



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD Y LA PRODUCCIÓN ANIMAL

**EFFECTO EN RATONAS GESTANTES Y NO GESTANTES A
LA PRIMOINFECCIÓN POR VÍA ORAL DE
Chlamydophila abortus PROPAGADA EN
DOS LÍNEAS CELULARES**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

MARÍA SUSANA JAIMES VILLARREAL

TUTOR PRINCIPAL

CRISTINA ESCALANTE OCHOA

COMITÉ TUTORAL

**PATRICIA MARGARITA TATO ZALDÍVAR
ENRIQUE MARTÍN ABURTO MARTÍNEZ**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

- Con amor y cariño dedico esta tesis a mi familia, que de una u otra forma, siempre estuvieron a mi lado:
 - Mami, gracias por tu cariño incondicional.
 - Tía Ana, muchísimas gracias por escucharme siempre.
 - Gaby, agradezco tu comprensión al no estar contigo.
 - Pedro, te quiero mucho y gracias por tus desveladas a mi lado.
 - Tío Fer, a pesar de todo, te quiero.

- Horacio, el inicio de nuestra historia comenzó al mismo tiempo que esta tesis en el que compartimos muchas cosas, momentos buenos y malos. Muchas gracias por comprender mi carácter a lo largo de este trabajo, y el poco tiempo que tuvimos en muchas ocasiones. Sé que estaremos siempre juntos para motivarnos y seguir nuestros proyectos a lo largo de nuestro matrimonio. Te Amo

- A TODOS mis amigos, por que no les dediqué el tiempo suficiente para escucharlos, dejando en la mayoría de las veces, esa tacita de café y la visita programada para otra ocasión.

- A mis mascotas, y las mascotas de mis amigos. Porque no pude cuidarlos.

“Ángel de mi guarda, de mi dulce compañía...”

AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Raúl Vargas, por platicarme sobre un trabajo de investigación con *Chlamydophila abortus*.
- **Cristina Escalante**, “El mal profesor informa la verdad, el bueno enseña cómo encontrarla” (Diestereg 1790-1866). Gracias por presentarme a la bacteria, y por mantenerme siempre trabajando.
- A los integrantes de mi comité tutorial por tener ese tiempito para analizar los resultados de este trabajo.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por otorgarme una beca durante los 2 primeros años de estudios de Maestría.
- Al SICUAE por permitir la realización de los experimentos planteados en este trabajo de investigación utilizando el modelo murino.
- A todas las personas que me ayudaron en el INIFAP-CENID Microbiología en Palo Alto, al proporcionar las facilidades para el mantenimiento de las ratonas utilizadas en este estudio:
 - Dn Lupe, MUCHAS GRACIAS!
- Al Dr. Roberto Montes de Oca, por el apoyo para la realización de los bloques de parafina conteniendo las muestras de los órganos infectados, en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, sección de histopatología, en la Universidad Autónoma del Estado de México, y por tenerlos a tiempo.
- A la Dirección General de Estudios de Posgrado. Subdirección de Cooperación Académica, por las facilidades otorgadas para la realización de una estancia de investigación en la Universidad de Murcia, España.

- Al Dr. Jesús Salina Lorente, Director del departamento de microbiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, España, por aceptar el que hiciera una estancia corta de investigación en sus instalaciones.
 - A todo el equipo de trabajo del Departamento de Microbiología: María Rosa, MariCarmen, Francisco. Laura Del Río.
 - Nieves, gracias por dedicarme tiempo y enseñarme la herramienta de Citometría de Flujo.
 - Al equipo de trabajo del Departamento de Anatomía y Anatomía Comparada: José Antonio, Antonio Buendía.
 - Carlos Manuel, muchas gracias por esas pláticas tan interesantes, y enseñarme con mucha paciencia la técnica de Inmunohistoquímica.

- A la familia Tudela, en Murcia, España.
 - MariCarmen, gracias por tu confianza.
 - Ventura (q.e.p.d.), te recordaré con cariño siempre.

- Al Dr. Efrén Díaz, Dra. Beatriz Arellano, Dr. Sahagún por la crítica a este manuscrito.

- A la Q.B.P. María Angélica Martínez, en el Control de Fármacos y Reactivos del Departamento de Fisiología y Farmacología de la FMVZ-UNAM , por ayudarme en la obtención de las sustancias para obtener las diferentes mediciones de pH.

- Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), por haberme concedido una beca para la conclusión de mis estudios.

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARCIALMENTE FINANCIADO POR:

- **CONACYT**

- PROYECTO: Influencia de la glicosilación eucariótica en la patogénesis de las infecciones causadas por *Chlamydomphila* spp.: fase II- aspectos inmunológicos.
- No. DE PROYECTO: CONACYT- 40504-Z

- **PAPIIT**

- PROYECTO: Identificación y caracterización de *Chlamydomphila* spp. de afección en ganado lechero caprino.
- No. de PROYECTO: PAPIIT-IN224007

ÍNDICE -----	VII
Resumen -----	IX
Abstract -----	X
Lista de cuadros -----	XI
Lista de figuras -----	XII
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Aborto Enzoótico de los Pequeños Rumiantes (AEPR) -----	1
1.2 Familia <i>Chlamydiaceae</i> -----	2
1.3 Ciclo de Desarrollo -----	4
1.4 Estructura Antigénica -----	6
1.5 Patogenia -----	8
1.6 Aspectos Inmunológicos -----	11
1.7 Infección Experimental en Pequeños Rumiantes -----	17
1.8 Modelo Murino -----	17
2. HIPÓTESIS -----	24
3. OBJETIVOS	
3.1 Objetivo General -----	25
3.2 Objetivos Particulares -----	25
4. MATERIAL Y MÉTODOS	
4.1 Efecto del pH sobre la Viabilidad de <i>Chlamydophila abortus</i>	
4.1.1 Medio de Transporte y pH-----	26
4.1.2 Bacteria -----	26
4.1.3 Monoestratos Celulares -----	27
4.1.4 Preparación del Inóculo -----	27
4.1.5 Infección de Monoestratos -----	28
4.1.6 Cuantificación del Antígeno Clamidal -----	28
4.2 Infección en Animales Susceptibles	
4.2.1 Ratonas -----	29
4.2.2 Grupos -----	29
4.2.3 Desafío -----	31
4.2.4 Sacrificio -----	31
4.2.5 Colección de Muestras -----	31

