

Resultados de Proyectos  
Sesión Pública Extraordinaria  
sobre

## **Modelos Experimentales para el Estudio de la Patogenia de la Muerte Embrionaria en Tricomonosis Bovina y Herpesvirosis Equina**

**Resultados del Proyecto de Investigación dirigido por el Académico Dr. Eduardo J. Gimeno**

**Apertura del Académico Presidente, Dr. Carlos O. Scoppa**

13 de junio de 2013

Tengo el placer y la distinción de dejar abierta esta Sesión Pública Extraordinaria, convocada para presentar los resultados de un proyecto de investigación dirigido por nuestro cofrade, el Académico Dr. Eduardo Gimeno que versara sobre "Modelos Experimentales para el estudio de la Patogenia de la Muerte Embrionaria en Tricomonosis Bovina y Herpesvirosis Equina".

Las disertaciones presentaran "El modelo murino de tricomonosis bovina" y el "Modelo murino de herpesvirosis equina" las cuales estarán cargo, respectivamente, de las Dras. Cristina Ester Monteavaro y Cecilia Mónica Galosi. Los resultados y conclusiones generales de esta proyecto serán expuestos por el Dr. Claudio Gustavo Barbeito.

Estas alocuciones son, en parte, derivados de un proyecto de investigación apoyado por esta Academia y que el Académico Gimeno ha llevado a cabo junto al distinguido equipo que se encargará de mostrarnos su corolario. Ellas seguramente serán demostrativas de sus excelentes cualidades de investigadores y

docentes que siempre caracterizó a la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

De la misma forma, pone en evidencia el cumplimiento por parte de la Academia del compromiso de apoyar, también financieramente y dentro de sus posibilidades, el desarrollo de las ciencias de su incumbencia.

Esperamos con interés estas conferencias y para ello dejamos en el uso de la palabra al Académico Eduardo Gimeno para que nos introduzca, con el detalle y enjundia que lo caracteriza, en las cuestiones específicas que motivaran esta investigación.

Agradecemos a los expositores su presencia en esta Academia, estando seguros que de sus exposiciones obtendremos una visión rigurosa y actualizada sobre un tema de incuestionable interés para las ciencias veterinarias. Pero dejemos que sean nuestros invitados quienes así lo hagan.

Resultados de Proyectos  
Sesión Pública Extraordinaria  
13 de junio de 2013

## **Modelos experimentales para el estudio de la patogenia de la muerte embrionaria en tritrichomonosis bovina y herpesvirosis equina**

**Resultados del Proyecto de Investigación dirigido por el Académico Dr. Eduardo J. Gimeno**

Por

*Galosi CM<sup>1,5\*</sup>, Monteavaro CE<sup>4\*</sup>, Woudwyk MA<sup>2\*</sup>, Zanuzzi CN<sup>2,3,6</sup>  
\*, Portiansky EL<sup>3,6</sup>, Fuentealba NA<sup>1,6</sup>, Scrochi MR<sup>1,3,6</sup>, Nishida F<sup>3,6</sup>, Bravi ME<sup>1,7</sup>, Eöry ML<sup>1,2,6</sup>, Martin Ocampos GP<sup>1,3,6</sup>, Cid de la Paz V<sup>1,5</sup>, Barbeito CG<sup>2,3,6</sup>, Gimeno EJ<sup>3,6</sup>*

Cátedras de Virología<sup>1</sup>, Histología y Embriología<sup>2</sup>, Patología General Veterinaria<sup>3</sup>, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, 60 y 118, La Plata 1900, Bs As, Argentina. Laboratorio de Microbiología Clínica y Experimental. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires<sup>4</sup>. Comisión de Investigaciones Científicas de la Pcia. de Bs As<sup>5</sup>, CCT-CONICET La Plata<sup>6</sup>, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica<sup>7</sup>. Los autores señalados con el asterisco participaron de igual manera en la construcción del manuscrito.

Desde hace mucho tiempo, por razones prácticas, científicas y éticas, se han desarrollado modelos experimentales con animales de laboratorio para su aplicación en investigaciones biomédicas. Los modelos animales se definen como "organismos vivientes con una inherente adquisición natural a procesos patológicos inducidos o espontáneos que, de una u otra manera, semejan el mismo fenómeno ocurrido en el hospedador natural" (Márquez, 1997).

Los animales de laboratorio son modelos muy convenientes y herramientas útiles para utilizar en el estudio de muchas enfermedades infecciosas. En el caso de medicina veterinaria, en especial cuando se trata de enfermedades de grandes animales, el uso del hospedador natural para estudiar aspectos patogénicos e inmunológicos de una infección, muchas veces se torna dificultoso, tanto por las inconveniencias que genera el manejo de estos animales como por el costo que implica.

Debido al interés y la complejidad en el estudio de las enfermedades infecciosas, hay una búsqueda en la profundización de los conocimientos del proceso intrínseco de la inmunopatogenia que requiere de la creación de modelos animales alternativos a los hospedadores naturales. El objetivo es generar diseños experimentales confiables y reproducibles, desarrollables en medios controlados en espacios reducidos y con menor costo. Entre las múltiples ventajas que derivan de la utilización de modelos experimentales en el estudio de diferentes enfermedades, se mencionan las siguientes como las más importantes:

- Conocer la historia natural de la enfermedad, cuya etiología, patogenia, sintomatología y evolución pueden mantenerse en condiciones experimentales, sin la influencia de factores extraños que la modifiquen.

- Reproducir la enfermedad en forma experimental, casi a voluntad, lo que permite disponer de la casuística necesaria.
- Realizar estudios fisiopatológicos, desarrollando nuevas técnicas diagnósticas para tal enfermedad.
- Estudiar las enfermedades en animales endocriados lo que permite un amplio campo de investigación en inmunología, patología y genética, entre otras áreas (Cuba Caparó, 1982).

En la selección de la especie utilizada como modelo animal es importante tener en cuenta algunas características generales: a) que permita la transferencia de la información, b) bajo costo y disponibilidad permanentes, c) generalización de los resultados, d) facilidad y adaptabilidad a la manipulación experimental, e) que se pueda contar con un número de animales necesarios para realizar el experimento, f) tiempo de vida, edad en que se alcanza la adultez y generación del número de progenies necesarias en poco tiempo, g) consecuencias ecológicas e implicancias éticas de su uso (Klein, 2000).

### **Gestación temprana en el modelo murino**

Cuando se utiliza el 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 *et al.*, 1964). El mayor porcentaje de pérdidas de preñez se da en la etapa crítica de gestación, previa a la implantación (desde la fertilización hasta el día 5 de gestación) y en los 3 días posteriores, período en el cual se produce el reconocimiento e interacción madre-*conceptus* (Rugh, 1968).

Los óvulos fecundados migran hacia el útero para comenzar el proceso de implantación y desarrollo del *conceptus* (Rugh, 1968). A las 48 horas del apareamiento, los fibroblastos endometriales, fagocitan fibras de colágeno y comienzan los cambios degenerativos del endometrio por medio de apoptosis que permitirán la invasión del trofoblasto y la posterior implantación (Bijovsky *et al.*, 1992).

En el ratón 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 *et al.*, 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, que 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 uterinas* (uNK). Los cambios endometriales que ocurren en respuesta a la implantación constituyen la reacción decidual o decidualización. En general el proceso de decidualización tiene como características: a) el rápido crecimiento y diferenciación de los fibroblastos del estroma uterino en células deciduales y b) la diferenciación y proliferación de uNK. La progesterona es importante para la viabilidad y diferenciación de las NK a uNK. Esta diferenciación comienza a partir del día 7 de gestación y se manifiesta por la acumulación de mediadores citolíticos como: perforinas, proteinasas, factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ),

granzimas A y B; compuestos asociados con la actividad lítica de los NK (Allen & Nilsen-Hamilton, 1998). Esta reacción decidual es particularmente evidente en la placenta de los roedores y de muchos primates, incluyendo al ser humano, pero no se observa o es mucho menos intensa en los mamíferos domésticos. La decidua actúa como soporte nutricional del embrión o feto y lo protege de la reacción inmunológica materna. Además, produce hormonas, como la prolactina (Croy *et al.*, 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 días pos coito (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 décimo 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 y persiste hasta el final de la preñez (Gu *et al.*, 1994).

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

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 & Loke, 2006). Esta característica coloca a la placenta murina en un sitio intermedio entre la placenta humana y la placenta sinepitiocorial 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 ectodermo 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 endoduplicación, 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 & 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.

### **Respuesta inmune de sistema reproductor en modelos experimentales murinos**

En las enfermedades que ocasionan interrupción de la preñez, la respuesta del sistema inmune del tracto reproductor de la hembra es importante para lograr una gestación normal. Esta respuesta está bajo la influencia de los niveles de las hormonas sexuales que modifican la distribución y función de las células que intervienen frente a la colonización de un patógeno, como neutrófilos, mastocitos, eosinófilos, células presentadoras de antígenos, linfocitos citotóxicos, etc. (Fox, 1993).

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, que deberían ser reconocidos como extraños por la madre y, en consecuencia, rechazados. Existen diversos mecanismos que convierten al útero gestante en un sitio inmunoprivilegiado para que el embrión o feto pueda desarrollarse normalmente y concluir con éxito la gestación. 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 *et al.*, 2002). Dentro de este periodo, la progesterona regula negativamente la capacidad citotóxica del sistema reproductor femenino (Piccinni & Romagnani, 1996). Las prostaglandinas del semen promueven una 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).

La inducción de la respuesta inmune adquirida, que se basa en el reconocimiento de epitopes antigénicos de microorganismos patógenos, requiere de la participación de los linfocitos T colaboradores (Th) y sus citoquinas. La activación de estos linfocitos se realiza a través de células presentadoras de antígenos localizadas en todo el tracto reproductor. Estas últimas procesan y presentan antígenos en forma de péptidos, que se expresan en la superficie de las zonas próximas al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I o II. Luego migran a un órgano linfóide secundario donde estimulan a la población de linfocitos T.

Por lo general, cuando la infección se debe a un patógeno intracelular, las células presentadoras de antígenos expresan los péptidos relacionados con CMH de clase I, activando a los linfocitos Th0 para su transformación en linfocitos CD4<sup>+</sup> T *helper* 1 (Th1) productores, entre otras citoquinas, de interferón gamma (INF- $\gamma$ ), que activa a los macrófagos en su función fagocítica.

Cuando el agente patógeno es extracelular, se produce la expresión de péptidos relacionados con el CMH de clase II, lo que provoca el reclutamiento de la población de Th0 para su transformación en T *helper* 2 (Th2), estimulantes de los linfocitos B (LB), los que finalmente se transforman en células plasmáticas productoras de anticuerpos específicos de tipo IgM, IgA, IgG o IgE (Rescigno, 2002). Entre las células presentadoras de antígeno, se encuentran los macrófagos, las células dendríticas (CD), las células interdigitantes y de Langerhans (CL). Su ubicación y distribución depende del órgano del tracto reproductor considerado (Parr & Parr, 1991).

Desde principios de la década de 1990, el paradigma dominante para explicar la regulación inmune de la gestación fue la relación entre linfocitos Th1 y Th2 (Wegmann *et al.*, 1993). Las citoquinas producidas por los linfocitos Th1 y Th2 tienen funciones antagónicas. Las citoquinas Th1 como la interleucina-2 (IL-2), el interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) pueden llevar a la muerte embrionaria por activar la inmunidad mediada por células al estimular a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos y aparecen en concentraciones muy bajas en el útero gestante (Wegmann *et al.*, 1993). La respuesta Th1 es, además, efectiva en el control de infecciones intracelulares e 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. La progesterona favorece la aparición de un perfil Th2. Las citoquinas Th2 participan en el control de parásitos extracelulares y estimulan la inmunidad mediada por anticuerpos. Su ubicación y distribución depende del órgano del tracto reproductor considerado (Parr & Parr, 1991). En síntesis, según el paradigma 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 y causar 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 *et al.*, 1993).

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 ella es una sobresimplificación (Margni & Zencussen, 2001; Chaouat *et al.*, 2002). Esto se debe a que el paradigma Th1/Th2 no contempla la importancia de células de la inmunidad innata como las *natural killer* (NK) uterinas 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 en determinados momentos de la gestación existe cierta tendencia a la inmunosupresión local uterina o a

la tolerancia, especialmente durante los primeros estadios, son necesarias moléculas pro-inflamatorias, 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- $\beta$ ) y el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ). Esta última citoquina parece ser indispensable para la implantación y la creación del estado de tolerancia (Kimber, 2005; Zenclussen *et al.*, 2006a).

Más recientemente, se han incorporado dos poblaciones de linfocitos T al modelo para explicar la respuesta inmune durante la gestación: las células T reguladoras (Treg) y las Th 17. Las 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 *et al.*, 1995). Además, cumplen con funciones centrales en la inmunoregulación porque inhiben la proliferación y la producción de citoquinas en las células T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup>, la producción de inmunoglobulinas en las células B, la actividad citotóxica de las células NK 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 factor de transcripción *forkhead box P3* (*foxp3*), fundamental para el desarrollo y la activación de estas células (Sakaguchi *et al.*, 2006). Las células Treg también están presentes en el útero gestante para generar un microambiente privilegiado que impide el rechazo inmunológico del embrión (Zenclussen, 2005; Zenclussen *et al.*, 2006b). El número de células Treg aumenta inmediatamente después del establecimiento de la gestación en el útero de 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 linfonodos. Posteriormente, estas células migran hacia la interfase materno-fetal donde producen elevados niveles de moléculas protectoras (Zenclussen, 2006). En ratonas preñadas, las células Treg específicas contra antígenos paternos proliferan 3 días luego del coito en los linfonodos que drenan el útero. Estas células Treg específicas, rápidamente se dirigen hacia el útero gestante y proliferan en él, de este modo se induce un estado de tolerancia hacia los antígenos paternos durante la preñez temprana (Saito *et al.*, 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 *et al.*, 2006a). La deficiente actividad de estas células durante la gestación, conduce a la pérdida del *conceptus*. En un modelo murino de aborto bien establecido, las células Treg se encuentran disminuidas en número y función (Zenclussen, 2005). Además, se ha demostrado que la transferencia de células Treg, provenientes de ratonas normales preñadas, en ratonas predispuestas al aborto, pudo prevenir completamente el rechazo (Zenclussen *et al.*, 2005a). Se han postulado varios mecanismos por los cuales las células Treg inducen tolerancia. Como se mencionó anteriormente, estas células, que participan en el mantenimiento de la gestación, son específicas para los antígenos MHC paternos. Esto 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 *et al.*, 2007).

Las células Th17 producen una citoquina pro-inflamatoria, la IL-17. Las células Th17 murinas presentan una vía de señaliza-

ción única, caracterizada por el factor de transcripción ROR $\gamma$ 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 la diferenciación se denomina RORC (*retinoid orphan nuclear receptor C*) (Wang *et al.*, 2010). Las células Th17 son potentes inductores de inflamación tisular y están relacionadas con la patogenia de ciertas enfermedades autoinmunes, de respuestas de hipersensibilidad y del rechazo de aloinjertos (Korn *et al.*, 2009). Estas células, además, están involucradas en la eliminación de 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 *et al.*, 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<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> descritas anteriormente (Saito *et al.*, 2010). En el contexto de la preñez murina, las células IL-17<sup>+</sup> 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 totalmente 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 *et al.*, 2003).

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 *et al.*, 2007). La hemooxigenasa 1 (HO-1) es una enzima protectora de la gestación debido a

que previene la acumulación de grupos hemo libres que podrían ser perjudiciales para el *conceptus* (Zenclussen *et al.*, 2011). Se expresa en las células endoteliales y en el trofoblasto. 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 *et al.*, 2000; Zenclussen *et al.*, 2003a; Zenclussen *et al.*, 2005b). Su expresión disminuye en la placenta y en la decidua de ratones y humanos que sufren aborto mediado por células y citoquinas Th1. Esto indica un rol protector importante 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 *et al.*, 2005b). Las células Treg inducen un aumento en la producción de HO-1 protectora en la decidua y la placenta (Zenclussen *et al.*, 2006b). Además, la estimulación de HO-1 por medio de la terapia génica previene el rechazo fetal (Zenclussen *et al.*, 2006b).

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 *et al.*, 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 *et al.*, 1998). IDO no solo ha sido estudiada como una enzima protectora de la gestación; hay evidencias de 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 *et al.*, 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.

Además, algunas células de la respuesta inmune innata son de importancia para la gestación como las células *natural killer* (NK), los mastocitos y los eosinófilos.

Las 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- $\gamma$ . En las hembras adultas de varias especies, incluyendo al ser humano, una subpoblación de células NK, denominadas células *natural killer* uterinas (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, 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 *et al.*, 2000; Wegman *et al.*, 1993; Welsh & Enders, 1993; Croy *et al.*, 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 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 lumbinales reducidos, la decidua presenta una escasa celularidad y hay una disminución marcada en el tamaño de la placenta (Croy *et al.*, 2006).

Las células uNK sintetizan citoquinas inmunomoduladoras como el IFN- $\gamma$  (Ashkar & Croy, 1999) e interleuquinas, como IL-18 e IL-27 (Croy *et al.*, 2003). Una de sus principales funciones es regular la invasión trofoblástica del endometrio durante la implantación para evitar una invasión excesiva (Hunt *et al.*, 2000). Además, remueven células trofoblásticas aberrantes (Stewart, 1991). También sintetizan y secretan factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) que inhibe a los linfocitos T que reconocen a los antígenos paternos.

Las células uNK producen factor de crecimiento del endotelio

vascular (VEGF) y óxido nítrico (NO). Ambos poseen funciones angiogénicas y son importantes para el desarrollo vascular durante la gestación temprana. El NO es, además, vasodilatador. Mediante la secreción de estas sustancias y del IFN- $\gamma$ , 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.

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 *et al.*, 2003). Al quinto día de gestación, las uNK diferenciadas comienzan a observarse en la decidua mesometrial (*deciduabasalís*) de cada sitio de implantación (Zheng *et al.*, 1991a; Zheng *et al.*, 1991b; Croy *et al.*, 1997). En la medida que la gestación avanza, estas células proliferan y aumentan de tamaño, llegando a medir entre 40 y 100  $\mu\text{m}$  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 *et al.* 2000; Chantakru *et al.*, 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), por eso se las conoce también como células glandulares granulares metriales. 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 *et al.*, 1999). Las células uNK son transitorias porque no se observan en el útero luego del parto (Stewart & Peel, 1980). La lectina DBA (*Dolichos biflorus*) que no solo marca los gránulos citoplasmáticos, sino también la membrana plasmática de estas células, ha sido ampliamente adoptada para su reconocimiento (Paffaro *et al.*, 2003). 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 *et al.*, 2008).

Los mastocitos o células cebadas 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, los mastocitos producen y secretan mediadores pro-inflamatorios derivados de lípidos que, a diferencia de los anteriores, son sintetizados de

*novo*. 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 *et al.*, 2005). Algunas de sus funciones son: regular la permeabilidad vascular, proteger las superficies mucosas y regular la contractibilidad del miometrio.

En el útero de ratonas preñadas, los mastocitos se localizan especialmente en el triángulo mesometrial (Gibbons & Chang, 1972) y en el miometrio, algunos se ubican en el perimetrio y, en raras ocasiones, en la zona externa de la decidua (Widayati *et al.*, 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 entre las fibras del músculo liso regulan la contractibilidad del miometrio.

