β que inhibe a los linfocitos T que reconocen a los antígenos paternos.

Una de las primeras funciones que se describió para las células uNK fue la colaboración en la separación de los tejidos maternos y fetales en el momento del parto (Croy, 1994). Sin embargo, Hunt y col. (2000) postulan que no participarían en la facilitación del parto, debido a que en la decidua de una preñez a término estas células se encuentran debilitadas y ya no son funcionales.

Las células uNK producen el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y óxido nítrico (ON). Ambas sustancias poseen funciones angiogénicas y son importantes para el desarrollo vascular durante la gestación temprana. El ON, además, es

vasodilatador. Mediante la secreción de estas sustancias y del IFN- γ , las células uNK contribuyen a la angiogénesis en el endometrio, especialmente en la decidua, e inducen la modificación de las arterias espirales. Esta modificación de las arterias durante la preñez se caracteriza por la reducción del espesor de la túnica media por migración de las células musculares lisas y la dilatación de la luz vascular para aumentar el flujo sanguíneo hacia la placenta.

Las células uNK presentan características diferentes a las de otras localizaciones. Estas células se originan a partir de células pluripotenciales de la médula ósea (*stem cells*) y están ausentes en el útero no gestante. Chantakru y col. (2002) observaron que los progenitores de las células uNK migran desde los linfonódulos y el bazo hacia el útero en cada preñez. La maduración de las células uNK es inducida en el útero, durante la reacción decidual y consiste en la proliferación celular y el desarrollo de los gránulos citoplasmáticos. La IL-15 se expresa en el tejido conectivo del endometrio entre los días 6 y 11 de la gestación y es la principal citoquina que regula la diferenciación de las células uNK (Croy y col., 2003). Al 5° día de gestación, las uNK diferenciadas comienzan a observarse en la decidua mesometrial (*decidua basalis*) de cada sitio de implantación (Zheng y col., 1991^a; Zheng y col., 1991^b; Croy y col., 1997). En la medida que la gestación avanza estas células proliferan, y aumentan de tamaño, llegando a medir entre 40 y 100 μm de diámetro. El número de gránulos citoplasmáticos y el diámetro de las uNK son utilizados por varios autores como indicadores de maduración (Peel, 1989; Ashkar y col. 2000; Chantakru y col., 2001). Las grandes uNK granulares se acumulan en una zona denominada triángulo mesometrial, “agregado linfoideo mesometrial de la preñez” (*MLAp*) o “glándula metrial” (*metrial gland*) (Croy, 1999). A los días 8-10 de la gestación, las uNK se hacen muy numerosas. Hacia el día 12 su número comienza a declinar y el día 13 solo están presentes en el triángulo mesometrial (Moffet y Loke, 2006). A partir del día 15, sus gránulos se reducen en cantidad y tamaño y

posteriormente las células mueren por apoptosis (Kusakabe y col., 1999). Las células uNK son transitorias porque no se observan en el útero luego del parto (Stewart y Peel, 1980).

Los descubridores de las células uNK del ratón, las llamaron células glandulares granulares metriales o células GMG (Stewart y Peel, 1977), debido a la presencia de abundantes gránulos citoplasmáticos que permiten su fácil reconocimiento con la técnica histoquímica del Ácido Peryódico-Schiff (PAS) (Peel, 1989; Chantakru y col., 2001). Posteriormente, la lectina DBA (*Dolichos biflorus*) que no solo marca los gránulos citoplasmáticos, si no también la membrana plasmática de estas células, ha sido ampliamente adoptada para su detección (Paffaro y col., 2003). La lectina DBA se une específicamente a residuos terminales de N-acetilgalactosamina (GalNAc). No existen células positivas a DBA en los órganos linfohemopoyéticos de ratonas vírgenes o con 0,5-7 días de gestación, excepto en la decidua. Esto demuestra la especificidad de la marcación con DBA en células uNK e implica que la decidua es un ambiente único que induce esta especificidad en la diferenciación celular terminal de las uNK (Bianco y col., 2008).

Las células uNK descritas en el ratón y en el ser humano no se observan en el útero gestante de rumiantes. Sin embargo, otro tipo de células, los linfocitos T $\gamma\delta$ CD8⁺, podrían tener las mismas funciones (Entrican, 2002). Los linfocitos T $\gamma\delta$ CD8⁺ intraepiteliales son una subpoblación de linfocitos T que se encuentran en el endometrio de ovinos y bovinos, en el área ubicada entre los placentomas (Hansen y Lee, 1996; Entrican, 2002). La localización y el potencial citotóxico de estas células sugieren que son células maternas encargadas de controlar la invasión del trofoblasto en rumiantes (Fox y col., 1998). Estos linfocitos secretan IL-10, IFN- γ y TNF- α , y son incapaces de reconocer antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (Hansen, 1995; Entrican, 2002).

Mastocitos

Los mastocitos o células cebadas son células del sistema inmune con funciones efectoras e inmunoreguladoras, que intervienen tanto en respuestas mediadas por IgE, como en ciertas respuestas inmunes innatas y adaptativas. Los mastocitos derivan de células progenitoras hematopoyéticas que circulan por la sangre como células progenitoras inmaduras y se diferencian a mastocitos maduros localmente, en los tejidos vascularizados o en las cavidades serosas (Kitamura, 1989). En su citoplasma, contienen abundantes gránulos metacromáticos, fácilmente distinguibles con las técnicas histológicas de Giemsa y Azul de Toluidina. Sus gránulos citoplasmáticos almacenan mediadores preformados tales como aminas vasoactivas y proteasas neutras. Además, secretan mediadores pro-inflamatorios derivados de lípidos cuya producción, a diferencia de los anteriores, es inducida y no constitutiva. Estos últimos, resultan del metabolismo del ácido araquidónico e incluyen a las prostaglandinas y a los leucotrienos.

Los mastocitos constituyen una importante fuente de citoquinas tanto para el crecimiento y la diferenciación de otras poblaciones celulares, como para la regulación de la inflamación y la reparación tisular (Crivellato y col., 2005). Algunas de sus funciones son: regular la permeabilidad vascular, proteger a las superficies mucosas y regular la contractibilidad del miometrio.

Los mastocitos de diferentes especies presentan características únicas, las cuales a su vez varían en las distintas superficies mucosas del organismo. En humanos, por ejemplo, se distinguen diferentes subpoblaciones de acuerdo al contenido enzimático de sus gránulos.

En el útero de ratonas preñadas, los mastocitos se localizan especialmente en el triángulo mesometrial (Gibbons y Chang, 1972) y en el miometrio, algunos se ubican en el perimetrio y, en raras ocasiones, en la zona externa de la decidua (Widayati y col.,

2004). La ubicación de estas células en el triángulo mesometrial podría estar relacionada con el control de la permeabilidad vascular en el útero. Por otro lado, los mastocitos que se encuentran cerca del músculo liso serían los responsables de regular la contractibilidad del miometrio.

En algunos casos, el aumento en el número de mastocitos en el útero está asociado con la pérdida de la preñez. Widayati y col. (2004) observaron que, en un modelo de preñez interespecífica en murinos, los mastocitos aumentaron cerca de los embriones xenogénicos que fueron abortados. En otro trabajo, Zenclussen y col. (2003^b) encontraron un aumento en el número de mastocitos en la placenta en el modelo de aborto murino CBA x DBA/2, con respecto a la cruce no predispuesta al aborto CBA x BALB/c. El mayor número de mastocitos fue observado en los sitios de reabsorción indicando que podrían intervenir en el rechazo fetal. Además, se ha demostrado que los mastocitos uterinos del ratón inducen la contractibilidad del miometrio *in vitro* (Rudolph y col., 1992). Corbeil y col. (2005) postulan que la degranulación masiva de los mastocitos durante la gestación temprana podría contribuir al fracaso de la preñez por inducir la contracción del miometrio.

Los estudios acerca de los mastocitos bovinos son escasos. Se sabe que secretan algunos de los mediadores usuales como histamina, leucotrienos, prostaglandinas, heparina y proteinasas, así como citoquinas pro-inflamatorias y citoquinas de tipo Th2 como la IL-4. Con respecto a la función de los mastocitos en la TB, Corbeil y col. (2005) demostraron que la respuesta mediada por anticuerpos de tipo IgE contra los antígenos de *T. foetus* y la liberación de la infección en bovinos están asociadas con la degranulación de estas células.

HIPÓTESIS MÁS RELEVANTES

- 1- La presencia de *T. foetus* en el útero de ratonas genera cambios en la secuencia de carbohidratos del epitelio uterino los cuales dependen del estado de la preñez.
- 2- Las ratonas infectadas con *T. foetus* presentan alteraciones en la respuesta inmune uterina ya sea en el número de células de las distintas poblaciones involucradas como en la expresión de citoquinas.
- 3- La presencia del protozoo y las modificaciones en la respuesta inmune local alteran los índices de proliferación y muerte celular en el epitelio superficial del útero de las ratonas infectadas.
- 4- Los procesos previamente descritos se relacionan con la muerte embrionaria que ocurre en las ratonas infectadas con *T. foetus*.

OBJETIVOS

Objetivos generales

- 1- Estudiar la patogénesis e inmunocaracterización de la muerte embrionaria/fetal ocasionada por *T. foetus* en un modelo murino.
- 2- Generar conocimientos básicos que ayuden a comprender y explicar la muerte embrionaria en los animales y el hombre.

Objetivos específicos

- 1- Describir las características de las lesiones macroscópicas y microscópicas en el útero y en la placenta provenientes de ratonas infectadas con *T. foetus*.
- 2- Determinar cambios en el número y la distribución de los mastocitos y células uNK, en el patrón de unión a las lectinas y en los índices de muerte y proliferación celular en la placenta y el endometrio de las ratonas infectadas con *T. foetus*.
- 3- Detectar y cuantificar la expresión de citoquinas y otras sustancias en la placenta de las ratonas no infectadas y compararlas con los cambios ocurridos en las ratonas infectadas con *T. foetus*.

A partir de los antecedentes descriptos y de las hipótesis planteadas, se analizaron los siguientes aspectos que podrían intervenir en la patogenia de la tritrichomonosis bovina:

Patrón de carbohidratos en las células epiteliales. Si bien se ha determinado que dicho patrón se modifica en la trompa uterina, útero y vagina de los bovinos (Cobo y col., 2004) y en la vagina y el útero de las ratonas infectadas con *T. foetus* (Monteavaro y col., 2008), el presente estudio profundiza las modificaciones que podrían ocurrir en los días cercanos al momento de la muerte embrionaria.

Muerte y proliferación celular en los tejidos maternos. Las modificaciones en el recambio celular de la mucosa uterina podrían ser fundamentales en la patogenia de las alteraciones de la implantación que ocurren en esta enfermedad. Este es un aspecto poco abordado en los estudios sobre tritrichomonosis ya que solamente se han desarrollado trabajos *in vitro* para estudiar la muerte de células bovinas (Singh y col., 1999; Singh y col., 2004).

Cambios en el número y en la distribución de células uNK y mastocitos en los tejidos maternos. Se sabe claramente que estas células intervienen en el mantenimiento o en la pérdida de la preñez (Chaouat y col., 2002; Entrican, 2002; Croy y col., 2003), pero hasta el momento no se ha determinado cómo se comportan en la tritrichomonosis experimental en ratonas.

Expresión de citoquinas en los tejidos maternos y fetales. Como ya se mencionó, numerosas citoquinas intervienen en el mantenimiento de la preñez. En la presente tesis se analiza, mediante *real time* RT-PCR, la presencia del ARNm de algunas citoquinas relevantes en el útero de las ratonas infectadas y controles.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales de experimentación

Para el desarrollo de la presente tesis se utilizaron ratonas BALB/c de 6 a 8 semanas de edad con un peso promedio de 20 a 25 g, del Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Las ratonas fueron alojadas en un cuarto del mencionado bioterio, destinado a animales en experimentación, en cajas con 5 animales cada una. Los animales fueron tratados de acuerdo con las normas internacionales citadas en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (National Research Council, Academy Press, 1996, Washington, USA). Las ratonas se identificaron mediante muescas en el pabellón auricular. La temperatura del recinto se mantuvo en $22^{\circ}\text{C} \pm 2$ con circulación de aire controlado y luz artificial provista con tubos fluorescentes, sin entrada de luz natural. Siendo los ciclos luz/oscuridad de 12hs/12hs. Se utilizó alimento balanceado formulado para rata y ratón con 23% de proteínas, extrusado, disponible *ad-libitum*. El agua clorinada fue controlada diariamente y administrada *ad-libitum*.

Para los estudios de histopatología, lectinahistoquímica e inmunohistoquímica se utilizaron 76 ratonas BALB/c con las características mencionadas previamente. Los animales fueron divididos en dos grupos experimentales: Grupo control (Cb): N=36 y Grupo infectado (Ib): N=40.

Para la cuantificación de citoquinas y otras moléculas se utilizaron 19 animales criados bajo las mismas condiciones que el grupo anteriormente mencionado.

Para este trabajo, se consideraron las fases temprana y media de la gestación (Barbeito y col, 2008), utilizando animales con preñeces de 5 a 8 y 9 a 11 días,

respectivamente. A su vez, para cada etapa se trabajó con un grupo de animales controles y un grupo infectado (Tabla 1).

Tabla 1: Ratonas utilizadas para la cuantificación de citoquinas y enzimas mediante la técnica de *real time* RT-PCR y grupos experimentales.

GRUPOS	FASE TEMPRANA	FASE MEDIA
CONTROL	5	6
INFECTADO	4	4

Sincronización y determinación del estro

Para la sincronización del estro, todos los animales fueron inoculados vía intramuscular con 5 µg de 3-benzoato de β-estradiol (BE) suspendido en 0,1 ml de aceite de sésamo estéril (Estradiol 10, Rio de Janeiro, LAIKA, Argentina) (Monteavaro, 2004).

Para determinar la fase del ciclo estral, se realizaron colpocitologías a las 24 y 48 h posteriores a la administración del BE. La colpocitología consistió en realizar la observación directa de un extendido del contenido vaginal obtenido por lavaje con 10 µl de solución de buffer fosfato estéril (PBS) pH 7,2. Los extendidos se observaron con un microscopio óptico con objetivo de 10X y se identificaron las etapas del ciclo estral conforme a los distintos tipos de células presentes y el predominio de las mismas (Figura 5). Los criterios que se utilizaron para determinar las distintas fases del ciclo estral fueron los siguientes (Allen, 1922):

- Proestro: Predominio de células epiteliales nucleadas, escasas células queratinizadas, escasos leucocitos.
- Estro: Predominio de células epiteliales queratinizadas, ausencia de leucocitos.
- Metaestro: Predominio de células epiteliales queratinizadas plegadas, escasos leucocitos.
- Diestro: Predominio de leucocitos formando conglomerados, moderadas células epiteliales nucleadas.

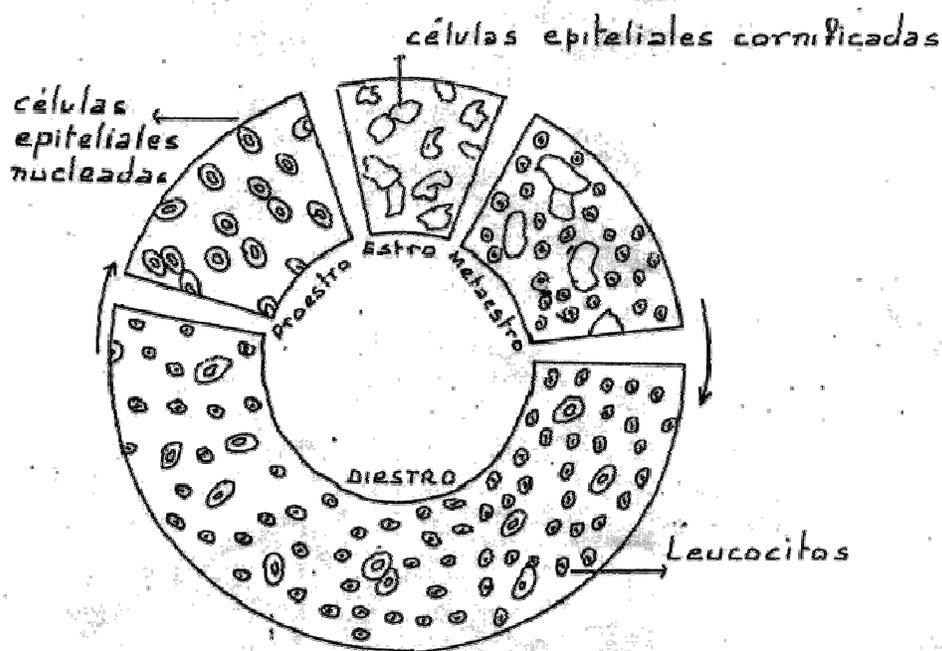


Figura 5: Poblaciones celulares presentes en la citología exfoliativa vaginal durante las diferentes fases del ciclo estral del ratón (Allen, 1922).

Inóculo

Se utilizó una cepa de *T. foetus* obtenida a partir de un cultivo prepuccial de un toro naturalmente infectado, denominada cepa 106 del cepario del Laboratorio de Microbiología Clínica y Experimental, Departamento SAMP, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (Monteavaro, 2004). El cultivo se realizó en el medio de Diamond (TYM) enriquecido con suero equino inactivado a 56°C durante 30 min (Diamond, 1987). La cepa fue mantenida en nitrógeno líquido hasta la realización de los ensayos de caracterización patogénica y la inoculación de los animales. La caracterización se realizó mediante: producción de absceso subcutáneo en ratón BALB/c, producción de hemólisis sobre glóbulos rojos bovinos, ensayos de citoadherencia en células vaginales de ratón y bovino, persistencia de infección intravaginal y pérdida de gestación en ratón BALB/c (Monteavaro, 2004). Esta cepa fue utilizada en diversos trabajos previos (Monteavaro y col., 2005; Monteavaro y col., 2008; Barbeito y col., 2008).

Para la preparación del inóculo, los protozoos fueron subcultivados en 50 ml de caldo TYM a 37°C durante 48 horas, posteriormente lavados 3 veces con solución de PBS estéril pH 7,2 y centrifugados 20 min a 1500g (Barbeito y col., 2008). El sedimento fue resuspendido en PBS y su concentración fue ajustada a 9×10^5 células viables de *T. foetus*/10µl para ser utilizado como inóculo intravaginal (Monteavaro, 2004).

Diseño experimental

Como se mencionó anteriormente, las ratonas fueron sincronizadas pues la sensibilidad a la infección por *T. foetus* es máxima en el estro. La fase del ciclo estral fue determinada mediante colpocitología 24 y 48 h después de la administración de estradiol.

Dos días después de la sincronización del ciclo, las ratonas del grupo infectado (Ib) fueron inoculadas intravaginalmente (IV) con la cepa patógena de *T. foetus* mediante dos dosis de 10 μ l de la suspensión de *T. foetus* con un intervalo de 24 horas. Las ratonas del grupo control (Cb) fueron inoculadas IV con similar volumen de PBS estéril. En todos los casos, las inoculaciones fueron realizadas mediante micropipetas y tips descartables por el mismo operador.

Luego de la infección, se efectuaron semanalmente muestreos para realizar colpocitologías y siembra en el medio TYM. Las muestras se obtuvieron a partir de lavados vaginales con 10 μ l de PBS estéril. Se realizó el extendido del contenido vaginal de cada ratona infectada sobre un portaobjetos limpio, el cual se observó directamente en microscopio óptico con objetivo de 10X. Se pudo confirmar la infección vaginal a partir de la observación directa de protozoos viables o del cultivo de *T. foetus*. Las ratonas fueron consideradas infectadas cuando se observaron protozoos móviles con morfología típica de *T. foetus* en las muestras vaginales (Soto y col., 2005). Las muestras negativas por observación directa fueron sembradas en medio TYM, incubadas durante 7 días a 37°C y observadas cada 24 horas. Luego de 3 observaciones negativas, los animales fueron considerados negativos a la infección vaginal.

A partir de los diez días post-inoculación se realizaron nuevamente colpocitologías a las ratonas de ambos grupos para determinar la etapa del ciclo estral. También se confirmó la presencia del protozoo y la persistencia de la infección en el grupo Ib. Basados en los resultados previos de nuestro laboratorio sobre la cinética de la infección en este modelo (Monteavaro y col., 2008; Barbeito y col., 2008), los animales fueron utilizados para los experimentos a los 15 \pm 3 días post-infección. Las hembras cuyo estro fue confirmado, fueron apareadas con machos BALB/c no infectados. El momento en que se determinó la presencia del tapón mucoso vaginal fue considerado como día 0 de la gestación. A partir del día 5 posterior al apareamiento y hasta el día 11, se sacrificaron

cada día entre 6 y 8 hembras infectadas con sus testigos (Figura 6). En ese momento, los grupos fueron subdivididos según las hembras estuvieran vacías o preñadas.



Figura 6: Representación esquemática del diseño experimental.

Obtención de muestras

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y en la necropsia se extrajeron el útero, oviductos, ovarios, bazo y linfonódulos ílfacos. Estos últimos serán utilizados para estudios futuros.

Con el material fresco y previo a la fijación, se recolectaron muestras de la luz de los cuernos uterinos de las hembras infectadas para corroborar la persistencia de la infección y la viabilidad del protozoo. Este procedimiento consistió en realizar una observación directa de un extendido del contenido uterino obtenido por lavaje con 10 μ l de PBS estéril pH 7,2. Los extendidos se observaron en microscopio óptico con objetivo de 10X.

Uno de los cuernos uterinos fue fijado en formol tamponado al 10% durante 24 horas para realizar técnicas histológicas e histoquímicas. El otro cuerno uterino fue congelado rápidamente en nitrógeno líquido y mantenido a -80°C para estudios de biología molecular (RT-PCR en tiempo real).

Técnicas histológicas

Las muestras fijadas en formol tamponado al 10% durante 24 horas fueron procesadas para su inclusión en parafina de acuerdo con el siguiente protocolo:

- Deshidratación: 1 pasaje en alcohol de 20° por 30 min, 1 pasaje en alcohol 30° por 30 min, 1 pasaje en alcohol 50° por 30 min y posteriormente 1 pasaje en alcohol 70° por 30 min. Luego se realizaron 3 pasajes en alcohol de 96° por 20 min cada uno y finalmente, 3 pasajes en alcohol 100° por 20 min cada uno.
- Aclarado: 2 pasajes en xilol por 20 min cada uno.
- Inclusión: 3 pasajes en parafina por 30 min cada uno.
- Inclusión definitiva: armado de tacos de parafina.

De los tacos de parafina obtenidos, se realizaron cortes de $3\ \mu\text{m}$ de espesor con micrótopo de deslizamiento que se montaron en vidrios positivados o silanizados. En algunos de estos cortes se realizaron técnicas de coloración e histoquímicas tradicionales (Hematoxilina y eosina, PAS y Azul de Toluidina) según los procedimientos de rutina (Bancroft y Stevens, 1990). Se utilizaron otros cortes para realizar las técnicas de lectinas e inmunohistoquímica. Los protocolos de las técnicas realizadas se encuentran detallados en el apartado "Anexo".

Lectinahistoquímica

Las técnicas de lectinahistoquímica se realizaron siguiendo el protocolo habitual de nuestro laboratorio para muestras de placenta y tracto reproductor femenino (Fernández y col., 1998; Fernández y col., 2000; Cobo y col., 2004; Sant'Ana y col., 2005) y que se detalla:

Los cortes fueron desparafinados en xilol, lavados en etanol, incubados con peróxido de hidrógeno al 0,3% en metanol absoluto para bloquear la peroxidasa endógena e hidratados y lavados en PBS pH 7,4. Luego, las muestras se incubaron con albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma, St. Louis, MO, USA) 0,1% en PBS y posteriormente con las distintas lectinas (Lectin Kit BK 1000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) en cámara húmeda a 4°C durante toda la noche. Los cortes fueron lavados nuevamente en PBS e incubados con el complejo LSAB. Luego de tres lavajes en PBS de 5 min, se procedió al revelado con una solución comercial de 3-3'diaminobenzidina (DAB) (Dako Laboratories, Carpinteria, CA, USA) durante 2 a 5 min a temperatura ambiente. Como coloración de contraste se utilizó hematoxilina de Meyer. Por último, los cortes fueron deshidratados en una batería de etanol de graduación creciente, aclarados en xilol y montados con bálsamo sintético.

Las lectinas biotiniladas que se emplearon fueron: DBA (*Dolichos biflorous*), Con-A (*Concanavalia ensiformis*), RCA-1 (*Ricinus communis*), UEA-1 (*Ulex europaeus*), PNA (*Arachis hypogaea*), WGA (*Triticum vulgaris*), SBA (*Glycine max*). La afinidad de las lectinas utilizadas se presenta en la Tabla 2. La concentración para todas las lectinas fue 30 µg/ml en BSA 0,01%, excepto para PNA cuya concentración fue 10 µg/ml en BSA 0,01%. En todos los casos se utilizaron cortes de tejidos controles que fueron sometidos a todo el procesamiento excepto la incubación con la lectina. Este control permitió determinar la existencia de falsos positivos. Los tejidos controles positivos fueron cortes

provenientes de muestras cuyo patrón de unión a lectinas había sido comprobado en experimentos anteriores.

La observación de los cortes se realizó con microscopio óptico y objetivo de 45X. La intensidad de marcación con las diferentes lectinas fue establecida subjetivamente utilizando la siguiente escala (Monteavaro y col., 2008):

- 0 = negativo
- 1 = débilmente positivo
- 2 = moderadamente positivo
- 3 = fuertemente positivo

Los protocolos completos de las técnicas realizadas se encuentran detallados en el apartado "Anexo".

Tabla 2: Lectinas utilizadas en este trabajo.

GRUPO	NOMBRE DE LA LECTINA	ABREVIATURA	ESPECIFICIDAD
Manosa	<i>Concanavalin A</i>	ConA	β -D-Man; α -D-Glc
GlcNAc	<i>Wheat germ agglutinin</i>	WGA	α -D-GlcNAc; NeuNAc
Fucosa	<i>Ulex europaeus agglutinin-1</i>	UEA-1	α -L-Fuc
Galactosa/ GalNAc	<i>Dolichos biflorous agglutinin</i>	DBA	α -D-GalNAc
	<i>Ricinus communis agglutinin- 1</i>	RCA-1	β -D-Gal; α -D-Gal
	<i>Peanut agglutinin</i>	PNA	β -D-Gal; (1-3) GalNAc
	<i>Soy bean agglutinin</i>	SBA	α -D-GalNAc; α y β -Gal

Man: manosa; Glc: glucosa; GlcNAc: N-acetilglucosamina; NeuNAc: ácido N-acetil neuramínico; Fuc: fucosa; GalNAc: N-acetilgalactosamina; Gal: galactosa.

Inmunohistoquímica

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) es una proteína nuclear de 29 Kda que participa en varias vías moleculares responsables de la vida y la muerte celular. El PCNA es considerado un marcador útil para la evaluación de la proliferación celular (Hall y col., 1990) porque es esencial para la replicación al permitir una firme asociación entre las ADNpolimerasas y el ADN (Moldovan y col., 2007) y prevenir la disociación enzima-ADN (Maga y col., 2003).

La técnica de inmunohistoquímica se realizó sobre cortes de tejidos parafinados para determinar PCNA y cuantificar la proliferación celular en el epitelio uterino (Correia-

da-Silva y col., 2004). El índice de proliferación (IP) se obtuvo aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{IP} = \frac{\text{Células positivas para PCNA}}{\text{Total de células epiteliales}}$$

Para reconocer las células en apoptosis en el epitelio uterino, decidua y tejidos embrionarios se utilizó la inmunodetección de caspasa-3 activa (Correia-da-Silva y col., 2004). La caspasa-3 ha sido caracterizada como la principal enzima efectora vinculada a la apoptosis (Yuan y Horvitz, 2004).

El índice de muerte celular por apoptosis (IMC) se obtuvo aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{IMC} = \frac{\text{Células positivas para Caspasa-3}}{\text{Total de células epiteliales}}$$

En todos los casos, se utilizaron tejidos controles negativos a los que se les realizaron todos los procedimientos excepto la incubación con el anticuerpo primario, para determinar la existencia de falsos positivos.

Para cada grupo estudiado, se calculó la media \pm desvío estándar de los índices de proliferación y muerte celular. La significación de las diferencias entre los grupos se estableció mediante el test de ANOVA y el test *post hoc* de Tukey (Sokal y Rohlf, 1980).