4.3	Procesamiento de Muestras	
4.3.1	Aislamiento Clamidal -----	32
4.3.2	Cuantificación de UFI en el Bazo -----	33
4.4	Inmunohistoquímica -----	33
4.5	Análisis Estadístico -----	34
5.	RESULTADOS	
5.1	Estudio sobre la Viabilidad de <i>Chlamydomphila abortus</i> en diferentes pH's en Cultivo Celular L929 -----	35
5.2	Desafío en Animales Susceptibles	
5.2.1	Signos Clínicos -----	36
5.2.2	Cambios Macroscópicos -----	36
5.2.3	Peso del bazo -----	37
5.2.4	Aislamiento Bacteriano -----	39
5.2.5	Ratonas No Gestantes -----	40
5.2.6	Ratonas Gestantes -----	41
5.2.7	Relación del Peso en g del Bazo y UFI/ml de <i>C. abortus</i> -	42
5.2.8	Descripción Histopatológica -----	44
5.2.9	Inmunohistoquímica -----	47
6.	DISCUSIÓN -----	48
7.	CONCLUSIONES -----	56
8.	REFERENCIAS -----	57
9.	ANEXO	70
	Técnicas y preparación de medios y reactivos -----	
10.	ABREVIATURAS -----	72

Chlamydophila abortus es el agente etiológico de la enfermedad conocida como Aborto Enzoótico de los Pequeños Rumiantes, induciendo el aborto durante el último tercio de gestación, o el nacimiento de corderos o cabritos débiles. Los miembros de la familia *Chlamydiaceae* se consideran bacterias Gram negativas, intracelulares obligadas de células eucariotas. La bacteria puede multiplicarse en células del sistema reticuloendotelial, células epiteliales de la mucosa conjuntival o genital, así como del tracto intestinal, en células sinoviales, placentarias y fetales. Estudios sobre su desarrollo, indican que las condiciones intracelulares de la célula hospedadora afectan el desarrollo bacteriano. *In vitro*, el perfil de glicanos presente en las glicoproteínas de superficie de la bacteria varía de acuerdo al hospedador donde se ha desarrollado, influenciando significativamente la adherencia y desarrollo intracelular posteriores de este microorganismo. El modelo murino se ha utilizado ampliamente para estudiar la patogénesis y los mecanismos inmunitarios durante la infección por *C. abortus*, debido a las similitudes existentes en la respuesta a la infección de estos animales con respecto al hospedador natural. El objetivo de este trabajo es evaluar *in vivo* si el desarrollo de la bacteria en líneas celulares diferentes induce una respuesta distinta en la inoculación por vía oral, la vía de entrada natural del agente. Se propagó y purificó *Chlamydomphila abortus* cepa A22 utilizando células HeLa y L929. La dosis infectante se determinó con base en revisión bibliográfica y el análisis *in vitro* sobre el impacto del pH ácido en la viabilidad de *C. abortus*, tomando en consideración el pH estomacal de las ratonas. Se inocularon ratonas NIH SPF no gestantes y gestantes de 8 semanas de edad, las cuales, se infectaron por vía oral en concentración de 3×10^6 UFI/50 μ l/ratona. Se monitoreó la infección durante 15 días, sacrificándose animales para su análisis en los días 5, 7, 10 y 15 post-infección. Para cada tiempo de sacrificio, y previo a la inoculación, los roedores fueron divididos en 2 grupos (20 animales/grupo) de acuerdo al estado fisiológico (no gestantes/gestantes). Cada grupo fue subdividido en 4 grupos (5 animales/grupo) de acuerdo al tipo celular donde la bacteria se propagó (células L929 y HeLa), y grupos control negativo (no gestantes no infectados/gestantes no infectados). En cada necropsia, se colectaron muestras de bazo, hígado y útero. El bazo se utilizó para el aislamiento y titulación clamidial en cultivo celular. Las muestras de hígado, útero y uniones fetoplacentarias fueron analizadas mediante la técnica de inmunohistoquímica. No se encontró evidencia de la infección por *C. abortus* en ningún grupo. *C. abortus* fue aislada en 90% del grupo de las ratonas no gestantes y 100% en las ratonas gestantes cuando la bacteria inoculada se propagó en células L929, así mismo, se aisló 65% en ratonas no gestantes y 95% de ratonas gestantes cuando el inóculo fue propagada en células HeLa, indicando que existen diferencias en la infección por *C. abortus* dependiendo del tipo celular donde la bacteria se haya replicado previamente, así como que el modelo murino es adecuado para poder dilucidar estas diferencias y su impacto en el tipo de respuesta inmune del hospedador.

Palabras clave: *Chlamydomphila abortus*, Aborto, Modelo Murino, Glicoproteínas, pH, Vías de Administración.