Los eosinófilos son granulocitos derivados de la médula ósea; contienen gránulos de proteínas ricas en arginina. En el útero, están localizados en el tejido conectivo profundo del endometrio, llegan al lumen, e incrementan su número cuando los niveles de estrógenos son elevados (proestro y estro). En el mecanismo de acción de los eosinófilos, se ha podido diferenciar una primera etapa, en la cual liberan proteínas tóxicas que destruyen a microorganismos y parásitos, pero también pueden producir daño tisular por reacciones de hipersensibilidad. En una segunda etapa producen moléculas como prostaglandinas, leucotrienos y citoquinas, las cuales amplifican la respuesta inflamatoria por reclutar y activar a otros eosinófilos y a los macrófagos. Cuando la población linfocitaria Th2 es activada, se liberan citoquinas, como

IL 5 que incrementa la producción de eosinófilos y promueve su liberación hacia la circulación y los tejidos. Se comprobó también que los eosinófilos son fagocíticos cuando son estimulados por IgE específicas (Ito *et al.*, 1975; Monteavaro *et al.* 2007).

En general, las hembras son muy susceptibles a los patógenos que ingresan por vía venérea; esto se debe a que el sistema inmunológico modula su respuesta frente al embrión, que posee antígenos paternos extraños para la madre. De esta manera, el *conceptus* toma contacto con el tejido materno, se implanta y no es afectado por los leucocitos uterinos (Roberts *et al.*, 2001). Por lo tanto, el sistema inmune materno puede promover o inhibir el desarrollo de la unidad feto-placenta. Los leucocitos maternos permiten la implantación del embrión, mediante la secreción de diferentes citoquinas que favorecen el normal desarrollo de la gestación.

## **MODELOS MURINOS ESPECÍFICOS DE ENFERMEDADES REPRODUCTIVAS**

### **Herpesvirus equino 1(EHV-1)**

#### **Introducción**

El EHV-1 es un virus que infecta a los miembros de la familia *Equidae* y produce importantes pérdidas económicas en la industria equina. Al igual que todos los herpesvirus, el EHV-1 es antiguo y, durante su prolongada co-evolución con el caballo, se ha convertido en un parásito viral exitoso. Desde un punto de vista biológico, el potencial patógeno del EHV-1 puede ser considerado un atributo básico del virus que garantiza su supervivencia (Allen *et al.*, 1998; Allen *et al.*, 2004).

Las manifestaciones clínicas que se presentan en los animales luego de la infección por este virus son:

- *Rinoneumonitis equina*: se inicia con un cuadro caracterizado por rinofaringitis y traqueobronquitis; el animal presenta tos, fiebre (que se observa como una curva difásica con el segundo pico febril coincidente con la viremia), descarga nasal serosa que puede hacerse mucosa y hasta mucopurulenta, congestión e hiperemia de la mucosa conjuntival, anorexia y depresión generalizada. La infección es de tipo sistémico y la viremia se acompaña de neutropenia y linfopenia. Los signos clínicos permanecen por aproximadamente 7 días y las complicaciones bacterianas secundarias pueden conducir a la formación de abscesos en los linfonodos y el tejido linfoide subepitelial de la faringe. Ocasionalmente se presenta bronconeumonía que puede llegar a ser fatal (Allen & Bryans, 1986). Durante su recuperación, algunos caballos desarrollan el denominado "síndrome de bajo rendimiento", que puede estar asociado con un estado de hipersensibilidad bronquial no específica o con signos similares a los que se encuentran en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica que traen aparejados efectos perjudiciales a largo plazo sobre el rendimiento deportivo (Mumford & Rosedale, 1980).
- *Síndrome neurológico*: se observa en animales de ambos sexos y de distinta edad. Este síndrome puede aparecer entre los 6-10 días posteriores a la infección respiratoria, y de manera repentina, con un pico de intensidad a los 2-3 días de sus inicios. Las manifestaciones clínicas dependen de la extensión y localización de las lesiones, y varían desde ataxia moderada hasta parálisis completa de miembros torácicos y pelvianos

con incontinencia urinaria. El pronóstico para los caballos que no están en decúbito es favorable, pero aquellos que permanecen en esa posición por más de dos días generalmente tienen complicaciones fatales, como neumonía, cólicos o rotura vesical (Whitwell & Blunden, 1992).

- *Infección ocular*: puede observarse uveítis o corioretinitis en potrillos, durante el brote de enfermedad neurológica en adultos o a las 3-5 semanas después de la infección del tracto respiratorio. Las lesiones focales y multifocales no afectan la visión, pero las lesiones difusas pueden llevar a la destrucción de la retina y a la consecuente ceguera (Slater *et al.*, 1992; McCartan *et al.*, 1995).

- *Infección vasculotrópica pulmonar*: se observa ocasionalmente en caballos jóvenes. Se caracteriza por fiebre alta, anorexia, depresión severa, dificultad respiratoria y alta mortalidad. No se acompaña de signos nerviosos. Los animales afectados pueden ser encontrados muertos, ya que el inicio de la enfermedad es repentino y su progresión hasta la muerte es rápida. Se produce vasculitis multisistémica, particularmente importante en los pequeños vasos sanguíneos de los pulmones (Del Piero & Wilkins, 2001).

- *Trastornos en sementales*: puede observarse edema escrotal y pérdida de libido. La fiebre prolongada tiene efecto perjudicial sobre la espermatogénesis que se traduce en la reducción del número de espermatozoides normales. Algunos investigadores han documentado la presencia de partículas virales en semen, pero su importancia en una posible transmi-



sión venérea de la infección es aún incierta (McCartan *et al.*, 1995; Tearle *et al.*, 1996).

- *Aborto - Síndrome neonatal*: el aborto sucede en forma súbita, sin signos premonitorios y generalmente sin evidencia de infección respiratoria previa. Las hembras abortan generalmente en los últimos cuatro meses de gestación, entre los 15 y 120 días posteriores a la infección viral. La placenta es expelida con el feto que permanece con las membranas fetales intactas. El feto muere por asfixia, asociada a la abrupta separación (previa a la expulsión) entre el corion y el endometrio. En la mayoría de los casos se suceden abortos aislados y en general las hembras abortan una sola vez. En algunos establecimientos pueden observarse “tormentas de aborto” en las que pueden llegar a afectarse el 75% de las hembras gestantes (Smith *et al.*, 1996; Allen *et al.*, 2004). En algunas oportunidades, y cuando el feto resulta infectado en el último tercio de la gestación, se presenta el síndrome neonatal caracterizado por dos posibles cuadros: el animal nace pero muere rápidamente por un severo estado de depresión y por insuficiencia respiratoria, resultante de las lesiones pulmonares inducidas por la infección. En otros casos, nacen potrillos de apariencia normal pero que inmediatamente presentan un severo cuadro respiratorio y diarrea que culmina con la muerte dentro las primeras 72 h posteriores al nacimiento (Smith *et al.*, 1992; Allen, 2002)

El virus se mantiene en la naturaleza por la infección generalizada de caballos jóvenes, por ser de alta morbilidad (hasta el 90%) y baja mortalidad, por la alta prevalencia de animales

latentemente infectados y por la continua liberación de virus a partir de los animales portadores, de tal manera que se produce la transmisión eficiente y sin interrupciones a las nuevas generaciones de equinos.

La forma respiratoria es común en potrillos al destete o cuando ingresan a los centros hípicas y la liberación de virus a través de las secreciones respiratorias puede llegar a durar hasta 15 días. La infección subclínica ocurre debido a reinfecciones sucesivas, y se presenta en animales de diferentes edades, aunque es más frecuente en equinos adultos. La principal fuente de contagio de los potrillos es la reactivación de virus latente de los adultos convivientes (Gibson *et al.*, 1992). Luego del primer ciclo replicativo en el tracto respiratorio se produce la fase virémica, caracterizada por la expresión de antígenos virales en las células sanguíneas y en la cual el virus es fácilmente recuperable por co-cultivo con células permisivas. Cuando el EHV-1 entra en estado de latencia en los linfocitos T CD8+ y en el ganglio trigémico, la transcripción del genoma viral está restringida, como sucede en todos los alfa herpesvirus. Por lo tanto, las proteínas virales no se expresan, la célula es resistente a los mecanismos inmunes y el virus es difícil de recuperar por co-cultivos celulares (Welch *et al.*, 1992; Slater *et al.*, 1994; Baxi *et al.*, 1995; Chesters *et al.*, 1997). La reactivación de virus latente se produce cuando los animales se encuentran en situaciones estresantes, como sucede durante el transporte, movimientos de potreros, en ciertas medidas de manejo, con el destete, como así también por tratamientos con corticoides o prácticas deportivas exigentes. Estas reactivaciones son generalmente silentes y la viremia que sigue a la reactivación puede conducir al virus hasta el útero, causando aborto, y al

sistema nervioso central, produciendo síndrome neurológico. El aborto puede ocurrir sin el requisito previo de una infección respiratoria epitelial lítica o de una viremia detectable. El EHV-1 es el primer alfa herpesvirus para el que se ha descrito reactivación en los linfocitos, además de la reactivación en el ganglio trigémino (Mumford *et al.*, 1985).

La respuesta inmune de los equinos a una infección por EHV-1 es similar a la que ocurre en otras especies infectadas por herpesvirus. El mecanismo es complejo y aún no está completamente dilucidado, e incluye a las respuestas innata y adaptativa, celular y humoral (Allen & Bryans, 1986; Allen *et al.*, 2004). Los anticuerpos (Ac) maternos transmitidos por el calostro protegen a los potrillos de la infección natural y la inmunidad conferida está relacionada con la concentración de los mismos y con el volumen ingerido por el potrillo en las primeras 24 hs de vida. El título de Ac calostrales decae exponencialmente, de manera que aproximadamente entre los 4-6 meses de edad los potrillos pueden ser infectados naturalmente. En la infección natural de adultos, el título de los Ac decae rápidamente, de manera que los animales se tornan nuevamente susceptibles al virus entre los 4 y 5 meses posteriores a su recuperación. La resistencia a la reinfección durante este periodo se encuentra garantizada por: 1) los elevados niveles de Ac en sangre y en el mucus nasofaríngeo, 2) la actividad proliferativa de los linfocitos T CD4+ activados por el virus, 3) la presencia de precursores de linfocitos T citotóxicos CD8+ virus específicos, 4) la actividad de células NK y 5) la citotoxicidad celular dependiente de Ac virus específico (Allen *et al.*, 2004). Cuando estos mecanismos de resistencia decaen, la mucosa respiratoria puede ser nuevamente reinfectada por el virus

en forma repetida. Como consecuencia de estas reinfecciones múltiples, no se presentan síntomas clínicos de enfermedad respiratoria, pero pueden aparecer manifestaciones de enfermedad neurológica o abortiva. El mecanismo por el cual el virus escapa a la neutralización por Ac en su pasaje al feto está estrechamente relacionado con la viremia asociada a células.

El propósito de vacunar contra EHV-1 es el de proteger a los equinos de la enfermedad respiratoria y del aborto. Las primeras vacunas desarrolladas a nivel mundial fueron con virus inactivado y se elaboraron con hígado de feto equino infectado y tejido de hámsteres infectados experimentalmente (Doll *et al.*, 1959; Doll & Bryans, 1963). Estas vacunas dejaron de utilizarse debido a las respuestas adversas, tanto locales como sistémicas, y a su baja inmunogenicidad. Posteriormente, Doll (1961) desarrolló una vacuna a virus modificado por pasajes en hámsteres cuya aplicación era intranasal; y recomendable para estadios tempranos de gestación, ya que se consideraba que contenía residuos de partículas virulentas que podían causar el aborto si la misma era administrada en la última etapa de la preñez. Esta vacuna fue utilizada hasta que se comenzaron a producir vacunas a virus inactivado y atenuado desarrollado en cultivos celulares. En 1968 se creó una vacuna atenuada utilizando cultivos de riñón de feto porcino inoculados con la cepa RaCh (cepa atenuada por su delección del gen 67). Otros investigadores realizaron varios estudios utilizando otras vacunas con cepas atenuadas por pasajes en cultivos celulares. Si bien las mismas resultaron eficientes para erradicar la infección en áreas endémicas, pudo comprobarse que, en muchos casos, la atenuación no era eficaz ya que inoculada directamente al feto se producía el aborto del mismo. El uso de

otras vacunas atenuadas también fue asociado con mieloencefalitis posvacunal. En el año 2006, una vacuna desarrollada con un mutante de EHV-1 sensible a temperatura, también demostró proteger de la enfermedad respiratoria y de la viremia posterior a una infección experimental con una cepa virulenta. Sin embargo, algunos autores en desacuerdo con esta última opinión, consideran que las vacunas atenuadas deben ser utilizadas con precaución ya que pueden producir la interacción génica entre el virus vacunal y las cepas de campo (Allen *et al.*, 2004). En forma paralela, muchas otras vacunas fueron elaboradas sólo con EHV-1 y combinadas con EHV-4, principalmente con virus inactivados con formaldehído y asociados a diferentes tipos de adyuvantes de uso común. Este tipo de vacunas, si bien son seguras porque carecen de virus activo, presentan el inconveniente de inducir una respuesta inmune de corta duración, por lo que resulta necesario repetir la aplicación de dosis. Si el propósito de una vacuna es prevenir la enfermedad, reducir la incidencia, la duración de los signos clínicos y el periodo de eliminación viral, las vacunas inactivadas son adecuadas ya que cumplen con estos objetivos. Sin embargo, si tenemos en cuenta que el EHV-1 produce viremia asociada a células, se puede inferir que estas vacunas no son totalmente efectivas y algunas partículas virales pueden llegar al feto y producir aborto (Kydd *et al.*, 1994; Heldens *et al.*, 2001; Allen *et al.*, 2004; Patel & Hendels, 2005; Goehring *et al.*, 2010). Las vacunas contra EHV-1 deben entonces proteger contra la infección respiratoria y prevenir la viremia, así como también estimular la producción de Ac y la respuesta inmune celular, tanto a nivel sistémico como en las mucosas.

Las investigaciones que se realizan mundialmente sobre el EHV-1 se encuentran dirigidas a tres áreas principales: a) resolver

aspectos fundamentales de la patogenia del aborto, b) estudiar el fenómeno de latencia y reactivación viral, y c) lograr la obtención de respuesta inmune que prevenga el aborto.

### **El modelo ratón para el estudio de Herpesvirus equino 1**

Los modelos animales inicialmente utilizados para el estudio de EHV-1 estuvieron orientados al desarrollo de las primeras vacunas a partir de macerados de tejidos de hámsteres infectados experimentalmente (Doll *et al.*, 1959; Doll & Bryans, 1963) y de vacunas a virus modificado por pasajes en hámsteres (Doll, 1961). Posteriormente en las décadas de los '70s y los '80s se comenzó a trabajar con ratones lactantes (Wilks & Coggins 1977; Patel & Edington 1983; Nowotny *et al.*, 1987; Stokes *et al.*, 1989). Sin embargo, en todos estos estudios la edad de los animales difería, las rutas de inoculación del virus eran variadas y, por lo tanto, no se observaban manifestaciones clínicas similares y constantes por lo que los resultados no podían ser comparables. Recién con las experiencias de Awan *et al.* (1990, 1991) se logró reproducir la enfermedad respiratoria utilizando ratones BALB/c anestesiados e inoculados por vía intranasal, la ruta natural de entrada del virus. Posteriormente, los esfuerzos fueron orientados a determinar si existían cepas de ratones más susceptibles a la infección que otras (Alber *et al.*, 1995), a comprobar si se podía reproducir la infección abortigénica (Walker *et al.*, 1998 a, 1998b; Inazu *et al.*, 1993), a investigar la respuesta inmune (Awan *et al.*, 1995; Bartels *et al.*, 1998), a ensayar agentes antivirales (Awan & Fields, 1993), al estudio del establecimiento de la latencia y de la reactivación (Field *et al.*, 1992) y a analizar diferentes cepas virales (Van Woensel *et al.*, 1995; Colle *et al.*, 1996) y nuevos

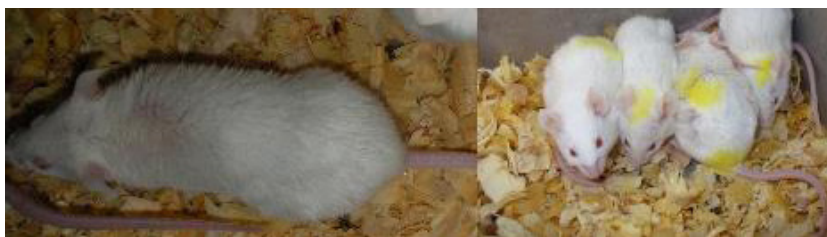
inmunógenos (Tewari *et al.*, 1994, 1995; Osterrieder *et al.*, 1994; Stokes *et al.*, 1996; Kukreja *et al.*, 1998; Ruitenberg *et al.*, 1999).

Básicamente las razones por las cuales se adoptó definitivamente al modelo ratón para el estudio de EHV-1 fueron:

- *Similitud en el tropismo tisular*: tanto en el equino como en el ratón el virus puede ser aislado de diversos órganos demostrando una infección de tipo sistémico. Los primeros estudios realizados indicaron que el ADN del virus fue detectado por PCR en todos los órganos (Baxi *et al.*, 1996), aunque no se lo aisló del bazo y del hígado del ratón (Awan *et al.*, 1990). Sin embargo, estudios actuales, permitieron demostrar el aislamiento viral a partir de estos órganos (Zanuzzi *et al.*, 2014). En el caso de hembras equinas preñadas e infectadas experimentalmente, no todos los fetos abortados resultan positivos al virus, lo que puede estar relacionado a diversos factores aún no del todo determinados. En ratonas preñadas se hallaron resultados similares aunque al tratarse de hembras múltiparas, algunos fetos resultaron negativos mientras que otros fueron positivos al virus (Walker *et al.*, 1999).

- *Presencia de signos clínicos respiratorios y nerviosos*: el periodo de incubación para el equino generalmente es de 2 días y los signos respiratorios característicos se resuelven aproximadamente a los 12 días pos infección. Los signos nerviosos resultan de los cambios vasculares, pero aparecen con menor frecuencia (Allen & Bryans, 1986). En los ratones se observa dificultad respiratoria, pelo hirsuto, decaimiento, cambios generales de comportamiento, conjuntivitis ocasional y en general todos se resuelven totalmente a los 6 días pos in-

fección (Figura 1). Los signos nerviosos no son muy comunes y cuando fueron observados, su presencia se atribuyó a la característica neuropatogénica de la cepa viral utilizada en la infección experimental (Awan *et al.*, 1990; Inazu *et al.*, 1993; Van Woensel *et al.*, 1995)



**Figura 1.** Ratones BALB/c infectados por EHV-1. Obsérvese el aspecto característico del pelo y el agrupamiento con sus congéneres.

- *Efecto sobre la preñez:* la infección en equino puede causar aborto dependiendo del tiempo de gestación, o bien producirse el nacimiento de los potrillos que mueren en las primeras 48 hs de vida (Smith *et al.*, 1996). En la infección experimental en ratones, los resultados dependen del momento de la infección: en caso de producirse en el primer tercio de preñez se observa reabsorción fetal; la infección durante la gestación media lleva al nacimiento de fetos prematuros muertos o que mueren en el primer día de vida y, cuando la infección se produce en el último tercio de la gestación puede observarse menor tamaño de los neonatos respecto a ratones controles sin infectar (Awan *et al.*, 1995; Walker *et al.*, 1998b).
- *Cambios en las células sanguíneas y eliminación viral:* en la infección aguda de los equinos se observa leucopenia (neutropenia y linfopenia), en cambio durante la convalecencia aparece linfocitosis. Ninguno de estos eventos se ha comprobado en



el ratón y algunos autores mencionan la aparición de neutrofilia (Csellner *et al.*, 1998; Packiarajah *et al.*, 1998).