Los protocolos de las técnicas realizadas se encuentran detallados en el apartado "Anexo".

Recuentos celulares

Células uNK

Las células uNK fueron marcadas mediante la técnica de PAS y con la lectina DBA. Tras la observación de 40 campos microscópicos por corte transversal del cuerno uterino con objetivo de inmersión 100X, se determinó el promedio de uNK por campo y luego la media \pm desvío estándar por grupo. La significación de las diferencias entre los grupos control e infectado para cada día se estableció mediante el test de "t" y ANOVA. En los casos en que el test de homogeneidad fue significativo ($p < 0,05$), los datos fueron transformados con el método de la raíz cuadrada [$\sqrt{(x+1)}$]. Sin embargo, como las varianzas tampoco fueron homogéneas, se realizaron test no paramétricos (Mann Whitney y Kruskal Wallis) y el test de comparaciones múltiples de Dunn (Sokal y Rohlf, 1980).

Mastocitos

Se utilizó la coloración con azul de Toluidina para identificar a los mastocitos en los cortes de cuernos uterinos. Se contaron 10 campos microscópicos de miometrio y 5 campos microscópicos de mesometrio por animal, con objetivo de 40X. Se determinó el promedio de mastocitos por campo y se calculó la media \pm desvío estándar por grupo. La significación de las diferencias entre los grupos se estableció mediante el test de "t" y ANOVA. En los casos en que el test de homogeneidad fue significativo ($p < 0,05$), los datos fueron transformados con el método de la raíz cuadrada [$\sqrt{(x+1)}$]. Sin embargo, como las varianzas tampoco fueron homogéneas, se realizaron test no paramétricos para el análisis (Mann Whitney y Kruskal Wallis) y el test de comparaciones múltiples de Dunn (Sokal y Rohlf, 1980).

RT-PCR en tiempo real

Los órganos congelados a -80°C fueron tratados con Trizol (Invitrogen, Darmstadt, Alemania) (1 ml cada 100 mg de tejido) y macerados utilizando un homogeneizador (Ultra-Turrax T25; IKA, Staufen, Alemania). El aislamiento del ARN mensajero (ARNm), la síntesis del ADN complementario (ADNc), y la RT-PCR fueron realizados en el laboratorio de Ginecología y Obstetricia Experimental, Universidad Otto-von Guericke, Magdeburg, Alemania, según métodos estandarizados (Zenclussen y col., 2005^a). Las reacciones de amplificación para *foxp3*, *HO-1*, *IL-4*, *IL-10* y *TNF α* se realizaron con 1 μl de ADNc, 3 μl del primer mix, 2,25 μl de agua destilada estéril libre de ARNasa, 0,5 μl de la sonda fluorescente y 6,25 μl de TaqMan® Universal PCR Master mix el cual contiene buffer para PCR, desoxirribonucleótidos (dNTPs), MgCl_2 y Ampli-Taq ADN polimerasa. En el caso de *IDO* y *ROR γ t*, se utilizaron 1 μl de ADNc, 3 μl del primer mix, 2 μl de agua destilada estéril libre de ARNasa, 0,5 μl de fluoresceína y 6,5 μl de SYBR® Green PCR Master mix (Applied Biosystems, Weiterstadt; Alemania) para la detección de los productos de la PCR.

La PCR comenzó con un paso de desnaturalización de 3 min a 95°C seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 94°C y 1 min a la temperatura apropiada para cada caso. Todas las reacciones fueron realizadas en el iCycler (Bio-Rad, Munich, Alemania). Todas las muestras fueron normalizadas con respecto a su concentración de ARNm de β -actina (*house keeping gene*). Las secuencias de primers y sondas se encuentran detalladas en el apartado “Anexo”.

Tratamiento estadístico de los datos obtenidos mediante la técnica de real time RT-PCR

Los datos de RT-PCR en tiempo real no presentaron una distribución normal. Por lo tanto, las diferencias estadísticas entre el grupo control y el grupo infectado fueron determinadas mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. Para el análisis de los datos se utilizó el programa de estadística Graph Pad Prism5 (Graph Pad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Los valores de $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

CAPÍTULO 1: HALLAZGOS DE NECROPSIA E HISTOPATOLOGÍA

OBJETIVO ESPECÍFICO

- Describir las lesiones macroscópicas y microscópicas en el útero y en la placenta provenientes de ratonas infectadas con *T. foetus*.

HIPÓTESIS

- En el modelo experimental de tritrichomonosis en ratonas BALB/c, los cambios macro y microscópicos se relacionan con la muerte embrionaria que ocurre en esta enfermedad.

RESULTADOS

La infección con *T. foetus* en ratonas produce muerte embrionaria

Las hembras BALB/c preñadas, infectadas con *T. foetus* y sacrificadas tanto en la fase temprana (5 a 8 dpc) como en la fase media (9 a 11 dpc) de su gestación sufrieron severas pérdidas embrionarias. Los sitios de muerte embrionaria fueron identificados macroscópicamente por su pequeño tamaño y aspecto hemorrágico o necrótico, en comparación con las implantaciones normales de las hembras del grupo control (Tabla 3).

El 72% de las hembras del grupo control (26 animales) estaban preñadas en el momento del sacrificio y las vesículas embrionarias eran normales. En el 28% restante (10 animales) no se observaron vesículas embrionarias a pesar de haber presentado tapón mucoso luego del apareamiento.

En el grupo infectado, solo el 27,5% de las hembras estuvieron preñadas al momento del sacrificio (n=11). Sin embargo, algunas de ellas presentaron cambios patológicos en la placenta y decidua. El 72,5% de las hembras infectadas sufrió la pérdida del *conceptus* (n=29). Las diferencias en el porcentaje de hembras preñadas entre ambos grupos, control e infectado, fueron significativas ($p < 0,001$) (Figura 7) sugiriendo que la pérdida embrionaria en el grupo infectado estuvo relacionada con la presencia de *T. foetus*.

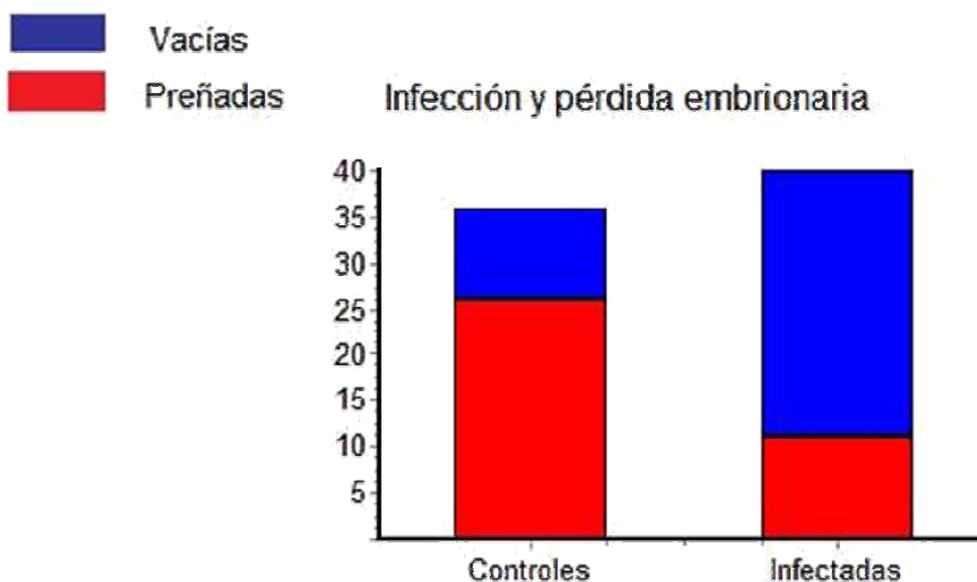


Figura 7: Relación de hembras preñadas en los grupos control e infectado. Los datos se analizaron estadísticamente mediante el test de Chi cuadrado. $P < 0,001$.

La mayoría de los animales del grupo infectado en los que persistió la infección hasta el sacrificio presentaron muerte embrionaria. Las restantes hembras con infección persistente estaban preñadas en el momento del sacrificio, pero presentaban algunas

vesículas embrionarias macroscópicamente normales y otras pequeñas y de aspecto hemorrágico o edematoso (Figura 8b). Trece hembras del grupo infectado fueron negativas cuando se obtuvieron muestras de la luz de los cuernos uterinos para corroborar la persistencia de la infección con *T. foetus*. Dentro de este grupo de ratonas que se negativizaron a la infección, seis tuvieron gestación normal al momento de la necropsia (Figura 8a) y siete estaban vacías (Tabla 3). En tres de las hembras vacías y negativas, los cuernos uterinos eran rosados, de aspecto normal, pero en las cuatro restantes presentaban signos de congestión o edema.

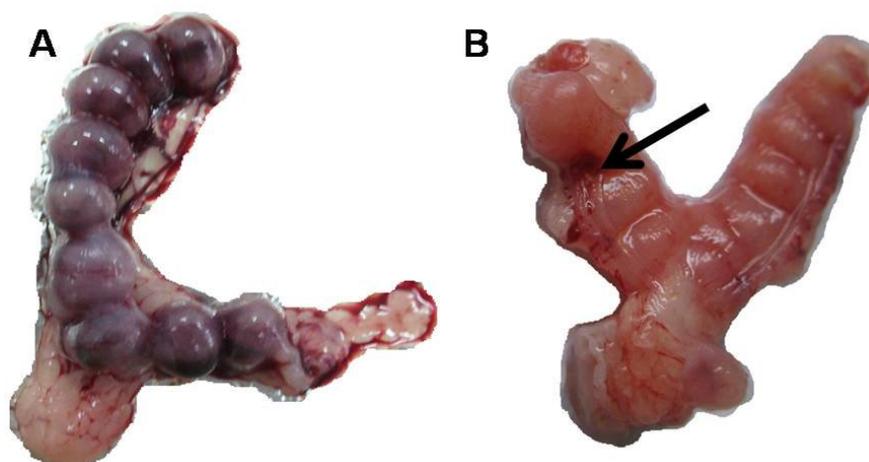


Figura 8: La infección con *T. foetus* produce muerte embrionaria. a) Útero de una ratona normal del grupo control, sacrificada a los 10 dpc. b) Útero de una ratona del grupo infectado, sacrificada a los 10 dpc. La flecha señala el área hemorrágica de reabsorción.

La mayoría de las ratonas positivas a *T. foetus* perdieron la gestación y presentaron las lesiones típicas de la infección que se detallan más adelante. Algunas ratonas positivas a *T. foetus* sacrificadas 5, 6 y 8 dpc presentaron vesículas embrionarias normales junto con reabsorciones y cambios patológicos en la placenta. A partir del 9° dpc no se observaron ratonas preñadas con infección persistente (positivas a *T. foetus*).

Aquellas que presentaron preñeces normales en el momento de la necropsia, fueron negativas para *T. foetus* (Tabla 3).

Estos datos demuestran que la persistencia de la infección, con parásitos viables, se correlaciona con la muerte embrionaria.

Tabla 3: Persistencia de la infección y pérdida embrionaria en el grupo de ratonas infectadas.

DPC	VACÍAS		PREÑADAS	
	<i>T. foetus</i> +	<i>T. foetus</i> -	<i>T. foetus</i> +	<i>T. foetus</i> -
Día 5	4		1	
Día 6	4		3	1
Día 7	3			1
Día 8	1	3	1	3
Día 9	5	3		
Día 10	2	1		1
Día 11	3			
TOTAL	22 (55%)	7 (17,5%)	5 (12,5%)	6 (15%)

DPC: días post coito.

Hallazgos histopatológicos

En todas las edades gestacionales estudiadas, el principal cambio observado en el útero de las ratonas infectadas fue la presencia de abundante infiltrado de células inflamatorias a base de neutrófilos, eosinófilos, linfocitos, macrófagos y células plasmáticas (Figuras 9a, b y f). En el miometrio y en el perimetrio se localizaron mastocitos (se analizará en el Capítulo 4). También fue un hallazgo notable la gran cantidad de células en apoptosis en los epitelios luminal y glandular del endometrio y en la lámina propia (Figuras 9c y d, Figuras 10a y b). La apoptosis se confirmó mediante IHQ para caspasa-3 activa. A partir del 8° dpc las glándulas endometriales estaban dilatadas y con abundante exudado purulento, detritos celulares (Figuras 9a-c) y protozoos en el lumen (Figura 9e). Algunas glándulas presentaban solución de continuidad en el epitelio con salida del contenido hacia la lámina propia (Figuras 9a y b). En la lámina propia se observaron acúmulos celulares de forma nodular. Con mayor magnificación se comprobó que estaban constituidos por neutrófilos, linfocitos y macrófagos. Las células uNK eran escasas y pequeñas. Los hallazgos histopatológicos en el grupo de ratonas infectadas se resumen en la Tabla 4.

En las secciones de los cuernos uterinos que incluyeron reabsorciones no se detectaron estructuras embrionarias ni anexos extraembrionarios, pero se encontraron células uNK, algunas de ellas estaban en apoptosis.

Las ratonas infectadas sacrificadas 8, 9 y 10 dpc negativas a *T. foetus*, presentaron cuernos uterinos macroscópicamente normales en el momento de la necropsia. Sin embargo, en los cortes histológicos de sus cuernos uterinos, se observó abundante infiltrado de células polimorfonucleares en la lámina propia, células apoptóticas y metaplasia epitelial.

Ningún animal del grupo control presentó respuesta inflamatoria ni otros cambios patológicos cuando se analizaron los cortes provenientes de sus cuernos uterinos.

En las hembras que se negativizaron y no sufrieron pérdidas del *conceptus* se detectaron estructuras embrionarias y anexos extraembrionarios como el amnios y el saco vitelino. Además, en el laberinto placentario y en la decidua se observaron abundantes células uNK de gran tamaño, en su mayoría no apoptóticas, con abundantes gránulos citoplasmáticos refringentes y algunas de ellas binucleadas.

Tabla 4: Hallazgos histopatológicos en el grupo de ratonas infectadas.

	Lesiones	DPC						
		5	6	7	8	9	10	11
Epitelio luminal	Metaplasia							
	Apoptosis							
	Vacuolización							
Glándulas endometriales	<i>T. foetus</i> en la luz							
	Dilatación							
	Exudado purulento							
	Solución de continuidad							
Lámina propia	Edema							
	Apoptosis							
	Infiltrado inflamatorio							
	Vasos hiperémicos							
Miometrio	Infiltrado inflamatorio							

DPC: días post coito.

Referencias de los colores utilizados:

	ausente
	leve
	moderado
	abundante

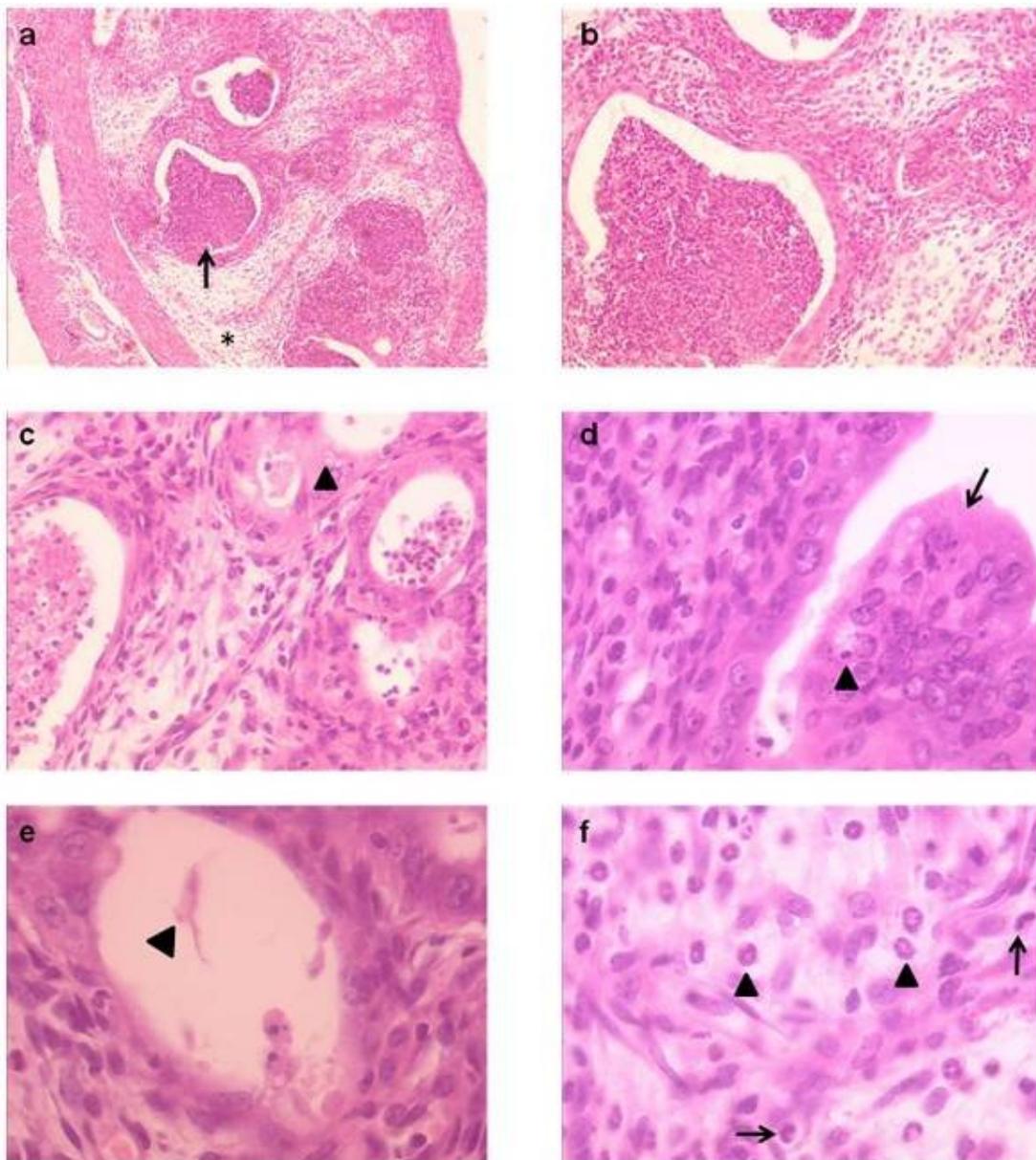


Figura 9: Microfotografías de cortes transversales de los cuernos uterinos de ratonas infectadas con *T. foetus*, vacías, sacrificadas a los 8 dpc. a) Células inflamatorias y edema (asterisco) en la lámina propia. Exudado inflamatorio en la luz glandular y solución de continuidad en el epitelio (flecha). HE 100X. b) Mayor detalle de a). HE 400X. c) Células inflamatorias en la lámina propia, exudado en la luz glandular y apoptosis de las células epiteliales glandulares (punta de flecha). HE 400X. d) Apoptosis (punta de flecha) y metaplasia (flecha) en el epitelio uterino. HE. 400X. e) *T. foetus* en la luz glandular (punta de flecha). Nótese también los protozoos adheridos al epitelio glandular. HE. 400X. f) Infiltrado inflamatorio en la lámina propia. Se observan neutrófilos (punta de flecha), eosinófilos (flecha) y macrófagos. HE. 400X.

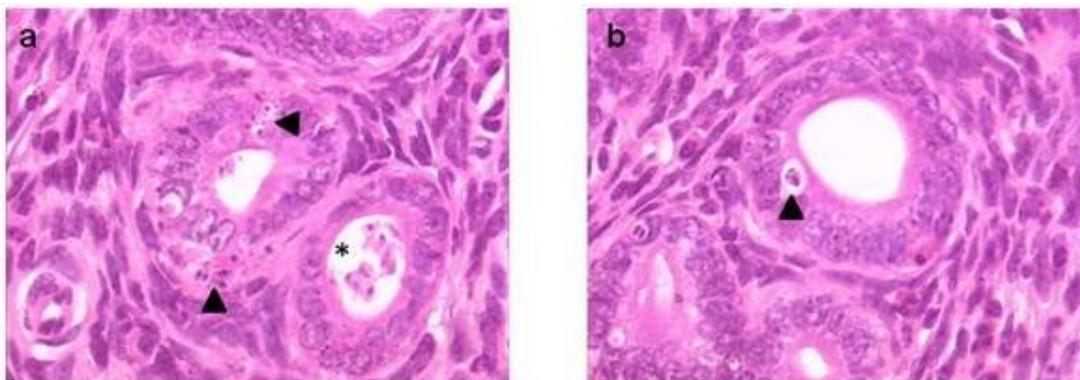


Figura 10: Microfotografías de cortes transversales de cuernos uterinos de ratonas infectadas con *T. foetus*, vacías, sacrificadas a los 9 dpc. a) *T. foetus* en la luz glandular (asterisco). Células apoptóticas en el epitelio glandular (puntas de flecha). HE. 400X. b) Células apoptóticas en el epitelio glandular (punta de flecha). Nótese la acidofilia característica de las células en apoptosis. HE 400X.

DISCUSIÓN

Considerando que la principal manifestación clínica de la TB es la infertilidad por pérdida del *conceptus*, resulta de interés profundizar los estudios sobre la patogenia de la muerte embrionaria temprana en el modelo murino de la enfermedad. En trabajos previos hemos logrado la preñez de ratonas BALB/c infectadas con *T. foetus* (Barbeito y col., 2008), en las cuales se producen cambios y lesiones que mimetizan aquellas ocurridas en el bovino infectado. En el presente trabajo se corrobora nuevamente que *T. foetus* se adhiere a las células epiteliales y causa endometritis y muerte embrionaria en el modelo experimental de ratonas BALB/c.

En este trabajo, se observó que el 72% de las hembras del grupo control y solo el 27,5% de las hembras del grupo infectado estuvieron preñadas al momento del sacrificio. Las pérdidas del *conceptus* en los animales infectados ocurrieron entre la etapa temprana y media de la preñez. En un trabajo previo, encontramos que el 81,7% de los animales del grupo control desarrolló preñez normal mientras que en el grupo infectado, solo el 32,6% de las hembras estaban preñadas (Barbeito y col., 2008). Las diferencias con los resultados obtenidos en esta tesis pueden deberse al mayor número de animales utilizado en el citado trabajo. Además, si se considera solo la fase temprana y media, los valores encontrados previamente se aproximan a los obtenidos en la presente tesis ya que el 79% de las hembras controles estaban preñadas al momento del sacrificio y el 21% restante no presentaba signos de preñez. Los resultados que obtuvimos en el modelo murino de TB coinciden con los de Parsonson y col. (1976) y BonDurant (1985) en bovinos. Estos autores observaron que la interrupción de la preñez en los bovinos infectados con *T. foetus* ocurre también, principalmente, en la etapa temprana de la gestación.

En las ratonas infectadas sacrificadas durante la etapa temprana de la gestación, hubo evidencia de muerte embrionaria aunque sin cambios inflamatorios como los observados en etapas posteriores. Este resultado sugiere algún mecanismo patogénico que no involucra daño tisular directo, por ejemplo, cambios en las moléculas responsables de la adhesión celular entre el trofoblasto y el epitelio uterino. En los animales sacrificados a partir del 6° dpc en adelante, la pérdida del *conceptus* estuvo asociada con la infiltración de células inflamatorias como neutrófilos, eosinófilos, linfocitos, macrófagos y células plasmáticas. La mayoría de las hembras que abortaron presentaron lesiones exudativas en las glándulas endometriales, con dilatación, degeneración epitelial y edema periglandular. Las lesiones encontradas en el grupo infectado fueron similares a las descritas en ratonas estresadas infectadas con *T. foetus* (Rutkowski y Harmsen, 2007), en ratonas infectadas no preñadas y no estresadas (Monteavaro y col., 2008) y en bovinos infectados con el protozoo (Parsonson y col., 1976).

A pesar de las diferencias anatómicas e histológicas que existen entre las placentas bovina y murina, estos resultados demuestran que la infección experimental con *T. foetus* en ratonas preñadas, provoca la pérdida de la preñez de manera similar a lo que ocurre en el bovino.

Algunas ratonas con preñeces mayores a los 6 dpc se negativizaron para *T. foetus*. Estos resultados permiten especular que existe una importante respuesta inmune local uterina hacia el protozoo y que esos cambios pueden llevar a pérdidas del *conceptus* en algunas ocasiones, aunque pueda obtenerse la liberación de la infección y finalizar la preñez en otras. Debido a que tanto la infección con *T. foetus* como la preñez ocurren en el mismo sitio, la continuidad o interrupción de la misma probablemente dependa del balance o equilibrio entre el protozoo y el microambiente uterino. En este

balance intervienen factores como la patogenicidad de la cepa y la respuesta inmune del hospedador.

CAPÍTULO 2: LECTINAHISTOQUÍMICA.

OBJETIVO ESPECÍFICO

- Determinar cambios en el patrón de unión a lectinas en los epitelios glandular y luminal del endometrio de las ratonas infectadas con *T. foetus*.

HIPÓTESIS

- La presencia de *T. foetus* en el útero de ratonas genera cambios en la secuencia de carbohidratos de los glicoconjugados del epitelio uterino los cuales dependen del estado de la preñez.

RESULTADOS

El patrón de unión a las 7 lectinas utilizadas en los cuernos uterinos de las ratonas BALB/c infectadas y controles se encuentra resumido en la Tabla 5. La composición de carbohidratos en el endometrio de los animales infectados con *T. foetus* evidenció diferencias al compararlos con las muestras de las ratonas del grupo control.

El patrón de unión a lectinas fue analizado en dos sitios de las secciones histológicas: el epitelio luminal del endometrio y el epitelio de las glándulas endometriales tubulares. En cada uno de los epitelios estudiados, se analizó el patrón de unión de las lectinas en el glicocálix apical y el citoplasma. Esta última región corresponde a los gránulos de secreción provenientes del complejo de Golgi.

Las lectinas PNA y SBA con afinidad por la N-acetilgalactosamina y la β -D-galactosa, evidenciaron cambios importantes en los epitelios luminal y glandular del endometrio de las ratonas infectadas en todas las edades gestacionales estudiadas cuando se compararon con los tejidos de las ratonas controles (Figuras 11a-d).

Las demás lectinas utilizadas en este trabajo tuvieron resultados variables de acuerdo a la edad gestacional y la estructura analizada. La afinidad por la lectina ConA fue mayor a los 6 dpc en el epitelio luminal del útero en el grupo infectado (Figuras 12a y b). En el caso de WGA, RCA-1, UEA-1 y DBA, los resultados fueron más heterogéneos. Por ejemplo, a los 8 dpc WGA generó una débil marcación en el citoplasma de los epitelios luminal y glandular en el grupo infectado, mientras que la marcación fue más intensa al día 10 (Figuras 12c y d). A los 6 dpc, el patrón de unión a WGA no presentó diferencias entre los grupos infectado y control. En el citoplasma de las células epiteliales, la marcación con RCA-1 fue más intensa en el grupo infectado a los 6 dpc (Figuras 13a y b). Sin embargo, cuando se analizaron los epitelios de los animales sacrificados a las edades gestacionales de 8 dpc y de 10 dpc, la marcación con RCA-1 no presentó diferencias entre ambos grupos. El epitelio endometrial del grupo control no presentó marcación con la lectina UEA-1, excepto en los animales no preñados (aquellos que presentaron tapón mucoso post coito pero no poseían vesículas embrionarias en el momento del sacrificio), sacrificados 10 dpc, los cuales se marcaron con una intensa positividad. Los animales infectados con *T. foetus* sacrificados a los 8 y 10 dpc y que perdieron el *conceptus* mostraron una moderada marcación positiva en los epitelios luminal y glandular (Figuras 13c y d). A los 6 dpc, el epitelio uterino de los animales infectados se marcó débilmente con la lectina DBA, mientras que en el grupo control esta lectina no reaccionó. Los epitelios luminal y glandular de las ratonas controles sacrificadas 8 y 10 dpc fueron débilmente positivos a DBA, mientras que en las ratonas infectadas no existió afinidad (Figuras 14a y b). La lectina DBA es un útil marcador para

las células uNK (Paffaro y col., 2003). Esta lectina nos permitió detectar e identificar a las células uNK en la decidua *basalis* y el triángulo mesometrial en las ratonas preñadas (Figura 14c). Estas células también fueron marcadas con la lectina SBA (Figura 14d).

DPC: días post coito.

*: No hay datos del día 6 post coito porque no se encontraron indicios de preñez en los cortes de útero que fueron sometidos a LHQ.