Chlamydomphila abortus, the etiological agent of the Enzootic Abortion of the Small Ruminants (EASM), causes either abortion during the last third of the pregnancy or the born of weak offsprings. Members of the *Chlamydiaceae* family are considered Gram negative bacteria which are obligate intracellular parasites of eucariotic cells. This bacteria multiplies into reticuloendotelial cells, conjunctival or genital epithelial cells as well as those of the gastrointestinal tract, sinovial cells, placenta and fetal cells. Studies on its development indicate that the intracellular conditions of the host cell affect the bacterial development. *In vitro*, it has been shown that the glycan profile of surface glycoproteins varies depending of the host cell where the bacteria grows, significantly affecting its further adherence and intracellular development. The murine model has been widely used to study the pathogenesis and immunity mechanisms during the infection due to *C. abortus* since the existing similarities between these animals and the natural hosts on their response to the infection. The objective of this study was to evaluate *in vivo* whether the growth of the bacteria in different cell lines might induce a distinct response in mice after bacterial inoculation through the oral via, the entrance site during natural infections. *Chlamydomphila abortus* strain A22 was propagated and purified from HeLa and L929 cells. The infecting dose was determined on basis of what it is reported in the literature together with *in vitro* analysis on the impact of acidic pH on the viability of *C. abortus*, considering as well the mice stomach pH. NIH SPF pregnant and non pregnant female mice, 8 weeks of age, were inoculated through the mouth with 3×10^6 IFU/50 μ l/mouse of the bacteria. The infection was followed for 15 days, mice being sacrificed at days 5, 7, 10, and 5 p.i. For each time point to be analyzed, animals were divided prior to inoculation in two groups (20 animals/group) according to their physiological state (pregnant/non-pregnant). Each group was further subdivided into 4 groups (5 animals/group) regarding the procedence of the inocula to be used (HeLa or L929 cells) and the negative control groups (non-infected pregnant and non-pregnant mice). At days of sacrifice, all 5 animals of the respective time point were killed, necropsy was performed throughly, and samples from spleen, liver and uterus were taken. Spleen was collected to perform bacterial isolation on cell culture, whereas liver and uterus, as well as fetoplacental unions, were meant for immunohistochemistry analysis. Along the infection period, no sign or evidence of infection was found throughout this study. *C. abortus*, nevertheless, was isolated from 90% of the non-pregnant mice, and 100% of the pregnant mice when the bacteria used had been previously propagated within L929 cells, while it was found en 65% of the non-pregnant mice, and 95% of the pregnant mice when the bacteria used for infection had been propagated within HeLa cells. This indicates that there are indeed differences in the infectious process caused by *C. abortus* regarding on the host cell type the bacteria has previously developed within. The murine model is adecuate for elucidation of such differences and their impact on the immune response of the host.

Key words: *Chlamydomphila abortus*, Abortion, Murine Model, Glicoproteins, pH, Route of inoculation.

No.	Descripción	Pág.
1.2.1	Representación esquemática de la nueva taxonomía del Orden <i>Chlamydiales</i> propuesta por Everett <i>et al.</i> , 1999.	3
1.8.1	Vías de inoculación de <i>C. abortus</i> y dosis infectante en el modelo murino.	19
1.8.2	Relación de razas de ratonas y aislamiento bacteriano en primoinfección de <i>Chlamydiae</i> .	23
4.2.2.1	Grupos de ratonas de acuerdo al estado reproductivo y al grupo infectado con <i>C. abortus</i> propagada en las diferentes líneas celulares.	30
5.2.3.1	Evaluación en porcentajes de la diferencia entre el peso del bazo promedio en el grupo de ratonas no gestantes con respecto al peso promedio del bazo en el grupo de ratonas gestantes de acuerdo a los días p.i. por vía oral de <i>C. abortus</i> y los días de sacrificio.	39
6.1	Vías de inoculación de <i>C. abortus</i> y dosis infectante en el modelo murino.	

No.	Descripción	Pág.
1.3.1	Ciclo de desarrollo de <i>Chlamydophila abortus</i> , adaptado de Escalante-Ochoa, 2000a.	5
5.1.1	Desarrollo de <i>Chlamydophila abortus</i> propagada en la línea celular L929 bajo diferentes condiciones de pH. Los resultados se expresan como el promedio de 3 experimentos independientes.	35
5.2.3.1	Peso del bazo en ratonas no gestantes tras la infección por vía oral con <i>C. abortus</i> propagada de forma previa en células L929 y HeLa. Los resultados se expresan como el promedio de 5 ratonas por grupo y día de sacrificio p.i.	37
5.2.3.2	Peso del bazo en ratonas gestantes tras la infección por vía oral con <i>C. abortus</i> propagada de forma previa en células L929 y HeLa. Los resultados se expresan como el promedio de 5 ratonas por grupo y día de sacrificio p.i.	38
5.2.4.1	Aislamiento de <i>C. abortus</i> cepa A22 a partir del bazo de ratonas vacías y gestantes inoculadas con la bacteria desarrollada de forma previa en líneas celulares L929 y HeLa respectivamente.	39
5.2.5.1	<i>C. abortus</i> aislada de bazo en Ratonas No Gestantes inoculadas con la bacteria desarrollada previamente en células L929 y HeLa. Los valores gráficos demuestran el promedio del aislamiento de los 5 bazos analizados por día p.i., así como el error estándar de los mismos.	40
5.2.6.1	Aislamiento de <i>C. abortus</i> del bazo de Ratonas Gestantes inoculadas con la bacteria desarrollada previamente en células L929 y HeLa respectivamente. Los valores gráficos demuestran el promedio del aislamiento de los 5 bazos analizados por día p.i., así como el error estándar de los mismos.	41
5.2.7.1	Análisis gráfico de las UFI de <i>C. abortus</i> A22 al aislamiento con respecto al valor promedio del peso en gramos del bazo en el grupo de ratonas Vacías. Los valores gráficos demuestran el promedio del aislamiento de los 5 bazos analizados por día p.i., así como el error estándar de los mismos.	42
5.2.7.2	Concentración de <i>C. abortus</i> A22 en bazo (UFI/g) de ratonas gestantes inoculadas con la bacteria desarrollada previamente en células L929 y HeLa respectivamente. Los valores muestran el promedio del aislamiento de los 5 bazos analizados por día p.i., así como el error estándar de los mismos.	43
5.2.8.1	Corte histológico de hígado de ratona no gestante infectada con <i>C. abortus</i> replicada en la línea celular L929 al día 7 p.i., en el que se observan escasos agregados de células inflamatorias (H y E 40x).	45

5.2.8.2	Corte histológico de hígado de ratona gestante infectada con <i>C. abortus</i> propagada en la línea celular HeLa al día 10 p.i., en el que se observa el citoplasma de los hepatocitos con cambio vacuolar (ABC-Hematoxilina 40x).	45
5.2.8.3	Corte histológico de útero de ratona del grupo control, en el que se observa hemosiderina en el endometrio (ABC-Hematoxilina 40x).	46

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ABORTO ENZOÓTICO DE LOS PEQUEÑOS RUMIANTES (AEPR)

El aborto clamidial fue descrito por primera vez en 1936 por Greig, quien lo nombró aborto enzoótico de la oveja, sugiriendo que esta patología se encontraba asociada de igual forma a factores ambientales y deficiencias en la dieta (Entrican *et al.*, 2001). No fue sino hasta 1950 que Stamp y colaboradores demostraron que el papel central en la epidemiología de la enfermedad abortiva en las ovejas era causado por un organismo del grupo de psitacosis-linfogranuloma venéreo (Appleyard *et al.*, 1985).