- En equinos infectados experimentalmente el tiempo de la eliminación de virus varía entre 5 a 14 días con un pico máximo a los 12 días pos infección a partir de los hisopados nasofaríngeos (Allen & Bryans 1986), si bien la detección del virus a partir del pulmón puede extenderse pese a la desaparición total de los signos clínicos. La eliminación del virus en ratones es similar, aunque también es dependiente de la dosis y de la cepa viral utilizada para la infección (Awan *et al.*, 1990; Inazu *et al.*, 1993; Walker *et al.*, 1998a). Con respecto a la viremia en el equino, diferentes autores indican una extensión que varía entre 3-5 días, 12-16 días y de 3-14 días (Gibson *et al.*, 1992), mientras que en el ratón existen datos dispares ya que algunos autores citan periodos de viremia de 5 a 8 días y otros determinaron que es indetectable (Walker *et al.*, 1999).

- *Lesiones histopatológicas:* en equinos se observa inflamación, necrosis y la presencia de cuerpos de inclusión en el epitelio nasofaríngeo y en nódulos linfoides bronquiales. Se detectan focos de bronquiolitis aguda y edema intersticial. En hembras preñadas se observa vasculitis endometrial y en caso de presentarse signos nerviosos se encuentran focos de vasculitis y necrosis en cerebro y cerebelo (Jackson *et al.*, 1977; Edington *et al.*, 1986; Walker *et al.*, 1999). En ratones las lesiones pulmonares son similares a las descritas en el equino y se caracterizan por alveolitis y bronquiolitis, presencia de cuerpos de inclusión, necrosis focal y agregados de células

inflamatorias. En el sistema nervioso central no se han observado lesiones vasculares ni procesos degenerativos (Bartels *et al.*, 1998). El endometrio de hembras preñadas ha sido descrito como congestivo con severos cambios vasculares, áreas de isquemia asociadas con necrosis e infiltración perivascular de células inflamatorias (Smith *et al.*, 1992). En las placentas de ratonas se ha descrito congestión, necrosis y atrofia de la capa media del trofoblasto entre los 2 y 4 días pos infección (Walker *et al.*, 1998b), tal como se observó en la placenta equina (Smith *et al.*, 1992). En fetos equinos abortados o muertos en las primeras 24 hs de vida se han descrito bronquiolitis necrotizante, neumonitis intersticial y necrosis hepática focal (Kydd *et al.*, 1994). En el caso de muerte perinatal en ratones se ha observado efecto citopático típico en pulmones y epitelio bronquiolar aunque no se han descrito lesiones en fetos analizados antes de la fecha de parto (Walker *et al.*, 1998b).

- *Latencia*: como otros herpesvirus, luego de la infección primaria se ha descrito como sitio de latencia al ganglio trigémino, tanto en el equino como en el ratón, aunque en este modelo experimental también ha sido detectado por PCR a partir del bulbo olfatorio (Baxi *et al.*, 1995,1996).

### **Estudios experimentales en la República Argentina**

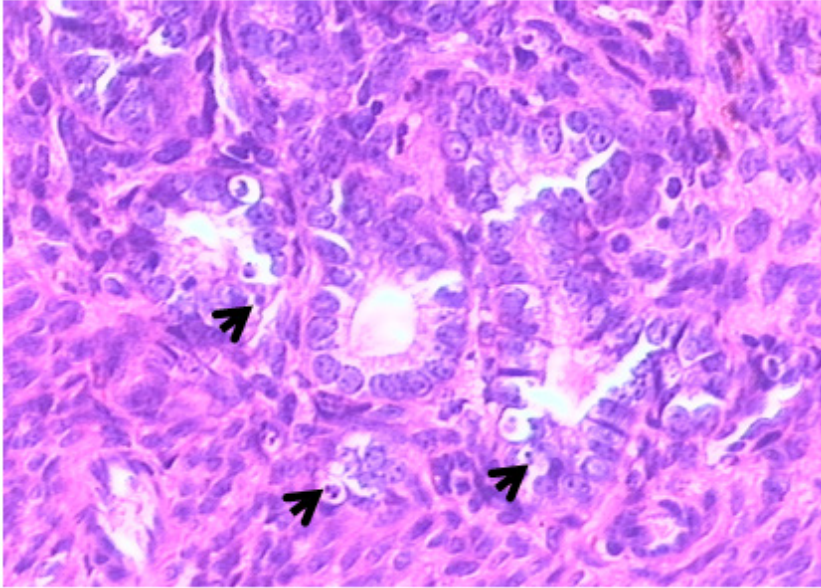
En el año 1979 se realizó, en la Cátedra de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, el primer aislamiento de este virus partir de un feto abortado. Esta cepa originalmente fue denominada SP y actualmente se denomina AR1 de acuerdo a la nomenclatura internacional.

En 1985, se aisló una nueva cepa a partir de plasma rico en leucocitos de un caballo con sintomatología respiratoria (Galosi *et al.*, 1989). En los años sucesivos, se continuaron aislando nuevas cepas y muchas de ellas fueron analizadas por sus patrones de restricción de ADN demostrando homogeneidad genómica de las mismas aunque en algunos casos se observaron diferencias de movilidad en sus fragmentos de ADN (Galosi *et al.*, 1993, 1998a). Por esta última razón se iniciaron los primeros estudios experimentales para demostrar el biotipo de las mismas utilizando ratones lactantes inoculados intracerebralmente. Se demostró que la cepa AR1 correspondía a un biotipo específico respecto a las cepas restantes y que podría significar que fuera menos virulenta (Galosi *et al.*, 1998b).

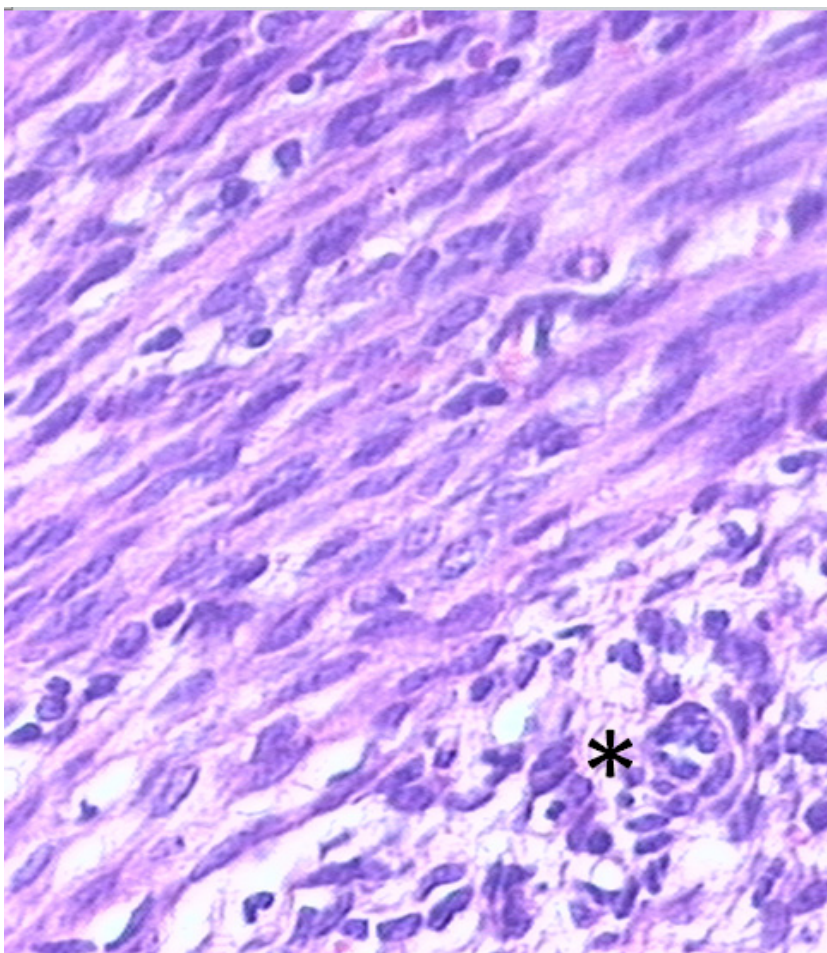
Debido a estos resultados, se estudiaron las propiedades de crecimiento de AR1 en cultivos celulares y su efecto patógeno en el modelo respiratorio y abortigénico de ratón BALB/c, comparativamente con la cepa internacional de referencia HH1. Si bien no se encontraron diferencias significativas en el efecto de estas cepas sobre cultivos celulares, en el modelo ratón se demostró la menor virulencia de la cepa AR1 respecto a la HH1 para producir enfermedad respiratoria y sus consecuencias en diferentes etapas de gestación (Galosi *et al.*, 2004). En otra etapa del mismo trabajo se evaluó la capacidad de AR1 de conferir protección ante la descarga con una cepa más patogénica y se observó que el peso de los ratones previamente inmunizados no disminuyó ante la descarga con HH1, los signos clínicos fueron más leves, los animales se recuperaron en un periodo de tiempo más corto, el título viral recuperado en pulmón fue menor que en el control inoculado con HH1 y las lesiones histológicas fueron más atenuadas (Galosi *et al.*, 2006).

- *Estudios moleculares-evolutivos y de virulencia:* dado que en el país eran numerosas las cepas aisladas, muchas veces a partir de "tormentas de abortos" en establecimientos sujetos a estrictos planes de vacunación, hipotetizamos que algunas cepas actuantes podrían ser más virulentas y que las diferencias entre ellas podrían basarse en variaciones genómicas. Por tales motivos, se inicio un estudio experimental cuyos dos principales objetivos fueron a) relacionar la estructura genómica de las cepas de EHV-1 con las variaciones en su virulencia utilizando el modelo experimental BALB/c y b) establecer hipótesis sobre las relaciones filogenéticas que reflejen la evolución de cepas argentinas de EHV-1 basando el estudio en la constitución genómica de la denominada región intergénica (IR). Las cepas denominadas AR2, AR3 y AR8, que presentaron las diferencias genómicas más marcadas, fueron seleccionadas y se estudiaron desde el punto de vista patogénico en ratonas preñadas BALB/c que fueron inoculadas por vía intranasal. Todos los animales inoculados con dichas cepas desarrollaron signos clínicos y disminuyeron su peso corporal en los días pos infección; además se aislaron virus de los úteros preñados. Con los datos que se obtuvieron no pudieron observarse diferencias que permitieran determinar mayor o menor virulencia de estas cepas. En el pulmón de todos los animales inoculados se observaron evidencias histológicas de infección y los cambios encontrados en los úteros fueron muy heterogéneos. En algunos casos se observó endometritis, en otros, una ligera congestión y edema, mientras que algunos animales no presentaron alteraciones. En los úteros de las ratonas inoculadas con la cepa AR2 se observaron gran cantidad de células

apoptóticas en el tejido conectivo y en los epitelios glandular y luminal, con exfoliación celular en la luz del órgano(Figura 2).



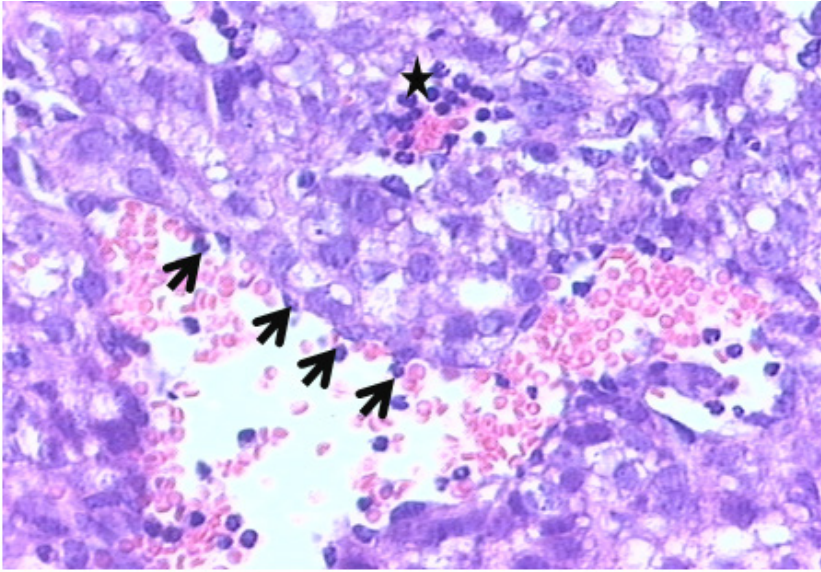
**Figura 2.** Útero de una hembra BALB/c infectada con la cepa AR2 de EHV-1. Las flechas señalan células apoptóticas en las glándulas uterinas. HE 400X.



**Figura 3.** Abundantes células inflamatorias en el endometrio de una hembra BALB/C infectada con la cepa AR2, fundamentalmente alrededor de algunos vasos sanguíneos (asteriscos). HE 400X.

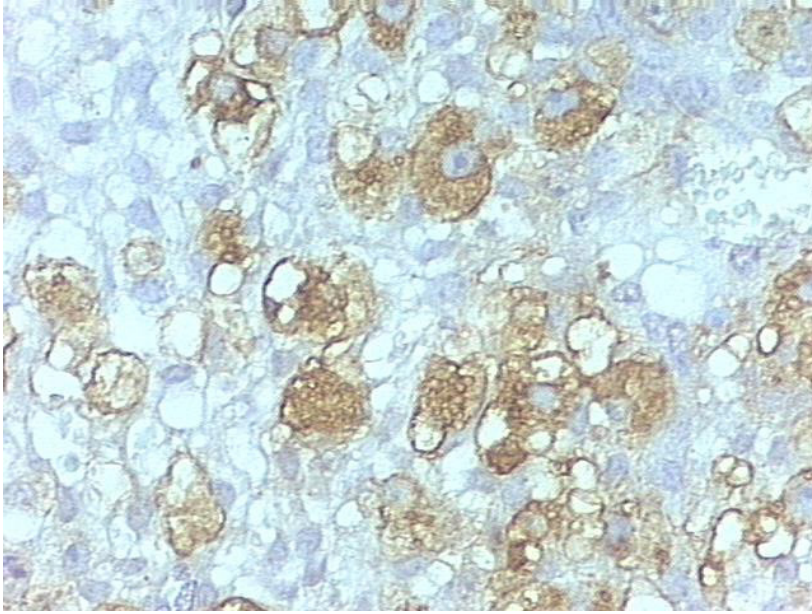
En algunos cortes pudieron observarse focos de necrosis y abundante cantidad de macrófagos y leucocitos polimorfonucleares (Figura 3). La inoculación de la cepa AR3 indujo muerte celular en el útero, sin embargo no se observaron alteraciones ni en la placenta ni en la decidua. Las ratonas inoculadas con la cepa AR8 presentaron zonas de necrosis evidentes y abundante canti-

dad de neutrófilos. La placenta presentó apariencia normal en la mayoría de los casos, sin embargo en algunos de los animales se detectaron áreas congestivas con abundantes células inflamatorias del tipo polimorfonuclear (Figura 4).



**Figura 4.** Placenta de una ratona BALB/c infectada con la cepa AR8. Se observa gran cantidad de células inflamatorias especialmente alrededor de vasos (estrella) de un vaso (flechas negras). Las flechas señalan leucocitos en distintas etapas de un proceso de extravasación. HE 400X.

No se encontró correlación entre el grado de las lesiones y la detección de virus por aislamiento viral y PCR en los úteros de las ratonas infectadas. No se encontraron cambios cuantitativos ni en las células uNK ni en los mastocitos de los animales infectados (Figura 5).



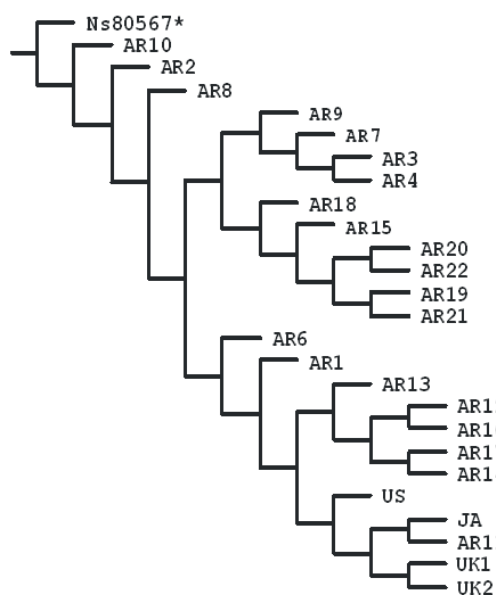
**Figura 5.** Lectinahistoquímica en útero de una ratona BALB/c infectada con la cepa AR8. Patrón de marcación de la lectina DBA en la decidua. La marcación positiva (pardo-dorada) corresponde a las células NK uterinas (GMG). 400X

En este trabajo se describieron por primera vez en el ratón las lesiones uterinas que son frecuentemente documentadas en el equino.

Por otra parte, se realizó el análisis genómico de distintas cepas y se demostró un alto porcentaje de identidad de la IR. En trece cepas argentinas (AR8, AR7, AR4, AR2, AR3, AR10, AR9, AR18, AR20, AR15, AR19, AR21, AR22) se encontraron inserciones de 18 bp ubicadas en la posición 109168 bp, mientras que en la cepa AR6 se encontró una inserción de 9 bp en la misma posición. Las cepas estudiadas fueron clasificadas utilizando técnicas de similitud global y el análisis de distancias genéticas reveló que 7 cepas se agruparon con las cepas extranjeras. Dentro de este



grupo se ha podido identificar un subgrupo formado por una cepa argentina y una británica (ambas no productoras de signos neurológicos). No se observó relación entre las cepas relacionadas con el año de aislamiento o el origen geográfico. Se aplicaron los métodos de parsimonia y máxima verosimilitud para reconstruir la historia evolutiva de las cepas de EHV-1 y de acuerdo a nuestros resultados las cepas argentinas AR11, AR12, AR13, AR14, AR16 y AR17 junto con las cepas británicas UK1 y UK2, la cepa japonesa JA y la cepa norteamericana US constituyen un grupo monofilético. Esto nos indicó que las mismas poseen un ancestro común más cercano. Dentro de este grupo se pudieron identificar subgrupos: uno formado por las cepas británicas UK1 y UK2, y otro por las cepas AR12 y AR16. Ambos subgrupos serían monofiléticos. La relación con el resto de las cepas no ha podido ser establecida en este estudio (Figura 6).



**Figura 6.** Árbol óptimo obtenido mediante las rutinas de parsimonia del programa TNT (*Tree Analysis using New Technologies*) utilizando pesos iguales.

Según nuestro análisis, las cepas analizadas en este trabajo constituyen un grupo polifilético lo que podría estar relacionado al continuo movimiento de animales desde países donde EHV-1 es común. Sin embargo, considerando que las cepas extranjeras son escasas, estas cepas podrían también ser polifiléticas y pueden haber evolucionado anidadas dentro de las cepas argentinas. El mapeo del carácter signos clínicos indicó que la enfermedad neonatal, la enfermedad respiratoria y enfermedad neurológica causada por EHV-1 no están relacionadas con la evolución histórica del virus. Nuestro análisis sugirió que: a) la condición aborto es ancestral en las cepas de EHV-1, mientras que la condición enfermedad neonatal se desarrolló de manera independiente en distintas cepas mediante evolución convergente; b) las diferencias en la signología observada causada por EHV-1 puede constituir un mecanismo de adaptación del virus a diferentes presiones ambientales de los tejidos. Los factores que pueden actuar como diferentes presiones ambientales del hospedador pueden ser la causa de la diversidad de poblaciones celulares infectadas, las diferentes poblaciones de Ac activos presentes en distintos tejidos y las condiciones físico-químicas. Estos factores, al actuar como diferentes presiones de selección, pueden incrementar la frecuencia de las variantes genéticas más eficientes en las nuevas condiciones ambientales. Este estudio constituye el primer análisis realizado en Sudamérica con cepas de EHV-1 para establecer las relaciones filogenéticas existentes entre las cepas así como para reconstruir la historia evolutiva de los signos clínicos, basado en el método de parsimonia (Martín Ocampos, 2010).