Referencias de los colores utilizados:

	0 = negativo
	1 = débilmente positivo
	2 = moderadamente positivo
	3 = fuertemente positivo

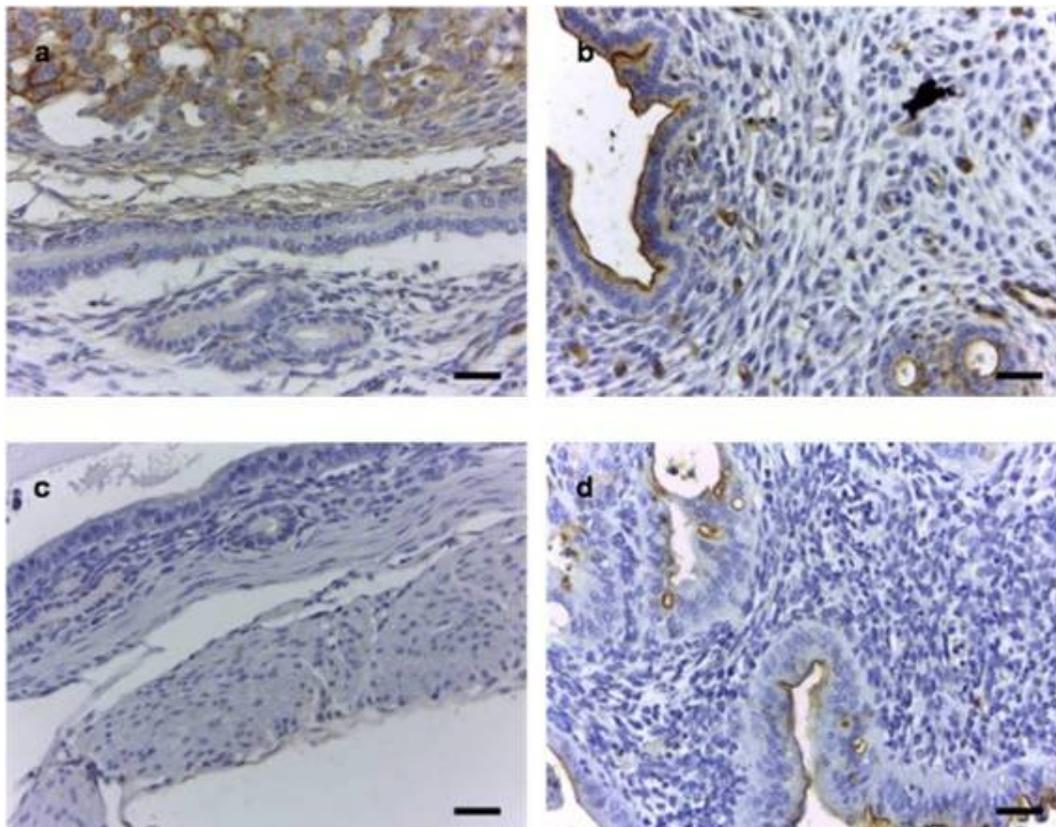


Figura 11: Microfotografías de secciones transversales de los cuernos uterinos de ratonas BALB/c. Lectinahistoquímica. a-d) La marcación con las lectinas PNA y SBA fue más intensa en los epitelios luminal y glandular del endometrio de las ratonas infectadas. a) Día 6 post coito. Grupo control: Epitelios negativos para la lectina PNA. b) Día 6 post coito. Grupo infectado: Fuerte marcación con la lectina PNA en el glicocalix del epitelio luminal y moderada marcación en el epitelio glandular. c) Día 10 post coito. Grupo control: Negativo frente a la lectina SBA. d) Día 10 post coito. Grupo infectado: Moderada marcación con la lectina SBA en los epitelios glandular y luminal del endometrio. 400X. Barra: 20 μ m.

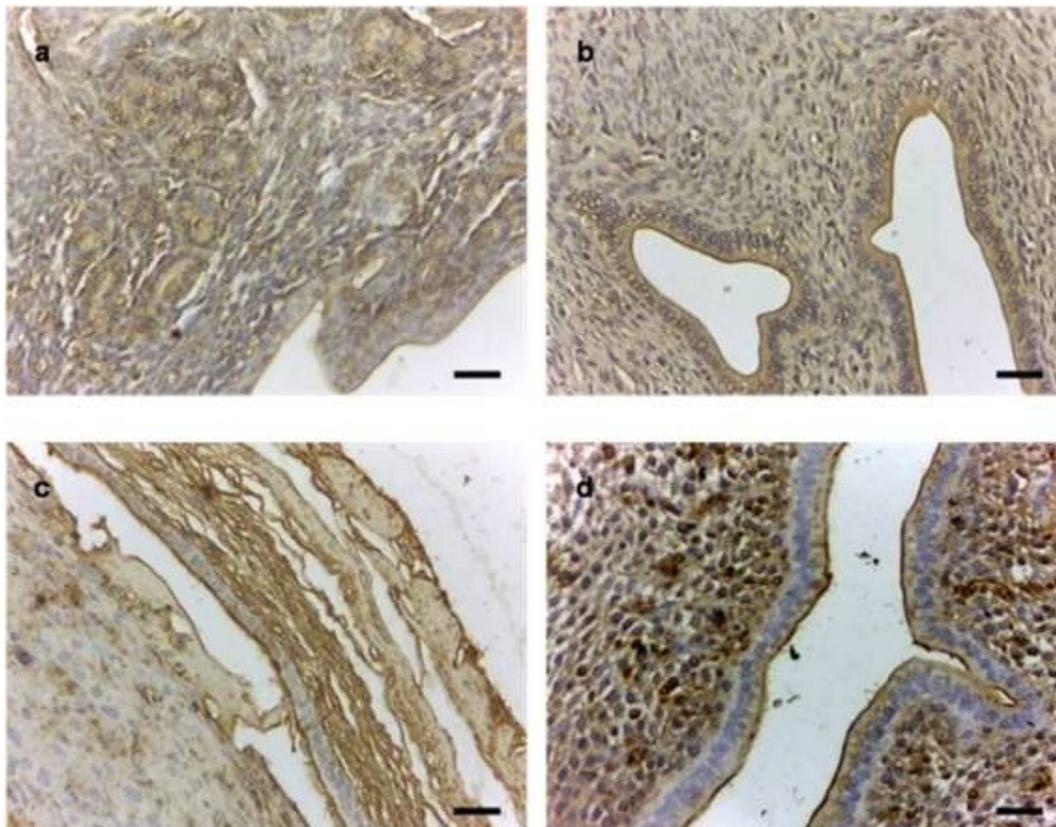


Figura 12: Microfotografías de secciones transversales de los cuernos uterinos de ratonas BALB/c. Lectinahistoquímica. a,b) La afinidad por la lectina ConA se encuentra aumentada en el epitelio luminal de los animales del grupo infectado sacrificados 6 días post coito. a) Grupo control. b) Grupo infectado. c,d) Fuerte marcación con WGA en el epitelio luminal del endometrio en los animales del grupo infectado sacrificados 10 días post coito. c) Grupo control. d) Grupo infectado. 400X. Barra: 20 μ m.

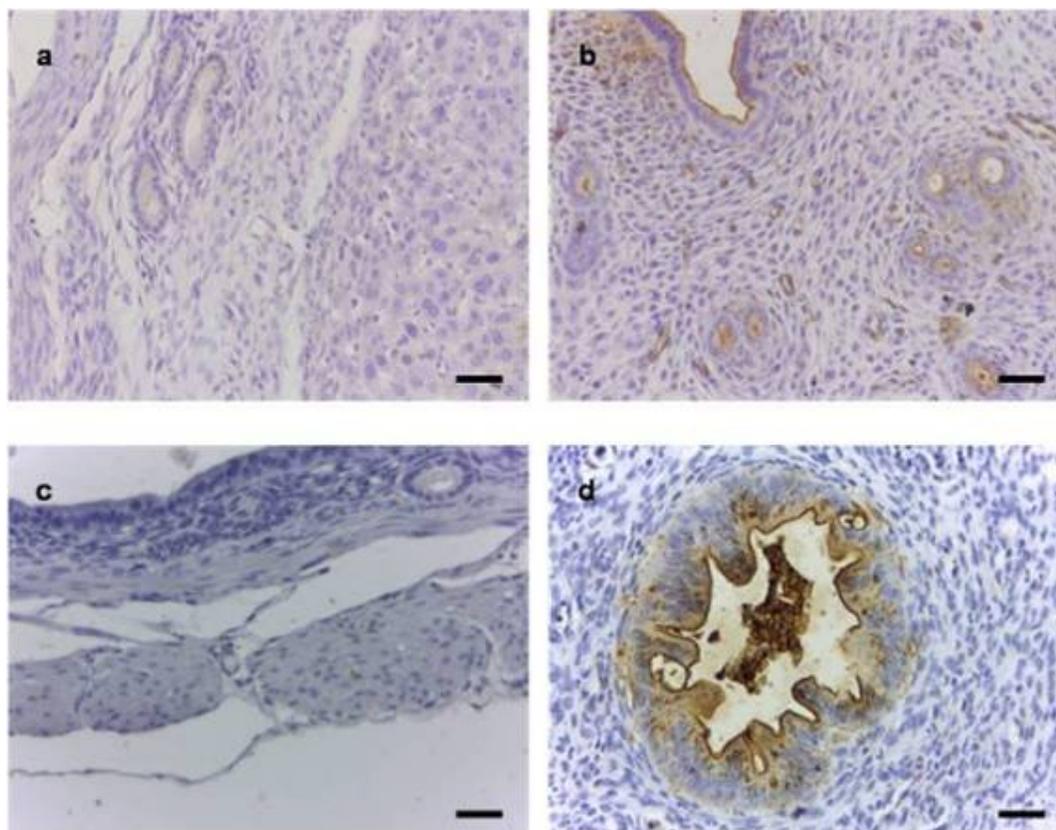


Figura 13: Microfotografías de secciones transversales de los cuernos uterinos de ratones BALB/c. Lectinahistoquímica. a,b) La marcación con la lectina RCA-1 fue más intensa en los animales infectados que en los controles a los 6 dpc. a) Grupo control. b) Grupo infectado. c,d) La afinidad por UEA-1 se encontró aumentada en el epitelio uterino glandular en los animales del grupo infectado sacrificados a los 10 dpc. c) Grupo control. d) Grupo infectado. Se observa además, metaplasia epitelial y células apoptóticas en el epitelio glandular. 400X. Barra: 20 μ m.

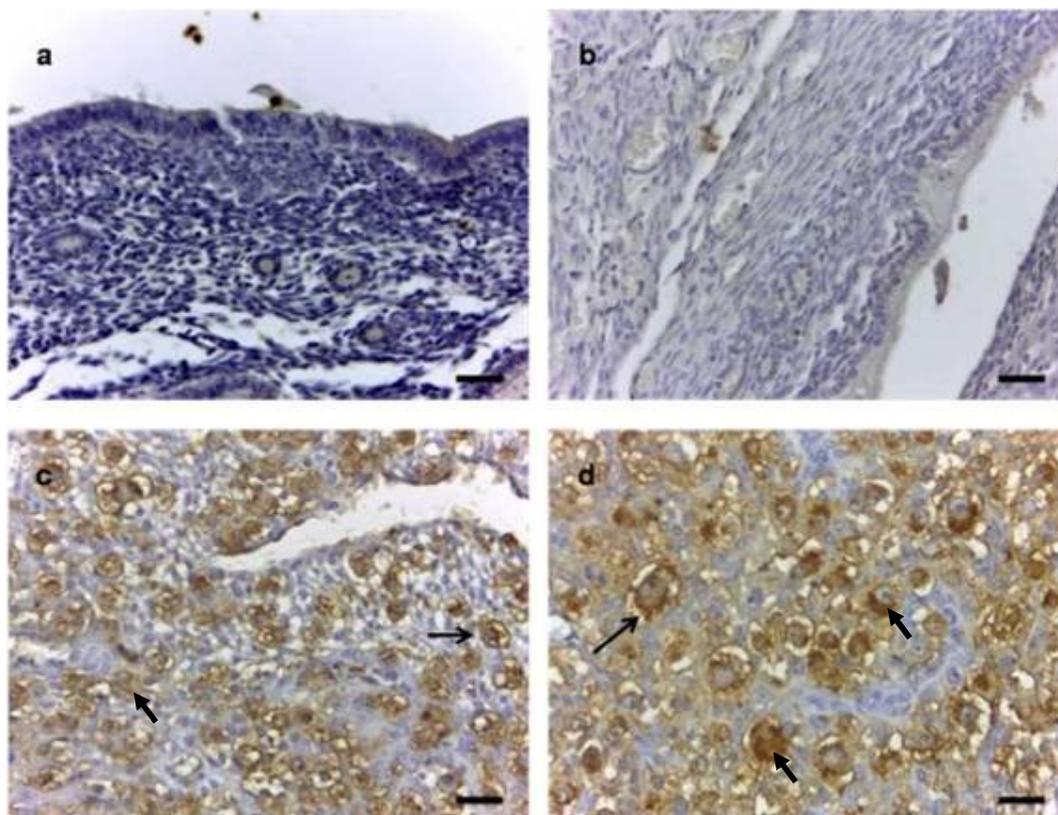


Figura 14: Microfotografías de secciones transversales de los cuernos uterinos de ratonas BALB/c. Lectinahistoquímica. a,b) A los 8 días post coito, los epitelios glandular y luminal de los animales del grupo control fueron débilmente positivos a DBA mientras que en los animales del grupo infectado la marcación fue negativa. a) Grupo control. b) Grupo infectado. c,d) Células *natural killer* uterinas (flechas) marcadas con las lectinas DBA (c) y SBA (d). 400X. Barra: 20 μ m.

DISCUSIÓN

Dentro de los mecanismos patogénicos de *T. foetus*, es conocida la importancia de las enzimas como la cistein-proteasa. Estas enzimas podrían alterar las moléculas de adhesión del trofoblasto en los casos de pérdidas embrionarias tempranas, previas a la implantación (Thomford y col., 1996). Otras enzimas producidas por el protozoo como la β -glucosidasa, la β -N-acetilglucosaminidasa y la α -manosidasa, actúan sobre el mucus de la vagina y crean un ambiente hostil que podría favorecer la patogénesis de la tritrichomonosis (Felleisen, 1999; Kania y col., 2001). Además, *T. foetus* produce neuraminidasa, una enzima que hidroliza los enlaces α -2,3 glicosídicos del ácido siálico y expone así otros azúcares de los glicoconjugados (Babál y Russel, 1999). El aumento o la disminución en la expresión de estos carbohidratos ricos en ácido siálico en el tracto genital femenino podría ser un factor importante de susceptibilidad a la infección debido a que el protozoo podría utilizar estos cambios para promover su adhesión. Al modificar carbohidratos, estas enzimas podrían ser las responsables de los cambios observados en el patrón de unión a lectinas en el tracto genital de vaquillonas infectadas (Cobo y col., 2004), en ratonas no preñadas infectadas (Monteavaro y col., 2008) y en ratonas preñadas infectadas con *T. foetus* como se describió en este capítulo.

La adhesión celular es un proceso clave en la patogenia de la tritrichomonosis bovina. Este proceso se encuentra mediado por los glicoconjugados de la membrana plasmática del protozoo y de la superficie de las células epiteliales del tracto genital del hospedador (Felleisen, 1999). Un estudio de lectinahistoquímica realizado con vaquillonas infectadas con *T. foetus* demostró que las células epiteliales uterinas presentaron una mayor afinidad por las lectinas UEA-1 y PNA en el grupo infectado con respecto al grupo control (Cobo y col., 2004). En otro trabajo, realizado con ratonas no preñadas, infectadas con dicho protozoo, se observaron cambios en el patrón de carbohidratos en la vagina, con mayor afinidad por la lectina UEA-1 y en el útero con

mayor intensidad de marcación con las lectinas SBA y PNA (Monteavaro y col., 2008). En esta tesis, se observó que la infección con *T. foetus* determina cambios en el patrón de unión a lectinas y, por lo tanto, en el tipo de carbohidratos de los epitelios glandular y luminal de los cuernos uterinos de ratonas BALB/c preñadas. Los cambios más evidentes están relacionados con aquellas lectinas que presentan afinidad por la β -D-galactosa y N-acetilgalactosamina. En las ratonas preñadas infectadas con *T. foetus*, existe una mayor exposición de los residuos galactosilados en los epitelios glandular y luminal del endometrio y en consecuencia, una mayor afinidad por las lectinas SBA y PNA. Estos cambios podrían facilitar la adhesión del protozoo al epitelio de los órganos genitales de la hembra infectada y, secundariamente, generar alteraciones en la implantación y en la placentación llevando a la pérdida embrionaria temprana.

Según la bibliografía, la modificación de los carbohidratos superficiales en los órganos de los animales infectados podría estar causada por la reacción del hospedador ante la presencia del protozoo o bien podría ser ocasionada por la acción de las diversas enzimas producidas y secretadas por *T. foetus*, para facilitar la adhesión en los órganos genitales (Cobo y col., 2004; Monteavaro y col., 2008).

Es importante resaltar que tanto en las ratonas BALB/c preñadas (hallazgos de esta tesis) como en las no preñadas (Monteavaro y col., 2008), los cambios en el patrón de unión a las lectinas son similares a aquellos encontrados en bovinos (Cobo y col., 2004). Este hallazgo enfatiza la utilidad del empleo de la ratona BALB/c como modelo animal experimental para estudiar la patogénesis de la tritrichomonosis bovina.

Por otra parte, la lectinahistoquímica fue importante para reconocer las células uNK que se diferencian en los sitios de implantación durante la preñez normal del ratón (Peel, 1989). Estas células contribuyen a la remodelación vascular y decidual en los sitios de implantación. Un marcador de células uNK muy utilizado es la lectina DBA, la cual se

une específicamente a los residuos terminales de N-acetilgalactosamina (α -D-GalNAc). Esta lectina marca intensamente la membrana plasmática y los gránulos de las uNK (Paffaro y col., 2003). Zhang y col. (2009) demostraron que la marcación con la lectina DBA subestima el número total de células uNK porque existe una población menor de uNK que es positiva a la técnica de PAS pero negativa a DBA (PAS+ DBA-). Según estos autores, las células uNK que son positivas a la marcación con la lectina DBA, serían células que migraron desde la médula ósea hacia el útero gestante y, por lo tanto, incluyen solo a una subpoblación de uNK conformada por células de origen extra-uterino. La población celular que resulta PAS+ pero DBA-, correspondería a células diferenciadas *in situ*. En este trabajo, pudimos reconocer células DBA+ en la decidua *basalis* y en el mesometrio. También se realizó la técnica histoquímica de PAS para la identificación de las células uNK. Los resultados obtenidos se describen y se discuten en el Capítulo 4: “Inmunología parte I: células *natural killer* uterinas y mastocitos”. Además, en las ratonas preñadas, las células uNK también se marcaron con la lectina SBA. Si bien la marcación con la lectina DBA está ampliamente difundida para la marcación de las células uNK de ratón, en la bibliografía no existen datos referidos a la marcación de estas células con la lectina SBA. Tanto la lectina DBA como SBA se unen específicamente a los residuos terminales de α -D-N-acetilgalactosamina. Por lo tanto, la lectina SBA podría ser otra herramienta de utilidad para el reconocimiento de las células uNK del ratón.

CAPÍTULO 3: INMUNOHISTOQUÍMICA: PROLIFERACIÓN Y MUERTE CELULAR.

OBJETIVO ESPECÍFICO

- Determinar cambios en los índices de muerte y proliferación celular, en el endometrio de ratonas BALB/c infectadas con *T. foetus*.

HIPÓTESIS

- La presencia de *T. foetus* altera los índices de proliferación y muerte celular en el epitelio superficial del útero de las ratonas infectadas.

RESULTADOS

Para evaluar la muerte celular por apoptosis y la proliferación celular en el útero de ratonas preñadas infectadas con *T. foetus*, se investigó la expresión de caspasa-3 activa y del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) en las células del epitelio uterino. Se realizó el recuento de células marcadas en el epitelio luminal del útero y en las glándulas endometriales.

Muerte celular

El índice de muerte celular (IMC) en el epitelio uterino de cada animal se obtuvo a partir del recuento de las células epiteliales totales y de las células marcadas. Las células positivas a la marcación con el anticuerpo anti-caspasa-3 activa son células en las que se ha desencadenado el proceso de muerte celular por apoptosis. La marcación de las

células apoptóticas fue de color marrón, de distintas intensidades y de localización citoplasmática (Figura 15).

En las hembras infectadas, sacrificadas entre los 5 y los 7 dpc y que perdieron su gestación, se observaron abundantes células positivas a la inmunomarcación para caspasa-3 en el epitelio, en el exudado presente en la luz de las glándulas endometriales y en la lámina propia del útero. En las ratonas infectadas y sacrificadas a los 9 dpc, las células positivas estaban distribuidas en grupos a lo largo del epitelio luminal. En las zonas del epitelio donde no se observaron células positivas para caspasa-3, se encontraron células en división. Las regiones de las glándulas más cercanas a la luz presentaron células positivas, mientras que las porciones profundas de las mismas permanecieron sin marcar. En las ratonas preñadas e infectadas no se observaron diferencias en el IMC con respecto a las hembras del grupo control. En las ratonas del grupo control preñadas a la necropsia, se encontraron células marcadas en el epitelio luminal y en las glándulas en aquellas sacrificadas entre los 5 y los 7 dpc. Sin embargo, en las hembras controles preñadas que se sacrificaron entre los 8 y los 11 dpc, no se observaron células positivas en los epitelios analizados. En los cortes provenientes de ratonas preñadas sacrificadas entre los 8 y los 11 dpc se detectaron algunas células deciduales, trofoblásticas, gigantes y uNK positivas.

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos a partir del recuento celular, se trabajó con dos subgrupos. El primero incluyó a las hembras sacrificadas entre los días 5 y 7 post coito, fechas en las que ocurre la reacción decidua una vez producida la implantación del blastocisto. El segundo subgrupo estuvo constituido por las hembras sacrificadas entre los días 8 y 11 post coito, período que coincide con el proceso de placentación.

Luego del análisis de los datos, se observó una mayor incidencia de muerte celular en los epitelios luminal y glandular en las hembras infectadas que habían perdido el *conceptus*, con respecto a las hembras de los otros grupos (Figuras 17 y 18).

Proliferación celular

El índice de proliferación celular (IP) en el epitelio uterino de cada animal se obtuvo a partir del recuento de las células epiteliales totales y de las células marcadas. Las células positivas a la marcación con el anticuerpo anti-PCNA son células que se encuentran en la interfase del ciclo celular. La marcación de las células positivas en interfase fue de color marrón, de distintas intensidades y de localización nuclear (Figura 16).

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos a partir del recuento celular, se trabajó con los dos subgrupos utilizados para evaluar el índice de muerte celular: uno incluyó a las hembras sacrificadas entre los días 5 y 7 post coito, y el otro estuvo constituido por las hembras sacrificadas entre los días 8 y 11 post coito (Figuras 19 y 20).

Se observó mayor marcación con el anticuerpo anti-PCNA en el epitelio luminal de las hembras infectadas sacrificadas entre los 5 y los 7 dpc con respecto a los animales controles. Sin embargo, en el epitelio de las glándulas endometriales el IP no mostró diferencias significativas entre los diferentes grupos. En las hembras preñadas, tanto del grupo control como del grupo infectado, las células deciduales presentaron una intensa inmunomarcación para PCNA.

Con respecto al subgrupo de hembras sacrificadas entre los 8 y los 11 dpc, se observó mayor proliferación celular en aquellas infectadas que mantuvieron su gestación. En las hembras del grupo control que estaban preñadas, las glándulas endometriales no presentaron marcación con el anticuerpo anti-PCNA. Sin embargo, muchas células de la

decidua mesometrial, células uNK y células gigantes trofoblásticas presentaron una intensa marcación en estos animales.

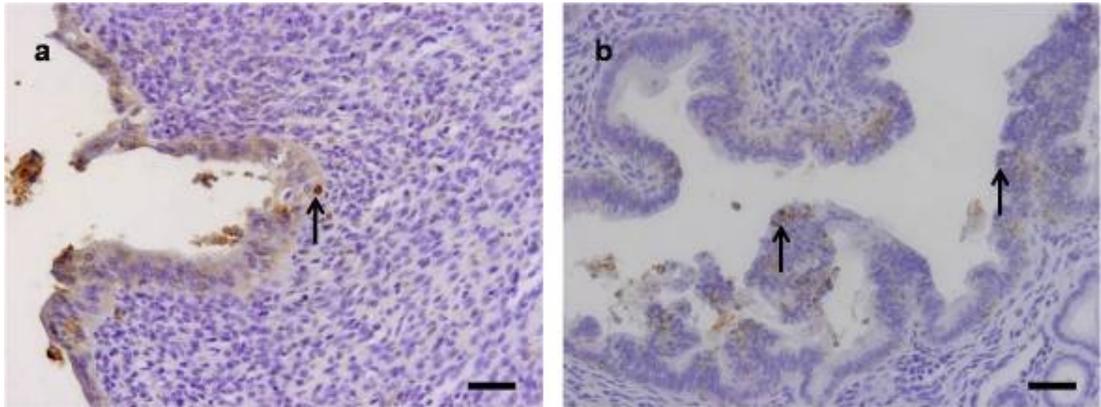


Figura 15: Microfotografías de secciones transversales de los cuernos uterinos de ratonas BALB/c. Inmunomarcación para caspasa-3 activa. a) Grupo control, día 9 post coito. b) Grupo infectado, día 11 post coito. 400X. Barra: 20 μ m.

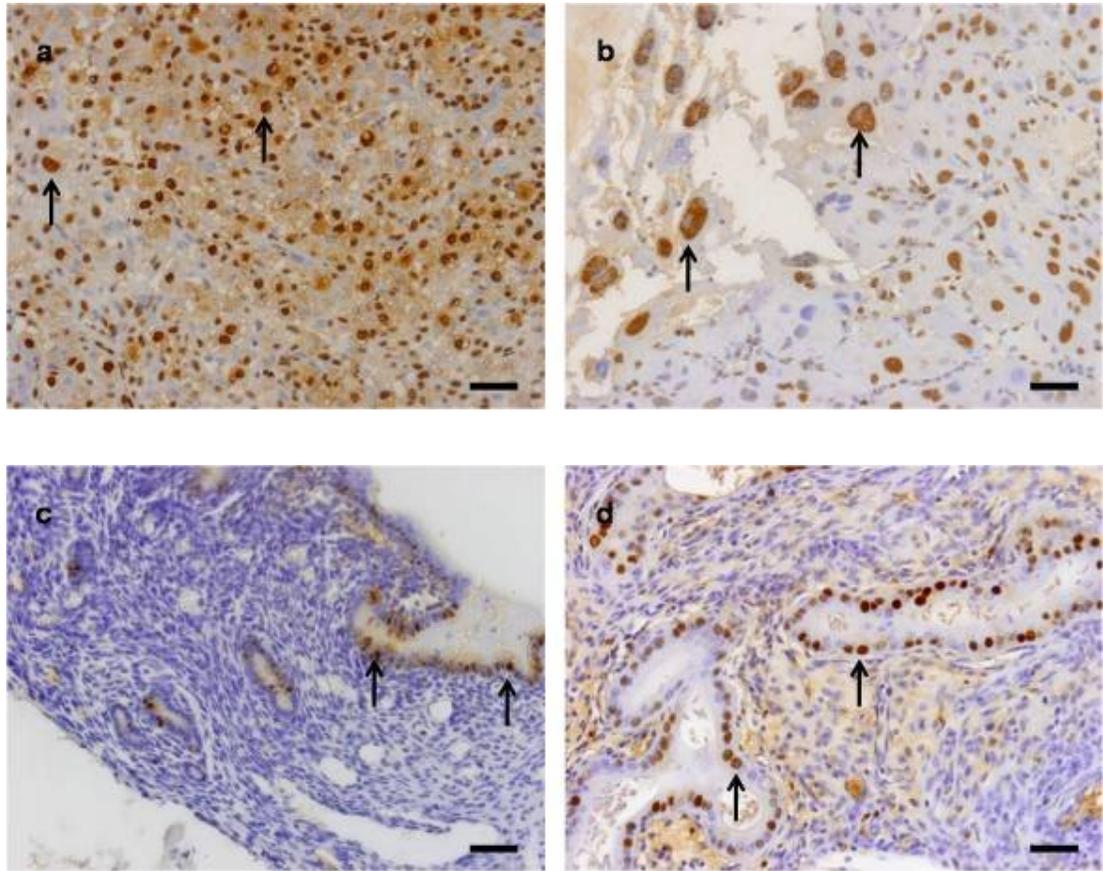
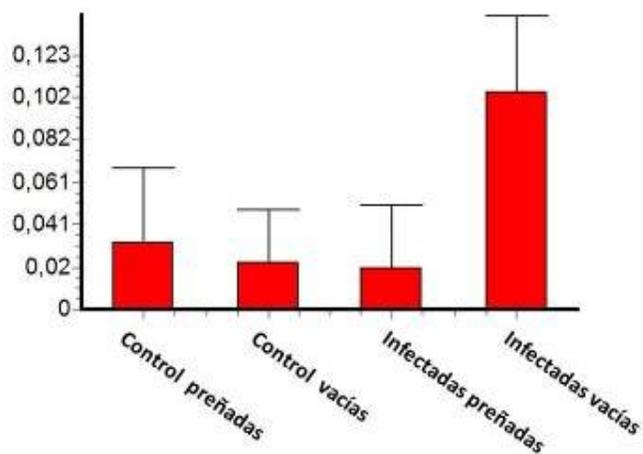


Figura 16: Microfotografías de secciones transversales de los cuernos uterinos de ratonas BALB/c. Inmunomarcación para PCNA. a-d) Día 8 post coito. a) Decidua. b) Células trofoblásticas gigantes. c) Epitelios luminal y glandular. Grupo control. d) Epitelio glandular. Grupo infectado. 400X. Barra: 20 μ m.