El agente etiológico del Aborto Enzoótico Ovino (AEO) fue reconocido dentro del género *Chlamydiae* como *Chlamydia psittaci* serotipo 1 a mediados de los años 70's (Sperars y Storz 1979).

En la actualidad, y a través de estudios realizados por Everett *et al.*, (1999) en el orden *Chlamydiales*, se describen las diferencias entre las especies con fundamento en características fenotípicas, hospedero susceptible, tipo de patologías asociadas y análisis filogenético del operón ribosomal, donde se reconoce a *Chlamydophila abortus* (*C. abortus*) como agente causal del Aborto Enzoótico de los Pequeños Rumiantes (AEPR), de amplia distribución, impacto y prevalencia a nivel mundial por las pérdidas económicas que causa, e induce el aborto durante el último tercio de gestación o el nacimiento de corderos débiles. (Buxton *et al.*, 1990; Rodolakis *et al.*, 1998; Livingston *et al.*, 2005 : Martínez *et al.*, 2006).

Los microorganismos procariotes del género *Chlamydophila* spp., con excepción de *C. pneumoniae*, son responsables de infecciones clínicas y subclínicas en diferentes animales, incluyendo aquellos considerados como domésticos y de producción, pudiendo incluso causar afecciones de tipo zoonóticas en diversas comunidades alrededor del mundo (Aitken *et al.*, 1990; Bourke *et al.*, 1992).

En México la participación de estos microorganismos en procesos infecciosos, tanto clínicos (abortos, queratoconjuntivitis), como subclínicos (infecciones intestinales) en rumiantes y aves, ha sido demostrada (Escalante-Ochoa *et al.*, 1996, 1997; Rojas 1996; Lazcano, C. A. *et al.*, 2005), siendo reportado un caso de la participación de *Chlamydophila* como agente zoonótico (Escalante-Ochoa *et al.*, 2001).

1.2 FAMILIA *Chlamydiaceae*

Los miembros de esta familia son bacterias intracelulares obligadas de células eucarióticas (Page, 1968); viven en lo que se ha referido como un medio ambiente extremo en el que desarrollan propiedades únicas de supervivencia volviéndose dependientes de la célula que infectan, lo cual, involucra un ciclo de desarrollo característico en donde participan dos fases: el Cuerpo Elemental (CE) con capacidad infecciosa y el Cuerpo Reticular (CR) con capacidad multiplicativa (Moulder, 1974).

Se consideran bacterias Gram-negativas por tener en su estructura externa una membrana trilaminar (compuesta por fosfolípidos, lípidos, LPS y proteínas), aunque la existencia de peptidoglicano no se ha detectado (Barbour *et al.*, 1982).

Basados en el análisis filogenético de los genes 16S y 23S ARNr del orden *Chlamydiales*, Everett *et al.*, (1999), sugirieron la existencia de nueve especies diferenciadas en la familia *Chlamydiaceae*, conduciendo a una reclasificación y la formación de dos nuevos géneros *Chlamydia* y *Chlamydophila*, que incluyen nuevas especies (cuadro 1.2.1). Los resultados están de acuerdo con los obtenidos por análisis filogenéticos de otros cinco genes de codificación (GroEL, KDO-transferasa, MOMP, 60-kDa proteína rica en cisteína y lipoproteína rica en cisteína) (Everett, 2000), y con las propiedades biológicas de las diferentes cepas (Everett *et al.*, 1999).

Cuadro 1.2.1 Representación esquemática de la nueva taxonomía del Orden <i>Chlamydiales</i> propuesta por Everett <i>et al.</i>, 1999.			
Orden	<i>Chlamydiales</i>		
Familia	<i>Chlamydiaceae</i>		
	TAXONOMÍA ANTERIOR	NUEVA TAXONOMÍA	
Género	<i>Chlamydia</i>	<i>Chlamydia</i>	<i>Chlamydophila</i>
Especies	<i>C. trachomatis</i>	<i>C. trachomatis</i> <i>C. suis</i> <i>C. muridarum</i>	
	<i>C. pneumoniae</i>		<i>C. pneumoniae</i>
	<i>C. psittaci</i>		<i>C. abortus</i>
			<i>C. psittaci</i>
			<i>C. felis</i>
<i>C. pecorum</i>		<i>C. pecorum</i>	

El género *Chlamydia* incluye 3 especies: *C. trachomatis* (cepa humana), *C. suis* (cepa porcina relacionada con *C. trachomatis*) y *C. muridarum* (cepas de ratón y hámster).

El género *Chlamydophila* consiste de 6 especies: *C. pneumoniae* (cepa humana, de caballos y koalas), *C. psittaci* (cepa aviar), *C. pecorum* (cepa de rumiantes, koalas y cerdos), y las nuevas especies: *C. abortus* (cepa de rumiantes), *C. caviae* (cepa de cuyes) y *C. felis* (cepa felina). Las biovariedades patógenas como *C. psittaci*, *C. abortus* y *C. felis* son agentes zoonóticos.

1.3 CICLO DE DESARROLLO

La familia *Chlamydiaceae* requiere de células eucariotas para poder reproducirse, de éstas obtienen compuestos energéticos necesarios para llevar a cabo la supervivencia en el hospedador, como el adenosín-trifosfato (ATP) (Moulder, 1974).