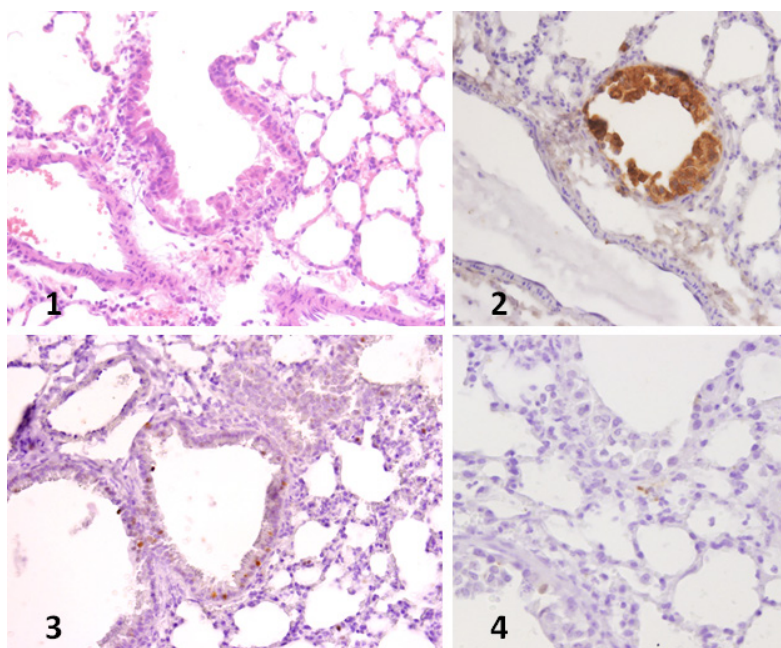
- *Efecto de diferentes anestésicos en el modelo respiratorio murino:* dado que pueden ocurrir posibles interacciones entre

EHV-1 y los anestésicos que se utilizan para realizar los trabajos experimentales, en este estudio se investigó si los primeros eventos de la respuesta inmune en pulmón como consecuencia de la infección por EHV-1 pudo verse afectada por diferentes anestésicos. Se evaluó la anestesia con éter, con una combinación de ketamina y xilacina y con isoflurano; en todos los casos se infectaron grupos de animales con la cepa AR4 ( $10^{5.75}$  CCID<sub>50</sub>/50 $\mu$ l) por vía intranasal. Se describieron los signos clínicos, se evaluaron las lesiones en el pulmón y se determinó la tasa de muerte y proliferación celular utilizando la técnica de inmunohistoquímica (IHQ) para detectar los antígenos indicadores de proliferación celular (PCNA) y de muerte celular por apoptosis (caspasa 3 activa). La cuantificación de estos parámetros se realizó con un análisis de imágenes digital con el programa *Image-Pro Plus 6.0* (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA) y el análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA seguido de múltiples comparaciones con el test de Tukey.

Los signos clínicos fueron más severos en los animales anestesiados con éter, tanto en el grupo control como en el infectado, y se hallaron diferencias cualitativas en el reclutamiento de células inflamatorias que siguió a cada tipo de anestesia. Los pulmones de los animales de ambos grupos anestesiados con ketamina/xilacina mostraron mayor tasa de muerte celular, mientras que aquellos anestesiados con isoflurano presentaron mayor tasa de proliferación celular (Figura 9).

Con este trabajo se enfatizó la importancia de la correcta elección del anestésico a utilizar en los ensayos experimentales, ya el

mismo puede modificar la respuesta a la infección y se pueden obtener resultados que conduzcan a conclusiones erróneas (Eöry *et al.*, 2013).



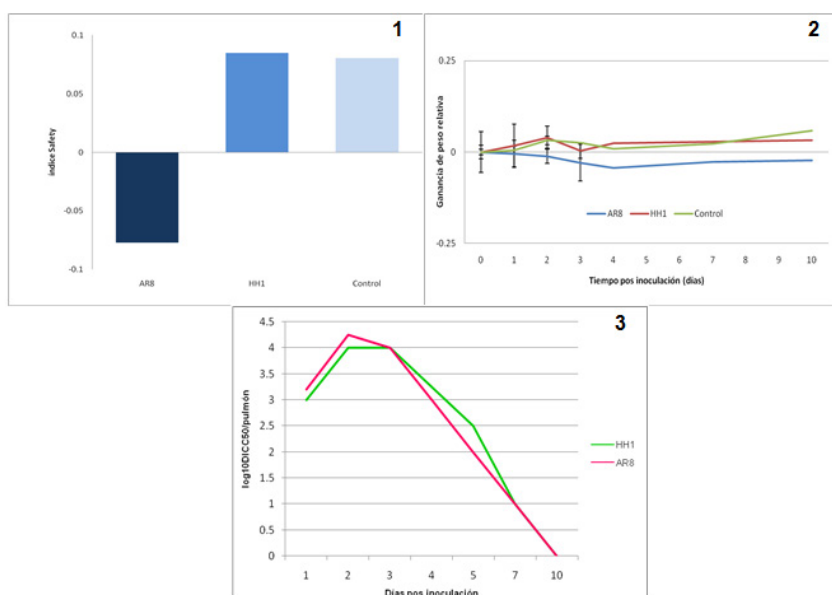
**Figura 9.** (1) Pulmón de ratón infectado anestesiado con isoflurano en el que se aprecia infiltración linfocítica alrededor de las vías aéreas y de los vasos sanguíneos. 200X HE. (2) Immunomarcación positiva del antígeno viral en células epiteliales bronquiales de un ratón anestesiado con ketamina-xilacina. Cromógeno diaminobencidina. Contraste con hematoxilina 200X. (3-4) Immunomarcación positiva del antígeno nuclear de proliferación celular (3) y de la proteína caspasa 3 activa (4) en células epiteliales bronquiales de un ratón anestesiado con isoflurano. Cromógeno diaminobencidina. Contraste con hematoxilina 200X.

- *Efecto de las cepas AR8 y HH1 en ratones BALB/c:* a pesar de los avances obtenidos mundialmente con el uso del modelo ratón BALB/c para el estudio del EHV-1, la mayoría de ellos se han realizado utilizando diferentes cepas, dosis viral y vías de inoculación, por lo cual se dificulta la extrapolación de los resultados a otras investigaciones. En este trabajo se

describe y se compara el comportamiento de la cepa AR8 y HH1 a diferentes tiempos pos inoculación en ratones. Los animales fueron anestesiados con isofluorano e inoculados con la misma dosis viral para ambas cepas. Se observó la aparición de signos clínicos y se calculó el índice *SAFETY*, expresado como el promedio de ganancia/pérdida de peso de los animales. Se tomó sangre heparinizada cada 12 horas y se realizó aislamiento viral en plasma rico en leucocitos, pulmones, bazo e hígado, detección de ADN por PCR y técnicas histológicas y de IHQ. Los ratones inoculados con la cepa AR8 manifestaron signos clínicos desde el día 1 posinfección (pi) hasta el día 3 pi. Sin embargo, aquellos ratones inoculados con HH1 comenzaron a presentar signos clínicos desde el día 2 pi. El aislamiento viral y la detección por PCR a partir de plasma rico en leucocitos fue posible desde el día 1 pi hasta el día 2 pi para AR8 y HH1, respectivamente. En el pulmón se encontraron virus hasta el día 7 pi, con el título máximo al día 2 y 3 pi, respectivamente para cada cepa. En el hígado el aislamiento viral y la detección por PCR fueron posibles hasta el día 2 pi con ambas cepas, mientras que en el bazo de los animales inoculados con AR8 y HH1 se determinó la presencia del virus hasta el día 2 y 3 pi, respectivamente (Fig. 10). Se observaron focos de infección en los bronquios y bronquiólos terminales de los animales infectados, tanto con AR8 como con HH1. Mediante IHQ se detectó al antígeno viral en dichos focos de infección desde el día 1 pi hasta el día 4 pi, con ambas cepas.

Este estudio nos permitió demostrar que la dosis viral inoculada, el tropismo viral, el tipo de anestésico elegido para realizar la ino-

culación, así como diversos factores específicos del hospedador, son variables que de no ser contempladas contribuyen a la heterogeneidad de los resultados hallados. Asimismo, en este trabajo se enfatizó la relevancia de la estandarización del modelo para cada cepa seleccionada antes de extrapolar datos que podrían conducir a conclusiones erróneas (Zanuzzi et al., 2014).



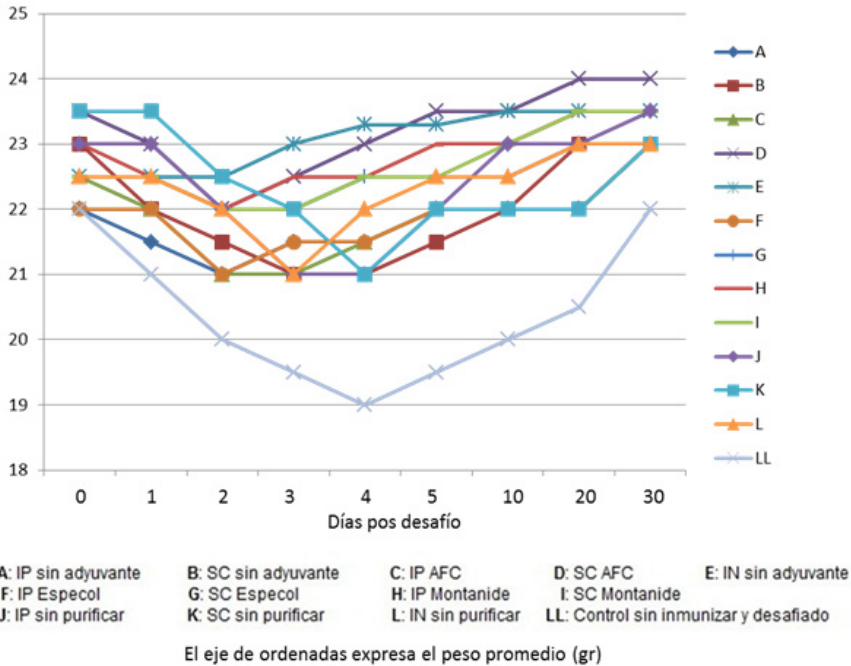
**Figura 10.** (1) Índice *SAFETY* (área bajo la curva del peso relativo durante los primeros diez días pi en los animales inoculados con la cepa AR8 y HH1 de EHV-1, y en los animales del grupo control).(2) Ganancia de peso relativa de ratones BALB-c del grupo control e inoculados con las cepas AR8 o HH1. (3) Aislamiento viral a partir de los pulmones de animales inoculados con la cepa AR8 y HH1 de EHV-1.

- *Estudio de la expresión de proteínas antigénicas y evaluación de la respuesta inmune inducida:* como se describió anteriormente, el otro aspecto que aún no está resuelto en relación a la prevención de la infección por EHV-1 es la obtención de un inmunógeno que estimule tanto la respuesta humoral como la

celular y que prevenga tanto la enfermedad respiratoria como el aborto. En este sentido se expresó la glicoproteína (g) D del EHV-1 en un sistemas eucariota (baculovirus) y se evaluó su capacidad inmunogénica en el modelo animal experimental respiratorio y abortigénico.

Se realizó un plan de inmunización, utilizando la gD recombinante pura o combinada con adyuvantes, a través de distintas vías de inmunización. Se evaluaron los Ac inducidos utilizando las técnicas de ELISA y neutralización viral. Posteriormente, se desafiaron los animales con la cepa AR8 y se determinó el grado de protección conferido mediante el monitoreo de la aparición de signos clínicos, la detección del virus en el pulmón y la expresión de antígenos (Ag) virales detectables por la técnica de IHQ en dicho órgano.

En los días posteriores al desafío se observó que los ratones correspondientes al grupo B (vía subcutánea, sin adyuvante) y LL (control sin inmunizar y desafiado) presentaron depresión general, pelo hirsuto, disnea y disminución del peso corporal. En los restantes grupos los signos clínicos fueron variables, excepto en el grupo inoculado por vía intranasal y sin adyuvante ya que no se observaron manifestaciones clínicas. La disminución del peso corporal sucedió desde las 24 hs pos desafío y comenzó a recuperarse el mismo a partir de los días 3-4, excepto en los grupos B (via subcutánea sin adyuvante), K (proteína sin purificar) y LL en los cuales el incremento se notó recién a los 5 días pos desafío. En el caso del grupo E, inoculado por vía intranasal sin adyuvante, no se observaron signos de enfermedad ni pérdida de peso (Figura 11).

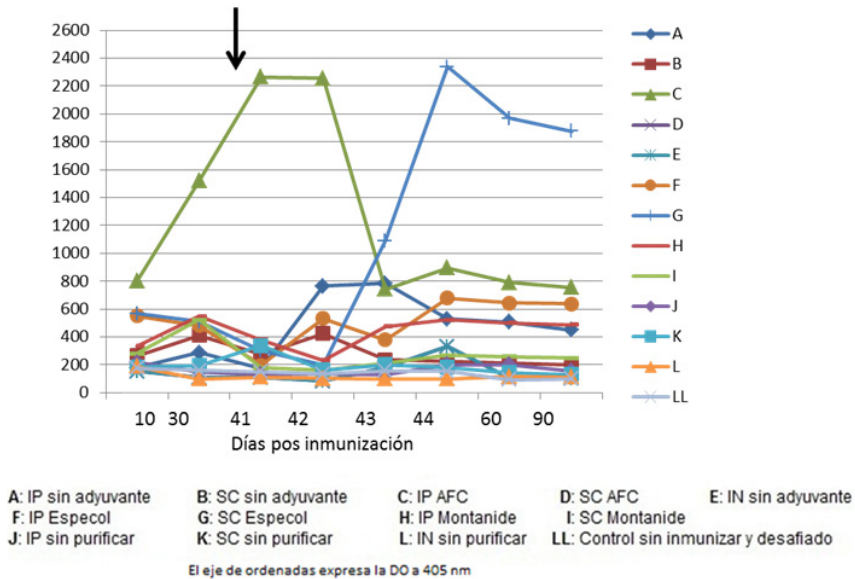


**Figura 11.** Peso de ratones BALB/c inmunizados con Bac-gD y desafiados con  $10^{5.9}$  DICC<sub>50</sub> de la cepa AR8 de EHV-1 en 25  $\mu$ l de inóculo. Cada punto representa el valor promedio de los pesos obtenidos de los animales correspondientes a cada grupo a los días 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 y 30 pos desafío.

Los resultados hallados con el análisis de los sueros con la técnica de ELISA, tanto con el Ag soluble como con la gD purificada, determinaron que la gD no indujo la formación de Ac en ausencia de adyuvantes. La prueba estadística empleada determinó diferencias significativas entre grupos ( $p < 0,05$ ) y evidenció similitud para los valores hallados al día 10 y al día 30 dentro de cada uno. Los Ac se mantuvieron hasta los 90 días de iniciado el plan de inmunización, momento en que se dio por finalizada la experiencia. Todos los Ac inducidos neutralizaron la actividad viral, obteniéndose valores máximos de 1/16 a los 30 días pos inmunización. Luego del desafío los Ac se mantuvieron detectables hasta el



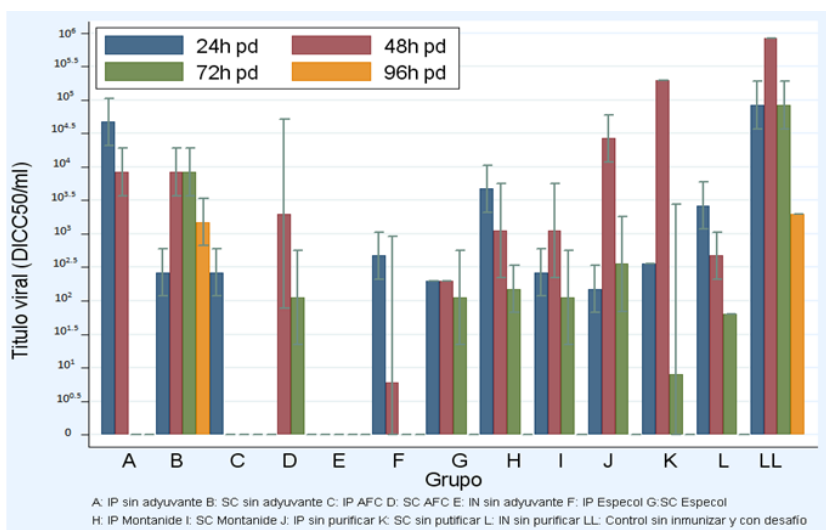
final de la experiencia en la que se hallaron títulos neutralizantes de 1/8 a los 60 y 90 días. La isotipificación de los Ac luego de la última inmunización reveló una producción de IgG1 mayor que la de IgG2a (Figura 12).



**Figura 12.** Ac medidos por ELISA (Densidad óptica (DO) a 405 nm) de sueros obtenidos de ratones BALB/c inmunizados con Bac-gD y desafiados con  $10^{5.9}$  DICC<sub>50</sub> en 25 µl de inóculo de la cepa AR8. Los primeros dos valores corresponden a la DO medida para el *pool* de sueros de cada grupo con n=10 (días 10, 30) y n=2 (día 60), y los restantes corresponden al promedio de la DO para n=2 de cada grupo (días 41, 42, 43, 44 y 90). La flecha indica el momento del desafío.

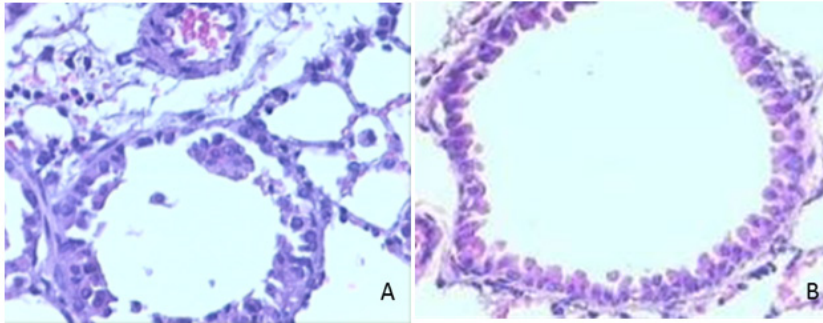
El aislamiento viral fue positivo en las muestras de pulmón correspondientes al grupo control (grupo LL) tomadas a los días 1, 2, 3 y 4 pos desafío. En el resto de los grupos de ratones, los títulos virales variaron de acuerdo a la vía de inmunización utilizada y a la presencia o no de adyuvantes. En el grupo E (vía intranasal, sin adyuvante) no se recuperó virus de pulmón, ya que luego de los pasajes ciegos no se observó la aparición de efecto citopático

ni se detectó virus por PCR. A partir de estas observaciones, se concluyó que sólo la inmunización por vía intranasal impidió la llegada del virus a los pulmones (Figura 13).