A) Índice de muerte celular en el epitelio luminal, días 5 a 7.

Media y desvío estándar



B) Índice de muerte celular en el epitelio luminal, días 8 a 11.

Media y desvío estándar

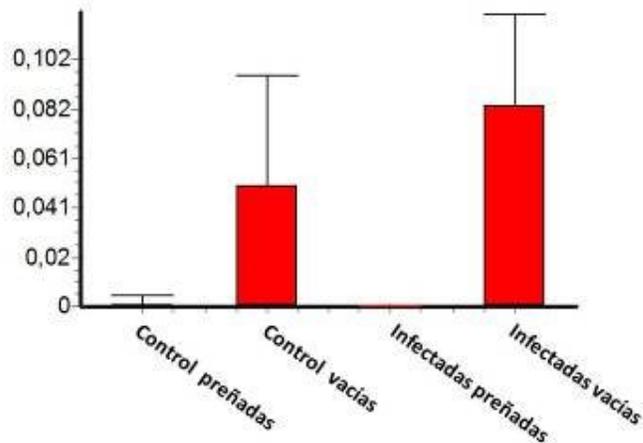
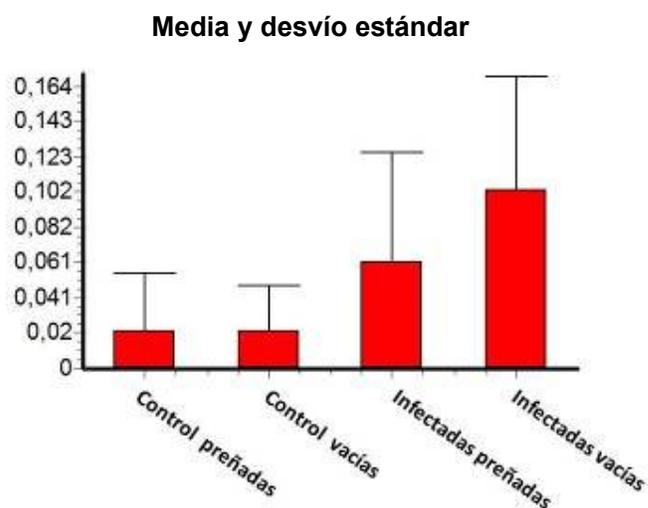


Figura 17: Índice de muerte celular del epitelio luminal. Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA. A) Días 5 a 7: $p < 0,001$. Se encontraron diferencias entre los siguientes grupos: control preñadas vs infectadas vacías (test *post hoc* de Tukey: $**p < 0,01$), control vacías vs infectadas vacías (test *post hoc* de Tukey: $**p < 0,01$) e infectadas preñadas vs infectadas vacías (test *post hoc* de Tukey: $**p < 0,01$). B) Días 8 a 11: $p < 0,001$. Se encontraron diferencias entre los siguientes grupos: control preñadas vs infectadas vacías (test *post hoc* de Tukey: $***p < 0,001$) e infectadas preñadas vs infectadas vacías (test *post hoc* de Tukey: $**p > 0,01$).

A) Índice de muerte celular en el epitelio glandular, días 5 a 7.



B) Índice de muerte celular en el epitelio glandular, días 8 a 11.

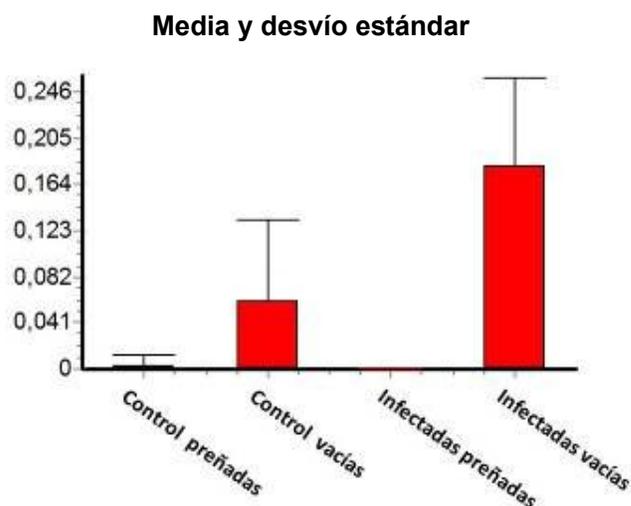
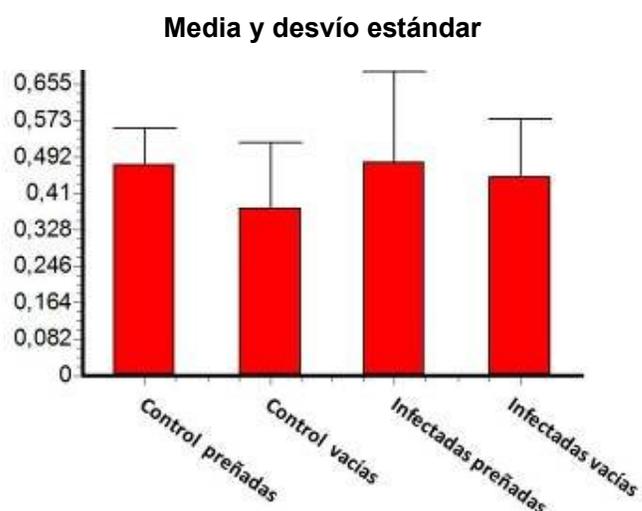


Figura 18: Índice de muerte celular del epitelio glandular. Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA. A) Días 5 a 7: $p < 0,05$. Se encontraron diferencias entre los siguientes grupos: control preñadas vs infectadas vacías (test *post hoc* de Tukey: $*p < 0,05$). B) Días 8 a 11: $p < 0,001$. Se encontraron diferencias entre los siguientes grupos: control preñadas vs infectadas vacías (test *post hoc* de Tukey: $***p < 0,001$), control vacías vs infectadas vacías (test *post hoc* de Tukey: $*p < 0,05$) e infectadas preñadas vs infectadas vacías (test *post hoc* de Tukey: $**p < 0,01$).

A) Índice de proliferación celular en el epitelio luminal, días 5 a 7.



B) Índice de proliferación celular en el epitelio luminal, días 8 a 11.

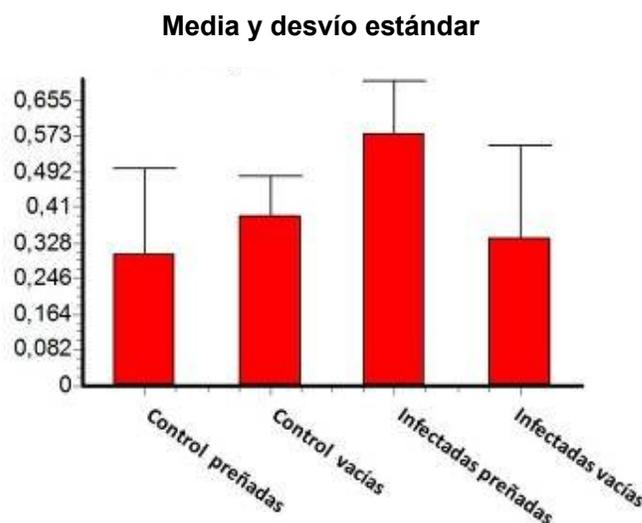
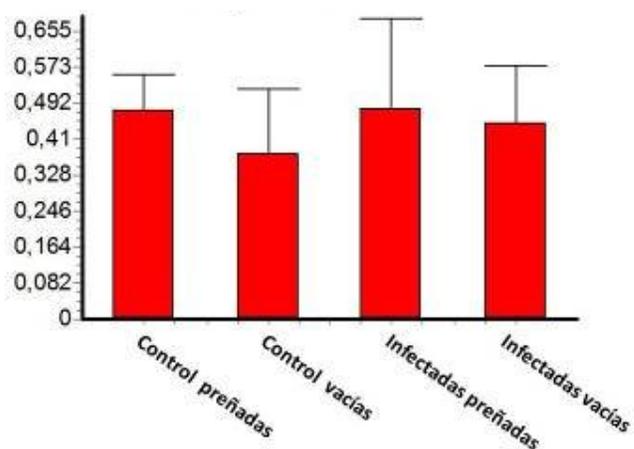


Figura 19: Índice de proliferación celular del epitelio luminal. Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA. A) Días 5 a 7: $p < 0,001$. Se encontraron diferencias entre los siguientes grupos: control vacías vs infectadas preñadas (test *post hoc* de Tukey: $***p < 0,001$) y control vacías vs infectadas vacías (test *post hoc* de Tukey: $**p < 0,01$). B) Días 8 a 11: $p < 0,05$. Se encontraron diferencias entre los siguientes grupos: control preñadas vs infectadas preñadas (test *post hoc* de Tukey: $*p < 0,05$).

A) Índice de proliferación celular en el epitelio glandular, días 5 a 7.

Media y desvío estándar



B) Índice de proliferación celular en el epitelio glandular, días 8 a 11.

Media y desvío estándar

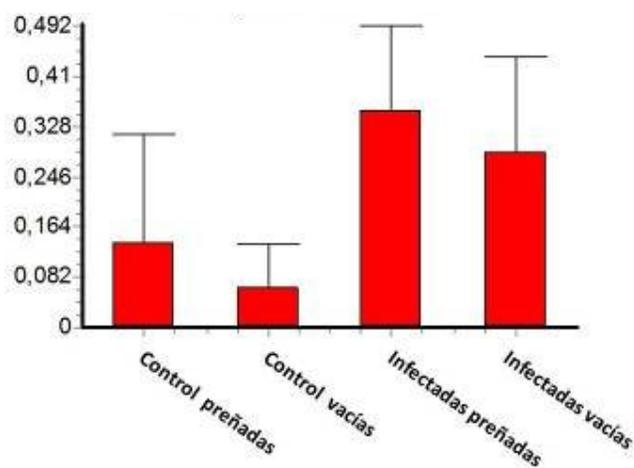


Figura 20: Índice de proliferación celular del epitelio glandular. Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA. A) Días 5 a 7: $p > 0,05$. B) Días 8 a 11: $p < 0,05$. Se encontraron diferencias entre los siguientes grupos: control preñadas vs inyectadas preñadas (test *post hoc* de Tukey: $*p < 0,05$), control vacías vs inyectadas preñadas (test *post hoc* de Tukey: $*p < 0,05$) y control vacías vs inyectadas vacías (test *post hoc* de Tukey: $*p < 0,05$).

DISCUSIÓN

En los roedores, la respuesta uterina a la implantación involucra procesos secuenciales de proliferación, diferenciación y regresión en distintas regiones del endometrio y en diferentes momentos (Bell, 1983). La apoptosis y la proliferación celular tienen un importante rol en la adhesión e implantación del blastocisto en el útero (Demir y col., 2002). El balance entre ambos procesos es esencial para la implantación exitosa y el mantenimiento de la gestación.

La apoptosis del epitelio uterino durante el proceso de implantación comienza con la adhesión inicial del blastocisto. La región del epitelio uterino que se encuentra cercana al embrión experimenta muerte celular, que es inducida por las células del trofoblasto (Schlafke y Enders, 1975). La pérdida de las células epiteliales que toman contacto con el blastocisto en los sitios de implantación permite que el trofoblasto establezca contacto con el estroma del endometrio e induzca, posteriormente, la reacción decidual (Parr y col., 1987; Gu y col., 1994).

Por otro lado, el efecto citotóxico de *T. foetus* ha sido estudiado por varios autores en modelos *in vitro* mediante los cuales se demostró que *T. foetus* induce la apoptosis de las células del epitelio vaginal de bovino (Singh y col., 2004) y de las células del epitelio uterino de bovino (Singh y col., 2005) por acción de una cistein-proteasa denominada CP30. Además, se evidenció que *T. foetus* induce la muerte por apoptosis de las células epiteliales de oviducto bovino en un modelo de cultivo de órgano (Benchimol y col., 2006) y en ovocitos bovinos cultivados *in vitro* (Benchimol y col., 2007). Midlej y col. (2009) obtuvieron resultados similares en cultivos primarios de células de oviducto bovino. Estos resultados sugieren que la apoptosis podría estar involucrada en la patogenia de la TB *in vivo*.

En esta tesis, no se encontraron diferencias en el índice de muerte celular de las células epiteliales uterinas entre los grupos infectado y control de ratonas preñadas sacrificadas durante los días 5 a 7 post coito. Este resultado podría deberse a los procesos normales de muerte celular que ocurren durante la implantación en ratonas. En las ratonas preñadas con gestaciones de 8 a 11 días, tanto infectadas como no infectadas, no se observaron células epiteliales positivas para caspasa-3 debido a que el embrión ya se encuentra implantado y el proceso que predomina es la placentación. En estas hembras, se detectaron algunas células deciduales apoptóticas. Esto coincide con el inicio de la regresión de la decidua (Gu y col., 1994). En ambos subgrupos (hembras sacrificadas entre los 5-7 dpc y 8-11 dpc), las células de los epitelios luminal y glandular del endometrio, en las ratonas infectadas que sufrieron muerte embrionaria, presentaron una mayor expresión de caspasa-3 y, por lo tanto, mayor índice de muerte celular con respecto a los otros grupos estudiados. *T. foetus* se adhiere a las células epiteliales uterinas y, como se describió en el Capítulo 1 de esta tesis, a partir del 6° dpc se observaron protozoos en la luz de las glándulas endometriales en las ratonas infectadas. La apoptosis en este grupo de animales podría estar causada por el efecto citotóxico de *T. foetus* y sería uno de los mecanismos responsables de las fallas de la implantación y pérdidas embrionarias tempranas que ocurren durante la infección. La apoptosis incrementada del epitelio luminal durante los días 5 a 7 post coito, podría alterar la implantación normal y la muerte de las células glandulares, la producción de histiotropo.

Correia-da-Silva y col. (2004) utilizaron la técnica de inmunohistoquímica para estudiar la proliferación celular en el útero de ratas preñadas. Estos autores demostraron que desde el inicio de la decidualización hasta el día 12 post coito, las células deciduales son intensamente positivas para PCNA y en días posteriores la marcación disminuye abruptamente. La inmunomarcación para PCNA de las células deciduales de ratón

observada en esta tesis, coincide con el patrón de marcación descrito por Correia-da-Silva y col. (2004) para el útero normal.

Además, se observaron abundantes células uNK inmunomarcadas para PCNA en los cortes de tejidos de las ratonas preñadas sacrificadas a los 9 dpc. Este hallazgo es coincidente con otros autores quienes describen la mayor actividad proliferativa de las células uNK entre los días 8 y 10 post coito (Moffet y Loke, 2006).

Öner y col. (2010) analizaron mediante IHQ la distribución de las células positivas para PCNA en el útero de rata durante la preñez temprana. Según estos autores, las células epiteliales del endometrio presentaron una intensa inmunomarcación los primeros dos días de gestación que disminuyó el día 3 y desapareció el día 4. Los días 4 y 5 post coito, las células del estroma fueron intensamente positivas a la marcación, hecho que indica el inicio de la reacción decidual. En esta tesis, las hembras preñadas sacrificadas en etapas tempranas de la preñez presentaron mayor IP con respecto a aquellas sacrificadas entre los días 8 y 11 post coito coincidiendo con la actividad proliferativa normal del epitelio uterino en esta fase. En el subgrupo de hembras sacrificadas entre los 5 y 7 dpc, las hembras infectadas, tanto preñadas como vacías, presentaron el IP más elevado en el epitelio luminal. Sin embargo, cuando se analizaron los IP del epitelio glandular en las ratonas de este subgrupo, no se encontraron diferencias entre infectadas y controles. Con respecto a los animales sacrificados entre los días 8 y 11 post coito, el mayor IP tanto del epitelio luminal como glandular, se encontró solo en las hembras infectadas que mantuvieron su preñez. La mayor proliferación celular observada en el epitelio luminal de las hembras infectadas sacrificadas entre los 5 y los 7 dpc, podría ser una respuesta inicial del hospedador a los efectos citotóxicos y a la irritación generada por el protozoo más que un mecanismo involucrado en la patogenia de la muerte embrionaria. En las hembras infectadas sacrificadas entre los 8 y los 11 dpc esta respuesta se mantendría solo en aquellas que logran mantener su preñez, pero no en las

vacías. El aumento de la proliferación celular en el epitelio glandular como posible respuesta a la acción del protozoo, se corresponde con la cinética de la infección ya que no se observaron diferencias en el IP dentro del subgrupo de hembras sacrificadas entre los 5 y los 7 dpc, momento en el que la invasión glandular está comenzando, pero aumentó en aquellas infectadas que fueron sacrificadas posteriormente.

De acuerdo a estos resultados, la muerte celular por apoptosis de las células epiteliales uterinas de las ratonas podría estar causada por el efecto citotóxico de *T. foetus* y sería un mecanismo involucrado en la patogenia de la muerte embrionaria temprana que ocurre durante la infección en este modelo experimental. El aumento de la proliferación celular en las ratonas infectadas podría ser una respuesta del hospedador que actuaría como mecanismo compensatorio ante el incremento de la apoptosis.

CAPÍTULO 4: INMUNOLOGÍA Parte I: células *natural killer* uterinas y mastocitos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar los posibles cambios en el número y la distribución de uNK y mastocitos en los cuernos uterinos de ratonas infectadas con *T. foetus*, para establecer una posible relación entre estas células y la muerte embrionaria temprana que ocurre durante la tritrichomonosis.

HIPÓTESIS

- Las ratonas infectadas con *T. foetus* presentan alteraciones en la respuesta inmune uterina ya sea en el número de células de las distintas poblaciones involucradas como en la expresión de citoquinas.
- El número de células uNK y de mastocitos aumenta en los animales infectados y estas células podrían intervenir en la patogenia de la muerte embrionaria producida por *T. foetus* en el modelo experimental en ratonas BALB/c.

RESULTADOS

Las células uNK disminuyeron en las hembras infectadas que perdieron el conceptus.

Para identificar a las células uNK, describir su morfología y distribución, se utilizaron la técnica histoquímica de PAS y la lectina biotinilada DBA. El recuento celular

se realizó en las células marcadas con la técnica de PAS en base a datos bibliográficos que describen en el ratón la presencia de células uNK DBA negativas y PAS positivas (Zhang y col., 2009).

En las ratonas preñadas, tanto del grupo control como del grupo infectado, sacrificadas a los 5 dpc, las células uNK eran pequeñas y escasas y se distribuyeron en la incipiente decidua. Hacia el día 7 post coito, fueron más abundantes y aumentaron su tamaño. En los animales sacrificados a partir de los 9 dpc, la distribución de las células uNK no se limitó a la decidua y al triángulo mesometrial, sino que también alcanzó las porciones embrionarias de la placenta en formación. En los animales preñados sacrificados a los 10 y 11 dpc, estas células eran grandes con abundantes gránulos DBA, SBA y PAS positivos en su citoplasma (Figura 21a). En estos casos, se observaron algunas células uNK en la región del espongiotrofoblasto que limita con la decidua mesometrial (decidua *basalis*). Dentro de la decidua, su mayor concentración estuvo siempre en la porción más alejada del miometrio. Las células uNK presentaron uno o dos núcleos (Figura 21b), y, en algunos casos, se observaron células trinucleadas.

Para el análisis estadístico de los datos del recuento celular, se trabajó con dos subgrupos de la misma manera que se describió en el Capítulo 3 para el análisis de los índices de proliferación y muerte celular. El primer grupo incluyó a las hembras sacrificadas entre los días 5 y 7 post coito, fechas en las que ocurre la reacción decidual una vez producida la implantación del blastocisto. El segundo subgrupo fueron las hembras sacrificadas entre los días 8 y 11 post coito, en coincidencia con la placentación. El promedio de uNK en las hembras preñadas, controles e infectadas, fue semejante en ambos subgrupos ($p > 0,05$) (Figura 23). En la mayoría de las hembras del grupo control no preñadas al momento del sacrificio, no se observaron células uNK (Tabla 6), con la excepción de un animal de este grupo que fue sacrificado al 7° día post coito, en el que existían escasas células PAS positivas de pequeño tamaño. Este hallazgo podría ser un

indicador de la existencia previa de preñez en esa ratona. En las hembras infectadas que perdieron el *conceptus*, las uNK fueron muy pequeñas y disminuyeron drásticamente su número ($p < 0,05$) (Figura 22a) (Tabla 6). Presentaron escasos gránulos PAS positivos y en algunos casos eran evidentes los cambios degenerativos y las características de la muerte celular por apoptosis (Figura 22b).

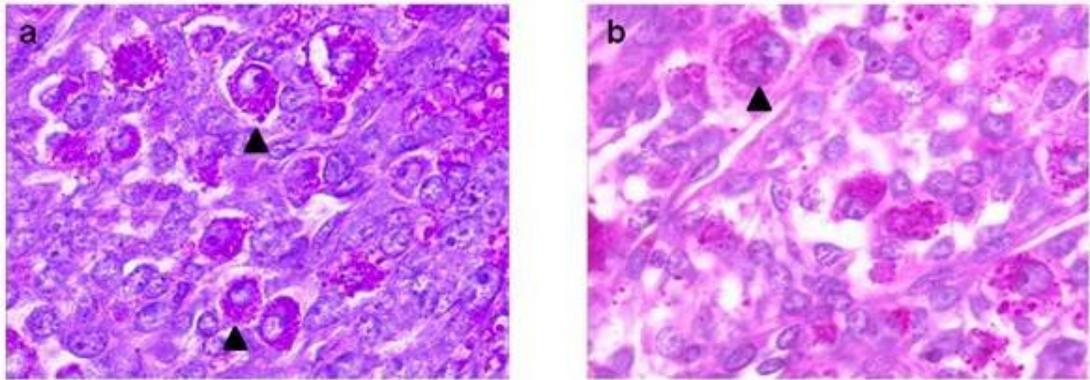


Figura 21: Microfotografía de cortes transversales de cuernos uterinos de ratonas controlas, preñadas, sacrificadas a los 8 dpc. a) Células uNK grandes, con abundantes gránulos citoplasmáticos (puntas de flecha) en la decidua *basalis*. PAS. 400X. b) Célula uNK binucleada (punta de flecha). PAS 400X.

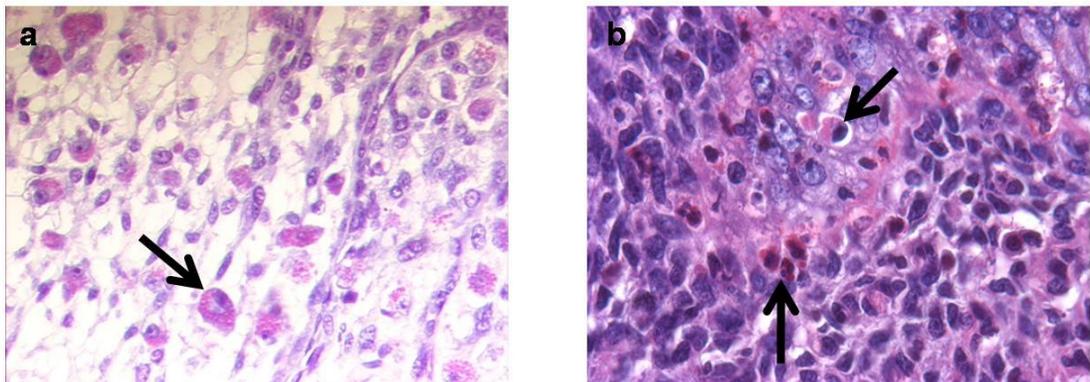


Figura 22: Microfotografía de cortes transversales de cuernos uterinos de ratonas infectadas con *T. foetus*, vacías, sacrificadas a los 10 dpc. a) Células uNK en menor cantidad y más pequeñas con respecto a las de las hembras preñadas (flecha). PAS. 400X. b) Células uNK PAS+ con cambios degenerativos, escasos gránulos y morfología compatible con apoptosis (flechas). PAS. 400X.

Tabla 6: Promedio de células uNK PAS+ por campo microscópico en el útero de cada grupo de ratonas.

DPC	Controles		Infectadas	
	Preñadas	Vacías	Preñadas	Vacías
5	3,45	0	2,4	
6		0	2,03	2,65
7	14,85	0,6		0,3
8	24,83	0	22,77	1,68
9	25,6	0		0,25
10	22,95	0	15,45	0,3
11	22,23	0		

DPC: días post coito.

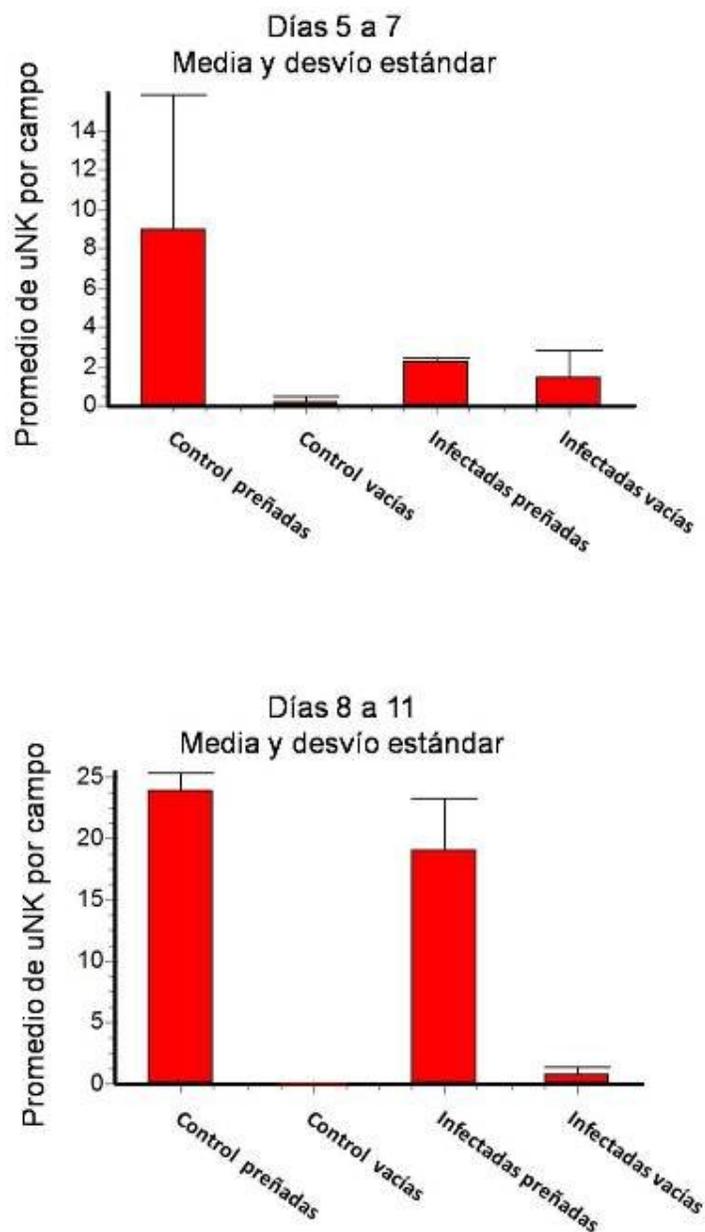


Figura 23: Promedio de uNK por campo microscópico y desvío estándar. Los datos se analizaron estadísticamente mediante el test no paramétrico de Kruskal Wallis. Días 5 a 7: $p < 0,01$. Se encontraron diferencias entre los siguientes grupos: control preñadas vs control vacías (test *post hoc* de Dunn: $**p < 0,01$). Días 8 a 11: $p < 0,001$. Se encontraron diferencias entre los siguientes grupos: control preñadas vs control vacías (test *post hoc* de Dunn: $***p < 0,001$) y control vacías vs infectadas preñadas (test *post hoc* de Dunn: $*p < 0,05$).