El ciclo bifásico de *Chlamydiaceae* es distinto al de otras bacterias, porque incluye el desarrollo de diferentes estructuras para la infección de las células hospedadoras (Figura 1.3.1): el CE, que mide de 0.2 a 0.3 μm de diámetro, de forma esférica, con núcleo electrodenso, y el CR, el cual presenta un diámetro de 0.5 a 1.3 μm , con estructura nuclear de aspecto granular debido al desdoblamiento del ADN y a un gran número de ribosomas, por lo que posee una fuerte actividad biosintética (Edlinger, 1979; Moulder, 1991). En este ciclo se diferencian las siguientes fases:

- Adhesión del CE a la célula susceptible.
- Internalización de la forma infecciosa (CE) en la célula hospedadora.
- Conversión del CE a la forma metabólicamente activa CR.
- Multiplicación del CR mediante fisión binaria, produciendo una inclusión citoplasmática.
- Reorganización del CR a CE mediante mecanismos aún no bien dilucidados.
- Liberación de la nueva progenie.

El CE induce su propia internalización dentro de una vacuola (inclusión), al adherirse a la membrana celular, evitando así, la fusión fagolisosomal. La infección de este procariote eventualmente puede ejercer un efecto citolítico que implica la liberación de una nueva progenie de partículas infecciosas; sin embargo, en algunos casos *Chlamydothila* spp. puede ser eliminada de la célula sin que exista lisis de la misma, o bien puede establecerse una infección persistente (Escalante-Ochoa *et al.*, 1998).

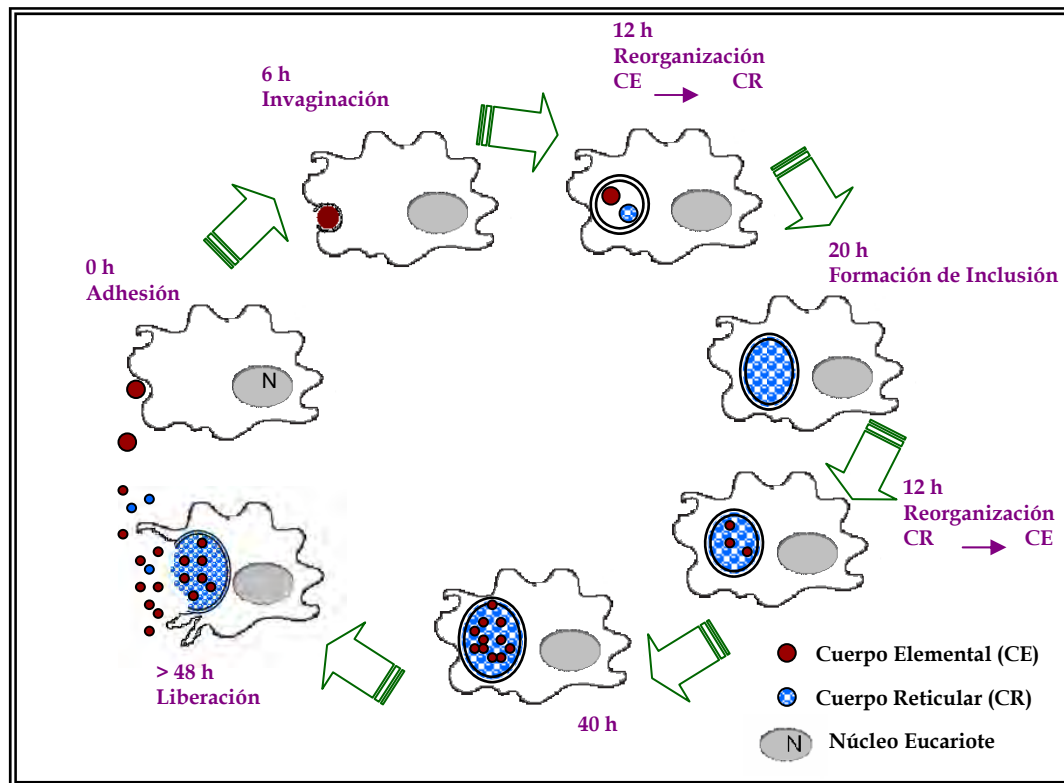


Figura 1.3.1 Ciclo de desarrollo de *Chlamydia abortus*, adaptado de Escalante-Ochoa, 2000a.

Este ciclo de desarrollo puede variar con respecto a la cepa bacteriana y al tipo de célula infectada que puede acarrear importantes consecuencias *in vivo*, determinar diferencias en la susceptibilidad del hospedero o el tropismo tisular, entre otros. En los estudios realizados sobre el desarrollo de *C. abortus in vitro*, en diferentes líneas celulares (Escalante-Ochoa *et al.*, 2000b), se indica que las condiciones intracelulares (con la participación del citoesqueleto) son las que afectan el desarrollo bacteriano durante la infección (Escalante-Ochoa *et al.*, 1999). El principal factor en la fase de adhesión del procarionte es el hospedero, por lo que la interacción de *Chlamydiae* con la célula hospedadora está determinada por el tropismo hacia el tejido susceptible (Puolakkainen *et al.*, 2005). De igual modo, se ha demostrado que la estructura externa del microorganismo se modifica dependiendo del tipo de célula eucariótica donde se desarrolle, lo cual afecta significativamente los fenómenos de adhesión y multiplicación intracelular posteriores (Escalante-Ochoa, 2000b).

1.4 ESTRUCTURA ANTIGÉNICA

Una característica inusual de la bacteria es la estructura de la fase infectante, el CE, ya que no se ha determinado la presencia de peptidoglicano en la superficie (Barbour *et al.*, 1982). La rigidez de la membrana y su escasa permeabilidad están determinadas por la presencia de un complejo externo de la membrana clamidial (COMC), la cual, contiene regiones conservadas intercaladas con cuatro regiones variables que comprenden secuencias cortas, codificando así, la proteína principal de la membrana externa (MOMP), rica en aminoácidos azufrados (Caldwell *et al.*, 1981).