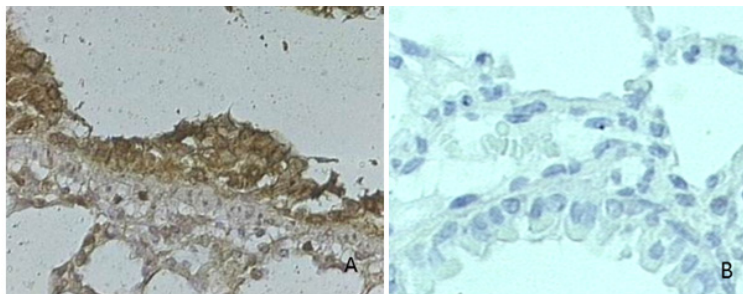
**Figura 13.** Título viral (DICC<sub>50</sub>/ml) promedio en pulmón obtenido a partir del homogenato de dos pulmones por grupo a las 24, 48, 72 y 96 horas (h) pos desafío (pd).

En el estudio histopatológico no se observaron focos de infección o inflamación en los pulmones del grupo inoculado por vía intranasal y sin adyuvante, sólo se encontraron algunas células en apoptosis y escasos restos celulares en la luz de las vías respiratorias. En los restantes grupos se observó infiltrado inflamatorio leve alrededor de las vías respiratorias y vasos sanguíneos; mientras que en los epitelios de estos animales se detectaron sincitios, zonas de erosión y cuerpos de inclusión intranucleares eosinofílicos. Las células inflamatorias fueron principalmente mononucleares, aunque se encontraron también escasos neutrófilos. En el grupo control (LL) se observaron los mismos cambios, con mayor presencia de cuerpos de inclusión intranucleares y necrosis bronquiolar más severa (Figura 14).



**Figura 14.** Estudio histopatológico. A: Histología de pulmón de animales controles (sin inmunizar) y desafiados. Se observa desprendimiento del epitelio e intensa reacción inflamatoria. B: Pulmón de animales inmunizados por vía IN (grupo E) y desafiados. Nótese la ausencia de las lesiones propias del proceso infeccioso. HE. 40X.

En los pulmones de los ratones del grupo inmunizado por vía intranasal, sin adyuvante no se detectaron antígenos virales mediante IHQ. Sin embargo, en los pulmones de los restantes grupos se observó inmunomarcación positiva en los epitelios bronquiales y bronquiolares, en algunas células de las paredes alveolares, así como en restos celulares localizados en la luz de las vías respiratorias desde las 24 horas pos desafío. En algunos pulmones se observaron células sin inmunomarcación pero con indicios morfológicos de infección. Muchas de las células marcadas en los epitelios formaban sincitios (Figura 15).



**Figura 15.** Inmunomarcación de antígenos virales. A: Se observa marcación positiva y descamación del epitelio bronquial de los animales controles (sin inmunizar) y desafiados (grupo LL). B: Inmunohistoquímica negativa en pulmones de animales inmunizados por vía IN (grupo E) y desafiados.

Se concluyó que, en las estrategias de inmunización con la gD expresada en baculovirus, las rutas sistémicas fueron exitosas para conducir a la producción de Ac, pero sólo la inoculación intranasal fue capaz de impedir la entrada directa del virus, probablemente como resultado de la producción de IgA secretoria. La inoculación sistémica indujo la producción de IgG que, por trasudación al tejido pulmonar, lo liberó del virus. El estudio demostró que gD de EHV-1 expresada en baculovirus generó una buena respuesta de Ac en el modelo experimental, protegiéndolo, además, frente al desafío con una cepa autóctona de EHV-1 (Fuentealba, 2012).

Posteriormente se estudió el efecto de la inmunización intranasal con la gD en ratonas preñadas y descargadas con tres cepas argentinas de EHV-1 (AR8, AR11 y AR52) en la etapa temprana del periodo medio de gestación. Se evaluaron los signos clínicos, se realizó el aislamiento viral, la detección de ADN viral por PCR, y se analizaron las lesiones en pulmón y útero, y se localizaron antígenos virales en pulmón, placentas y úteros. No se detectó presencia de efecto citopático ni lesiones en las ratonas inmunizadas ni en sus crías. Las ratonas no inmunizadas presentaron signos clínicos de infección, aislamiento viral positivo a partir de los pulmones y útero y, en los animales inoculados con la cepa AR8, se produjeron abortos. Nuestros resultados demuestran la capacidad de la gD para inducir protección contra tres cepas de EHV-1 y nos permiten sugerir que la respuesta immune secretoria (IgA) a nivel del tracto respiratorio superior podría ser responsable de los hallazgos descriptos. Debido a que las ratonas inmunizadas y desafiadas con las tres cepas presentaron pocas lesiones en sus placentas y útero, sugerimos que la respuesta en el tracto

respiratorio superior redujo el acceso del virus y la viremia. Sin embargo, se debe considerar que el efecto del *conceptus* es altamente variable y también depende de la cepa. Una discusión que permanece abierta es si el aborto es producido primariamente por factores maternos o por la infección viral. Toda esta información podría conducir a nuevas estrategias de inmunización en el hospedador natural.

## **Tritrichomonosis bovina: un modelo experimental en ratón BALB/c**

### **Introducción**

La Tritrichomonosis bovina (TB) es una enfermedad de transmisión sexual, producida por *Tritrichomonas foetus* (*T. foetus*), un protozoo flagelado no invasor que coloniza la mucosa del tracto reproductor. La enfermedad se manifiesta en las hembras con repetición de celo e infertilidad temporaria por muerte embrionaria o fetal, asociada con vaginitis, cervicitis, endometritis, salpingitis, placentitis y en forma esporádica, piómetra (Parsonson *et al.*, 1976; Skirrow & Bon Durand, 1988; Anderson *et al.*, 1996).

El impacto económico que tiene la enfermedad sobre la producción pecuaria depende de la zona geográfica y de las características de explotación. Ocasiona grandes pérdidas por la disminución de terneros nacidos por año y por el costo de reposición de los animales infectados para los cuales no hay tratamiento efectivo debido a la resistencia del protozoo hacia los agentes terapéuticos (Mardones *et al.*, 2008).

La principal herramienta de control es el diagnóstico adecuado de la enfermedad en los toros, previo al servicio, como así

también de las hembras que abortan o repiten celo, a los fines de evitar la permanencia de los animales infectados en el rodeo (Mardones *et al.*, 2008).

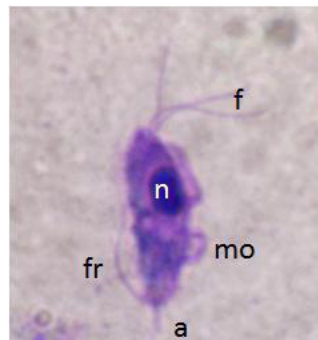
La inmunopatogenia de la TB, es un proceso complejo, en el que interactúan factores inherentes al hospedador y al agente. Para una mayor comprensión de esta enfermedad es necesario conocer con profundidad las características generales del protozoo y su mecanismo de acción patógena.

### **Características generales de *Tritrichomonas foetus***

La morfología más frecuente de *T.foetus* es la de un flagelado, piriforme de 10-25  $\mu\text{m}$  de largo y 3-15  $\mu\text{m}$  de ancho. Cuando las condiciones son desfavorables en el huésped o en cultivo toma la forma redondeada o de pseudoquiste (Granger *et al.*, 2000; Pereira-Neves *et al.*, 2011). Actualmente este protozoo se ubica en el Dominio Eukarya, Reino Excavata (Cavalier-Smith, 2002, enmendado por Simpson, 2003), *Phylum* Parabasalia, Orden Trichomonadida, Familia Trichomonadidae Subfamilia Tritrichomonadinae (Kleinaa *et al.*, 2004; Adl *et al.*, 2005).

En cuanto a las características estructurales presenta una membrana citoplasmática que interviene en el mecanismo de adherencia a las células del hospedador. El núcleo es oval y excéntrico (Figura 16). El complejo de Golgi se encuentra en la parte anterior del núcleo. El citostoma es difícil de apreciar aunque, como en otros protozoos, interviene en la incorporación de alimentos y además participa en la fijación al tejido específico (Monteavaro *et al.*, 2007). Los flagelos se originan en el blefaroplasto o cuerpo parabasal, son tres anteriores, y uno posterior o recurrente, este último se extiende a lo largo de la membrana ondulante, para

abandonar el soma en una porción libre (Skirrow & Bon Durand, 1988; Honinberg *et al.*, 1984). Presenta un citoesqueleto formado por el axostilo constituido por microtúbulos orientados longitudinalmente que van de un polo a otro, y una pelta. El axostilo emerge del cuerpo del protozoo a través de un anillo cromático. *T. foetus* carece de mitocondrias, pero posee hidrogenosomas que son organelas rodeadas por una doble membrana que contienen enzimas que participan en el metabolismo del piruvato, capaces de producir ATP e hidrógeno molecular en condiciones anaeróbicas (Benchimol *et al.* 1996; Benchimol & Engelke, 2003). Además, posee gránulos de glucógeno, sintetizados a partir del metabolismo de la glucosa, sacarosa, maltosa y otros glúcidos. La membrana ondulante se extiende a lo largo del protozoo, sobre el recorrido de la costa. Esta última es una estructura fibrilar, que se origina en la región anterior, próxima al blefaroplasto y se proyecta hacia la zona posterior (Honigberg *et al.*, 1984; Benchimol *et al.*, 1993).



**Figura 16.** *T. foetus*. Giemsa, 1000X. Referencias: a: axostilo, f: flagelo, fr: flagelo recurrente, n: núcleo

*T. foetus* se nutre por endocitosis. El metabolismo es anaerobio aerotolerante: produce superóxido dismutasa (SOD) que

degrada al radical superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno (Granger *et al.*, 1997). La reproducción se realiza por mitosis longitudinal (Figura 17) con la duplicación de todas las estructuras en pre-mitosis, las cuales se dirigen en sentido opuesto y finalmente se separan las dos células hijas (Benchimol & Engelke, 2003).



**Figura 17.** *T. foetus* realizando una mitosis longitudinal. Giemsa, 1000X.

## **Mecanismo de acción patógena**

Los principales mecanismos de acción patógena de *T. foetus* son: adherencia, colonización y producción de enzimas extracelulares con efecto citotóxico que provocan el daño tisular.

### *Adherencia y colonización*

El fenómeno de adherencia es complejo y específico. En él son fundamentales las adhesinas que promueven el contacto parásito-célula por disminuir la electronegatividad del protozoo y permitir la proximidad entre ambas células (Feillesen, 1999). La adhesina más abundante es un lipogluco péptido denominado lipofosfoglican), que es un componente estructural de la membrana citoplasmática, específico de especie y con características antigénicas (Singh *et al.*, 1999).

*T. foetus* presenta, además, en su membrana citoplasmática hemaglutininas, lectinas glicoproteicas. Su función es facilitar



la adherencia a receptores específicos, como ácido siálico unido a otros azúcares. Mediante la técnica de lectinahistoquímica se identificaron en las membranas citoplasmáticas alguno de los siguientes compuestos: ácido N-acetil glucosamina, ácido N-acetil galactosamina, D-galactosa, D- manosa; estos compuestos indicarían los sitios de afinidad del protozoo para adherirse y colonizar (Bonilha *et al.*, 1995; Babal & Russell, 1999). En un trabajo de caracterización de cepas aisladas de establecimientos de la Provincia de Buenos Aires se ha encontrado un predominio de D- glucosa, D-manosa, N-acetilglucosamina y ácido sialico, (Doumeci *et al.*, datos no publicados).

En ensayos *in vitro* de citoadherencia y efecto citopático de *T.foetus* en cultivo de células epiteliales vaginales bovinas, Singh y colaboradores (1999) observaron que luego de 3 horas del contacto protozoo-célula comienza la adhesión, mientras que el efecto citopático se detectó luego de 9 horas de incubación.

### *Producción de enzimas extracelulares*

Durante el cultivo *in vitro* de *T. foetus* y en el mucus cérvico-vaginal de vaquillonas infectadas experimentalmente, se han detectado altas concentraciones de proteinasas extracelulares, las que en su mayoría son utilizadas por el protozoo para la obtención de nutrientes. Además, estas enzimas están relacionadas con la virulencia, principalmente las cisteín-proteinasas que degradan gran variedad de proteínas que intervienen en la defensa del hospedador, tales como IgM, IgA, IgG, fibronectinas, fibrinógeno, lactoferrina, albúmina, transferrina (Talbot *et al.*, 1991) y glicoproteínas de la matriz extracelular. Esta acción también podría afectar al tejido placentario (Burgess *et al.*, 1990).

La hidrólisis sobre la fibronectina y fibrinógeno también altera el mecanismo de eliminación del protozoo, al impedir la acción de los neutrófilos y macrófagos. Otra de las enzimas extracelulares de importancia para el mecanismo de acción de *T. foetus* es la glicosidasa que degrada la mucina, principal componente del mucus que actúa como un protector de las mucosas. (Talbot *et al.*, 1991; Thomford *et al.*, 1996).

La patogenicidad de *T. foetus* es variable, pudiéndose caracterizar las diferentes cepas a través de: la producción de abscesos subcutáneos en ratones, la producción de hemolisinas (Burgess *et al.*, 1990); la adherencia a células epiteliales vaginales bovinas (BVECs) (Corbeil *et al.*, 1989); el efecto citotóxico en líneas celulares (CHO, Hela, BVECs etc.) (Singh *et al.*, 1999) y la persistencia de la infección vaginal en ratonas estrogenizadas (Hook *et al.*, 1995; Soto *et al.*, 2005), entre otras técnicas.

### **Patogenia en los machos**

En los toros, *T. foetus* tiene una localización superficial en el área posterior del glande y el prepucio adyacente, y en las criptas prepuciales, sin invasión del epitelio. La espermatogénesis y la libido no se alteran. A las dos semanas posteriores a la infección, aparece una leve inflamación subepitelial del prepucio con una escasa infiltración de neutrófilos, macrófagos y linfocitos. En la dermis del prepucio y pene se encuentran células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas, las cuales por difusión alcanzan la cavidad prepucial. En la lámina propia de la dermis, cuando la infección es persistente, se observan células mononucleares, linfocitos, mastocitos, neutrófilos, eosinófilos y folículos linfoides intraepiteliales (Flower *et al.*, 1982). Las vesículas seminales y

glándulas accesorias (bulbouretral y próstata), colaboran en la producción de inmunoglobulinas que se eliminan con el fluido seminal (Parsonson *et al.*, 1974; Campero *et al.*, 1989a).

Si bien existe una respuesta específica, la persistencia de la infección en los toros podría deberse a la acción superficial del protozoo con ausencia de invasión al epitelio escamoso estratificado. Por lo tanto, la estimulación antigénica no es suficiente y no alcanza niveles adecuados para una respuesta inmune efectiva. De este modo los toros se comportan como reservorio y portadores de *T. foetus* (Bon Durant, 1997).

### **Patogenia en las hembras**

Las hembras bovinas son muy susceptibles a la infección que se produce en el momento del estro (Bon Durant, 1997). En este período los niveles de estrógenos son elevados, y se incrementa la liberación de glicocomplejos sobre la mucosa del tracto reproductor y la presencia de mayor número de células cornificadas. Este proceso favorece la adhesión de *T. foetus* al epitelio vaginal (Corbeil *et al.*, 1989).

En el inicio de la infección se observa proliferación de *T. foetus* en la vagina, que genera un aumento de secreción vaginal que es fluida y clara. Hacia los 20-30 días, disminuye el número de protozoos que en este momento se localizan en el lumen de las glándulas endometriales o entre los placentomas materno-fetales en caso de existir preñez. En algunos casos se presenta una leve vaginitis pero la fertilización y el desarrollo temprano del embrión no están afectados (Parsonson *et al.*, 1976, Bielanski *et al.*, 2004). La interrupción de la gestación se produce más frecuentemente entre el reconocimiento materno (día 14 a 18) y el 5º mes de gestación (Bon Durant *et al.*, 1985; Bon Durant, 1997).

La mayoría de las hembras eliminan al protozoo espontáneamente mediante la respuesta del sistema inmune a los 2 a 4 meses de infección, con un proceso gradual de recuperación de la fertilidad uterina (Skirrow & Bon Durant, 1988). Ocasionalmente se encuentran vacas preñadas infectadas que tienen un parto normal, pero continúan eliminando *T. foetus* durante 6 a 9 semanas postparto (Anderson *et al.*, 1996). La duración de este período de presencia de protozoos es suficiente para la infección de los toros en servicio.

Los primeros cambios histológicos uterinos en la hembra bovina se manifiestan, entre los días 63 a 74 pi, como una endometritis. Si el cuerpo lúteo persiste, se desarrolla piómetra. Posteriormente se produce una fibrosis periglandular con hiperplasia del epitelio glandular y atrofia glandular. Las lesiones más graves aparecen a los 90 días, acompañadas de muerte fetal. En la vagina y el cérvix los cambios son mínimos. En infecciones persistentes aparecen linfonodos en la submucosa (Parsonson *et al.*, 1976; Anderson *et al.*, 1996).

El desarrollo del placentoma en los bovinos es un proceso continuo a partir de los 28 a 45 días e implica un rápido crecimiento y expansión del área de contacto entre los tejidos fetales y maternos. Este contacto se encuentra alterado por la acción citotóxica del protozoo a través de las enzimas extracelulares y explicaría por qué muchas preñeces se pierden después de este período; en estos casos, se produce la implantación, se forma el placentoma en ausencia de una severa respuesta inflamatoria, pero si la infección persiste, el daño tisular es incompatible con la preñez y se produce la pérdida del *conceptus* (Bon Durant, 1997).

## Métodos de detección de *T. foetus* en tejidos

Para el estudio de la patogenicidad de las enfermedades es importante poner de manifiesto el agente patógeno colonizando los órganos afectados. Existen diferentes técnicas para este fin, entre las que se pueden mencionar: coloraciones (Giemsa, Gomori), y técnicas inmunohistoquímicas (IHQ). La IHQ permite detectar antígenos de microorganismos o de células en un extendido celular o en un corte de tejido (incluido en parafina o congelado).

Burgess & Knoblock (1989) utilizaron un anticuerpo monoclonal anti-*Tritrichomonas* en pruebas de inmunofluorescencia. Campero *et al.* (1989b) realizaron ensayos en los que se empleó la técnica peroxidasa-antiperoxidasa para visualizar el protozoo en cortes de tejido fijados en formol e incluidos en parafina. Rhyan *et al.* (1995) utilizaron la técnica de IHQ para determinar la presencia y el poder invasivo de *T. foetus* en placenta y tejidos fetales bovinos (Figura 18). Estos autores demostraron las ventajas de la IHQ con respecto a las coloraciones de hematoxilina-eosina (HE) para las observaciones histopatológicas, ya que además de identificar al agente en el tejido, permite diferenciar al protozoo del material necrótico.



**Figura 18.** Inmunohistoquímica anti-*T. foetus* . AEC, 400X.

## **Antecedentes de modelos experimentales de tritrichomonosis bovina**

Teniendo en cuenta los antecedentes de otros investigadores, desarrollamos un modelo murino para los estudios de patogenia, con sincronización del estro para favorecer la infección inicial, pero con una dosis que no presentara efectos colaterales (Monteavaro *et al.*, 2000). Se estipuló que la dosis adecuada para la sincronización es de 5 µg de 3-benzoato de beta estradiol por vía intramuscular. Esta dosis cumple con los objetivos planteados, a las 48 horas el 74% de los animales se encuentra en estro y el 19% en proestro. Los animales retoman a un ciclo normal entre los 5 a 7 días posteriores al tratamiento y la capacidad reproductiva se mantiene entre los índices normales para esta cepa (Monteavaro, 2004).

Con respecto a la aparición de los cambios histopatológicos significativos en útero, en los bovinos se reconocen entre los 50 a 60 días pi, mientras que en nuestro modelo experimental hemos observado a los mismos alrededor de los 25 a 30 días pi.