Los mastocitos se distribuyen en el miometrio y en el triángulo mesometrial.

Los mastocitos se observaron en el tejido conectivo del miometrio y en el triángulo mesometrial (Figuras 24a-d). En ninguno de los cortes tisulares provenientes de hembras preñadas, los mastocitos se localizaron en la decidua o en los tejidos placentarios.

Se realizó el recuento de mastocitos uterinos por campo microscópico y para el análisis estadístico de los datos, los animales se dividieron en dos subgrupos como se describió en el Capítulo 3: animales sacrificados entre los días 5 y 7 post coito y animales sacrificados entre los días 8 y 11 post coito. Las diferencias en el promedio de estas células por campo entre los grupos controles e infectados, en los animales sacrificados entre los días 5 y 7 post coito, no resultaron estadísticamente significativas cuando se realizó el test no paramétrico de Kruskal Wallis ($p > 0,05$) (Figura 25). Sin embargo, en los días 8, 9, 10 y 11 post coito, el número de mastocitos disminuyó significativamente en las hembras infectadas con respecto a las hembras vacías controles ($p < 0,05$) (Figura 25). Esta disminución se observó tanto en las ratonas infectadas que perdieron su gestación a causa de la infección como en las infectadas que presentaron vesículas embrionarias en el momento del sacrificio. Al comparar el promedio de mastocitos en las hembras preñadas, los promedios fueron semejantes entre los grupos control e infectado (Tabla 7).

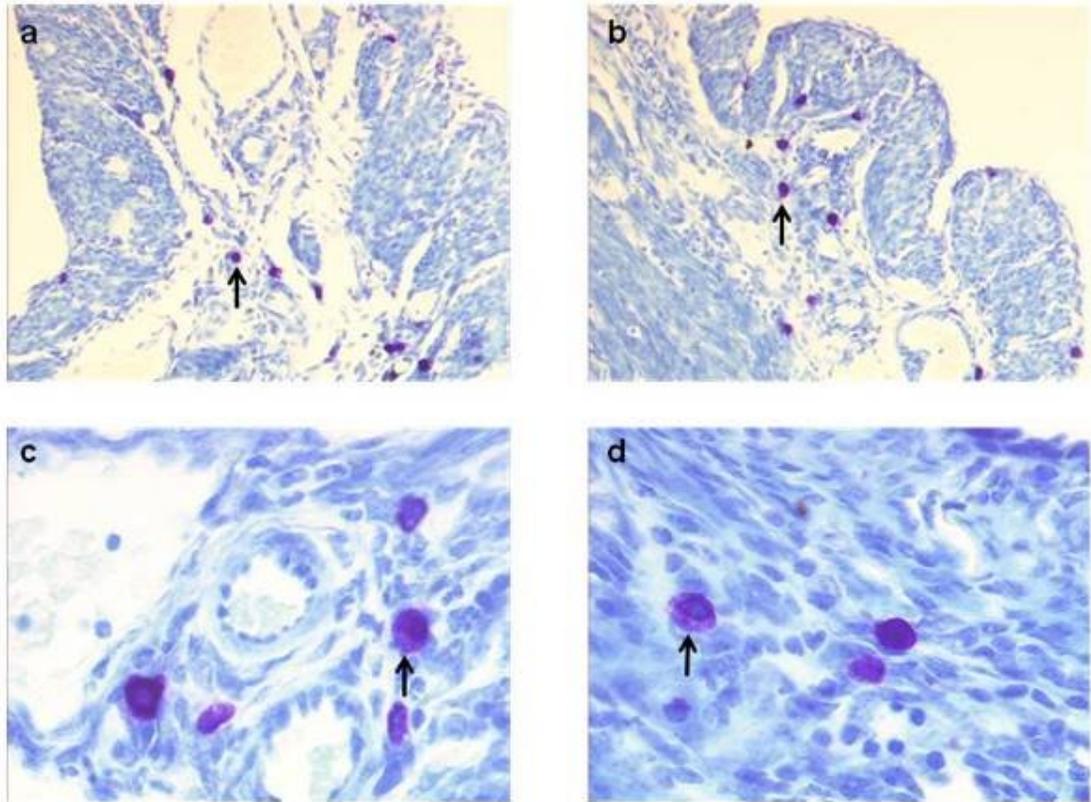


Figura 24: Microfotografía de mastocitos en cortes transversales de cuernos uterinos de ratonas BALB/c. a) Mesometrio de una hembra infectada preñada, sacrificada a los 6 dpc. Azul de toluidina. 100X. b) Miometrio de una hembra BALB/c infectada preñada, sacrificada a los 6 dpc. Azul de toluidina. 100X c) Mesometrio de una hembra BALB/c infectada vacía, sacrificada a los 9 dpc. Azul de toluidina. 400X. d) Miometrio de una hembra BALB/c infectada vacía, sacrificada a los 7 dpc. Azul de toluidina. 400X. En las cuatro imágenes, los mastocitos se distinguen por la metacromasia de sus gránulos citoplasmáticos (flechas).

Tabla 7: Promedio de mastocitos por campo microscópico en el útero de cada grupo de ratonas.

DPC	Controles		Infectadas	
	Preñadas	Vacías	Preñadas	Vacías
5	1,2175	1,91	1,035	0,8855
6			3,4675	2,527
7	0,94	1,525	1,125	2,1525
8	1,2735	3,25	1,089	1,035
9	2,22	2,22		1,0545
10	1,005	4,2675	0,75	0,865
11	0,7975	1,74		1,0975

DPC: días post coito.

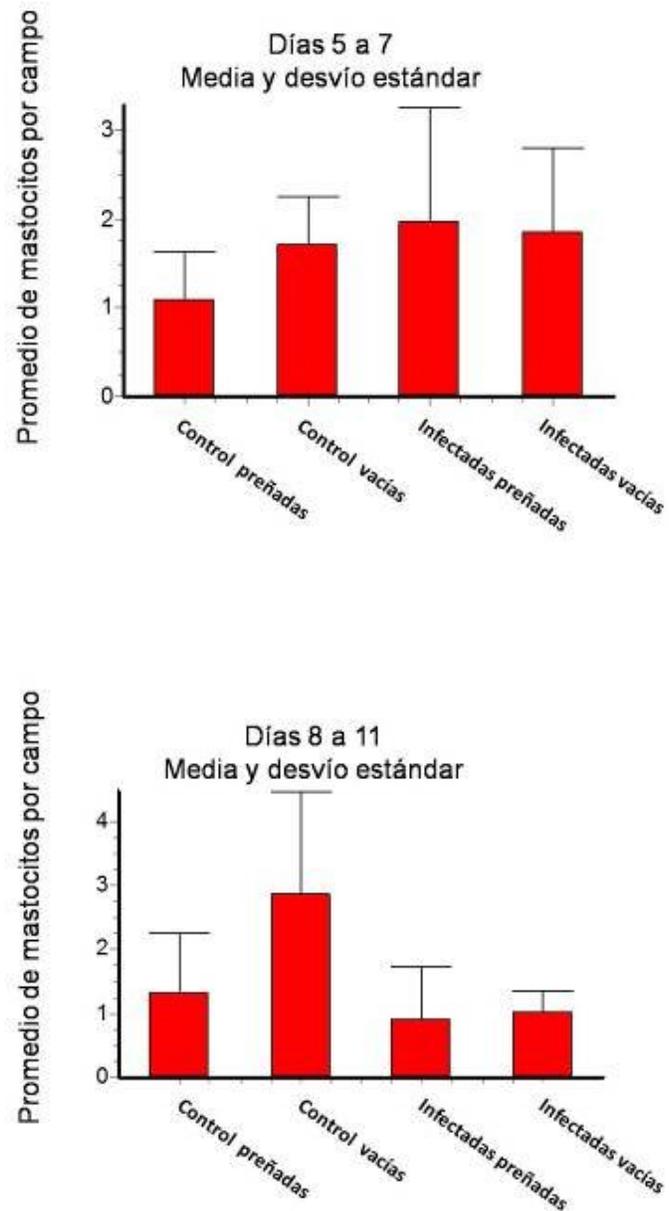


Figura 25: Promedio de mastocitos por campo microscópico y desvío estándar. Los datos se analizaron estadísticamente mediante el test no paramétrico de Kruskal Wallis. Días 5 a 7: $p > 0,05$. Días 8 a 11: $p < 0,01$. Se encontraron diferencias entre los siguientes grupos: control preñadas vs control vacías (test *post hoc* de Dunn: $*p < 0,05$), control vacías vs infectadas preñadas (test *post hoc* de Dunn: $**p < 0,01$) y control vacías vs infectadas vacías (test *post hoc* de Dunn: $**p < 0,01$).

DISCUSIÓN

En el presente capítulo se analizó el número y la distribución uterina de dos poblaciones celulares relacionadas con la inmunidad innata: las células uNK y los mastocitos, con el objetivo de determinar su potencial intervención en la patogenia de la muerte embrionaria producida por *T. foetus* en el modelo experimental en ratonas BALB/c.

Zhang y col. (2009) desarrollaron un sistema de doble marcación utilizando PAS y DBA en secciones de útero de ratonas C57BL/6J preñadas (6-12 dpc). La doble marcación permitió demostrar que PAS y DBA no proveen un reconocimiento equivalente de las células uNK en los sitios de implantación. Dichos autores observaron dos fenotipos celulares: uNK PAS+ DBA- y uNK PAS+ DBA+, distribuidas en la decidua y en el triángulo mesometrial. Estas dos variantes poblacionales podrían representar células originadas de distintas fuentes: células diferenciadas localmente y células que migraron desde la médula ósea, respectivamente. Estos autores realizaron, además, un experimento con ratonas alinfoideas preñadas transplantadas con médula ósea de una ratona preñada normal, en el que observaron que las células que poblaban el útero eran PAS+ DBA+, pero las células PAS+ DBA- eran muy raras. Ello sugiere que la lectina DBA distingue a las células uNK que migraron desde la médula ósea hacia el útero. Por lo tanto, estudios basados únicamente en la marcación con la lectina DBA, incluyen solo a una subpoblación de uNK que representan células de origen extra-uterino. Además, con la técnica histoquímica de PAS solo se marcan los gránulos citoplasmáticos, por lo tanto, no es posible reconocer a las células uNK inmaduras que son agranulares (Bianco y col., 2008). Por este motivo, los resultados aquí presentados solo se refieren a células uNK maduras granulares tanto de origen medular como diferenciadas localmente en el endometrio de las ratonas.

Las células uNK son la subpoblación de linfocitos predominantes en el útero de ratonas preñadas, las cuales cumplen roles esenciales para mantener la preñez. Los ratones *knock out* que carecen de estas células presentan anomalías histológicas en los sitios de implantación (Croy y col., 2006). En algunos casos, las variaciones en cantidad y función de las células uNK se encuentran asociadas a pérdidas embrionarias. Los linfocitos T de la decidua y las células uNK tienen actividad citotóxica hacia el trofoblasto cuando son estimulados con ciertas citoquinas como la IL-2 (Olivares y col., 2002; King y col., 1996). La destrucción excesiva de las células trofoblásticas inducida por las uNK podría ocasionar la pérdida de la preñez. Asimismo, un aumento excesivo en el número y función de las uNK puede inducir la muerte embrionaria (Gendron y Baines, 1988). En un modelo de preñez interespecífica, en el cual los embriones de ratones alogénicos y xenogénicos fueron transferidos bilateralmente en los cuernos uterinos de ratones CD-1, se produjo el rechazo de los embriones xenogénicos y las células uNK aumentaron cerca de los embriones que fueron abortados (Widayati y col., 2004). Kaloglu y Bulut (2007) describieron hiperplasia e hipertrofia de las células uNK en ratas que abortaron espontáneamente, sus gránulos eran más densos y muchas células se habían degranulado. Sin embargo, en el presente modelo de estudio de la muerte embrionaria causada por la infección con *T. foetus* en ratonas, no se observó un aumento en el número de células uNK como se había planteado en la hipótesis inicial. Por el contrario, en las hembras infectadas, las células uNK disminuyeron en número y eran más pequeñas, con escasos gránulos y en ocasiones presentaban cambios degenerativos. Estos resultados coinciden con los de Buendía y col. (1998), quienes trabajaron en un modelo murino de aborto inducido por *Chlamydia psittaci*. Este microorganismo infectó diferentes poblaciones celulares de la placenta y decidua, entre ellas a las células uNK. Según los autores, la lisis y degranulación tempranas de las uNK podría ser uno de los mecanismos intervinientes en el aborto producido por *C. psittaci*. En el presente trabajo, la degranulación temprana y los cambios degenerativos observados

en las uNK podrían estar inducidos por moléculas citotóxicas producidas por *T. foetus*. La muerte y degranulación prematura de las uNK podría contribuir al malfuncionamiento placentario y en consecuencia a la pérdida de la preñez.

El aumento del número de mastocitos en los sitios de implantación se encuentra asociado, en algunos casos, a pérdidas embrionarias. Zenclussen y col. (2003^b) observaron una elevada cantidad de mastocitos en los sitios de reabsorción embrionaria en un modelo murino de aborto espontáneo con respecto a los sitios de implantación de las hembras controles. Sin embargo, los hallazgos de esta tesis, no apoyan la hipótesis de que un aumento de estas células podría intervenir en la patogenia de la muerte embrionaria por *T. foetus* en el modelo experimental en ratonas BALB/c. En las hembras sacrificadas entre los días 5 y 7 post coito, no existieron diferencias estadísticamente significativas en el número de mastocitos presentes en los cuernos uterinos. En cambio, en las hembras sacrificadas entre los 8 a 11 dpc, dichas células disminuyeron en las hembras infectadas. El hecho de haber constatado un menor número de mastocitos en las ratonas infectadas podría deberse a la falta de coloración de los gránulos metacromáticos como consecuencia de su degranulación. Corbeil y col. (2005) demostraron en hembras bovinas infectadas con *T. foetus* que la respuesta inmune mediada por IgE estuvo asociada a la degranulación de los mastocitos y a la liberación de la infección. Por lo tanto, la disminución en el número de mastocitos observada en esta tesis, pudo deberse a la intervención de estas células en la respuesta inmune hacia *T. foetus*.

CAPÍTULO 5: INMUNOLOGÍA Parte II: células T reguladoras, células T helper 17 y expresión de citoquinas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar los mecanismos de la respuesta inmune local uterina en ratonas que podrían ser los responsables de la pérdida temprana de la preñez que ocurre en la tritrichomonosis.

HIPÓTESIS

- Las ratonas infectadas experimentalmente con *T. foetus* presentan alteraciones en la respuesta inmune uterina las cuales pueden manifestarse mediante cambios en el número de células de las distintas poblaciones involucradas o en la expresión de citoquinas.
- En la patogenia de la muerte embrionaria producida por la infección con *T. foetus* en ratonas podría intervenir una respuesta inmune materna exacerbada hacia el protozoo.

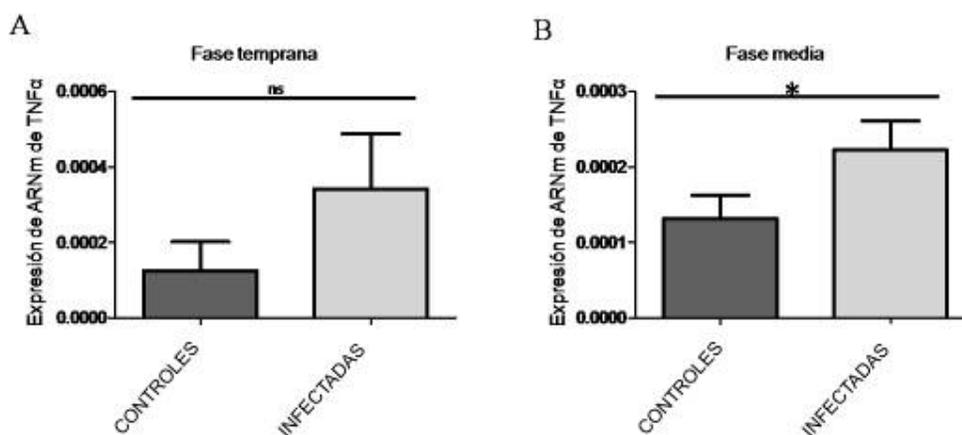
RESULTADOS

La infección con T. foetus en ratonas aumenta los niveles de las citoquinas Th1 y Th2 en el útero.

Uno de los primeros mecanismos inmunes de la muerte embrionaria descritos fue el desbalance en la respuesta Th1/Th2 (Wegmann y col., 1993). En esta tesis, se

analizó la expresión del ARNm de algunas citoquinas Th1 y Th2 en el útero de los animales infectados y controles. La citoquina Th1 analizada fue TNF- α , mientras que las citoquinas Th2 fueron IL-4 e IL-10.

La expresión de ARNm de TNF- α en el útero no varió entre los animales del grupo infectado y animales del grupo control sacrificados en la fase temprana de la preñez. Sin embargo, en ratonas infectadas y sacrificadas en la fase media de la preñez, su expresión se incrementó significativamente (Figuras 26a y b). La expresión del ARNm de las citoquinas IL-4 e IL-10 también aumentó en el útero de los animales infectados. La expresión del ARNm de IL-4 se encontró especialmente aumentada en el útero de los animales infectados sacrificados durante la etapa temprana (Figuras 26c y d), mientras que el ARNm de IL-10 aumentó en el útero de los animales infectados sacrificados en la fase media de la gestación (Figuras 26e y f).



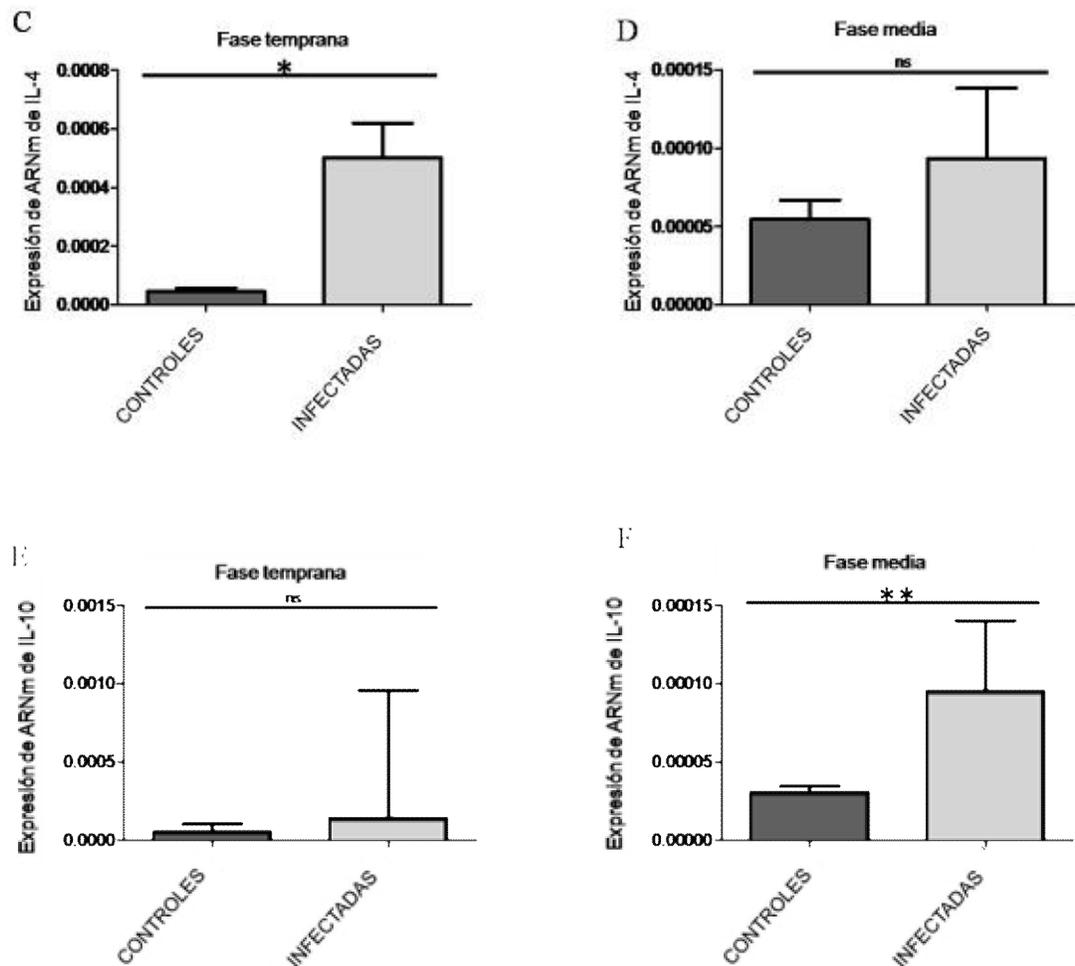


Figura 26: La infección con *T. foetus* aumenta los niveles de citoquinas Th1 y Th2 en el útero. a–f muestran la expresión del ARNm de TNF- α (a, b), IL-4 (c, d) e IL-10 (e, f) analizada mediante *real-time* RT-PCR en el útero de ratonas infectadas con *T. foetus* y ratonas controles. Las barras expresan las medianas de cada grupo. *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$ y ns: $P > 0,05$ diferencia no significativa. Los datos fueron analizados mediante el test de Mann–Whitney. a, c y e muestran los resultados de la fase temprana de la preñez. Grupo control, $n = 5$; grupo infectado, $n = 4$. b, d y f muestran los resultados de la fase media de la preñez. Grupo control, $n = 6$; grupo infectado, $n = 4$.

La infección con *T. foetus* aumenta la expresión de *foxp3* en el útero.

Se sabe que las células Treg tienen un rol fundamental en el mantenimiento de la preñez (Aluvihare y col., 2004; Zenclussen y col., 2005^a). Estas células son activadas por antígenos paternos presentes en el plasma seminal y luego proliferan en los linfonódulos que drenan el útero (Zenclussen, 2006). *Foxp3* es el gen maestro para la diferenciación de las células Treg. En la presente tesis se analizaron los niveles de ARNm de *foxp3* en el útero de las ratonas infectadas y controles. Se observó una expresión de *foxp3* más elevada en el útero de los animales infectados sacrificados durante la etapa temprana y media de la preñez (Figuras 27a y b).

El útero de ratonas infectadas con *T. foetus* presenta elevados niveles de *RORγt*.

Las células T *helper* 17 (Th17) han sido descritas como importantes mediadores en la inflamación pues inducen la migración de los neutrófilos y macrófagos hacia los tejidos infectados (Peck y Mellins, 2010). Durante la gestación, su presencia está asociada con abortos (Wang y col., 2010^a).

En este trabajo se analizó la expresión del ARNm de *RORγt*, un marcador de células Th17. Se determinó que el ARNm de *RORγt* estaba significativamente sobreexpresado en el útero de las ratonas infectadas con *T. foetus*, sacrificadas durante la etapa temprana de la preñez (Figuras 27c y d). En ratonas sacrificadas en estadios más avanzados de la preñez, las diferencias en la expresión de *RORγt* no fueron significativas.

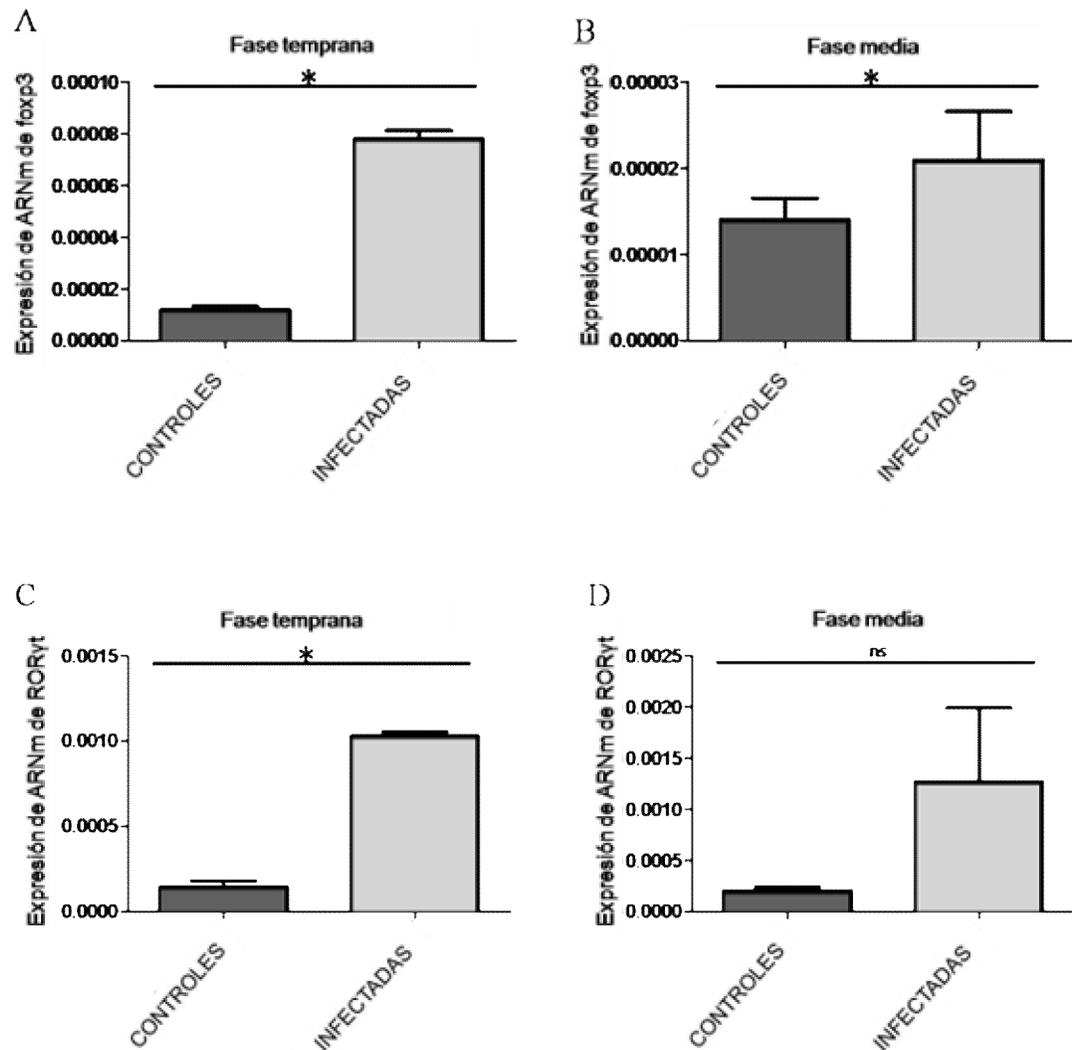


Figura 27: Los úteros de ratonas infectadas con *T. foetus* presentaron niveles de expresión aumentados del ARNm de foxp3 y RORyt con respecto a los animales del grupo control. a–d muestran la expresión del ARNm de foxp3 (a, b) y RORyt (c, d) analizada mediante *real-time* RT-PCR en el útero de ratonas infectadas con *T. foetus* y ratonas controles. Las barras expresan las medianas de cada grupo. *: $P < 0,05$. ns: $P > 0,05$ diferencia no significativa. Los datos fueron analizados mediante el test de Mann–Whitney. a y c muestran los resultados de la fase temprana de la preñez. Grupo control, $n = 5$; grupo infectado, $n = 4$. b y d muestran los resultados de la fase media de la preñez. Grupo control, $n = 6$; grupo infectado, $n = 4$.

El ARNm de IDO se encuentra sobre-expresado, mientras que la expresión del ARNm de HO-1 se encuentra disminuída en el útero de ratonas infectadas con *T. foetus*.

Como se describió anteriormente, la infección con *T. foetus* durante la preñez estimula el sistema inmune, probablemente en un intento de combatir al parásito. La respuesta está caracterizada por una elevada producción de citoquinas Th1 y Th2, así como por un aumento de células Th17 efectoras. A partir de este hallazgo surge preguntarse si la expresión de ciertas enzimas de crucial importancia para la preñez como IDO y HO-1, se ve también afectada por la infección con *T. foetus*.