En el CE, las proteínas decisivas en la adhesión a la célula blanco por la unión covalente de moléculas de glicano o de heparán-sulfato, son las de la membrana externa 2 (Omp2, OmcB, EnvB) y las de la membrana externa 3 (Omp3, OmcA, EnvA) respectivamente (Newhall *et al.*, 1983; Yuan *et al.*, 1989; Hatch, 1996; Beswick *et al.*, 2003), con la formación de polímeros unidos por puentes disulfuro, por la presencia de proteínas ricas en cisteína. Ambas proteínas, Omp2 y Omp3, son sintetizadas de forma tardía en el ciclo de desarrollo (Hatch, 1996), dando como resultado un CE de gran estabilidad en el medio, manteniendo así la integridad estructural y cierta resistencia a diversos agentes físico-químicos en contraste con el CR, que es una forma sensible y osmóticamente frágil incapaz de sobrevivir en el medio externo (Pérez-Martínez y Storz, 1987).

Se reconocen dos funciones en las proteínas de MOMP: la de porina, la cual confiere permeabilidad a componentes hidrofílicos como el ATP, y la de adhesina, que permite el ataque e internalización de la bacteria a la célula eucariota (Bavoil *et al.*, 1984, Su *et al.*, 1990) a través de los ligandos de superficie, incluidos los glicosaminoglicanos (GAGs) (Su *et al.*, 1990; Zhang y Stephens, 1992).

Chlamydiae posee proteínas relacionadas con el desarrollo de la inclusión, las cuáles, son secretadas al medio extracelular a través del sistema de secreción Tipo-III (SST-III), relacionado con la evasión del sistema inmune, y con los procesos de transición del CR al CE y viceversa (Toh *et al.*, 2003 Rockey *et al.*, 2002). Este sistema es una vía necesaria para proveer nutrientes esenciales para asegurar el desarrollo del organismo, que al ser auxotrófico, requiere precursores, incluyendo aminoácidos como el triptofano en el caso de *C. abortus* (Entrican *et al.*, 2004).

Otro grupo de proteínas presentes en *Chlamydiae* son las proteínas polimórficas de la membrana externa (Pmps), las cuales, son reconocidas con este nombre debido a que sus genes sufren constantes mutaciones que originan variaciones en su estructura (Grimwood *et al.*, 2001). Las Pmps sólo se han encontrado en cepas de *C. pneumoniae*, *C. abortus* y *C. psittaci* (Campbell *et al.*, 1990; Souriau *et al.*, 1994).

Por otro lado, el género *Chlamydiae* presenta dos antígenos glicolipídicos presentes en todas las especies: el lipopolisacárido (LPS), y un exoantígeno glicolípido soluble (GLXA).

El LPS clamidial es un antígeno específico de género que se encuentra expuesto en la superficie tanto del CE como del CR, así como en la membrana de las células infectadas (Campbell *et al.*, 1994; Brade *et al.*, 1997), por lo que es capaz de inducir una débil respuesta inmune de tipo agudo (Ingalls *et al.*, 1995; Stephens, 2003). Se encuentra serológica y estructuralmente relacionado con

antígenos de mutantes rugosas de bacterias Gram-negativas, como las de la familia *Enterobacteriaceae*.

El GLXA (reconocido en *C. trachomatis* y *C. psittaci* por Stuart *et al.*, 1987) se relaciona con el CE en las primeras etapas del proceso de invasión al exponerse en la superficie de la célula infectada. Este glicolípido está asociado con la eliminación de los CEs al medio extracelular, provocando que las células adyacentes sean más susceptibles a la infección (Vora y Stuart 2003; Webley *et al.*, 2004).

1.5 PATOGENIA

Chlamydophila spp. puede multiplicarse en células del sistema reticuloendotelial, células epiteliales de la mucosa conjuntival, genital, y del tracto intestinal, en células sinoviales y en células de la placenta y fetales. Las lesiones que ocasiona dependen de la virulencia de la cepa involucrada en particular. Estos procariones no pueden crecer fuera de las células hospedadoras ya que necesitan obtener de ellas, los compuestos de alta energía y los intermediarios metabólicos de bajo peso molecular necesarios para la síntesis de sus propios ácidos nucleicos y proteínas (Moulder *et al.*, 1991). Cabe mencionar que, dependiendo de las condiciones ambientales, los CEs pueden permanecer viables desde un período mínimo de 3 semanas y un máximo de 10, por lo que se recomienda aislar a las hembras susceptibles para evitar una contaminación mayor (Aitken *et al.*, 1990).

La ingestión de agua o alimento contaminado con *C. abortus* (fluidos vaginales o membranas placentarias durante el aborto, heces), y la inhalación de aerosoles, son la principal vía en que el microorganismo es adquirido por los pequeños rumiantes susceptibles (Papp *et al.*, 1993).

Las hembras infectadas llegan a tener una disminución en el consumo de alimento y presentan un flujo vaginal ligero 48 horas antes de manifestarse el aborto, que se mantiene durante las siguientes 2-3 semanas (Nietfeld, 2001). Storz (1971) observa que la exposición prolongada de *C. abortus* en infecciones del tipo asintomático, con excreción fecal, probablemente contribuya a la contaminación perenne del área en la que los animales confluyen.

Appleyard *et al.*, (1985) al igual que Papp y Shewen (1996), reportan que en la transmisión venérea, un gran número de bacterias clamidiales son necesarias para establecer la infección persistente. En el mismo sentido Buxton *et al.*, (2002) y Entrican, (2002a) mencionan la transmisión vertical al feto vía placentaria.

Amin y Wilsmore (1995) reportan que el portal de entrada de *C. abortus* podría ser la vía orofaríngea, estableciéndose principalmente en las tonsilas, o que a través de la ingestión oral, en la mucosa del abomaso y del intestino delgado, exista la diseminación hacia el drenaje linfático o sanguíneo ocurriendo la infección en otros órganos, y al establecerse la bacteria en tejido linfoide, permanece durante períodos prolongados en forma latente. (Papp *et al.*, 1993).