En la vagina, la respuesta del hospedador es más tardía, hasta los 30 días de infección no hay lesiones, posiblemente por el recambio periódico de células a través de procesos naturales de proliferación, diferenciación y descamación del epitelio estratificado cornificado. Es importante destacar la presencia de eosinófilos en el tejido conectivo de la vagina y el cérvix. La llegada y la degranulación de estos leucocitos colaboran con el daño tisular debido a la acción del contenido de sus gránulos (Monteavaro *et al.*, 2008). Además, los eosinófilos pueden fagocitar a los protozoos en el lumen del útero (Monteavaro *et al.*, 2007).

Posteriormente, realizamos un ensayo en ratonas gestantes que constituyó el primer trabajo en el que se utilizó el modelo en

ratones con hembras preñadas (Barbeito *et al.*, 2008). Pudimos observar los parámetros indicativos de gestación en los animales tanto infectados como controles, pero posteriormente en los animales infectados se interrumpió frecuentemente la gestación. Los porcentajes de preñez del lote control fueron del 88%, superiores a los valores normales citados en la bibliografía para las cepas endocriadas BALB/c x BALB/c, que se encuentran en un 80%. En las hembras infectadas, las lesiones fueron similares a las encontradas en los animales no preñados y la interrupción de la preñez ocurrió principalmente en la etapa temprana, cuando comienza la estrecha interacción útero-embrión (Barbeito *et al.*, 2008).

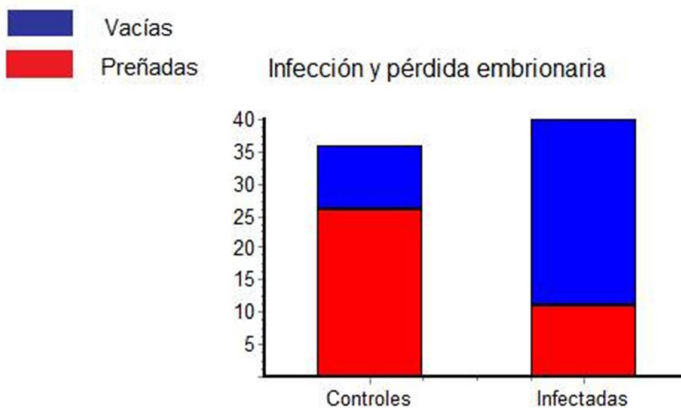
### **Experimentos realizados durante la ejecución de este proyecto**

En el proyecto se incluye la tesis doctoral de Mariana Woudwyk durante la cual se realizó la inoculación intravaginal con *T. foetus* de ratonas BALB/c que fueron apareadas con machos sanos. Se utilizaron técnicas histológicas para estudiar los cambios endometriales en las ratonas infectadas y para analizar el número y distribución de las células *natural killery* de los mastocitos. Mediante lectinahistoquímica e inmunohistoquímica se analizaron los carbohidratos y la muerte y proliferación del epitelio uterino, respectivamente. Utilizando *real time* RT-PCR se estudió la expresión de citoquinas, hemooxigenasa 1 (HO-1) e indolamina deoxigenasa (IDO), y a las células T reguladoras (Treg) y T helper17 (Th17), en el útero.

Las hembras BALB/c preñadas, infectadas con *T. foetus* y sacrificadas tanto en la fase temprana, 5 a 8 días poscoito (dpc), como en la fase media, 9 a 11 dpc, de su gestación, sufrieron una alta incidencia de pérdida embrionaria. Las reabsorciones o sitios

de muerte embrionaria fueron identificadas macroscópicamente por su pequeño tamaño y su aspecto hemorrágico o necrótico, en comparación con las implantaciones normales de las hembras del grupo control.

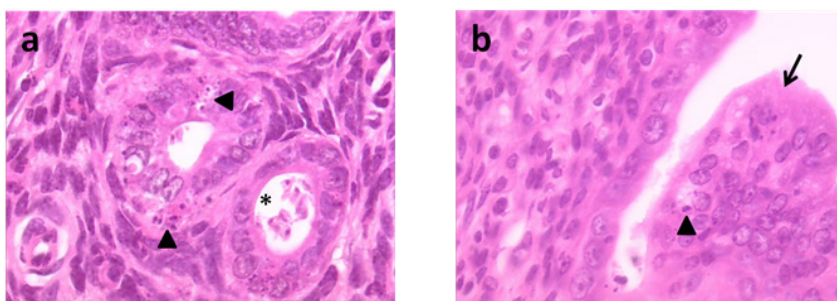
El 72% de las hembras del grupo control (26 animales) estaban preñadas en el momento del sacrificio y las vesículas embrionarias eran normales. En el 28% restante (10 animales) no se observaron vesículas embrionarias a pesar de haber presentado tapón mucoso luego del apareamiento. En el grupo infectado, 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 muy significativas ( $p < 0,001$ ) (Fig. 19). Esto indica que la pérdida embrionaria en el grupo infectado estuvo relacionada con la presencia de *T. foetus*.



**Figura 19.** Porcentaje 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 con el protozoo hasta el momento del sacrificio, presentaron muerte embrionaria. Sin embargo, algunas hembras con infección persistente estaban preñadas en el momento del sacrificio, pero si bien presentaban algunas vesículas embrionarias de aspecto normal, la mayoría era de muy pequeño tamaño y aspecto hemorrágico o edematoso. Además, el número de vesículas fue menor que el número esperado para la especie. Trece hembras del grupo infectado fueron negativas cuando se tomaron muestras de la luz de los cuernos uterinos para corroborar la persistencia de la infección. Dentro de estas hembras que se negativizaron para el protozoo, seis presentaron una gestación normal al momento de la necropsia y siete estaban vacías. En tres de las hembras vacías negativas los cuernos uterinos eran rosados, de aspecto normal, pero en las cuatro restantes presentaban signos de congestión o edema.



**Figura 20.** Cortes transversales de cuernos uterinos de ratonas infectadas con *T. foetus*, vacías. a) Día 9 post coito. *T. foetus* en la luz glandular (asterisco). Células apoptóticas en el epitelio glandular (puntas de flecha). HE. 400X. b) Día 8 post coito. Apoptosis (punta de flecha) y metaplasia (flecha) en el epitelio uterino. HE. 400X.

En los cortes histológicos provenientes de los cuernos uterinos de las ratonas infectadas que sufrieron muerte embrionaria se observaron cambios en el epitelio (apoptosis, vacuolización, me-

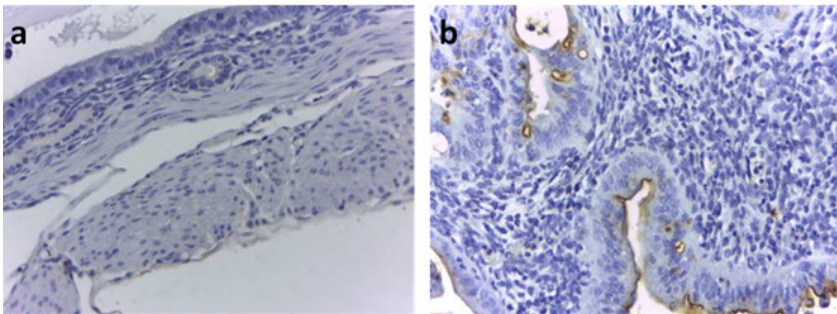
taplasia) y en las glándulas endometriales (dilatación, exudado, solución de continuidad en el epitelio glandular) y un importante infiltrado inflamatorio en la lámina propia (neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, linfocitos y células plasmáticas) (Figura 20).

Algunas hembras infectadas se negativizaron y no sufrieron pérdidas del *conceptus*. Con la coloración azul de Toluidina se evidenciaron los mastocitos distribuidos en el triángulo mesometrial y en el mesometrio. En los animales sacrificados entre los 5-7 días dpc no se registraron diferencias significativas en el promedio de mastocitos por campo entre los grupos control e infectado. Sin embargo, en las ratonas sacrificadas entre los 8-11 dpc, el número de mastocitos disminuyó significativamente en las hembras infectadas con respecto a las hembras vacías controles ( $p < 0,05$ ). 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. En las hembras preñadas, los promedios fueron semejantes entre los grupos control e infectado.

El aumento en el número de mastocitos en los sitios de implantación se encuentra asociado, en algunos casos, a pérdidas embrionarias. Zenclussen *et al.*(2003b) 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, en las hembras infectadas con *T. foetus* sacrificadas entre los 8 a 11 dpc, dichas células disminuyeron. 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 *et al.*(2005) de-

mostraron en hembras bovinas infectadas con *T. foetus* que la respuesta inmune mediada por IgE estuvo asociada a la degradación de los mastocitos y a la liberación de la infección. Por lo tanto, la disminución en el número de mastocitos observada en este trabajo, pudo deberse a la intervención de estas células en la respuesta inmune hacia *T. foetus*.

Mediante lectinahistoquímica, se detectaron cambios en el patrón de carbohidratos del epitelio luminal y glandular del útero. Las lectinas PNA y SBA con afinidad por la N-acetilgalactosamina y la  $\beta$ -D-galactosa, evidenciaron los cambios más importantes en todas las edades gestacionales estudiadas cuando se compararon con los tejidos de las ratonas controles (Fig. 21). La afinidad por la lectina ConA fue mayor a los 6 dpc en el epitelio luminal del útero en el grupo infectado. En el caso de WGA, RCA-1, UEA-1 y DBA, los resultados fueron más heterogéneos.



**Figura 21.** Lectinahistoquímica en el útero de ratonas BALB/c. La marcación con la lectina biotilada SBA fue más intensa en los epitelios luminal y glandular de las ratonas infectadas con respecto a las controles. a) Día 10 post coito. Grupo control. b) Día 10 post coito. Grupo infectado con *T. foetus*. 400X.

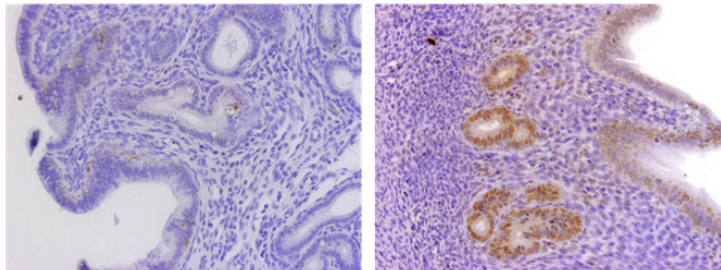
Se sabe que *T. foetus* produce diversas enzimas que modifican carbohidratos, las cuales podrían ser las responsables de los cambios observados en el patrón de unión a lectinas en el tracto

genital de vaquillonas infectadas (Cobo *et al.*, 2004), en ratonas no preñadas infectadas (Monteavaro *et al.*, 2008) y en ratonas preñadas infectadas con *T. foetus* (Cobo *et al.*, 2011; Woudwyk *et al.*, 2013). Los cambios más evidentes están relacionados con aquellas lectinas que presentan afinidad por la  $\beta$ -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. La modificación de los carbohidratos superficiales en los órganos de los animales infectados podría estar causada por la acción de las diversas enzimas producidas y secretadas por *T. foetus*, para facilitar su adhesión al epitelio de los órganos genitales y, secundariamente, generar alteraciones en la implantación y en la placentación llevando a la pérdida embrionaria temprana.

La lectina DBA es un marcador útil para las células uNK. Esta lectina nos permitió detectar e identificar a las células uNK en la decidua *basalis* y el triángulo mesometrial en las ratonas preñadas. Estas células también fueron marcadas con la lectina SBA. En las ratonas infectadas que perdieron el *conceptus*. Las células uNK eran pequeñas, con escasos gránulos citoplasmáticos y presentaban cambios degenerativos (Woudwyk *et al.*, 2013).

Con inmunohistoquímica se investigó la expresión de caspasa-3 activa y del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) en las células del epitelio uterino para evaluar, respectivamente, la muerte celular por apoptosis y la proliferación celular en el útero de ratonas preñadas infectadas con *T. foetus*. Se realizó el recuento de células marcadas en el epitelio luminal del útero y en las glándulas endometriales. 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 5 y 7 dpc, fechas en las que ocurre la reacción decidual una vez producida la implantación del blastocisto. El segundo subgrupo estuvo constituido por las hembras sacrificadas entre los 8 y 11 dpc, período que coincide con el proceso de placentación. En ambos subgrupos, se observó una mayor incidencia de muerte celular en los epitelios luminal y glandular de las hembras infectadas que habían perdido el *conceptus*, respecto de las hembras controles. Con respecto a la proliferación celular, se observó mayor marcación con el anticuerpo anti-PCNA en el epitelio luminal de las hembras infectadas sacrificadas entre los días 5 y 7 poscoito (Figura 22). Sin embargo, en el epitelio de las glándulas endometriales el índice de proliferación no mostró diferencias significativas entre los diferentes grupos. En el subgrupo de hembras sacrificadas entre los días 8 y 11 poscoito, se observó mayor proliferación celular en aquellas infectadas que mantuvieron su gestación. En las hembras preñadas, tanto del grupo control como del grupo infectado, las células deciduales presentaron una intensa inmunomarcación para PCNA (Woudwyk *et al.*, datos no publicados).



**Figura 22.** Inmunohistoquímica en el útero de ratonas BALB/c.a) Inmunomarcación para caspasa-3 activa. Día 9 post coito. Grupo infectado. b) Inmunomarcación para PCNA. Día 8 post coito. Grupo infectado con *T. foetus*. 400X.

*T. foetus* produce enzimas con efecto citotóxico en cultivos de células epiteliales bovinas (Singh *et al.*, 2004). El incremento de la apoptosis en el epitelio uterino de las ratonas infectadas posiblemente se deba al mencionado efecto y podría ser uno de los mecanismos responsables de las fallas de la implantación y pérdidas embrionarias tempranas que ocurren durante la infección. La mayor proliferación celular observada en el epitelio luminal de las hembras infectadas, podría ser una respuesta inicial del hospedador a los efectos citotóxicos y a la irritación generada por el protozoo, es decir, sería un mecanismo compensatorio más que un mecanismo involucrado directamente en la patogenia de la muerte embrionaria.

Para estudiar los mecanismos de la respuesta inmune local uterina que podrían ser los responsables de la pérdida temprana de la preñez que ocurre en la tritrichomonosis se analizó, mediante *real time* RT-PCR, la expresión del ARNm de ciertas citoquinas y enzimas relacionadas con el mantenimiento de la preñez. También se analizó la expresión de Foxp3 y ROR $\gamma$ t, marcadores de células T reguladoras y T helper 17, respectivamente. El ARNm de TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-4 aumentó en el grupo infectado. La expresión de Foxp3 y ROR $\gamma$ t fue mayor en el útero de las ratonas infectadas. Los niveles de ARNm de HO-1 disminuyeron en las ratonas que sufrieron pérdida embrionaria, mientras que el ARNm de IDO se encontró sobre-expresado (Woudwyk *et al.*, 2012).

Entre los mecanismos involucrados en la patogenia de la muerte embrionaria que se produce por la infección con *T. foetus* podría incluirse una respuesta inmune materna exacerbada hacia el protozoo afectando el normal desarrollo embrionario.

Durante la infección temprana con *T. foetus*, ocurre la activa-

ción del sistema inmune. En consecuencia, se observó un infiltrado de diversas poblaciones 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- $\alpha$  (Svanborg *et al.*, 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- $\alpha$  que se encontraron en estos animales. Los elevados niveles de IL-4 encontrados en el útero de las ratonas infectadas podría estar relacionada con la presencia de eosinófilos, dado que estos leucocitos son una fuente importante de dicha citoquina (Dombrowicz & 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. Por ello, a medida que la infección con *T. foetus* progresa en el tracto genital, es esperable observar una respuesta inmune de tipo Th2.

También se observó una exacerbada respuesta Th1 caracterizada por elevados niveles de ARNm de TNF- $\alpha$  en las ratonas infectadas. Se sabe que la respuesta Th1 estimula a los macrófagos y la producción de anticuerpos opsonizantes (Janeway *et al.*, 2003). 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.

Las células Treg son esenciales para el mantenimiento de una activa tolerancia inmune para el feto alogénico durante la gesta-

ción (Aluvihare *et al.*, 2004). En ratonas preñadas y no preñadas, Ge *et al.* (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*<sup>+</sup>, 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. Sin embargo, la expresión de *foxp3* fue significativamente mayor en el útero de las ratonas infectadas lo que sugiere una infección persistente.

El número de células Th17 en el útero durante la gestación se encuentra disminuido (Ostojic *et al.*, 2003) y, en humanos, su presencia está asociada con complicaciones del embarazo, como abortos y pre-eclampsia (Santner-Nanan *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010). En nuestro trabajo, se encontraron niveles elevados de ARNm de ROR $\gamma$ t 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 ROR $\gamma$ t podría estar implicado en la respuesta inmune hacia el protozoo y una respuesta Th17 exacerbada podría ser parcialmente responsable de la muerte embrionaria que ocurre en esta enfermedad.

La enzima HO-1 es citoprotectora con un rol crítico durante los procesos inflamatorios, su expresión es un mecanismo protector



de la gestación que ha sido bien estudiado (Zenclussen *et al.*, 2006b). Tachibana *et al.* (2008) demostraron que la expresión de HO-1 disminuyó en la placenta de ratonas infectadas con *Bruce-lla 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- $\gamma$ , 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 este trabajo, mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real, se observó disminución de ARNm de HO-1 en el útero de las ratonas infectadas que sufrieron 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 *et al.*, 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 *et al.* (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*.

Finalmente, se analizaron los niveles de ARNm de IDO. IDO es una enzima cuya función ha sido considerada de importancia para el mantenimiento de una gestación saludable (Mellor &

Munn, 2001). La inducción deIDO ejerce además efectos antimicrobianos, posiblemente por la depleción del triptófano que produce (Taylor & Feng, 1991). En este trabajo, el ARNm deIDO aumentó 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 deIDO durante la infección con *T. foetus* en ratonas preñadas tengan algún rol antiprotoso.

Si consideramos 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. Hemos logrado la preñez de ratonas BALB/c infectadas con *T. foetus*, en las cuales se producen cambios y lesiones que mimetizan aquellas ocurridas en el bovino infectado. *T. foetus* se adhiere a las células epiteliales y causa endometritis y muerte embrionaria en el modelo experimental de ratonas BALB/c.

### **Conclusiones generadas en el modelo murino de tritrichomonosis bovina:**

- El modelo murino de tritrichomonosis bovina permitió estudiar algunos aspectos de 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 que permitió la liberación de la infección y la continuidad de la preñez. Dado que tanto la infección con *T. foetus* como la preñez ocurren simultáneamente, la continuidad o interrup-

ción de la misma probablemente dependa del equilibrio entre el protozoo y el microambiente uterino, en el que intervienen diversos factores como la respuesta inmune del hospedador.

- La infección con *T. foetus* en ratonas BALB/c preñadas genera cambios en los carbohidratos del epitelio uterino que podrían ser determinantes en 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 destacó además, el importante rol de los mastocitos, neutrófilos, eosinófilos y macrófagos como colaborador 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.

## **CONSIDERACIONES FINALES**

Los mecanismos hormonales e inmunológicos que intervienen en la reproducción y la preñez, así como las características morfofuncionales de la placenta, presentan variaciones muy importantes entre los distintos grupos de mamíferos. Sin embargo, muchas enfermedades de las especies de producción pueden reproducirse experimentalmente en los animales de laboratorio. En el desarrollo del presente proyecto hemos alcanzado resultados relacionados con los mecanismos que intervienen en la infección y la respuesta frente al EHV-1 y *T foetus* que permitirán realizar estudios dirigidos más específicos utilizando los hospedadores naturales. Además hemos generado conocimientos que pueden utilizarse en otros modelos de enfermedades reproductivas del ser humano y los animales.