En este trabajo se detectó que la expresión del ARNm de IDO se encontró elevada en el útero de las ratonas infectadas sacrificadas durante la etapa temprana de la preñez que habían perdido la gestación. En ratonas sacrificadas en la etapa media de la preñez, no existieron diferencias significativas entre los grupos ($P > 0,05$). (Figuras 28a y b).

Para la expresión de HO-1, se observó una disminución del ARNm en las ratonas infectadas donde se confirmó la muerte embrionaria, tanto en la fase temprana como en la fase media de la gestación (Figuras 28c y d).

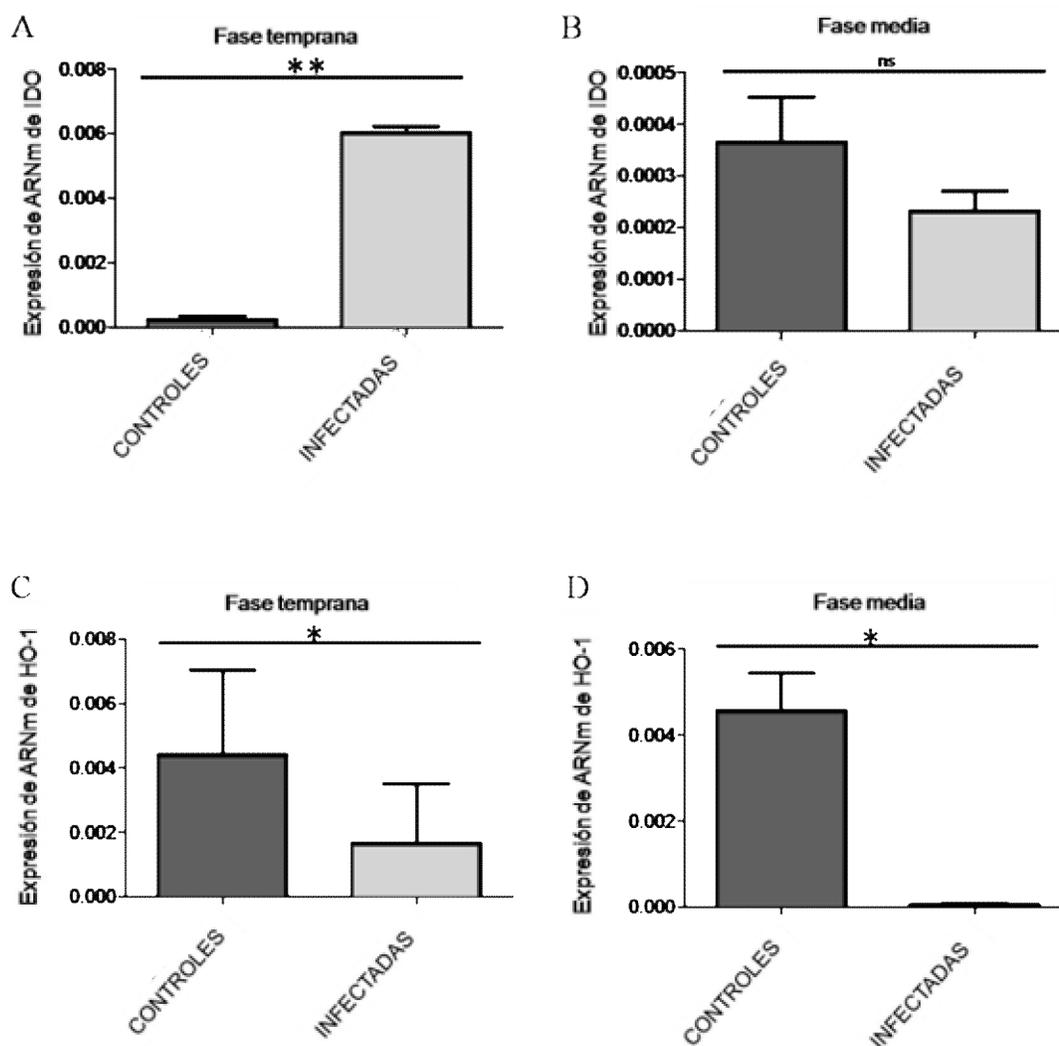


Figura 28: La expresión de indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO) se encuentra aumentada mientras que la de hemooxigenasa-1 (HO-1) está disminuída en el útero de ratonas infectadas con *T. foetus* respecto de las ratonas controles. a–d muestran la expresión del ARNm de IDO (a, b) y HO-1 (c, d) analizada mediante *real-time* RT-PCR en el útero de ratonas infectadas con *T. foetus* y ratonas controles. Las barras expresan las medianas de cada grupo. *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$ y ns: $P > 0,05$ diferencia no significativa. Los datos fueron analizados mediante el test de Mann–Whitney. a y c muestran los resultados de la fase temprana de la preñez. Grupo control, $n = 5$; grupo infectado, $n = 4$. b y d muestran los resultados de la fase media de la preñez. Grupo control, $n = 6$; grupo infectado, $n = 4$.

DISCUSIÓN

La reproducción exitosa en los mamíferos euterios depende de mecanismos que protegen al feto alogénico y controlan al sistema inmune materno, potencialmente hostil, sin dificultar la respuesta inmune dirigida hacia agentes infecciosos.

La muerte embrionaria que se produce por la infección con *T. foetus* podría deberse a una respuesta inmune materna exacerbada hacia el protozoo afectando el normal desarrollo embrionario.

La respuesta inmune más conocida durante la infección con *T. foetus* en el bovino es la humoral (Corbeil y col., 1998). Tanto en vacas naturalmente infectadas como en ratonas experimentalmente infectadas se observa una importante respuesta mediada por IgG en el suero y en el mucus cervico-vaginal con predominio de la IgA en las secreciones vaginales (BonDurant y col., 1993; Agnew y col., 2007; Agnew y col., 2008). Sin embargo, no existen referencias actualizadas con respecto a los cambios relacionados con la respuesta mediada por células en el útero y la placenta durante la tritrichomonosis en el hospedador gestante.

En el presente trabajo se enfatizó la descripción de la respuesta inmune local uterina durante la infección con *T. foetus* en un modelo de ratonas preñadas sincronizadas con bajas dosis de estrógenos. Además, se investigaron los cambios patológicos e inmunológicos asociados con la muerte embrionaria producida en la infección con el protozoo.

Durante la infección temprana con *T. foetus*, ocurre la activación del sistema inmune. En consecuencia, se observó un variado infiltrado de células inflamatorias en el útero de los animales infectados, así como elevados niveles de expresión de citoquinas pro-inflamatorias. Luego de la activación, los macrófagos producen y secretan varias

citoquinas pro-inflamatorias, entre ellas TNF- α (Svanborg y col., 1999). En el modelo experimental utilizado, se observaron abundantes macrófagos en el útero de las ratonas infectadas que podrían ser los responsables de la producción de los elevados niveles de TNF- α que se encontraron en estos animales. La presencia de eosinófilos en el útero de las ratonas infectadas podría estar relacionada con los elevados niveles de IL-4 encontrados en este grupo, dado que los eosinófilos son una fuente importante de dicha citoquina (Dombrowicz y Capron, 2001).

T. foetus es un parásito extracelular que se adhiere a las células epiteliales del tracto genital. Las células Th2 son esenciales en la eliminación de organismos patógenos extracelulares y producen citoquinas relacionadas con la inmunidad humoral (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y TGF- β). Por ello, a medida que la infección con *T. foetus* progresa en el tracto genital, es esperable observar una respuesta inmune de tipo Th2. Además, las células epiteliales de oviducto bovino en cultivo infectadas con *T. foetus*, secretan importantes cantidades de IL-10 en respuesta a la interacción con el protozoo (Chaves Vilela y Benchimol, 2013). En concordancia con esos hallazgos, en este trabajo se encontró un elevado perfil de citoquinas Th2 representado por la mayor expresión de IL-4 e IL-10 en las ratonas infectadas con *T. foetus* al compararlo con las ratonas del grupo control. También se observó una exacerbada respuesta Th1 caracterizada por elevados niveles de ARNm de TNF- α en las ratonas infectadas. Se sabe que la respuesta Th1 estimula a los macrófagos y la producción de anticuerpos opsonizantes (Janeway y col., 2003). Monteavaro y col. (2000) observaron antígenos de *T. foetus* marcados por IHQ en el citoplasma de células fagocíticas de la lámina propia de los cuernos uterinos de ratonas infectadas. Asimismo, Cobo y col. (2004) describieron inmunomarcadores de *T. foetus* en el citoplasma de los macrófagos subepiteliales de la vagina de vaquillonas infectadas. Esto sugiere que los macrófagos procesan antígenos de *T. foetus* para la presentación de los respectivos epitopes. Por lo tanto, la respuesta Th1 aumentada

permitiría estimular la opsonización y fagocitosis del protozoo. El aumento de la respuesta Th1, a pesar de ser protectora por colaborar con la eliminación del parásito, podría ser adversa para el feto, especialmente en la etapa media de la preñez. Barbeito y col. (2008) describieron que la endometritis en ratonas infectadas fue más severa en la etapa media de la preñez cuando ocurre la muerte embrionaria.

Diferentes enfermedades causadas por protozoos provocan la muerte embrionaria y diversos modelos han sido desarrollados en los cuales la muerte embrionaria/fetal podría estar causada por la respuesta inmune materna desencadenada por la presencia del parásito (Ge y col., 2008; Quinn y col., 2002; Innes y col., 2005). *Neospora caninum* es una importante causa de aborto en el ganado bovino. Este parásito intracelular induce una respuesta inmune mediada por células caracterizada por la producción de citoquinas IL-2, TNF- α e IFN- γ , las cuales podrían ser nocivas para la gestación (Dubey y col., 2006). En infecciones causadas por *Leishmania major*, las citoquinas pro-inflamatorias Th1 permiten el control del parásito intracelular, pero son nocivas para la supervivencia del feto (Krishnan y col., 1996^a). La respuesta Th2 dominante es beneficiosa para el desarrollo fetal pero no controla adecuadamente la infección, provocando un aumento de la carga parasitaria en la madre (Krishnan y col., 1996^b).

Las células Treg son una subpoblación de células T especializadas responsables del mantenimiento de la tolerancia inmunológica mediante la supresión activa de los linfocitos autoreactivos (Sakaguchi y col., 1995). Una de sus principales funciones es la prevención de la autoinmunidad (Sakaguchi y col., 2006), además de participar en la tolerancia de los injertos alogénicos (Kingsley y col., 2002). *Foxp3* (*forkhead box transcription factor*) es un factor de transcripción exclusivamente expresado en células Treg (Hori y col., 2003) y es un marcador utilizado para identificar a estas células. Las células Treg son esenciales para el mantenimiento de una activa tolerancia inmune para el feto alogénico durante la gestación (Aluvihare y col., 2004). El número de células Treg se incrementa en el útero

de ratonas preñadas y de mujeres embarazadas (Aluvihare y col., 2004; Sasaki y col., 2004). Un bajo número de dichas células o su débil actividad durante la gestación puede conducir a la pérdida del *conceptus* (Zenclussen y col., 2005^a). En el cruzamiento de ratones CBA x DBA/2, se demostró que las células Treg estaban presentes en bajo número en el útero de las ratonas que abortaron y su funcionalidad se encontraba disminuída (Zenclussen, 2005). Además se demostró que la transferencia de células Treg desde una ratona normal preñada a una ratona predispuesta al aborto evitó el rechazo fetal (Zenclussen y col., 2005^a).

En ratonas preñadas y no preñadas, Ge y col. (2008) demostraron que la infección con el protozoo intracelular *T. gondii* indujo disminución en la expresión del ARNm de *foxp3* y reducción en el número relativo y absoluto de células Treg *foxp3*⁺ tanto en el bazo como en la placenta. La disminución de las células Treg podría ser uno de los mecanismos involucrados en la patogenia del aborto causado por *T. gondii* en ratonas.

En este trabajo, se analizó la expresión del ARNm de *foxp3* para evaluar la presencia de las células Treg en el útero de las ratonas infectadas con *T. foetus* y en las ratonas controles. Se esperaba encontrar una menor expresión de *foxp3* en los cuernos uterinos de las ratonas infectadas, como en el modelo de aborto por toxoplasmosis. Sorpresivamente, la expresión de *foxp3* fue significativamente mayor en el útero de las ratonas infectadas sacrificadas tanto en la etapa temprana como en la etapa media de la preñez sugiriendo una infección persistente. En diversas enfermedades infecciosas, las células Treg han sido reconocidas por controlar la magnitud de la respuesta inmune, manteniendo la homeostasis y limitando el daño tisular causado por una exuberante respuesta inmune antimicrobiana (Belkaid y Rouse, 2005).

Las células Treg tienen dos orígenes diferentes: por un lado, las células CD4⁺ derivadas del timo, que expresan también CD25, conocidas como Tregs de “origen

natural” (Shevach y col., 2006). Por otro lado, células $CD4^+ CD25^+$ que son inducidas periféricamente a partir de precursores $CD25^-$ (Seddon y Mason, 1999). En esta tesis, el ARNm de *foxp3* estuvo significativamente más expresado en el útero de las ratonas infectadas. Como ambos tipos de células Treg expresan *foxp3*, no fue posible distinguir el origen de estas células en el presente trabajo. Es posible especular que en el inicio de la infección con *T. foetus*, las células Treg de origen natural infiltran el útero pero no son capaces de controlar la respuesta inmune materna exacerbada. Posteriormente, las células Treg inducidas llevan a la persistencia del protozoo manteniendo la infección. Esta hipótesis coincide con los resultados de Belkaid y col. (2002) quienes observaron que durante la infección producida por *Leishmania major* en ratones, la población de células Treg se expande para controlar la respuesta inmune efectora conduciendo a una infección crónica. Los microorganismos podrían inducir a las células Treg para suprimir la respuesta inmune efectora y mantener su propia supervivencia. En el presente trabajo se podría hipotetizar que las células $foxp3^+$ podrían aumentar su número para intentar controlar la respuesta T efectora específica dirigida a *T. foetus* para mantener viables a los embriones afectados.

Las células Th17 fueron descritas como la tercera subpoblación de las células T *helper* (Harrington y col., 2005). Las mismas se caracterizan por la producción de una citoquina pro-inflamatoria, la IL-17 y pueden identificarse por la expresión del receptor nuclear “huérfano” ROR γ t (Ivanov y col., 2006). Las células Th17 están involucradas en la patogenia de ciertas enfermedades autoinmunes y en la defensa contra diversos microorganismos (Korn y col., 2009). Es relativamente limitada la información existente sobre el rol de las células Th17 contra infecciones producidas por protozoos. En el caso de infección por *Trypanosoma cruzi* se demostró que la IL-17 fue importante en la resolución de la infección aguda (Miyazaki y col., 2010). Por otro lado, la infección con *T.*

gondii en ratones IL-17R^{-/-} produce una alta mortalidad, sugiriendo que la IL-17 tiene un rol crucial en el control de la infección (Kelly y col., 2005).

El número de células Th17 en el útero durante la preñez murina se encuentra disminuido (Ostojic y col., 2003). En la sangre y la decidua de mujeres embarazadas sanas, el número de Th17 también se reduce, mientras que su presencia está asociada con complicaciones del embarazo como abortos y pre-eclampsia (Santner-Nanan y col., 2009; Wang y col., 2010^a).

En este trabajo, se encontraron niveles elevados de ARNm de RORγt en el útero de ratonas que habían perdido su gestación debido a la infección con *T. foetus*, comparados con los del grupo control. Esto sugiere que el incremento de células que expresan RORγt podría estar implicado en la respuesta inmune contra el protozoo y una respuesta Th17 exacerbada podría ser parcialmente responsable de la muerte embrionaria que ocurre en esta enfermedad. Además, a partir de la observación de células plasmáticas en el endometrio de las ratonas infectadas, es posible especular que la IL-4 y la IL-17 podrían contribuir a la inducción de una respuesta inmune de tipo B, caracterizada por la producción de anticuerpos contra el parásito.

La enzima HO-1 es citoprotectora con un rol crítico durante los procesos inflamatorios, siendo además un mecanismo protector de la gestación bien estudiado (Zenclussen y col., 2006^b). En la combinación predispuesta al aborto CBA x DBA/2, la disminución de HO-1 estuvo asociada con un aumento en la producción de citoquinas Th1/Th2 (Zenclussen y col., 2005^b). Como se mencionó anteriormente, la respuesta Th1 se encuentra relacionada con el rechazo fetal. Además, HO-1 está involucrada en la tolerancia fetal inducida por Treg. Los niveles de ARNm de HO-1 aumentaron en la decidua y la placenta de animales que recibieron Treg para prevenir el aborto inmunológico (Zenclussen y col., 2006^a). En el modelo de aborto inmunológico, Brachwitz

y Zenclussen (comunicación personal, datos no publicados) encontraron que la disminución de la expresión de HO-1 está asociada a la disminución de la población de células uNK. La utilización de terapia génica o cobalto-protoporfirina (Co-PP) para estimular la expresión de HO-1 disminuye la cantidad de abortos en ese modelo y aumenta la cantidad de células uNK (Brachwitz y Zenclussen, datos no publicados). Estos datos sugieren que la HO-1 regula el número de células uNK en la interfase materno-fetal, promoviendo su migración o favoreciendo su supervivencia y proliferación.

Tachibana y col. (2008) demostraron que la expresión de HO-1 disminuyó en la placenta de ratonas infectadas con *Brucella abortus*. Además, el tratamiento con Co-PP, un estimulante de la expresión de HO-1, previno el aborto inducido por la infección bacteriana. Estos autores, también describieron un aumento transitorio de IFN- γ , una citoquina Th1. Las citoquinas Th1 podrían tener un papel importante en la disminución de la expresión de HO-1 en las células del trofoblasto infectadas con *B. abortus* y han sido propuestas como importantes actores en la patogenia del aborto que se produce durante la brucelosis. En esta tesis, mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real, se observó disminución de ARNm de HO-1 en el útero de los animales infectados con muerte embrionaria. La disminución en la expresión de HO-1 en la interfase materno-fetal es potencialmente peligrosa debido a que la acumulación del grupo hemo libre favorece la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales y permite la migración de células de la inflamación (Vachharajani y col., 2000). Adicionalmente, se observó aumento en los niveles de expresión de ARNm para citoquinas Th1 en el grupo de ratonas infectadas con *T. foetus*. Estos resultados concuerdan con aquellos comunicados por Tachibana y col. (2008) en ratones infectados con *B. abortus*. Así como en el modelo murino de brucelosis, la disminución de HO-1 mediada por la respuesta Th1 podría ser un importante mecanismo en la patogenia de la muerte embrionaria debida a la infección con *T. foetus*. Sin embargo, es necesario profundizar los estudios para confirmar el rol de HO-

1 como enzima mediadora en los abortos infecciosos, debido a que su regulación podría ser un interesante objetivo terapéutico.

Finalmente, se analizaron los niveles de ARNm de IDO. IDO es una enzima que cataboliza el triptófano y cumple un rol importante en la respuesta inmune (Mellor y Munn, 1999) y su expresión es estimulada por citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 y TNF- α (Babcock y Carlin, 2000). IDO también ha sido propuesta como una enzima crítica para el mantenimiento de una gestación saludable (Mellor y Munn, 2001). Sin embargo, los animales deficientes en IDO (*knock out*) produjeron descendencia normal (Baban y col., 2004). Estos resultados sugieren que la importancia del sistema IDO en la gestación ha sido sobreestimado. Zenclussen y col. (2006^a) han observado que IDO no estaría involucrada en la tolerancia fetal mediada por células Treg en la interfase materno-fetal.

La inducción de IDO ejerce efectos antimicrobianos, posiblemente por la depleción del triptófano que produce (Taylor y Feng, 1991). Ha sido demostrado que IDO controla la infección causada por *T. cruzi*. El análisis de los mecanismos por los cuales IDO controla la replicación del parásito reveló que los amastigotes de *T. cruzi* eran sensibles a los metabolitos producidos durante el catabolismo del triptófano (Knubel y col., 2010). También se demostró que IDO presenta actividad anti-*T. gondii* que depende de la síntesis de IFN- γ (Fujigaki y col., 2002).

En este trabajo, se encontró que el ARNm de IDO aumenta en el útero de ratonas infectadas que perdieron su preñez y que fueron sacrificadas en la fase temprana de la misma. Debido a su efecto antimicrobiano, es posible que los niveles elevados de IDO durante la infección con *T. foetus* en ratonas preñadas, tengan algún rol antiprotoso.

En conclusión, en las ratonas infectadas con *T. foetus* se producen respuestas T efectoras Th1, Th2 y Th17. La respuesta Th2 es esperable debido a que *T. foetus* es un patógeno extracelular. Por otro lado, la respuesta T efectora de tipo Th1 y Th17 estaría

involucrada en la patogenia de la muerte embrionaria debida a la infección con *T. foetus*. Además, esta respuesta alteraría mecanismos protectores de la preñez como HO-1. El aumento de células Treg promovería la persistencia de la infección debido a sus efectos inmunosupresores.

CONCLUSIONES FINALES

- En el desarrollo de esta tesis, se utilizó un modelo experimental en ratonas BALB/c que permitió estudiar algunos aspectos vinculantes a la patogenia de la muerte embrionaria ocasionada por *T. foetus*.

- Dentro del grupo de ratonas infectadas, algunas hembras se negativizaron para *T. foetus*. Es factible que se haya producido una importante respuesta inmune local uterina hacia el protozoo permitiendo la liberación de la infección y continuidad de la preñez. Dado que tanto la infección con *T. foetus* como la preñez ocurren simultáneamente, la continuidad o interrupción de la misma probablemente dependa del equilibrio entre el protozoo y el microambiente uterino, en el que intervienen factores diversos como la respuesta inmune del hospedador.

- La infección con *T. foetus* en ratonas BALB/c preñadas genera cambios en los carbohidratos del epitelio uterino. Similares cambios se han observado en ratonas no preñadas y en vaquillonas infectadas con *T. foetus*. Los mismos podrían ser determinantes de la patogenia de la enfermedad y muerte embrionaria concomitante que ocurre durante la infección.

- Las modificaciones en el recambio celular de la mucosa uterina, probablemente inducidas por *T. foetus*, podrían intervenir en la patogenia de la muerte embrionaria temprana.

- La muerte y degranulación prematura de las uNK podría contribuir al malfuncionamiento placentario y en consecuencia, a la pérdida del *conceptus*.

- Se destaca el importante rol de los mastocitos, neutrófilos, eosinófilos y macrófagos colaborando en la respuesta inmune local uterina hacia *T. foetus*.

- Los mecanismos inmunes que determinan el éxito de la gestación en mamíferos son complejos y diversos factores pueden participar en la patogenia del aborto infeccioso. En el presente modelo murino, la respuesta efectora Th1 y Th17 tendiente a controlar la infección causada por *T. foetus*, podría participar en la patogenia de la muerte embrionaria durante la infección. Esta respuesta parece alterar los mecanismos que protegen a la preñez, como la expresión de HO-1, poniendo en riesgo, en consecuencia, la supervivencia de los embriones. El aumento de las células Treg en este contexto, podría facilitar la muerte embrionaria, al promover la persistencia de la infección debido a sus efectos inmunosupresores.

- Los hallazgos de esta tesis referentes a la respuesta inmune local uterina en ratonas infectadas experimentalmente con *T. foetus* evidencian similitud, en algunos aspectos, a otras infecciones ocasionadas por parásitos intracelulares.

- Los conocimientos aportados por este estudio acerca de los mecanismos involucrados en la mortalidad embrionaria servirán de base para otros trabajos a fines de dilucidar los mecanismos que acontecen con la mortalidad embrionaria ocasionados por la infección con *T. foetus* en la hembra bovina.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adl SM, Simpson AG, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA, Lodge J, Lynn DH, Mann DG, McCourt RM, Mendoza L, Moestrup O, Mozley-Standridge SE, Nerad TA, Shearer CA, Smirnov AV, Spiegel FW, Taylor MF. The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *Eukaryot Microbiol.* 2005; 52: 399–451.
2. Agnew DW, Munson L, Cobo ER, Olesen D, Corbeil LB, BonDurant RH. Comparative histopathology and antibody responses of non-*Tritrichomonas foetus* trichomonad and *Tritrichomonas foetus* genital infections in virgin heifers. *Vet Parasitol.* 2007; 151: 170–180.
3. Agnew DW, Corbeil LB, Munson L, Byrne BA, BonDurant RH. A Pregnant Mouse Model for Bovine *Tritrichomonas foetus* Infection. *Vet Pathol.* 2008; 45: 849–864.
4. Allen E. The estrous cycle in the mouse. *Am J Anat.* 1922; 30: 297.
5. Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol.* 2004; 5: 266–271.
6. Anderson M, BonDurant R, Corbeil R, Corbeil L. Immune and inflammatory responses to reproductive tract infection with *Tritrichomonas foetus* in immunised and control heifers. *J Parasitol.* 1996; 82: 594-600.

7. Apostolou I, Sarukhan A, Klein L, von Boehmer H. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol.* 2002; 3: 756–763.
8. Ashkar AA, Croy BA. Interferon- γ contributes to the normalcy of murine pregnancy. *Biol Reprod.* 1999; 61: 493–502.
9. Ashkar AA, Di Santo JP, Croy BA. Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer maturation during normal murine pregnancy. *J Exp Med.* 2000; 192: 259-270.
10. Aujla SJ, Dubin PJ, Kolls JK. Th17 cells and mucosal host defense. *Semin Immunol.* 2007; 19: 377–382.
11. Babál P, Russel LC. Sialic acid-specific lectin mediated adhesion of *Tritrichomonas foetus* and *Tritrichomonas mobilensis*. *J Parasitol.* 1999. 85: 33-40.
12. Baban B, Chandler P, McCoola D, Marshall B, Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression is restricted to fetal trophoblast giant cells during murine gestation and is maternal genome specific. *J Reprod Immunol.* 2004; 61: 67-77.
13. Babcock TA, Carlin JM. Transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in interferon-treated epithelial cells. *Cytokine.* 2000; 12: 588-594.
14. Bamberger AM, Schulte HM, Thuncke I, Erdmann I, Bamberger CM, Asa SL. Expression of the apoptosis-inducing Fas ligand (FasL) in human first and third trimester placenta and choriocarcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82: 3173-3175.

15. Bancroft JD, Stevens A. Theory and Practice of Histological Technique, Ed.Churchill, Livingstone, UK, 1990.
16. Barbeito C, Woudwyk M, Cacciato C, Soto P, Portiansky E, Catena M, Echeverría H, Gimeno E, Monteavaro C. *Tritrichomonas foetus*: Experimental Infection in Pregnant BALB/c Mice. Exp Parasitol. 2008; 120: 156–160.
17. Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. Nature. 2002; 420: 502-507.
18. Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. Nat Immunol. 2005; 6: 353-360.
19. Bell SC. Decidualization: regional differentiation and associated function. Oxf Rev Reprod Biol. 1983; 5: 220-271.
20. Benchimol M, Kachar B, de Souza W. The structural organization of the pathogenic protozoan *Tritrichomonas foetus* as seen in replicas of quick frozen, freeze-fractured and deep etched cells. Biol Cell. 1993; 77: 289-295.
21. Benchimol M, de Souza W. Carbohydrate involvement in the association of a prokaryotic cell with *Tritrichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. Parasitol Res. 1995; 81: 459-464.
22. Benchimol M, Dias AB, Fontes R. Interaction of *Tritrichomonas foetus* and the bovine oviduct in an organ culture model. Vet Parasitol. 2006; 140: 244-250.

23. Benchimol M, Dias AB, Fontes R. *Tritrichomonas foetus* damages bovine oocytes in vitro. *Vet Res.* 2007; 38: 399–408.
24. Bianco J, Stephenson K, Yamada AT, Croy BA. Time-Course Analyses Addressing the Acquisition of DBA Lectin Reactivity in Mouse Lymphoid Organs and Uterus During the First Week of Pregnancy. *Placenta.* 2008; 29: 1009–1015.
25. Blois S, Tometten M, Kandil J, Hagen E, Klapp BF, Margni RA, Arck PC. Intercellular Adhesion Molecule-1/LFA-1 Cross Talk is a Proximate Mediator Capable of Disrupting Immune Integration and Tolerance Mechanism at the Feto-Maternal Interface in Murine Pregnancies. *J Immunol.* 2005; 174: 1820-1829.
26. BonDurant RH. Diagnosis, treatment and control of bovine trichomoniasis. *Comp Cont Ed.* 1985; 10: 179-188.
27. BonDurant RH. Abortion/infertility caused by *Tritrichomonas foetus*. En: *Laboratory diagnosis of livestock abortion*, 3era. Edición. ed. Kirkbride CA, Iowa State University Press. Ames, IA, 1990, p. 161-164.
28. BonDurant RH, Corbeil RR, Corbeil LB. Immunization of virgin cows with surface antigen TF1.17 of *Tritrichomonas foetus*. *Infect Immun.* 1993; 61: 1385-1394.
29. BonDurant RH, Honigberg B. Trichomonads of veterinary importance. En *J Kreier Parasitic Protozoa*. 2da. Edición, Vol 9. San Diego, USA, Academic Press, 1994, p. 111-188.