Las hembras gestantes, que han sido contagiadas en el último período de gestación, no abortan en ese momento, pero permanecen como portadoras latentes de la infección hasta que el microorganismo se activa en el siguiente ciclo reproductivo, produciéndose entonces la patología del aborto; sin embargo, estas hembras no presentan problemas de infertilidad después de haber abortado, por lo que pueden quedar gestantes en los siguientes períodos productivos (Aitken *et al.*, 1990).

Los CEs son los que colonizan el tracto reproductor femenino a través de una bacteremia secundaria provocada por cambios fisiológicos derivados de la actividad reproductiva. La placenta es relativamente resistente a la infección hasta el día 60 de gestación, posteriormente se produce una invasión del estroma caruncular denotado por arteritis y trombosis. Las hemorragias en los vasos maternos, ocasionan hematomas que podrían generar un microambiente en el que las clamidias se relacionen con el epitelio coriónico (Novilla y Jensen, 1970; Sammin *et al.*, 2006).

Al establecerse la infección en el epitelio localizado en el hilio de varios placentomas después del día 90 de gestación, la infección se disemina centrífugamente hacia las membranas intercotiledonarias circundantes. El daño resultante es edema e inflamación que origina el característico engrosamiento de las membranas placentarias de color rojo amarillentas observadas al momento del aborto, mostrando en ocasiones exudados vaginales turbios de color rosa durante los 7 a 10 días siguientes (Storz, 1971; Buxton *et al.*, 1990; Entrican *et al.*, 2001).

Son tres las hormonas que de manera normal se encuentran relacionadas con la gestación: progesterona, 17β -estradiol, y la prostaglandina E_2 (PGE_2). Las células epiteliales del corion, en la placenta de ovejas, son una fuente importante de progesterona en la gestación tardía; a la infección con *C. abortus*, el daño en el epitelio coriónico resulta en un decremento en la producción de progesterona, alterando el balance hormonal necesario para el mantenimiento de la gestación. La disminución en el balance progesterona: 17β -estradiol, conlleva al incremento de PGE_2 , y como consecuencia de ello se produce el aborto (Entrican, 2002a).

De otro modo, las hembras infectadas pueden parir cabritos o corderos prematuros muy débiles, cuyo promedio de vida generalmente no va más allá de los 11 a 14 días (Buxton *et al.*, 1990); no obstante, si el producto es abortado, puede parecer normal o en su caso, mostrar edema tanto en tejido subcutáneo como en cavidad abdominal, presentando hematomas en esta región. El hígado

se puede observar congestionado con puntos grises de necrosis focal (Rodolakis *et al.*, 1998; Aitken, 2000; Entrican *et al.*, 2001; Rekiki *et al.*, 2004).

Debido a la respuesta humoral (principalmente por anticuerpos del tipo IgG), la infección induce inmunidad durante los 2 ó 3 años subsecuentes a la primoinfección en relación a la presentación de abortos (Jones y Anderson, 1988; Rodolakis, 2001; López-Hurtado y Guerra-Infante, 2002). Aún cuando esta inmunidad se va atenuando año con año, la infección permanece latente en la explotación, produciendo abortos esporádicos desde 10% hasta un 30%, por lo que las ovejas permanecen refractarias a la infección. En hatos infectados con *C. abortus* de forma primaria, el porcentaje de abortos puede variar desde 30% hasta un 90% (Shewen, 1980; Amin y Wilsmore, 1995; Rodolakis *et al.*, 1998; Aitken, 2000).

1.6 ASPECTOS INMUNOLÓGICOS

Chlamydiae spp. es capaz de infectar (o reinfectar) a las células hospedadoras al tener la capacidad de sobrevivir el ataque inmunológico. Las células epiteliales y las superficies mucosas son el primer contacto entre *Chlamydiae* spp. y el hospedero, por lo tanto, la habilidad de estas células para responder a la infección es probable que afecte el desarrollo subsecuente de la inmunidad adaptativa y en última instancia, determine la pauta en la progresión de la enfermedad (Entrican *et al.*, 2004).

La respuesta inmune innata es de suma importancia en las primeras fases de la infección clamidial (24-48 hrs), ya que consigue disminuir la carga bacteriana inicial, atenuando la gravedad de la infección que, al no conferir una protección total, puede evitar la infección masiva. En la fase primaria de la infección, este tipo de respuesta implica la acción de polimorfonucleares (PMNs), los cuales son

las primeras células en llegar a los focos inflamatorios en el caso de *C. abortus* (Buendía *et al.*, 1998), y *C. trachomatis* (Barteneva *et al.*, 1996).

Los PMNs tienen una función inmunorreguladora, secretan citocinas efectoras como el Interferón-gamma (IFN- γ), Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF- α) e interleucina (IL)-12, las cuales, promueven una respuesta de linfocitos tipo Th1 en respuesta a la infección; TNF- α ha sido señalada como una citocina producida en respuesta a la infección clamidial (Williams *et al.*, 1990; Perry *et al.*, 1997).

Los PMNs *in vivo* e *in vitro* son capaces de destruir a organismos infecciosos, pero en el caso de *C. abortus*, si la dosis infectiva es elevada, una parte de las bacterias puede evitar la acción de estas células debido a la capacidad de colonizar células susceptibles (Register *et al.*, 1986). El papel de los PMNs en la infección clamidial en placenta había sido pobremente estudiada, hasta que Buendía *et al.*, (1998) describen en el modelo murino, que la infiltración por neutrófilos de forma extensa puede tener un efecto adverso en el resultado de la gestación, lo que implica un serio problema en cuanto a una disfunción placentaria y la ruptura prematura de la decidua basal, pudiendo tener como resultado un aborto tardío. Se han propuesto diferentes mecanismos en que los PMNs son capaces de controlar la infección intracelular por *C. abortus* en el hígado, ya que pueden mediar la lisis en células blanco, así como también eliminar clamidias extracelulares antes de la infección, o justamente después de la infección celular (Montes de Oca *et al.*, 2000).