## **AGRADECIMIENTOS**

La financiación de este trabajo incluyó el Proyecto de Investigación Plurianual (2009-2011) de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria (ANAV): "Modelos experimentales para el estudio de la patogenia de la muerte embrionaria en tritricomonosis bovina y herpesvirosis equina". También se utilizaron parcialmente fondos provenientes de CONICET, CIC (Bs.As.), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2011-1123), Secretarías de Ciencia y Técnica de la UNLP y UNICEN.

Este trabajo contiene parte de los resultados de las tesis doctorales de Mariana Woudwyk, Giselle Martin Ocampos y Nadia Fuentealba y de la tesis de Licenciatura de Matías Eöry. Un resumen de este trabajo fue presentado en la Sesión Pública de la Academia en Buenos Aires el 13 de junio de 2013.

Se agradece la participación técnica de Rubén Mario, Rosa Villegas, Guadalupe Guidi, y Claudio Leguizamón.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Adl SM, Simpson AGB, Farmer MA, Andersen B RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov JS, Kugrens P, Krug J, Lane M CE, Lewis N LA, Lodge J, Lynn DH, Mann DG, Mccourt RM, Mendoza L, Moestrup Ø, Mozley-Standridge SE, Nerad TA, Shearer CI A, Smirnov AV, Spiegel FW & Taylor MF Jr 2005. The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52: 399–451

Alber DG, Greensill J, Killington RA & Stokes A. 1995. Role of T-cells, virus neutralising antibodies, and complement-mediated antibody lysis in the immune response against equine herpesvirus type-1 (EHV-1) infection of C3H (H-2k) and BALB/c (H-2d) mice. *Research in Veterinary Sciences*, 59: 205-213

Allen GP & Bryans JT. 1986. Molecular epizootiology, pathogenesis, and prophylaxis of equine herpesvirus 1 infections. *Progress in Veterinary Microbiology and Immunology*, 2: 78-144

Allen MP & Nilsen-Hamilton M. 1998. Granzymes D, E, F, and G Are Regulated Through Pregnancy and by IL-2 and IL-15 in Granulated Metrial Gland Cells. *Journal of Immunology*, 161: 2772-2779

Allen GP, Kydd JH, Slater JD & Smith KC. 1998. Advances in understanding of the pathogenesis, epidemiology and immunological control of equine herpesvirus abortion. P 129-146 En: Wernery U, Wade JF, Mumford JA & Kaaden OR (eds). *Proceedings of the Eighth International Conference Dubai*

Allen GP. 2002. Respiratory Infections by Equine Herpesvirus Types 1 and 4. En: Lekeux P. *Equine Respiratory Diseases*. Publisher International Veterinary Information Service ([http://www.ivis.org/special\\_books/Lekeux/allen/IVIS.pdf](http://www.ivis.org/special_books/Lekeux/allen/IVIS.pdf)), Ithaca, New York, USA

Allen GP, Kydd JH, Slater JD & Smith K-C. 2004. Equid herpesvirus-1 (EHV-1) and- 4 (EHV-4) infections. P 829-859 En: Coster

JAW& Tustin RC. *Infectious diseases of livestock*. Oxford University PressCapeTown, 76

Aluvihare VR, Kallikourdis M & Betz AG. 2004. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nature Immunology*, 5: 266–271

Anderson M, Bon Durand R, Corbeil R & Corbeil L. 1996. Immune and inflammatory responses to reproductive tract infection with *Tritrichomonas foetus* in immunised and control heifers. *Journal of Parasitology*, 82: 594-600

Aujla SJ, Dubin PJ & Kolls JK. 2007. Th17 cells and mucosal host defense. *Seminars in Immunology*, 19: 377–382

Awan AR, Chong YC & Field HJ. 1990. The pathogenesis of equine herpesvirus type 1 in the mouse: a new model for studying host responses to the infection. *Journal of General Virology*, 71: 1131-1140

Awan AR, Gibson JS & Field HJ.1991. A murine model for studying EHV-1-induced abortion. *Research in Veterinary Science*, 51: 94-99

Awan AR & Field HJ. 1993. Effects of phosphonylmethoxyalkyl derivatives studied with a murine model for abortion induced by equine herpesvirus 1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37: 2478-2482

Awan AR, Baxi M & Field HJ. 1995. EHV-1-induced abortion in mice and its relationship to stage of gestation. *Research in Veterinary Science*, 59: 139-145.

Babál P & Russell L. 1999. Sialic acid-specific lectin-mediated adhesion of *Tritrichomonas foetus* and *Tritrichomonas mobilensis*. *Journal of Parasitology*, 85: 33-40

Barbeito CG, Woudwyk M, Cacciato C, Soto P, Portiansky EL, Catena M, Echavarría H, Gimeno EJ & Monteavaro CE. 2008. *Tritrichomonas foetus*: Experimental Infection in Pregnant Balb/c Mice. *Experimental Parasitology*, 120: 156–160

Bartels T, Steinbach F, Hahn G, Ludwig H & Borchers K. 1998. In situ study on the pathogenesis and immune reaction of equine

herpesvirus type 1 (EHV-1) infections in mice. *Immunology*, 93: 329-334

Baxi MK, Efstathiou S, Lawrence G, Whalley JM, Slater JD & Field HJ. 1995. The detection of latency associated transcript of equine herpesvirus 1 in ganglionic neurons. *Journal of General Virology*, 76: 3113-3118

Baxi MK, Borchers K, Bartels T, Schellenbach A, Baxi S & Field HJ. 1996. Molecular studies of the acute infection, latency and reactivation of equine herpesvirus-1 (EHV-1) in the mouse model. *Virus Research*, 40: 33-45

Benchimol M, Kachar B & de Souza W. 1993. The structural organization of the pathogenic protozoan *Tritrichomonas foetus* as seen in replicas of quick frozen, freeze-fractured and deep etched cells. *Biology of the Cell*, 77: 289-295

Benchimol M, Johnson PJ & de Souza W. 1996. Morphogenesis of the hydrogenosome: An ultrastructural study. *Biology of the Cell*, 87: 197-205

Benchimol M & Engelke F. 2003. Hydrogenosome behavior during the cell cycle in *Tritrichomonas foetus*. *Biology of the Cell*, 95: 283-293

Bianco J, Stephenson K, Yamada AT & Croy BA. 2008. Time-Course Analyses Addressing the Acquisition of DBA Lectin Reactivity in Mouse Lymphoid Organs and Uterus During the First Week of Pregnancy. *Placenta*, 29: 1009-1015

Bielanski A, Ghazi DF & Phipps-Toodd B. 2004. Observations on the fertilization and development of preimplantation bovine embryos in vitro in the presence of *Tritrichomonas foetus*. *The-riogenology*, 61: 821-829

Bijovsky AT, Zorn TMT & Abramsohn PA. 1992. Remodeling of the Mouse Endometrial Stroma during the Preimplantation Period. *Acta Anatomica*, 144: 231-234

Bon Durant RH. 1985. Diagnosis, treatment and control of bovine trichomoniasis. *Comparative Continuing Education*, 10: 179-188

Bon Durant RH. 1997. Pathogenesis, Diagnosis, and management of trichomoniasis in cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 13: 345-361

Bonilha VL, Ciavaglia Mdo C, de Souza W & Costa e Silva Filho F. 1995. The involvement of terminal carbohydrates of the mammalian cell surface in the cytoadhesion of Trichomonads. *Parasitological Research*, 81: 121-126

Bronson FH, Dagg CP & Snell GD. 1964. Reproduction. Cap 11: 187-204 En: Snell GD (ed). *Biology of the Laboratory mouse*. Blakiston, Philadelphia

Burgess DE & Knoblock KF. 1989. Identification of *Tritrichomonas foetus* in sections of bovine placental tissue with monoclonal antibodies. *Journal of Parasitology*, 75: 977-980

Burgess DE, Knoblock KF, Daugherty T & Robertson NP. 1990. Cytotoxic and Hemolytic Effect of *Tritrichomonas foetus* on Mammalian Cells. *Infection and Immunity*, 58: 3627-3632

Campero CM, Ladds P, Hoffmann D & De'Ath G. 1989a. Immunoglobulin containing cells in normal and inflamed accessory sex glands of bulls. *Australian Veterinary Journal*, 66: 137-141

Campero CM, Ladds PW, Hirst GR & Vaughan JA. 1989b. Detection of *Tritrichomonas foetus* antigens in formalin-fixed, paraffin-embedded sections by the peroxidase-antiperoxidase technique. *Australian Veterinary Journal*, 66: 264-266

Cavalier-Smith T. 2002. Protist phylogeny and the high-level classification of Protozoa. *European Journal of Protistology*, 39: 338-348

Chantakru S, Miller C, Roach LE, Kuziel WA, Maeda N, Wang WC, Evans SS & Croy BA. 2002. Contributions from self-renewal and trafficking to the uterine NK cell population of early pregnancy. *Journal of Immunology*, 168: 22-28

Chesters PM, Allsop R, Purewal A & Edington N. 1997. Detection of latency-associated transcripts of equid herpesvirus 1 in equine leukocytes but not in trigeminal ganglia. *Journal of Virology*, 71: 3437-3443



Chaouat G, Zourbas S, Ostojic S, Lappree-Delage G, Dubanchet S, Ledee N & Martal J. 2002. A brief review of recent data on some cytokine expressions at the materno-foetal interface which might challenge the classical Th1/Th2 dichotomy. *Journal of Reproductive Immunology*, 53: 241–256

Cobo ER, Campero CM, Gimeno EJ & Barbeito CG. 2004. Lectin binding patterns and Immunohistochemical detection in the genitalia of *Tritrichomonas foetus*-infected heifers. *Journal of Comparative Pathology*, 131: 127-134

Cobo E, Eckmann L & Corbeil L. 2011. Murine Models of Vaginal Trichomonad Infections. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85: 667–673

Colle CF, Tarbet EB, Grafton WD, Jennings SR & O'Callaghan DJ. 1996. Equine herpesvirus-1 strain KyA, a candidate vaccine strain, reduces viral titers in mice challenged with a pathogenic strain. *RaL. Virus Research*, 43: 111-124

Corbeil LB, Hodgson J, Jones D, Corbeil R, Widders P & Stephens L. 1989. Adherence of *Tritrichomonas foetus* to Bovine Vaginal Epithelial Cells. *Infection and Immunity*, 57: 2158-2167

Corbeil LB, Campero CM, Rhyan JC, Anderson ML, Gershwin LJ, Agnew DW, Munson L & Bon Durant RH. 2005. Uterine mast cells and immunoglobulin-E antibody responses during clearance of *Tritrichomonas foetus*. *Veterinary Pathology*, 42: 282-290

Crivellato E, Finato N, Ribatti D & Beltrami C. 2005. Do mast cells affect villous architecture? Facts and conjectures. *Histology and Histopathology*, 20: 1285-1293

Croy BA, Guimond MJ, Luross J, Hahnel A, Wang B & Heuvel MVD. 1997. Uterine natural killer cells do not require interleukin-2 for their differentiation or maturation. *American Journal Reproductive Immunology*, 37: 463–470

Croy BA. 1999. Hasn't the time come to replace the term metrial gland? *Journal of Reproductive Immunology*, 42: 127–129

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. 2003. Uterine natural killer cells: insights into their cellular and molecular biology from mouse modelling. *Reproduction*, 126: 149-160

Croy BA, van den Heuvel M, Borzychowski AM & Tayade C. 2006. Uterine natural killer cells: a specialized differentiation regulated by ovarian hormones. *Immunology Reviews*, 214: 161-185

Croy BA, Wessels J, Linton N& Tayade C. 2009. Comparison of immune cell recruitment and function in endometrium during development of epitheliochorial (pig) and hemochorial (mouse and human) placentas. *Placenta*, 23: 23-31

Csellner H, Walker C& Whalley J. 1998. An equine herpesvirus 1 mutant with a lacZ insertion between open reading frames 62 and 63 is replication competent and causes disease in the murine respiratory model. *Archives of Virology*, 143: 2215-2231

Cuba Caparó A. 1982. Modelos experimentales. Importancia del estudio de las enfermedades de animales de laboratorio. P 173-175 En: *Manual de Patología de Animales de Laboratorio*. OPS, Publicación científica 423, Washington, DC

Davies CJ. 2007. Why is the fetal allograft not rejected? *Journal of Animal Science*, 85: E32-E35

Del Piero F & Wilkin S. 2001. Pulmonary vasculotropic EHV-1 infection in equids. *Veterinary Pathology*, 38: 474-475

Di Yacobo L, Roig de Vargas - Linares CE & Gallardo A. 1977. Gamma globulin in the mice vaginal fluids: cyclic and experimental variations. *Experientia (Basel)*, 33: 392

Doll ER, Bryans JT & McCollum WH. 1959. A procedure for evaluating the antigenicity of killed virus vaccines for equine rhinopneumonitis. *Cornell Veterinarian*, 49: 212-220

Doll ER. 1961. Immunization against viral rhinopneumonitis of horses with live virus propagated in hamsters. *Journal of Biochemistry*, 139: 1324-1330

Doll ER & Bryans JT. 1963. Immunization of young horses against viral rhinopneumonitis. *Cornell Veterinarian*, 53: 24-41

Dombrowicz D & Capron M. 2001. Eosinophils, allergy and parasites. *Current Opinions in Immunology*, 13: 716–720

Edington N, Bridges CG & Patel JR. 1986. Endothelial cell infection and thrombosis in paralysis caused by equid herpesvirus-1: equine stroke. *Archives of Virology*, 90: 111-124

Eöry ML, Zanuzzi CN, Fuentealba NA, Sguazza GH, Gimeno EJ, Galosi CM & Barbeito CG. 2013. Effects of different anesthetics in the murine model of *Equine herpesvirus 1* infection. *Veterinary Pathology*, 50: 849-856

Felleisen RS. 1999. Host-parasite interaction in bovine infection with *Tritrichomonas foetus*. *Microbes and Infection*, 1: 807-816

Field HJ, Awan AR & de la Fuente R. 1992. Reinfection and reactivation of equine herpesvirus-1 in the mouse. *Archives of Virology*, 123: 409-419

Fidel P, Wolf N & Kukuruga M. 1996. T Lymphocytes in the Murine Vaginal Mucosa Are Phenotypically Distinct from Those in the Periphery. *Infection and Immunity*, 64: 3793-3799

Flower PJ, Ladds PW, Thomas AD & Watson DL. 1982. An Immunopathologic Study of Bovine Prepuce. *Vet. Pathol.*, 20: 189 - 202

Fox H. 1993. Immunocompetent cells in the cervix and vagina. P 177-186 En: Griffin PD & Johnson PM (eds), *Local immunity in reproduction tract tissues*. Oxford University Press

Fuentealba NA 2012. *Herpesvirus equino 1: estudio de la expresión de proteínas antigénicas y evaluación de la respuesta inmune inducida*. Tesis de Doctorado en Ciencias Veterinarias. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

Galosi CM, Nosetto EO, Gimeno EJ, Gomez Dunn C, Etcheverrigaray ME & Ando Y. 1989. Equine Herpesvirus-1 (EHV-1): Characterisation of a viral strain isolated from equine plasma in Argentina. *Review Scientific and Technique-Office International of Epizooties*, 8: 117-122

Galosi CM, Norimine J, Echeverría MG, Oliva GA, Nosetto EO & Etcheverrigaray ME. 1993. Restriction Endonuclease Analysis of Equine Herpesviruses Isolated in Argentina. *Proceedings Second*

*Meeting on The Cooperation Research Project in the Area of Veterinary Science between UNLP and JICA (Japan):23-27*

Galosi CM, Norimine J, Echeverría MG, Oliva GA, Nosetto EO, Etcheverrigaray ME, Tohya Y & Mikami T. 1998a. Diversity of genomic electropherotypes of naturally occurring Equine herpesvirus 1 isolates in Argentina. *Brazilian Journal of Medicine and Biological Research* 31, 771-774.

Galosi CM, Echeverría MG, Vila Roza MV, Cid de la Paz V, Oliva GA & Etcheverrigaray ME. 1998b. Virus herpes equino tipo 1 (EHV-1): patrones de restricción de ADN perfiles proteicos y estudio de patogenicidad en ratones. *Analecta Veterinaria*, 18: 35-40

Galosi CM, Barbeito CG, Vila Roza MV, Cid de la Paz V, Ayala MA, Corva SG, Etcheverrigaray ME & Gimeno EJ. 2004. Argentine strain of equine herpesvirus 1 isolated from an aborted foetus shows low virulence in mouse respiratory and abortion models. *Veterinary Microbiology*, 103: 1-12

Galosi CM, Barbeito CG, Martín Ocampos GP, Martínez JP, Ayala MA, Corva SG, Fuentealba NA & Gimeno EJ. 2006. An Argentine equine herpesvirus strain with special restriction patterns protect mice challenged with a pathogenic strain. *Journal of Veterinary Medicine B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 53: 412-417

Ge YY, Zhang L, Zhang G, Wu JP, Tan MJ, Hu W, Liang YJ & Wang Y. 2008. In pregnant mice, the infection of *Toxoplasma gondii* causes the decrease of CD4+CD25+-regulatory T cells. *Parasite Immunology*, 30: 471-481

Gibbons AFE & Chang MC. 1972. Number of mast cells in the rat uterus with special reference to its relation to hormonal treatment and decidual response. *Biology of Reproduction*, 6: 193-203

Gibson JS, Slater JD, Awan AR & Field HJ. 1992. Pathogenesis of equine herpesvirus-1 in specific pathogen-free foals: primary and secondary infections and reactivation. *Archives of Virology*, 123: 351-366

Goehring LS, Wagner B, Bigbie R, Hussey SB, Rao S, Morley PS & Lunn DP. 2010. Control of EHV-1 viremia and nasal shedding by

commercial vaccines. *Vaccine*, 28: 5203-5211

Granger BL, Warwood SJ, Hayai N, Hayashi H & Owhashi M. 1997. Identification of a neutrophil chemotactic factor *Tritrichomonas foetus* as superoxide dismutase. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 89: 85-95

Granger BL, Warwood SJ, Benchimol M & De Souza W. 2000. Transient invagination of flagella by *Tritrichomonas foetus*. *Parasitology Research*, 86: 699-709

Gu Y, Jow GM, Moulton BC, Lee C, Sensibar JA, Park-Sarge OK, Chen TJ & Giborit G. 1994. Apoptosis in Decidual Tissue Regression and Reorganization. *Endocrinology*, 135: 1272-1279

Heldens JG, Kersten AJ, Weststrate MW & Van Den Hoven R. 2001. Duration of immunity induced by an adjuvanted and inactivated equine influenza, tetanus and equine herpes 1 and 4 combination vaccine. *Veterinary Quarterly*, 23: 210-217

Honigberg BM, Volkmann D, Entzeroth R & Scholtyseck E. 1984. A freeze-fracture Electron Microscope Study of *Trichomonas vaginalis* Donn  and *Tritrichomonas foetus* (Riedm ller). *Journal of Protozoology*, 31: 116-131

Hook RR, StClaire M, Riley L, Franklin CL & Besh-Willford CL. 1995. *Tritrichomonas foetus*: Comparison of Isolate Virulence in an Estrogenized Mouse Model. *Experimental Parasitology*, 81: 202-207