30. BonDurant RH. Pathogenesis, diagnosis and management of trichomoniasis in cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1997; 13: 345-361.

31. Bronson FH, Dagg CP, Snell GD. Reproduction. En: Snell GD *Biology of the laboratory mouse.* Philadelphia, USA, Ed. Blakiston, 1964, p. 187-204.

32. Buendía AJ, Sánchez J, Martínez M, Cámara P, Navarro JA, Rodolakis A, Salinas J. Kinetics of infection and effects on placental cell populations in a murine model of *Clamidia psittaci*-induced abortion. *Infect Immun.* 1998; 66: 2128-2134.

33. Campero CM, Ladds PW, Hirst RG, Vaughan de Emery JA. Detection of *Tritrichomonas foetus* antigens in formalin-fixed, paraffin embedded sections by the peroxidase antiperoxidase technique. *Aust Vet J.* 1989; 66: 264-266.

34. Campero CM. Medios de cultivo para *Tritrichomonas foetus*: consideraciones generales. *Vet Arg.* 1992; 9: 318-323.

35. Campero CM, Conosciuto G, Odriozola E, Moreira AR, Lodeiro R, García Boissou R, Hernaiz R. Hallazgos clínicos, bacteriológicos e histopatológicos en vacas lecheras asociados con problemas reproductivos. *Rev Med Vet.* 1992; 73: 264-272.

36. Campero CM, Cobo ER. *Tritrichomonas foetus*: patogénesis de la mortalidad embrionaria/fetal, caracterización de antígenos vacunales y respuesta inmune inducida. *Revista de Medicina Veterinaria, Bs As, Argentina.* 2006; 87: 47-56.

37. Carson DD, DeSouza MM, Regisford GC. Mucin and proteoglycan functions in embryo implantation. *Bioessays.* 1998; 20: 577-583.

38. Cavalier-Smith T. Kingdom Protozoa and its 18 phyla. *Microbiol Rev.* 1993; 57: 953-994.
39. Chantakru S, Kuziel WA, Maeda N, Croy BA. A study on the density and distribution of uterine Natural Killer cells at mid pregnancy in mice genetically-ablated for CCR2, CCR5 and the CCR5 receptor ligand, MIP-1 α . *J Reprod Immunol.* 2001; 49: 33-47.
40. Chantakru S, Miller C, Roach LE, Kuziel WA, Maeda N, Wang WC, Evans SS, Croy BA. Contributions from self-renewal and trafficking to the uterine NK cell population of early pregnancy. *J Immunol.* 2002; 168: 22-28.
41. Chaouat G, Zourbas S, Ostojic S, Lappree-Delage G, Dubanchet S, Ledee N, Martal J. A brief review of recent data on some cytokine expressions at the materno-foetal interface which might challenge the classical Th1/Th2 dichotomy. *J Reprod Immunol.* 2002; 53: 241–256.
42. Chaves Vilela R, Benchimol M. *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*: interaction with fibroblasts and muscle cells - new insights into parasite-mediated host cell cytotoxicity. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 2012. 107: 720-727.
43. Chaves Vilela R, Benchimol M. IL-10 release by bovine epithelial cells cultured with *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 2013. 108: 110-112.
44. Clark BL, Dufty JH, Parsonson IM. The effect of *Tritrichomonas foetus* on calving rates in beef cattle. *Aust Vet J.* 1983; 60: 71-74.

45. Clark DA, Manuel J, Lee L, Chaouat G, Gorczynski RM, Levy GA. Ecology of danger-dependent cytokine-boosted spontaneous abortion in the CBA x DBA/2 mouse model. I. Synergistic effect of LPS and TNF- α +IFN- γ on pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol*. 2004; 52: 370-378.
46. Cobo ER, Cano D, Campero CM. Experimental infection with *Tritrichomonas suis* in heifers. *Vet Parasitol*. 2001; 99: 73-78.
47. Cobo E, Campero C. Nuevos aspectos inmunológicos y vacunales de la tricomoniasis bovina. *Rev Med Vet*. 2002; 83: 203-208.
48. Cobo ER, Campero CM, Gimeno EJ, Barbeito CG. Lectin binding patterns and Immunohistochemical detection in the genitalia of *Tritrichomonas foetus*-infected heifers. *J Comp Pathol*. 2004; 131: 127-134.
49. Corbeil LB, Hodgson J, Jones D, Corbeil R, Widders P, Stephens L. Adherence of *Tritrichomonas foetus* to bovine vaginal epithelial cells. *Infect. Immun*. 1989; 57: 2158-2167.
50. Corbeil LB. Vaccination strategies against *Tritrichomonas foetus*. *Parasitol Today*. 1994; 10: 103-107.
51. Corbeil LB, Anderson ML, Corbeil RR, Eddow JM, BonDurant RH. Female reproductive tract immunity in bovine trichomoniasis. *Am J Reprod Immunol*. 1998; 39: 189-198.

52. Corbeil LB, Campero CM, Rhyan JC, Anderson ML, Gershwin LJ, Agnew DW, Munson L, BonDurant RH. Uterine mast cells and immunoglobulin-E antibody responses during clearance of *Tritrichomonas foetus*. *Vet Pathol*. 2005; 42: 282-290.
53. Correia-da-Silva G, Bell S, Pringle J, Teixeira N. Patterns of uterine cellular proliferation and apoptosis in the implantation site of the rat during pregnancy. *Placenta*. 2004; 25: 538-547.
54. Crivellato E, Finato N, Ribatti D, Beltrami C. Do mast cells affect villous architecture? Facts and conjectures. *Histol Histopathol*. 2005; 20: 1285-1293.
55. Croy, BA. Granulated metrial gland cells: hypothesis concerning possible functions during murine gestation. *J Reprod Immunol*. 1994; 27: 85–94.
56. Croy BA, Guimond MJ, Luross J, Hahnel A, Wang B, Heuvel MVD. Uterine natural killer cells do not require interleukin-2 for their differentiation or maturation. *Am J Reprod Immunol*. 1997; 37: 463–470.
57. Croy BA. Hasn't the time come to replace the term metrial gland? *J Reprod Immunol*. 1999; 42: 127–129.
58. Croy BA, He H, Esadeg S, Wei Q, McCartney D, Zhang J, Borzychowski A, Ashkar AA, Black GP, Evans SS, Chantakru S, van den Heuvel M, Paffaro VA, Yamada AT. Uterine natural killer cells: insights into their cellular and molecular biology from mouse modelling. *Reproduction*. 2003; 126: 149-160.

59. Croy BA, van den Heuvel M, Borzychowski AM, Tayade C. Uterine natural killer cells: a specialized differentiation regulated by ovarian hormones. *Immunol Rev.* 2006; 214: 161-185.
60. Croy BA, Wessels J, Linton N, Tayade C. Comparison of immune cell recruitment and function in endometrium during development of epitheliochorial (pig) and hemochorial (mouse and human) placentas. *Placenta.* 2009; 23: 23-31.
61. Davies CJ. Why is the fetal allograft not rejected? *J Anim Sci.* 2007; 85: E32-E35.
62. Demir R, Kayisli UA, Celik-Ozenci C, Korgun ET, Demir-Weustend AY, Arici A. Structural differentiation of human uterine luminal and glandular epithelium during early pregnancy: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Placenta.* 2002; 23: 672-684.
63. Diamond LS. Lumen-dwelling protozoa: Entamoeba, Trichomonads and Giardia. En *In vitro* cultivation of protozoan parasites. J.B. Jensen (Ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, CRC Press, 1987, p. 89-98.
64. Dombrowicz D, Capron M. Eosinophils, allergy and parasites. *Curr Opin Immunol.* 2001; 13: 716–720.
65. Dubey JP, Buxton D, Wouda W. Pathogenesis of Bovine Neosporosis. *J Comp Path.* 2006; 134: 267-289.
66. Duc-Goiran P, Mignot TM, Bourgeois C, Ferré F. Embryo–maternal interactions at the implantation site: a delicate equilibrium. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1999; 83: 85–100.

67. Eaglesome M, Garcia M. Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. Part I. *Brucella abortus*, *Leptospira*, *Campylobacter fetus* and *Tritrichomonas foetus*. Vet Bulletin. 1992; 62: 743-775.
68. Entrican G. Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. J Comp Pathol. 2002; 126: 79-94.
69. Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, Belladonna ML, Fioretti MC, Alegre ML, Puccetti P. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. Nat Immunol. 2003; 4: 1206-1212.
70. Felleisen RS, Lambelet N, Bachmann P, Nicolet J, Müller N, Gottstein B. Detection of *Tritrichomonas foetus* by PCR and DNA enzyme immunoassay based on rRNA gene unit sequences. J Clin Microbiol. 1998; 36: 513-519.
71. Felleisen RS. Host-parasite interaction in bovine infection with *Tritrichomonas foetus*. Microbes Infect. 1999; 1: 807-816.
72. Fernández PE, Portiansky EL, Barbeito CG, Gimeno EJ. Characterization of Cytotrophoblastic-like cells present in subinvolutioned placental sites of the bitch. Histol Histopathol. 1998; 13: 995-1000.
73. Fernández PE, Barbeito CG, Portiansky EL, Gimeno EJ. Intermediate filament proteins expression and sugar moieties of the normal canine placenta. Histol Histopathol. 2000; 15: 1-6.

74. Fitzgerald PR, Johnson AE, Thorne JL, Hammond DM. Experimental infections of the bovine genital system with trichomonads from the digestive tracts of swine. *Am J Vet Res.* 1958; 19: 775-779.
75. Fox A, Lee CS, Brandon MR, Meeusen ENT. Effects of pregnancy on lymphocytes within sheep uterine interplacentomal epithelium. *Am J Reprod Immunol.* 1998; 40: 295-302.
76. Frumento G, Rotondo R, Tonetti M, Damonte G, Bernatti U, Ferrara GB. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Exp Med.* 2002; 196: 459-468.
77. Fujigaki S, Saito K, Takemura M, Maekawa N, Yamada Y, Wada H, Seishima M. L-tryptophan-L-kynurenine pathway metabolism accelerated by *Toxoplasma gondii* infection is abolished in gamma interferon-gene-deficient mice: cross-regulation between inducible nitric oxide synthase and indoleamine-2,3-dioxygenase. *Infect Immun.* 2002; 70: 779-786.
78. Ge YY, Zhang L, Zhang G, Wu J P, Tan MJ, Hu W, Liang YJ, Wang Y. In pregnant mice, the infection of *Toxoplasma gondii* causes the decrease of CD4+CD25+-regulatory T cells. *Parasite Immunol.* 2008; 30: 471-481.
79. Gendron RL, Baines MG. Infiltrating decidual natural killer cells are associated with spontaneous abortion in mice. *Cell Immunol.* 1988; 113: 261-267.
80. Gibbons AFE, Chang MC. Number of mast cells in the rat uterus with special reference to its relation to hormonal treatment and decidual response. *Biol Reprod.* 1972; 6: 193-203.

81. Gu Y, Jow GM, Moulton BC, Lee C, Sensibar JA, Park-Sarge O-K, Chen TJ, Giborit G. Apoptosis in Decidual Tissue Regression and Reorganization. *Endocrinology*. 1994; 135: 1272-1279.
82. Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CC-W, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillett CE, Camplejohn R, Dover R. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol*. 1990; 162: 285–294.
83. Hansen PJ. Interactions between the immune system and the ruminant conceptus. *J Reprod Fertil Suppl*. 1995; 49: 69-82.
84. Hansen PJ, Lee WJ. Immunological aspects of pregnancy: concepts and speculations using the sheep as a model. *Anim Reprod Sci*. 1996; 42: 483-493.
85. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005; 6: 1123-1132.
86. Hodgson JL, Jones WD, Widders PR, Corbeil LB. Characterization of *Tritrichomonas foetus* antigens by use of monoclonal antibodies. *Infec Immun*. 1990; 58: 3078-3083.
87. Honigberg BM. Trichomonads of veterinary importance. *Parasitic Protozoa*, Vol 2. Academic Press, New York, 1978, p. 163-273.
88. Honigberg BM, Volkmann D, Entzeroth R, Scholtyseck E. A freeze-fracture electron microscope study of *Tritrichomonas vaginalis* (Donné) and *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller). *J Protozool*. 1984; 31: 116-131.

89. Hook RR, St Claire MC, Riley LK, Franklin CL, Bessch-Williford CL. Mouse strain and age affect susceptibility to experimentally induced genital trichomoniasis. *Lab Anim Sci*. 1997; 47: 324-326.
90. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003; 299: 1057–1061.
91. Hunt JS, Petroff MG, Burnett TG. Uterine leukocytes: key players in pregnancy. *Sem Cell Tiss Dev*. 2000; 11: 127-137.
92. Ikeda JS, BonDurant RH, Campero CM, Corbeil LB. Conservation of a protective surface antigen of *Tritrichomonas foetus*. *J Clin Microbiol*. 1993; 31: 3289-3295.
93. Innes EA, Wright S, Bartley P, Maley S, Macaldowie C, Esteban-Redondo I, Buxton D. The host–parasite relationship in bovine neosporosis. *Vet Immunol Immunopathol*. 2005; 108: 29-36.
94. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*. 2006; 126: 1121-1133.
95. Janeway Jr CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Inmunobiología: el sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad*. 2da. Edición. Ed Masson, Barcelona, España, 2003.

96. Jubb KV, Kennedy PC, Palmer N. Pathology of Domestic Animals. 4 ed. Academic Press. USA. 1993.
97. Jungi TW, Besedovsky HO, Sorkin C, Schardt M. Hormonal control of neutrophils chemotactic activity in rat vagina. Am J Physiol. 1977; 233: 59-65.
98. Kaloglu C, Bulut HE. Vascular endothelial growth factor production by rat granulated metrial gland cells and their morphological features in normal and pathological conditions. Reprod Fertil Dev. 2007; 19: 341-350.
99. Kania SA, Reed SL, Thomford JW, BonDurant RH, Hirata K, Corbeil RR, North MJ, Corbeil LB. Degradation of bovine complement C3 by trichomonad extracellular proteinase. Vet Immunol Immunopathol. 2001; 78: 86–96.
100. Kelly MN, Kolls JK, Happel K, Schwartzman JD, Schwarzenberger P, Combe C, Moretto M, Khan IA. Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. Infect Immun. 2005; 73: 617-621.
101. Kimber SJ. Leukaemia inhibitory factor in implantation and uterine biology. Reproduction. 2005; 130: 131-145.
102. King A, Jokhi PP, Burrows TD, Gardner L, Sharkey AM, Loke YW. Functions of human decidual NK cells. Am J Reprod Immunol. 1996; 35: 258-260.
103. King NJ, Thomas SR. Molecules in focus: indoleamine 2,3-dioxygenase. Int J Biochem Cell Biol. 2007; 39: 2167-2172.

104. Kingsley CL, Karim M, Bushell AR, Wood K. CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol.* 2002; 168: 1080–1086.
105. Kitamura Y. Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations. *Annu Rev Immunol.* 1989; 7: 59-76.
106. Kleina P, Bettim-Bandinelli J, Bonatto SL, Benchimol M, Reis Bogo M. Molecular phylogeny of Trichomonadidae family inferred from ITS-1, 5.8S rRNA and ITS-2 sequences. *Int J Parasitol.* 2004; 34: 963-970.
107. Knubel CP, Martínez FF, Fretes RE, Díaz Lujan C, Theumer MG, Cervi L, Motrán CC. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is critical for host resistance against *Trypanosoma cruzi*. *FASEB J.* 2010; 24: 2689-2701.
108. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27: 485-517.
109. Krishnan L, Guilbert LJ, Wegmann TG, Belosevic M, Mosmann TR. T helper 1 response against *Leishmania major* in pregnant C57BL/6 mice increases implantation failure and fetal resorptions. Correlation with increased IFN-gamma and TNF and reduced IL-10 production by placental cells. *J Immunol.* 1996a; 156: 653-662.
110. Krishnan L, Guilbert LJ, Russell AS, Wegmann TG, Mosmann TR, Belosevic M. Pregnancy impairs resistance of C57BL/6 mice to *Leishmania major* infection and causes decreased antigen-specific IFN-gamma response and increased production of T helper 2 cytokines. *J Immunol.* 1996b; 156: 644-652.

111. Kuehner KA, Marks SL. *Tritrichomonas foetus* infection in purebred cats in Germany: Prevalence of clinical signs and the role of co-infection with other enteroparasites. *J Feline Med Surg*. 2011; 13: 251-258.
112. Kulda J. Employment of experimental animals in studies of *Tritrichomonas vaginalis* infection. En: *Trichomonads Parasitic in Humans*, Springer-Verlag, New York, NY. Ed. Hornberg BM, 1990, p. 112-154.
113. Kusakabe K, Okada T, Sasaki F, Kiso Y. Cell death of uterine natural killer cells in murine placenta during placentation and preterm periods. *J Vet Med Sci*. 1999; 61: 1093-1100.
114. Lohr J, Knoechel B, Wang JJ, Villarino AV, Abbas AK. Role of IL-17 and regulatory T lymphocytes in a systemic autoimmune disease. *J Exp Med*. 2006; 203: 2785-2791.
115. MacDonald EM, Nelson PM, Byme HJ, Tatum AL. *Tritrichomonas foetus* experimental infection in rabbits. *J Immunol*. 1948; 59: 295-300.
116. Maestrone G, Semar R. Experimental intravaginal infection with *Tritrichomonas foetus* in guinea pigs. *Chemotherapia*. 1967; 12: 137-145.
117. Maga G, Hübscher U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci*. 2003; 116: 3051-3060.
118. Mancebo OA, Russo AM, Carabajal LL, Monzon CM. Persistence of *Tritrichomonas foetus* in naturally infected cows and heifers in Argentina. *Vet Parasitol*. 1995; 59:7-11.

119. Margni RA, Zenclussen AC. During pregnancy, in the context of a Th2-type cytokine profile, serum IL-6 levels might condition the quality of the synthesized antibodies. *Am J Reprod Immunol*. 2001; 46: 181-189.
120. Margni RA, Malon Borel I, Gentile MD, Miranda S, Canellada S, Gutierrez G, Zenclussen AC. El paradigma Th1/Th2 durante la gestación: ¿Cambio simple o modulado? En: Rabinovich GA *Inmunopatología molecular: Nuevas fronteras de la medicina*. 1era. Edición. Buenos Aires, Argentina, Ed Panamericana, 2004, p. 359-366.
121. McCool CJ, Gilham MP, Wolfe SG, Simpson M, Olm T. Prevalence of trichomonas and *Campylobacter fetus* subsp fetus in the Australian swamp buffalo population. *Technote*. 1987; 47: 1-5.
122. Medawar PB. Some immunological and endocrinological problems raised by evolution of viviparity in vertebrates. *Symp Soc Exp Biol*. 1953; 7: 320-338.
123. Mellor AL, Munn DH. Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? *Immunol Today*. 1999; 20: 469-473.
124. Mellor AL, Munn DH. Extinguishing maternal immune responses during pregnancy: implications for immunosuppression. *Semin Immunol*. 2001; 13: 213-218.
125. Midlej V, Vilela R, Dias AB, Benchimol M. Cytopathic effects of *Tritrichomonas foetus* on bovine oviduct cells. *Vet Parasitol*. 2009; 165: 216-230.

126. Miyazaki Y, Hamano S, Wang S, Shimano Y, Iwakura Y, Yoshida H. IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.* 2010; 185: 1150-1157.

127. Moffett A, Loke C. Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nat. Rev. Immunol.* 2006; 6: 584-594.

128. Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S. PCNA, the Maestro of the replication fork. *Cell.* 2007; 129: 665-679.

129. Monteavaro C, Soto P, Echeverría H, Catena M, Portiansky E and Gimeno E. Immunohistochemical detection of *Tritrichomonas foetus* in experimentally infected mice. *Pesq Vet Bras.* 2000; 20: 43-46.

130. Monteavaro CE. Tritrichomonosis genital bovina: un modelo experimental en el ratón BALB/c. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. 2004.

131. Monteavaro C, Aguirre J, Soto P, Echeverría H, Catena M, Portiansky E, Gimeno E. Interaction of *Tritrichomonas foetus* with the reproductive tract of experimentally infected female BALB/c mice: ultrastructural evaluation. *Vet J.* 2005; 173: 206-210.

132. Monteavaro CE, Soto P, Gimeno EJ, Echeverría HM, Catena M, Portiansky EL, Barbeito CG. Histological and Lectin Binding Changes in the Genital Tract of Mice Infected with *Tritrichomonas foetus*. *J Comp Path.* 2008; 138: 40-45.

133. Munn D, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown Cand Mellor AL. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science*. 1998; 281: 1191-1193.
134. Okamoto S, Wakui M, Kobayashi H, Sato N, Ishida A, Tanabe M, Takeuchi T, Fukshima S, Yamada T, Ikeda Y. *Tritrichomonas foetus* meningoencephalitis after allogenic peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transpl*. 1998; 21: 89-91.
135. Olivares EG, Muñoz R, Tejerizo G, Montes MJ, Gómez-Molina F, Abadía-Molina AC. Decidual lymphocytes of human spontaneous abortion induce apoptosis but not necrosis in JEG-3 extravillous trophoblast cells. *Biol Reprod*. 2002; 67: 1211-1217.
136. Öner H, Öner J, Demir R. Distributions of PCNA and Cas-3 in rat uterus during early pregnancy. *Folia Histochem Cytobiol*. 2010; 48: 71-77.
137. Ostojic S, Dubanchet S, Chaouat G, Abdelkarim M, Truyens C, Capron F. Demonstration of the presence of IL-16, IL-17 and IL-18 at the murine fetomaternal interface during murine pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2003; 49: 101–112.
138. Paffaro VA, Bizinotto MC, Joazeiro PP, Yamada AT. Subset classification of mouse uterine natural killer cells by DBA lectin reactivity. *Placenta*. 2003; 24: 479-488.
139. Palladino MR, Campero CM, Villar JA. Resistencia de *Trichomonas foetus* a tricomonocidas. Parte II. Prueba en Hamster. *Gac Vet*. 1982; 44: 400-406.
140. Parr EL, Tung HN, Parr MB. Apoptosis as the mode of uterine epithelial cell death during embryo implantation in mice and rats. *Biol Reprod*. 1987; 36: 211-225.

141. Parsonson IM, Clark BL, Dufty JH. Early pathogenesis and pathology of *Tritrichomonas foetus* infection in virgin heifers. *J Comp Pathol.* 1976; 86: 59–66.
142. Peck A, Mellins ED. Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example. *Immunology.* 2010; 129: 147-153.
143. Peel S. Granulated metrial gland cells. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 1989; 115: 1–112.
144. Pereira-Neves A, Campero CM, Martinez A, Benchimol M. Identification of *Tritrichomonas foetus* pseudocysts in fresh preputial secretion samples from bulls. *Vet Parasitol.* 2011; 175: 1-8.
145. Piccini MP, Romagnani S. Regulation of fetal allograft survival by hormone-controlled Th1- and Th2-type cytokines. *Immunol Res.* 1996; 15: 141–150.
146. Piccini MP, Beloni L, Livi C, Maggi E, Scarselli GF, Romagnani S. A defective production of both leukaemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual cells in unexplained recurrent abortions. *Nat Med.* 1998; 4: 1020-1024.
147. Portiansky EL, Massone AR, Gimeno EJ. Kinetics of epitope retrieval techniques for unmasking of cytokeratins in bovine prostatic tissue after different formaldehyde fixation times. *Appl Immunohistoch.* 1997; 5: 194-201.
148. Quinn HE, Ellis JT, Smith NC. *Neospora caninum*: a cause of immunemediated failure of pregnancy? *Trends Parasitol.* 2002; 18(9): 391-394.

149. Rae DO, Crews JE. *Tritrichomonas foetus*. Vet Clin Food Anim. 2006, 22: 595-611.
150. Rhyan JC, Stackhouse LL, Quinn WJ. Fetal and placental lesions in bovine abortion due to *Tritrichomonas foetus*. Vet Pathol. 1988; 25: 350-355.
151. Rhyan JC, Blanchard PC, Kvasnicka WG, Hall MR, Hanks D. Tissue-invasive *Tritrichomonas foetus* in four aborted bovine fetuses. J Vet Diagn Invest. 1995a; 7: 409-412.
152. Rhyan JC, Wilson KL, Burgess DE, Stackhouse LL, Quinn WJ. Immunohistochemical detection of *Tritrichomonas foetus* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of bovine placenta and fetal lung. J Vet Diagn Invest. 1995b; 7: 98-101.
153. Rossant J, Cross J. Placental Development: Lessons from Mouse Mutants. Nature. 2001; 2: 538-546.
154. Rudolph MI, Bardisa L, Cruz MA, Reinicke K. Mast cell mediators evoke contractility and potentiate each other in mouse uterine horns. Gen Pharmacol. 1992; 23: 883-836.
155. Rugh R. Normal development of the mouse. En: Rugh R The mouse: its reproduction and development. Minneapolis, MN, USA, Ed Burgess Publishing Company, 1968, p. 45-101.
156. Rutkowski MR, Harmsen AG. *Tritrichomonas foetus*: Pathogenesis of acute infection in normal, estradiol-treated, and stressed mice. Exp Parasitol. 2007; 115: 143-159.

157. Rutkowski MR, McNamee LA, Harmsen AG. Neutrophils and inducible nitric-oxide synthase are critical for early resistance to the establishment of *Trichomonas foetus* infection. *J Parasitol.* 2007; 93: 562-574.

158. Saito S. Cytokine network at the fetomaternal interface. *J Reprod Immunol.* 2000; 47: 87-103.

159. Saito S, Shima T, Nakashima A, Shiozaki A, Ito M, Sasaki Y. What is the role of regulatory T cells in the success of implantation and early pregnancy? *J Assist Reprod Genet.* 2007; 24: 379-386.

160. Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and Regulatory T cells paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 2010; 63: 601-610.

161. Saito S, Nakashima A, Ito M, Shima T. Clinical implication of recent advances in our understanding of IL-17 and reproductive immunology. *Expert Rev Clin Immunol.* 2011; 7: 649-657.

162. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunological self-tolerance maintained by activated T-cells expressing IL-2 receptor alpha chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995; 155: 1151-1164.

163. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol.* 2005; 6: 345-352.

164. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, Shimizu J, Takahashi T, Nomura T. Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev.* 2006; 212: 8–27.
165. Sant'Ana F, Nascimento E, Gimeno E, Barbeito C. Cyclic related and pathological changes in the lectin-binding sites on the swine oviduct. *Rep Dom An.* 2005; 40: 40-45.
166. Santner-Nanan B, Peek MJ, Khanam R, Richarts L, Zhu E, Fazekas de St Groth B, Nanan R. Systemic increase in the ratio between Foxp3⁺ and IL-17-producing CD4⁺ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia. *J Immunol.* 2009; 183: 7023-7030.
167. Sasaki Y, Sakai M, Miyazaki S, Higuma S, Shiozaki A, Saito S. Decidual and peripheral blood CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol Hum Reprod.* 2004; 10: 347–353.
168. Schlafke S, Enders AC. Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. *Biol Reprod.* 1975; 12: 41-65.
169. Schumacher A, Wafula PO, Bertoja AZ, Sollwedel A, Thuere C, Wollenberg I, Yagita H, Volk HD, Zenclussen AC. Mechanisms of action of regulatory T cells specific for paternal antigens during pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2007; 110: 1137–1145.
170. Schumacher A, Wafula PO, Teles A, El-Mousleh T, Linzke N, Zenclussen ML, Langwisch S, Heinze K, Wollenberg I, Casalis PA, Volk HD, Fest S, Zenclussen AC. Blockage of heme oxygenase-1 abrogates the protective effect of regulatory T cells on murine pregnancy and promotes the maturation of dendritic cells. *PLoS One.* 2012; 7: e42301.

171. Seddon B, Mason D. Peripheral autoantigen induces regulatory T cells that prevent autoimmunity. *J Exp Med*. 1999; 189: 877–882.

172. Shaia CI, Voyich J, Gillis SJ, Singh BN, Burgess DE. Purification and expression of the Tf190 adhesin in *Tritrichomonas foetus*. *Infect Immun*. 1998; 66: 1100-1105.

173. Shevach EM, DiPaolo RA, Andersson J, Zhao DM, Stephens GL, Thornton AM. The lifestyle of naturally occurring CD4 + CD25 + Foxp3 + regulatory T cells. *Immunol Rev*. 2006; 212: 60–73.

174. Simpson AG. Cytoskeletal organization, phylogenetic affinities and systematics in the contentious taxon Excavata (Eukaryota). *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003; 53:1759-1777.

175. Singh BN, Lucas JJ, Beach DH, Shin ST, Gilbert RO. Adhesion of *Tritrichomonas foetus* to bovine vaginal epithelial cells. *Infect Immun*. 1999; 67: 3847-3854.

176. Singh BN, BonDurant RH, Campero CM, Corbeil LB. Immunological and biochemical analysis of glycosylated surface antigens and lipophosphoglycan of *Tritrichomonas foetus*. *J Parasitol*. 2001; 87: 770-777.

177. Singh BN, Lucas JJ, Hayes GR, Ish Kumar, Beach DH, Frajblat M, Gilbert RO, Sommer U, Costello CE. *Tritrichomonas foetus* induces apoptotic cell death in bovine vaginal epithelial cells. *Infect Immun*. 2004; 72: 4151-4158.

178. Singh BN, Hayes GR, Lucas JJ, Beach DH, Gilbert RO. In vitro cytopathic effects of a cysteine protease of *Tritrichomonas foetus* on cultured bovine uterine epithelial cells. *Am J Vet Res*. 2005; 66: 1181-1186.

179. Skirrow SZ, BonDurant RH. Immunoglobulin isotype of specific antibodies in reproductive tract secretions and sera in *Tritrichomonas foetus*-infected heifers. *Am J Vet Res.* 1990; 51: 645-653.
180. Soares MP, Lin Y, Anrather J, Csizmadia E, Takigami K, Sato K, Grey ST, Colvin RB, Choi AM, Poss KD, Bach FH. Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival. *Nat Med.* 1998; 4: 1073- 1077.
181. Sokal RR, Rohlf FJ. *Introducción a la Bioestadística.* Edición en español. Barcelona, España, Editorial Reverté, 1980.
182. Soto P, Parma AE. The immune response in cattle infected with *Tritrichomonas foetus*. *Vet Parasitol.* 1989; 33: 343-348.
183. Soto P, Echevarría H, Monteavaro C, Catena M: Experimentally induced intravaginal *Tritrichomonas foetus* infection in a mouse model. *Braz J Vet Res An Sci.* 2005; 25: 225-230.
184. St. Claire MC, Riley LK, Franklin CL, Besch-Williford CL, Hook Jr RR. Experimentally induced intravaginal *Tritrichomonas foetus* infection in the estrogenized mouse. *Lab Anim Sci.* 1994; 44: 430-434.
185. Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, Abbondanzo SJ. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature.* 1992; 359: 76-79.

186. Stewart I, Peel S. The Structure and Differentiation of Granulated Metrial Gland Cells of the Pregnant mouse Uterus. *Cell Tiss Res.* 1977; 184: 517-527.
187. Stewart IJ, Peel S. Granulated metrial glands cells at implantation sites of the pregnant mouse uterus. *Anat Embryol*, 1980; 160: 227–238.
188. Stewart IJ. Granulated metrial gland cells: pregnancy specific leukocytes? *J Leukoc Biol.* 1991; 50: 198-207.
189. Stewart IJ, Bebington CR, Mukhta DDY. Lectin binding characteristics of mouse placental cells. *J. Anat.* 2000; 196: 371-378.
190. Svanborg C, Godaly G, Hedlund M. Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence. *Curr Opin Microbiol*, 1999; 2: 99–105.
191. Svensson L, Arvola M, Sällström MA, Holmdahl R, Mattsson R. The Th2 cytokines IL-4 and IL-10 are not crucial for the completion of allogeneic pregnancy in mice. *J Reprod Immunol.* 2001; 51: 3-7.
192. Tachezy J, Suchan P, Schrevel J, Kulda J. The host-protein-independent iron uptake by *Tritrichomonas foetus*. *Exp. Parasitol.* 1998; 90: 155-163.
193. Tachibana M, Watanabe K, Yamasaki Y, Suzuki H, Watarai M. Expression of heme oxygenase-1 is associated with abortion caused by *Brucella abortus* infection in pregnant mice. *Microb Pathog.* 2008; 45: 105-109.

194. Talbot JA, Nielsen K, Corbeil LB. Cleavage of reproductive secretions by extracellular proteinases of *Tritrichomonas foetus*. *Can J Microbiol.* 1991; 37: 384-390.
195. Taylor MA, Marshall RN, Stack M. Morphological differentiation of *Tritrichomonas foetus* from other protozoa of the bovine reproductive tract. *Br Vet J.* 1994; 150: 73-80.
196. Taylor MW, Feng GS. Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB J.* 1991; 5: 2516-2522.
197. Terzolo HR, Argento E, Catena MC, Cipolla AL, Martinez AH, Tejada G, Villa C, Bentancort L, Campero CM, Cordeviola JM, Pasini MI. Procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la campylobacteriosis y tricomoniasis genital bovina. Documento de la Comisión Científica Permanente de Enfermedades Venéreas de los Bovinos. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico. Centro Regional Buenos Aires Sur, INTA Balcarce, 1992, p. 1-33.
198. Thomford J, Talbot J, Ikeda J, Corbeil L. Characterization of extracellular proteinases of *Tritrichomonas foetus*. *J Parasitol.* 1996; 82: 112-117.
199. Vachharajani TJ, Work J, Issekutz AC, Granger DN. Heme oxygenase modulates selectin expression in different regional vascular beds. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 278: 1613-1617.
200. Van Andel RA, Franklin CL, St. Claire MC, Riley LK, Besch-Williford CL, Hook RR Jr. Lesions of experimental genital *Tritrichomonas foetus* infections in estrogenized BALB/c mice. *Vet Pathol.* 1996; 33: 407-411.

201. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGF-beta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17 producing T cells. *Immunity*. 2006; 24: 179-189.

202. Walden HS, Dykstra C, Dillon A, Rodning S, Givens D, Bird R, Newton J, Lindsay D. A new species of *Tritrichomonas* (Sarcostigophora: Trichomonida) from the domestic cat (*Felis catus*). *Parasitol Res*. 2013; DOI 10.1007/s00436-013-3381-8.

203. Wang WJ, Hao CF, Yi-Lin, Yin GJ, Bao SH, Qiu LH, Lin QD. Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *J Reprod Immunol*. 2010a; 84: 164-170.

204. Wang WJ, Hao CF, Qu QL, Wang X, Qiu LH, Lin QD. The deregulation of regulatory T cells on interleukin-17-producing T helper cells in patients with unexplained early recurrent miscarriage. *Hum Reprod*. 2010b; 25: 2591-2596.

205. Wegmann T, Lin H, Gilbert L, Mosmann T. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol Today*. 1993; 14: 353-356.

206. Welsh AO, Enders AC. Chorioallantoic placenta formation in the rat. III. Granulated cells invade the uterine luminal epithelium at the time of epithelial cell death. *Biol Reprod*. 1993; 49: 38-57.

207. Widayati DT, Ohmori Y, Fukuta K. Distribution patterns of immunocompetent cells in the pregnant mouse uteri carrying allogeneic mouse and xenogeneic vole embryos. *J Anat*. 2004; 205: 45-55.

208. Yranzo NL. Inmunobiología del embarazo: Mecanismos celulares y moleculares involucrados en el mantenimiento de la unidad materno-fetal. En: Rabinovich GA Inmunopatología molecular: Nuevas fronteras de la medicina. 1era. Edición. Buenos Aires, Argentina, Ed Panamericana, 2004, p. 351-358.

209. Yuan J, Horvitz HR. A first insight into the molecular mechanisms of apoptosis. *Cell*. 2004; 116: 53-56.

210. Yujing Bi, Guangwei Liu, Ruifu Yang. Th17 Cell Induction and Immune Regulatory Effects. *J Cell Physiol*. 2007; 211: 273–278.

211. Zenclussen AC, Gentile MT, Kortebani G. Mazzolli A, Margni RA. Asymmetric antibodies and pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2001; 45: 289-294.

212. Zenclussen AC, Lim E, Knoeller S, Knackstedt M, Hertwig K, Hagen E, Klapp BF, Arck PC. Heme oxygenases in pregnancy. II: HO-2 is downregulated in human pathologic pregnancies. *Am J Reprod Immunol*. 2003a; 50: 66–76.

213. Zenclussen AC, Blois S, Olmos S, Roux ME, Margni RA. Murine abortion is associated with enhanced interleukin-6 levels at the feto-maternal interface. *Cytokine*. 2003b; 24: 150-160.

214. Zenclussen AC. CD4+CD25+ T regulatory cells in murine pregnancy. *J Reprod Immunol*. 2005; 65: 101-110.

215. Zenclussen AC, Gerlof K, Zenclussen ML, Sollwedel A, Zambon-Bertoja A, Ritter T, Kotsch K, Leber J, Volk HD. Abnormal T-cell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: adoptive transfer of pregnancy-induced CD4+CD25+ T regulatory

cells prevents fetal rejection in a murine abortion model. *Am J Pathol.* 2005a; 163: 811-822.

216. Zenclussen AC, Sollwedel A, Bertoja AZ, Gerlof K, Zenclussen ML, Woiciechowsky C, Volk HD. Heme oxygenase as a therapeutic target in immunological pregnancy complications. *Int Immunopharmacol.* 2005b; 5: 41–51.

217. Zenclussen AC. Regulatory T cells in pregnancy. *Springer Semin Immunopathol.* 2006; 28: 31-39.

218. Zenclussen AC, Gerlof K, Zenclussen ML, Ritschel S, Zambon Bertoja A, Fest S, Hontsu S, Ueha S, Matsushima K, Leber J, Volk HD. Regulatory T cells induce a privileged tolerant microenvironment at the fetal-maternal interface. *Eur J Immunol.* 2006a; 36: 82-94.

219. Zenclussen ML, Anegon I, Zambon Bertoja A, Chauveau C, Vogt K, Gerlof K, Sollwedel A, Volk HD, Ritter T, Zenclussen AC. Over-expression of heme oxygenase-1 by adenoviral gene transfer improves pregnancy outcome in a murine model of abortion. *J Reprod Immunol.* 2006b; 69: 35–52.

220. Zenclussen AC, Schumacher A, Zenclussen ML, Wafula P, Volk HD. Immunology of pregnancy: cellular mechanisms allowing fetal survival within the maternal uterus. *Exp Rev Mol Med.* 2007; 9: 1-14.

221. Zenclussen ML, Casalis PA, El-Mousleh T, Rebelo S, Langwisch S, Linzke N, Volk HD, Fest S, Soares MP, Zenclussen AC. Haem oxygenase-1 dictates intrauterine fetal survival in mice via carbon monoxide. *J Pathol.* 2011; 225: 293-304.

222. Zhang JH, Yamada AT, Croy BA. DBA-lectin reactivity defines natural killer cells that have homed to mouse decidua. *Placenta*. 2009; 30: 968–973.

223. Zheng LM, Ojcius DM, Young JDE. Role of granulated metrial gland cells in the immunology of pregnancy. *Am J Reprod Immunol*, 1991a; 25: 72–76.

224. Zheng LM, Ojcius DM, Liu CC, Kramer MD, Simon MM, Parr EL, Young JD. Immunogold labeling of perforin and serine esterases in granulated metrial gland cells. *FASEB J*. 1991b; 5: 79–85.

ANEXO

PROTOSCOLOS:

HEMATOXILINA Y EOSINA

1. Desparafinado: 2 pasajes por xilol de 5 a 10 minutos cada uno. Escurrir bien.
2. Hidratación:
 - a. 1 pasaje por alcohol 100° de 5 a 10 segundos.
 - b. 1 pasaje por alcohol 96° de 5 a 10 segundos.
 - c. 1 pasaje por alcohol 70° de 5 a 10 segundos.
 - d. 1 pasaje por agua destilada.
3. Coloración con hematoxilina de Mayer: 3 a 5 minutos.
4. Viraje en agua corriente: realizar 2 o 3 cambios de agua corriente.
5. Enjuague en agua destilada.
6. Coloración con eosina: 1 minuto.
7. Deshidratación:
 - a. 2 pasajes por alcohol 96° de 5 a 10 segundos.
 - b. 2 pasajes por alcohol 100° de 5 a 10 segundos.
 - c. 2 pasajes por xilol de 5 a 10 segundos.
8. Montaje: con bálsamo sintético o de Canadá.

ÁCIDO PERYÓDICO-SCHIFF (PAS)

1. Desparafinar: 2 pasajes por xilol de 5 a 10 minutos cada uno. Escurrir bien.
2. Hidratar:
 - a. 1 pasaje por alcohol 100° de 5 a 10 segundos.
 - b. 1 pasaje por alcohol 96° de 5 a 10 segundos.
 - c. 1 pasaje por alcohol 70° de 5 a 10 segundos.
 - d. 1 pasaje por agua destilada.
3. Oxidar: con ácido periódico de Schiff al 0,5% sobre el corte de tejido, en gradilla, durante 15 minutos.
4. Enjuagar con agua destilada.
5. Colocar reactivo de Schiff filtrado sobre el corte de tejido, en gradilla, durante 15 a 20 minutos.
6. Con un papel blanco debajo del portaobjetos, controlar que los tejidos de la muestra adquieran color fucsia.
7. Virar en agua corriente durante 5 minutos aproximadamente.
8. Lavar con agua destilada.
9. Contrastar la coloración con hematoxilina.
10. Virar en agua corriente.
11. Lavar con agua destilada.
12. Deshidratar:

- a. 2 pasajes por alcohol 96° de 5 a 10 segundos.
- b. 2 pasajes por alcohol 100° de 5 a 10 segundos.
- c. 2 pasajes por xilol de 5 a 10 segundos.

13. Montar.

Soluciones utilizadas

Ácido periódico de Schiff al 0,5%

Ácido peryódico ----- 0,5 g

Agua destilada ----- 100 ml

Reactivo de Schiff

Hervir 200 ml de agua destilada.

Agregar 0,5 g de fucsina básica.

A medida que La solución se va enfriando, agregar 2 g de metabisulfito de sodio.

Una vez que la solución está fría, agregar 22 ml de HCl 1N.

Guardar en la heladera durante 24 horas.

Filtrar antes de usar.

AZUL DE TOLUIDINA

1. Desparafinar: 2 pasajes por xilol de 5 a 10 minutos cada uno. Escurrir bien.
2. Hidratar:
 - a. 1 pasaje por alcohol 100° de 5 a 10 segundos.
 - b. 1 pasaje por alcohol 96° de 5 a 10 segundos.
 - c. 1 pasaje por alcohol 70° de 5 a 10 segundos.
 - d. 1 pasaje por agua destilada.
3. Sumergir en solución de Azul de Toluidina acuosa al 0,1%.
4. Lavar con agua destilada.
5. Deshidratar:
 - a. 3 pasajes por alcohol 96° de 5 a 10 segundos.
 - b. 2 pasajes por alcohol 100° de 5 a 10 segundos.
6. Aclarar: 3 pasajes por xilol de 5 a 10 segundos.
7. Montar con bálsamo sintético o bálsamo de Canadá.

LECTINAHISTOQUÍMICA

Batería de 7 lectinas biotiniladas: ConA, DBA, PNA, RCA-1, SBA, UEA-1 y WGA. (Ver especificidad en el apartado “Materiales y métodos”).

Método: complejo Estreptavidina-Biotina conjugada con peroxidasa.

- 1) Desparafinar: 2 pasajes por xilol de 5 minutos cada uno. Escurrir bien.
- 2) Hidratar: 2 pasajes por alcohol 100° de 10 minutos cada uno.
- 3) Inactivar las peroxidases endógenas: 1 pasaje por peróxido de hidrógeno al 0,3% en metanol absoluto durante 30 minutos.
- 4) Continuar la hidratación:
 - a. 2 pasajes por alcohol 96° de 5 minutos cada uno.
 - b. 1 pasaje por alcohol 80° de 5 minutos.
 - c. 1 pasaje por alcohol 70° de 5 minutos.
- 5) Lavar 3 veces con PBS (ver “soluciones utilizadas”) durante 5 minutos cada lavado.
- 6) Secar los portaobjetos con papel tissue, con cuidado de no barrer los cortes de tejido.
- 7) Inactivar las uniones inespecíficas: BSA al 1% en PBS durante 30 minutos.
- 8) Escurrir BSA.
- 9) Cubrir con las lectinas biotiniladas: Lectinas diluidas en BSA 0,1% en PBS (10-30 µg/ml). La dilución para PNA es 2,5 µl en 500 µl BSA al 0,1% en PBS

(concentración: 10 µg/ml). La dilución para las 6 lectinas restantes es 7,5 µl en 500 µl BSA al 0,1% en PBS (concentración: 30 µg/ml).

- 10) Incubar en cámara húmeda a 4°C durante toda la noche o a temperatura ambiente durante 2 horas.
- 11) Lavar 3 veces con PBS cada lectina por separado, durante 5 minutos cada lavado.
- 12) Secar los portaobjetos con papel tissue, con cuidado de no barrer los cortes de tejido.
- 13) Incubar con la solución de estreptavidina conjugada con peroxidasa durante 20 minutos.
- 14) Lavar 3 veces con PBS veces cada lectina por separado, durante 5 minutos cada lavado.
- 15) Revelar: incubar con solución comercial de 3-3'diaminobenzidina (DAB-Dako) durante 5-10 minutos a temperatura ambiente, o hasta observar coloración parda en el corte.
- 16) Interrumpir el revelado sumergiendo los cortes en agua corriente. Sumergir luego en agua destilada.
- 17) Lavar con PBS.
- 18) Realizar la coloración de contraste con Hematoxilina durante 20-30 segundos. Luego enjuagar 1-2 minutos en agua corriente. Sumergir luego en agua destilada.
- 19) Deshidratar:
 - a. Realizar 1 pasaje rápido por alcohol 80°.
 - b. Realizar 2 pasajes rápidos por alcohol 96°.

c. Realizar 2 pasajes rápidos por alcohol 100°. Ecurrir.

20) Realizar dos pasajes en xilol de 2 minutos cada uno.

21) Montar con bálsamo sintético.

INMUNOHISTOQUÍMICA

Existen distintos sistemas de detección inmunohistoquímica (complejo avidina–biotina: ABC; polímero de dextrano marcado: EnVision; streptavidina marcada: LSAB).

Método LSAB

1. Obtener cortes de 5 μm de espesor y acondicionarlos sobre portaobjetos con cargas positivas.
2. Mantener en estufa durante las 24 horas previas al procedimiento.
3. Desparafinar: 2 pasajes por xilol, de 10 minutos cada uno (observar que el xilol no esté hidratado, con burbujas o turbio).
4. Hidratar: 2 pasajes por alcohol 100° de 3 a 5 minutos cada uno.
5. Sumergir los cortes en solución de peróxido de hidrógeno al 0,3% en metanol absoluto durante 30 minutos a temperatura ambiente (para el bloqueo de peroxidasas endógenas).
6. Continuar la hidratación:
 - a. 2 pasajes por alcohol 96° de 5 minutos cada uno
 - b. 1 pasaje por alcohol 80° de 5 minutos
 - c. 1 pasaje por alcohol 70° de 5 minutos.
7. Realizar 2 lavados con PBS pH 7,4 (ver “soluciones utilizadas”) de 5 minutos cada uno (los tiempos de lavado pueden extenderse).

8. Quitar el exceso de PBS.
9. Realizar la recuperación antigénica si se considera pertinente (ver procedimiento en este mismo apartado).
10. Retirar los portaobjetos del buffer, dejar escurrir la solución y secar cuidadosamente el exceso de líquido del corte. Evitar la desecación de los cortes.
11. Incubar con BSA 1% durante 30 minutos para bloquear uniones inespecíficas.
12. Escurrir.
13. Cubrir con el anticuerpo primario (excepto los controles). Para cada anticuerpo debe utilizarse un tip diferente en la micropipeta. Asegurar la posición horizontal de los portaobjetos. Incubar durante toda la noche en cámara húmeda a 4° C o durante 1 a 2 horas a temperatura ambiente.
14. Realizar 3 lavados con PBS durante 5 minutos cada uno, cada anticuerpo por separado.
15. Secar.
16. Incubar con el anticuerpo puente (inmunoglobulinas biotiniladas en PBS) durante 10 minutos.
17. Realizar 2 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.
18. Secar cuidadosamente.
19. Incubar con la solución de estreptavidina-peroxidasa durante 30 minutos.
20. Realizar 2 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.

21. Revelado: incubar con solución comercial de 3-3'diaminobenzidina (DAB) durante 5-10 minutos a temperatura ambiente, o hasta observar coloración parda en el corte.
22. Interrumpir el revelado sumergiendo los cortes en agua corriente. Sumergir luego en agua destilada.
23. Realizar la coloración de contraste sumergiendo en hematoxilina de Meyer durante 15-30 segundos (ajustar el tiempo en función de los resultados).
24. Lavar con agua corriente durante 10 minutos para que vire el colorante.
25. Lavar con agua destilada.
26. Deshidratar:
 - a. Realizar un pasaje rápido por alcohol 80°.
 - b. Realizar 2 pasajes rápidos por alcohol 96°.
 - c. Realizar 2 pasajes rápidos por alcohol 100°. Ecurrir.
27. Realizar dos pasajes en xilol de 1-2 minutos cada uno.
28. Montar con bálsamo sintético.

Recuperación antigénica mediante el uso del horno de microondas.

Antes de realizar inmunohistoquímica se emplearon, sobre los cortes, métodos físicos de recuperación antigénica (Portiansky y col, 1997).

1. Colocar los cortes en Koplín de plástico sin tapar, sumergidos en buffer de citrato 10 mM, pH 6,0 (ver "soluciones utilizadas"). Colocar siempre el mismo número de

jarras cerca del centro del plato giratorio, con un número fijo de preparados (4 ó 5);
agregar portaobjetos vacíos si es necesario.

2. Irradiar a 750 W durante 5 minutos.
3. Reponer el buffer de citrato evaporado y repetir la operación con los mismos parámetros.
4. Dejar enfriar 20 minutos en el buffer.
5. Realizar 2 lavados con PBS durante 5 minutos cada uno.
6. Continuar con la técnica de IHQ de elección.

Soluciones utilizadas

Solución madre de *buffer* fosfato (*PB Stock*)

Fosfato de sodio dibásico anhidro-----11,4 g

Fosfato de sodio monobásico dihidrato-----3,3 g

Agua destilada-----1000 ml

Solución de trabajo de *buffer* fosfato (*PBS*)

Solución PB Stock-----100 ml

Cloruro de sodio-----8,5 g

Agua destilada-----900 ml

Solución 3: *buffer* de citrato pH 6,0 mM

Ácido cítrico monohidrato ($\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)-----2,1 g

Agua destilada-----1000 ml

Ajustar el pH a 6,0 con hidróxido de sodio 2 N.

AISLAMIENTO DE ARN A PARTIR DE MUESTRAS DE TEJIDOS

Luego de la necropsia y la toma de muestras, los órganos que se van a utilizar para el aislamiento de ARN se conservan a -80°C hasta su utilización.

- 1) Agregar 1 ml de TRIzol (Invitrogen) cada 100 mg de tejido y macerar en homogeneizador (Ultra-Turrax T25; IKA) en eppendorf de 2ml.
 - a. Limpiar el homogeneizador luego de cada paso sumergiendo la cuchilla 2 veces en una solución de peróxido de hidrógeno al 3%, una vez en etanol al 80% y una vez en agua destilada.
- 2) Agregar 200 μl de cloroformo e invertir el eppendorf unas 15 veces con la mano.
- 3) Centrifugar a 4°C durante 15 min a 12000g (12200 rpm).
- 4) Recolectar la fase acuosa superior (transparente) en un eppendorf libre de ARNasa.
- 5) Agregar isopropanol frío en una proporción 1:1.
- 6) Dejar precipitar el ARN durante 15 min a temperatura ambiente o a -20°C durante 1h o a -80°C durante toda la noche.
- 7) Centrifugar las muestras durante 15 min a 12000g (4°C). Descartar el sobrenadante cuidadosamente, sin tocar el pellet.
- 8) Lavar el pellet con 500 μl de etanol al 80%, sin agitar y centrifugar durante 5 min a 7500g (9652 rpm) a 4°C .
- 9) Repetir dos veces el paso 8.
- 10) Descartar el sobrenadante. Dejar secar el pellet durante 5 min y resuspenderlo en agua destilada libre de ARNasa. (La cantidad de agua destilada es variable según el tejido procesado, por ejemplo: para decidua se utilizan 30 μl , para placenta 50 μl).
- 11) Cuantificar el ARN mediante espectrofotometría (absorbancia de 260 nm) y conservar a -80°C en una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

SÍNTESIS DE ADNc (ADN complementario)

- Todos los reactivos se conservan a -20°C .
- Incubar en el termociclador.
- Todos los pasos se llevan a cabo sobre hielo.

Componentes	Por muestra:	Notas
RNA	2 μg	En eppendorf de 0,2 μl libres de ARNasa
Agua destilada libre de ARNasa	16 μl	
odT	2 μl	Vortexear y centrifugar rápido. Incubar a 75°C , 10 min en termociclador.
Mix A		
5x M-MLV RT-Bf (RB)	8 μl	Preparar el master mix para todas las muestras.
Agua libre de ARNasa	4 μl	Mezclar suavemente con la micropipeta, no vortexear.
dNTPs (2,5 mM)	4 μl	
ADNasa I (2 U/ml)	2 μl	Incubar las muestras 2 min en hielo.
RI (40 U/ml)	0,5 μl	
Mix A	18,5 μl	Agregar Mix A Incubar a 37°C , 30 min en termociclador para activar la ADNasa. Inactivar ADNasa a 75°C , 5 min. Incubar las muestras 2 min en hielo.

Mix B		
M-MLV RT (200 u/ml)	1 μ l	Preparar master mix para todas las muestras. Mezclar suavemente con la micropipeta, no vortexear.
RI	1 μ l	
		Agregar Mix B
Mix B	2 μ l	
		Síntesis de ADNc en termociclador a 42°C, 60 min e inactivación de RT a 94°C, 5 min.
		Mantener las muestras a -20°C

odT: timinas que se complementan con la cola PoliA del ARNm. En ese sitio comienza la transcripción inversa.

RB: Buffer.

dNTPs: desoxinucleótidos.

RI: Inhibidor de ARNasa.

M-MLV RT: Transcriptasa inversa.

REAL TIME RT-PCR**SECUENCIAS DE PRIMERS Y SONDAS****Foxp3:**

Forward primer CCC AGG AAA GAC AGC AAC CTT
Reverse primer TCC TCA CAA CCA GGC CAC TTG
 Sonda ATC CTA CCC ACT GCT GGC AAA TGG AGT C

HO-1:

Forward primer CAG AAG AGG CTA AGA CCG CCT T
Reverse primer TCT GGT CTT TGT GTT CCT CTG TCA
 Sonda TGC TCA ACA TTG AGC TGT TTG AGG AGC TG

IL-4:

Forward primer CTC ATG GAG CTG CAG AGA CTC TTT
Reverse primer GTG ATG TGG ACT TGG ACT CAT TCA
 Sonda ATG CCT GGA TTC ATC GAT AAG CTG CAC CT

IL-10:

Forward primer GAA GAC CCT CAG GAT GCG G
Reverse primer CCT GCT CCA CTG CCT TGC T
 Sonda CGC TGT CAT CGA TTT CTC CCC TGT GA

TNF α :

Forward primer TGC AGT GAC AAG CCC GTA GC
Reverse primer CTC AGC CAC TCC AGC TGC TC

Sonda CGT CGT AGC AAA CCA CCA AGC GGA

βactina:

Forward primer GCT TCT TTG CAG CTC CTT CGT T

Reverse primer GTT GTC GAC GAC CAG CGC

Sonda CAG CCT TCC TTC TTG GGT ATG GAA TCC T

Forward primer. (del inglés) Cebador o iniciador hacia adelante

Reverse primer. (del inglés) Cebador o iniciador reverso