Hook Jr RR, St Claire MC, Riley LK, Franklin CL & Bessch-Williford CL. 1997. Mouse strain and age affect susceptibility to experimentally induced genital trichomoniasis. *Laboratory Animal Science*, 47: 324-326

Hunt JS, Petroff M & Burnett T. 2000. Uterine leucocytes: key players in pregnancy. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 11: 127-137

Inazu M, Tsuha O, Kirisawa Y, Kawakami Y & Iwai H. 1993. Equid herpesvirus 1 infection in mice. *Journal of Veterinary Medical Science*, 55: 119-121

Ito Y, Furuya M, Doi M, Hayashi H, Yagyu M, Oka Y & Osaki H. 1975. Protective role of immune lymphoid cells and phagocytes in experimental trichomoniasis in mice. *Japanese Journal of Parasitology*, 24: 333-339

Jackson TA, Osburn BI & Kendrick JW. 1977. Equine herpesvirus 1 infection in horses: studies on the experimentally induced neurologic disease. *American Journal of Veterinary Research*, 38: 709-719

Janeway Jr CA, Travers P, Walport M & Shlomchik MJ. 2003. *Inmunobiología: el sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad*. 2da. Edición. Ed Masson, Barcelona, España

Kimber SJ. 2005. Leukaemia inhibitory factor in implantation and uterine biology. *Reproduction*, 130: 131-145

Kitamura Y. 1989. Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations. *Annual Reviews of Immunology*, 7: 59-76

Klein S. 2000. El uso de animales en la investigación biomédica. *Ciencia Hoy*, 10, 62-66

Kleinaa P, Bettim-Bandinellia J, Bonattoa SL, Benchimol M & Reis Bogoa M. 2004. Molecular phylogeny of Trichomonadidae family inferred from ITS-1, 5.8S rRNA and ITS-2 sequences. *International Journal for Parasitology*, 34: 963-970

Korn T, Bettelli E, Oukka M & Kuchroo VK. 2009 IL-17 and Th17 Cells. *Annual Reviews of Immunology*, 27: 485-517

Kukreja A, Love DN, Whalley JM & Field HJ. 1998. Study of the protective immunity of co-expressed glycoprotein H and L of equine herpesvirus-1 in a murine intranasal infection model. *Veterinary Microbiology*, 60: 1-11

Kusakabe K, Okada T, Sasaki F & Kiso Y. 1999. Cell death of uterine natural killer cells in murine placenta during placentation and preterm periods. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 61: 1093-1100

Kydd JH, Smith KC, Hannant D, Lvesay GJ & Mumford JA. 1994. Distribution of equid herpesvirus 1 in the respiratory tract

of ponies: implications in vaccination strategies. *Equine Veterinary Journal*, 26: 466–469

McCartan CG, Russel MM, Wood JL & Mumford JA. 1995. Clinical, serological and virological characteristics of an outbreak of paresis and neonatal foal disease due to equine herpesvirus-1 on astud farm. *The Veterinary Record*, 13: 7–12

Maestrone G & Semar R. 1967. Experimental intravaginal infection with *Tritrichomonas foetus* in guinea pigs. *Chemotherapy*, 12: 137–145

Mardones FO, Perez AM, Martínez A & Carpenter TE. 2008. Risk factors associated with *Tritrichomonas foetus* infection in beef herds in the Province of Buenos Aires, Argentina. *Veterinary Parasitology*, 153: 231–237

Margni RA & Zenclussen AC. 2001. During pregnancy, in the context of a Th2-type cytokine profile, serum IL-6 levels might condition the quality of the synthesized antibodies. *American Journal of Reproductive Immunology*, 46: 181–189

Márquez RJ. 1997. *Determinación de la cultura sobre el uso de los animales de laboratorio existentes en los investigadores de la Universidad de los Andes*. Tesis doctoral. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela

Martín Ocampos GP. 2010. *Estudios moleculares-evolutivos y de virulencia en herpesvirus potencialmente abortigénicos para el equino*. Tesis de Doctorado en Ciencias Naturales. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata

Mellor AL & Munn DH. 2001. Extinguishing maternal immune responses during pregnancy: implications for immunosuppression. *Seminars in Immunology*, 13: 213–218

Moffett A & Loke C. 2006. Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nature Reviews of Immunology*, 6: 584–594

Monteavaro CE, Soto P, Echevarría HM, Catena MC, Portiansky EL & Gimeno EJ. 2000. Immunohistochemical detection of *Tritrichomonas foetus* in experimentally infected mice. *Pesquisa Veterinaria Brasileria*, 20: 43–46

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

Monteavaro CE, Aguirre JI, Soto P, Echevarría HM, Catena MC, Portiansky EL & Gimeno EJ. 2007. Interaction of *Tritrichomonas foetus* with the reproductive tract of experimentally infected female BALB/c mice: ultrastructural evaluation. *Veterinary Journal*, 173: 204-208

Monteavaro CE, Soto P, Gimeno EJ, Echeverria HM, Catena M, Portiansky EL & Barbeito CG. 2008. Histological and lectin binding changes in the genital tract of mice infected with *Tritrichomonas foetus* (*T. foetus*). *Journal of Comparative Pathology*, 138: 40-45

Mumford JA & Rossdale PD. 1980. Virus and its relationship to the "poor performance" syndrome. *Equine Veterinary Journal*, 12: 3-9

Mumford JA, Rossdale PD, Jessett DM, Gann SJ, Ousey J & Cook RF. 1985. Serological and virological investigations of an equid herpesvirus 1 (EHV-1) abortion storm on a stud farm. *Journal of Reproductive Fertility* (Supplement), 35: 509-518

Mutwiri GK & Corbeil LB. 1998. Genital and systemic immune responses in a murine model of *Tritrichomonas foetus* infection. *Journal of Parasitology*, 84: 321-327

Nowotny N, Burtscher H & Burki F. 1987. Neuropathogenicity for suckling mice of equine herpesvirus 1 from the Lipizzan outbreak 1983 and of selected other EHV 1 strains. *Zentralblatt für Veterinärmedizin*, B 34: 441-448

Osterrieder N, Wagner R, Pfeffer M & Kaaden OR 1994. Expression of equine herpesvirus type 1 glycoprotein gp14 in *Escherichia coli* and in insect cells: a comparative study on protein processing and humoral immune responses. *Journal of General Virology*, 75, 2041-2046

Ostojic S, Dubanchet S, Chaouat G, Abdelkarim M, Truyens C & Capron F. 2003. Demonstration of the presence of IL-16, IL-



17 and IL-18 at the murine fetomaternal interface during murine pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology* 49: 101–112

Packiarajah P, Walker C, Gilkerson JR, Whalley JM & Love DN. 1998. Immune responses and protective efficacy of recombinant baculovirus expressed glycoproteins of equine herpesvirus 1 (EHV-1) gB gC and gD alone or in combinations in BALB/c mice. *Veterinary Microbiology*, 61, 261-278

Paffaro VA, Bizinotto MC, Joazeiro PP & Yamada AT. 2003. Subset classification of mouse uterine natural killer cells by DBA lectin reactivity. *Placenta*, 24: 479-488

Parr EL, Tung HN & Parr MB. 1987. Apoptosis as the mode of uterine epithelial cell death during embryo implantation in mice and rats. *Biology of Reproduction*, 36: 211-225

Parr MB & Parr EL. 1991. Langerhans Cells and Lymphocyte Subset in the Murine Vagina and Cervix. *Biology of Reproduction*, 45: 491-498

Parsonson IM, Clark BL & Dufty J. 1974. The pathogenesis of *Tritrichomonas foetus* infection in the bull. *Australian Veterinary Journal*, 50: 421-423

Parsonson IM, Clark BL & Dufty J. 1976. Early pathogenesis and pathology of *Tritrichomonas foetus* infection in virgin heifers. *Journal of Comparative Pathology* 86: 59-66

Patel JR & Edington N. 1983. The pathogenicity in mice of respiratory, abortion and paresis isolates of equine herpesvirus-1. *Veterinary Microbiology*, 8: 301-305

Patel JR & Heldens J. 2005. Equine herpesvirus 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4): epidemiology, disease and immunoprophylaxis: a brief review. *Veterinary Journal*, 170: 14-23

Pereira-Neves A, Campero CM, Martinez A & Benchimol M. 2011. Identification of *Tritrichomonas foetus* pseudocysts in fresh preputial secretion samples from bulls. *Veterinary Parasitology*, 175: 1-5

Rachman F, Casimiri V, Psychoyos A & Bernard O. 1983. Immunoglobulins in the mouse uterus during the oestrous cycle. *Journal of Reproductive Fertility*, 69: 17-21

Rescigno M. 2002. Dendritic cells and the complexity of microbial infection. *Trends in Microbiology*, 10: 425-431

Rhyan J, Wilson K, Burgess D, Stackhouse L & Quinn W. 1995. Immunohistochemical detection of *Tritrichomonas foetus* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of bovine placenta and fetal lung. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 7: 98-101

Roberts C, Walker W & Alexander J. 2001. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clinical Microbiology Reviews*, 14: 476-478

Rossant J & Cross J. 2001. Placental Development: Lessons from Mouse Mutants. *Nature Reviews of Genetic*, 2: 538-546

Rugh R. 1968. *The mouse its reproduction and development*. Burgess Publishing Company

Ruitenbergh KM, Walker C, Wellington JE, Love DN & Whalley JM. 1999. ADN-mediated immunization with glycoprotein D of equine herpesvirus 1 (EHV-1) in a murine model of EHV-1 respiratory infection. *Vaccine*, 17: 237-244

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M & Toda M. 1995. 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 auto-immune diseases. *Journal of Immunology*, 155:1151-1164

Sakaguchi S. 2005. Naturally arising Foxp-3 expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature Immunology*, 6: 345-352

Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, Shimizu J, Takahashi T & Nomura T. 2006. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunology Reviews*, 212: 8-27

Santner-Nanan B, Peek MJ, Khanam R, Richarts L, Zhu E, Fa-

zekas de St Groth B & Nanan R. 2009. Systemic increase in the ratio between Foxp3+ and IL-17-producing CD4+ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia. *Journal of Immunology*, 183: 7023-7030

Schumacher A, Wafula PO, Bertoja AZ, Sollwedel A, Thuere C, Wollenberg I, Yagita H, Volk HD & Zenclussen AC. 2007. Mechanisms of action of regulatory T cells specific for paternal antigens during pregnancy. *Obstetric and Gynecology*, 110: 1137-1145

Simpson AGB. 2003. Cytoskeletal organisation, phylogenetic affinities and systematics in the contentious taxon Excavata (Eukaryota). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 1759-1777

Singh BN, Lucas JJ, Beach DH, Shin ST & Gilbert RO. 1999. Adhesion of *Tritrichomonas foetus* to bovine vaginal epithelial cells. *Infection and Immunity*, 67: 3847-3854

Singh BN, Lucas JJ, Hayes GR, Kumar I, Beach DH, Frajblat M, Gilbert RO, Sommer U & Costello CE. 2004. *Tritrichomonas foetus* induces apoptotic cell death in bovine vaginal epithelial cells. *Infection and Immunology*, 72: 4151-4158

Skirrow SZ & Bon Durand RG. 1988. Bovine Trichomoniasis. *Veterinary Bulletin*, 58: 591-603

Slater JD, Gibson JS, Barnett KC & Field HJ. 1992. Chorioretinopathy associated with neuropathology following infection with equine herpesvirus-1. *Veterinary Record* 131: 237-239

Slater JD, Borchers K, Thackray AM & Field HJ. 1994. The trigeminal ganglion is a location for equine herpesvirus 1 latency and reactivation in the horse. *Journal of General Virology*, 75: 2007-2016

Smith KC, Whitwell KE, Binns MM, Dolby CA, Hannant D & Mumford JA. 1992. Abortion of virologically negative fetuses following experimental challenge of pregnant mares with equid herpesvirus 1. *Equine Veterinary Journal*, 24: 256-259

Smith KC, Mumford JA & Lakhani K. 1996. A comparison of equid herpesvirus 1 (EHV-1) vascular lesions in the early versus

late pregnant equine uterus. *Journal of Comparative Pathology*, 114: 231-247

Soto P, Echevarría H, Monteavaro CE & Catena M. 2005. Experimentally Induced Intravaginal *Tritrichomonas foetus* Infection in a Mouse Model. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 25: 225-230

St Claire MC, Riley LK, Franklin CL, Besch-Williford CL & Hook RR. 1994. Experimentally induced intravaginal *Tritrichomonas foetus* infection in the estrogenized mouse. *Laboratory Animal Science* 44: 5430-5435

Stewart IJ & Peel S.1980. Granulated metrial glands cells at implantation sites of the pregnant mouse uterus. *Anatomy and Embryology*, 160: 227-238

Stewart IJ. 1991. Granulated metrial gland cells: pregnancy specific leukocytes? *Journal of Leukocyte Biology*, 50: 198-207

Stewart J, Bebington CR & Mukhtar DD. 2000. Lectin binding characteristics of mouse placental cells. *Journal of Anatomy*, 196: 371-378

Stokes A, Allen GP, Pullen LA & Murray PK. 1989. A hamster model of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) infection; passive protection by monoclonal antibodies to EHV-1 glycoproteins 13, 14 and 17/18. *Journal of General Virology*, 70: 1173-1183

Stokes A, Alber DG, Cameron RS, Marshall RN, Allen GP & Killington RA. 1996. The production of a truncated form of baculovirus expressed EHV-1 glycoprotein C and its role in protection of C3H (H-2Kk) mice against virus challenge. *Virus Research*, 44: 97-109

Svanborg C, Godaly G & Hedlund M. 1999. Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defense. *Current Opinions in Microbiology* 2: 99-105

Talbot JA, Nielsen K & Corbeil LB. 1991. Cleavage of reproductive secretions by extracellular proteinases of *Tritrichomonas foetus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 37: 384-390

Tachibana M, Watanabe K, Yamasaki Y, Suzuki H & Watarai M. 2008. Expression of heme oxygenase-1 is associated with abor-

tion caused by *Brucella abortus* infection in pregnant mice. *Microbial Pathogenesis*, 45: 105-109

Taylor MW & Feng GS. 1991. Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB Journal*, 5: 2516-2522

Tearle JP, Smith KC, Boyle MS, Bin NS, Livesay GJ & Mumford JA. 1996. Replication of equid herpesvirus 1 (EHV-1) in the testes and epididymes of ponies and venereal shedding of infectious virus. *Journal of Comparative Pathology*, 115: 385-397

Tewari D, Whalley JM, Love DN & Field HJ. 1994. Characterization of immune responses to baculovirus-expressed equine herpesvirus type 1 glycoproteins D and H in a murine model. *Journal of General Virology* 75: 1735-1741

Tewari D, Nair SV, De Ungria MC, Lawrence GL, Hayden M, Love DN, Field HJ & Whalley JM. 1995. Immunization with glycoprotein C of equine herpesvirus-1 is associated with accelerated virus clearance in a murine model. *Archives of Virology*, 140: 789-797

Thomford J, Talbot J, Ikeda J & Corbeil L. 1996. Characterization of extracellular Proteinases of *Tritrichomonas foetus*. *Journal of Parasitology*, 82: 112-117

Vachharajani TJ, Work J, Issekutz AC & Granger DN. 2000. Heme oxygenase modulates selectin expression in different regional vascular beds. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 278: 1613-1617

Van Woensel PAM, Goovaerts D, Markx D & Visser N. 1995. A mouse model for testing the pathogenicity of equine herpes virus- 1 strains. *Journal of Virological Methods* 54: 39-49

Van Andel RA, Franklin CL, St Claire MC, Riley LK, Besch-Williford CL & Hook RR Jr. 1996. Lesions of experimental genital *Tritrichomonas foetus* infections in estrogenized BALB/c mice. *Veterinary Pathology*, 33: 407-411

Walker C, Packiarajah P, Gilkerson JR, Love DN & Whalley JM. 1998a. Primary and secondary infection of mice with equine herpesvirus 1, strain HVS25A. *Virus Research*, 57: 151-162

Walker C, Perotti VM, Love DN & Whalley IM. 1998b. Infection with equine herpesvirus 1 (EHV-1) strain HVS25A in pregnant mice. *Journal of Comparative Pathology*, 120: 15-27

Walker C, Love DN & Whalley JM. 1999. Comparison of the pathogenesis of acute equine herpesvirus 1 (EHV-1) infection in the horse and the mouse model: a review. *Veterinary Microbiology*, 68: 3-13

Wang WJ, Hao CF, Lin Y, Yin GJ, Bao SH, Qiu LH & Lin QD. 2010. Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *Journal of Reproductive Immunology*, 84: 164-170

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

Welch HM, Bridges CG, Lyon AM, Griffiths L & Edington N. 1992. Latent herpesviruses 1 and 4: detection and distinction using the polymerase chain reaction and co-cultivation from lymphoid tissues. *Journal of General Virology*, 73, 261-268

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

Whitwell KE & Blunden AS. 1992. Pathological findings in horses dying during an outbreak of the paralytic form of Equid herpesvirus type 1 (EHV1) infection. *Equine Veterinary Journal*, 24: 13-19

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

Wilks CR & Coggins L. 1977. Protective, immunity in equine herpesvirus type-1 infection of hamsters. *Cornell Veterinarian*, 67: 385-403

Woudwyk MA, Monteavaro CE, Jensen F, Soto P, Barbeito CG & Zenclussen AC. 2012. Study of the Uterine Local Immune Response in a Murine Model of Embryonic Death Due to *Tritrichomonas foetus*. *American Journal of Reproductive Immunology*, 68: 128–137

Woudwyk MA, Gimeno EJ, Soto P, Barbeito CG & Monteavaro CE. 2013. Lectin Binding Pattern in the Uterus of Pregnant Mice Infected with *Tritrichomonas foetus*. *Journal of Comparative Pathology*, 149: 341-345

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

Zanuzzi CN, Scrochi MR, Fuentealba N, Nishida F, Portiansky EL, Muglia C, Gimeno EJ, Barbeito CG & Galosi CM. 2014. Effects of *Equid herpesvirus 1* (EHV-1) AR8 and HH1 strains on BALB-c mice. *Archives of Virology*, 159: 141-145

Zenclussen AC, Lim E, Knoeller S, Knackstedt M, Hertwig K, Hagen E, Klapp BF & Arck PC. 2003a. Heme oxygenases in pregnancy. II: HO-2 is downregulated in human pathologic pregnancies. *American Journal of Reproductive Immunology*, 50: 66–76

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

Zenclussen AC, Gerlof K, Zenclussen ML, Sollwedel A, Zambon-Bertoja A, Ritter T, Kotsch K, Leber J & Volk HD. 2005a. 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. *American Journal of Pathology*, 163: 811-822

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

Zenclussen AC. 2005. CD4+CD25+ T regulatory cells in murine pregnancy. *Journal of Reproductive Immunology*, 65: 101-110

Zenclussen AC. 2006. Regulatory T cells in pregnancy. *Springer Seminars in Immunopathology*, 28: 31-39

Zenclussen AC, Gerlof K, Zenclussen ML, Ritschel S, Zambon Bertoja A, Fest S, Hontsu S, Ueha S, Matsushima K, Leber J & Volk HD. 2006a. Regulatory T cells induce a privileged tolerant microenvironment at the fetal-maternal interface. *European Journal of Immunology*, 36, 82-94

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

Zenclussen AC, Schumacher A, Zenclussen ML, Wafula P & Volk HD. 2007. Immunology of pregnancy: cellular mechanisms allowing fetal survival within the maternal uterus. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 9: 1-14

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

Zheng LM, Ojcius DM & Young JDE. 1991a. Role of granulated metrial gland cells in the immunology of pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*, 25: 72-76

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