En pequeños rumiantes no gestantes, la infección se establece de forma latente en tejido linfoide, siendo un proceso que se encuentra mediado por citocinas (Entrican *et al.*, 1998). En la infección latente, la citocina pro-inflamatoria IFN- γ (principalmente generada por los linfocitos T) es producida como respuesta a la primoinfección por *C. abortus*. Estudios *in vitro* demuestran que esta citocina puede restringir el crecimiento de la bacteria en células ovinas (Entrican *et al.*, 2004). La capacidad inhibitoria del IFN- γ sobre la inducción de la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), restringe la disponibilidad de triptofano para el

crecimiento de *Chlamydiae* (Carlin y Weller, 1995, Entrican *et al.*, 2001). Munn *et al.*, (1998) reportan que el trofoblasto y los macrófagos de la placenta en mamíferos expresanIDO de forma constitutiva, haciendo que esta limitación en triptofano sea significativa, controlando no sólo el crecimiento de patógenos, sino también, la participación de linfocitos T periféricos, suprimiendo la respuesta inmune materna.

Wong *et al.*, (1985) y Buxton *et al.*, (1990) reportan que *C. abortus* puede colonizar diferentes tipos de placenta (rumiantes, porcinas, murinas y humanas) causando el aborto durante el último tercio de gestación. La enfermedad en pequeños rumiantes es producida por una compleja interacción entre hormonas y la producción de citocinas durante la gestación, lo que permite el crecimiento de la bacteria o una infección persistente extrauterina, liberando CEs infecciosos que pueden llegar a la placenta y causar el aborto (Entrican, 2002a).

El evento que principalmente promueve la multiplicación clamidial es la preñez, donde los mecanismos inmunológicos son complejos al existir un cambio de la respuesta inmune de Th1 a Th2 (una respuesta Th1 es necesaria para resolver la infección) (Entrican, 2002a). En la producción de hormonas vitales para el mantenimiento de la gestación, la progesterona media la producción de citocinas Th2 (Factor Transformador de Crecimiento-beta (TGF- β), IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 e IL-10), las cuales, reducen la producción de moléculas pro-inflamatorias como IL-12 e IFN- γ , siendo estas últimas perjudiciales para la vida fetal (Tuffrey *et al.*, 1984; Perry *et al.*, 1997).

Durante la formación del tejido placentario, la invasión de células fetales en el tejido materno debe ser controlada, de forma inmunológica, para prevenir el daño a la hembra. Igualmente, el reconocimiento materno del producto debe evitar el rechazo alogénico del feto, por lo que la inmunidad materna (principalmente mediada por citocinas) acarrea un mecanismo crucial en la interfase materno-fetal,

asegurando una gestación exitosa. La infección por *Chlamydiae* en mucosas acarrea un desequilibrio perjudicial al hospedero, particularmente si se trata de una infección persistente, conduciendo a una respuesta inflamatoria severa (con focos necróticos) con la participación de citocinas como TNF- α e IFN- γ , que pueden ejercer efectos perjudiciales en la placenta; sin embargo, en la respuesta inmune del tipo Th2, donde se encuentra un predominio de citocinas reguladoras como TGF- β e IL-10, podría impedir la respuesta protectora anti-clamidia del tipo Th1 mediada por IFN- γ , dando como resultado un fracaso en el hospedador para eliminar al agente, y por lo tanto, desarrollar una infección crónica (Entrican, 2002; Stephens, 2003), hecho que Meeusen *et al.*, (2004) reconocen de igual forma al establecer que el tipo de respuesta inmune en superficies mucosas es del tipo Th2 mediada por citocinas.

El IFN- γ es la principal citocina producida para controlar el crecimiento de *C. abortus* actuando como un potente clamidiostático; sin embargo, al estimular la inflamación del tejido placentario para el control de la infección, compromete la supervivencia del feto, dando como resultado el aborto (Raghupathy, 1997; Clark *et al.*, 1999; Entrican, 2002b).

Estudios *in vitro* en células ovinas infectadas con *C. abortus* revelan que cuando se adiciona IFN- γ al medio de cultivo, la bacteria entra en un estado de latencia; sin embargo, este comportamiento es reversible, ya que al eliminar IFN- γ del medio la bacteria se activa nuevamente, pudiendo ser un reflejo de lo que sucede *in vivo* en hembras no gestantes (Brown y Entrican, 1996).

A pesar de que la inmunidad innata tiene un papel importante para el control de la infección primaria, la protección frente a *C. abortus* requiere de la inmunidad mediada por células (Buzoni-Gatel *et al.*, 1987; McCafferty, 1990). La contribución protectora de este tipo de inmunidad depende de una variedad de factores, como lo son el sitio de infección, y si ésta es primaria o secundaria, de tipo agudo o persistente.

Las células B localizadas en la placenta de ovejas infectadas, aparecen de forma difusa debajo de los sitios con intensa inflamación afectando el epitelio corial e incrementando los focos de células inflamatorias (Buxton *et al.*, 2002). Así mismo, estos autores al estudiar la caracterización inmunofenotípica del infiltrado inflamatorio de ovejas infectadas con *C. abortus*, refieren la existencia de un mecanismo de respuesta inmune de tipo celular, donde la detección de TNF- α , asociado posiblemente a la expresión del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) clase II por macrófagos, está relacionada de forma significativa con la patogenia del aborto clamidial. La inmunidad fetal incluye una pequeña cantidad de células T-CD4⁺ y T-CD8⁺, células T- $\gamma\delta$, y células B. (Morrison *et al.*, 1995; Su y Caldwell, 1995; Buxton *et al.*, 2002). El estudio sobre las células T- $\gamma\delta$ en la infección por *C. abortus*, en pequeños rumiantes, son limitados (Martínez *et al.*, 2005).

Los reportes de Buxton *et al.*, (2002) sugieren que los mecanismos de inmunidad específica frente a la infección clamidial, se basan en la acción de los linfocitos T y en la presencia de IFN- γ ; sin embargo, la importancia relativa de las subpoblaciones de linfocitos T en la respuesta mediada por células, depende de la especie de la familia *Chlamydiaceae* involucrada en el proceso infeccioso.

De forma particular, los linfocitos T-CD8⁺ son importantes en el control de la infección en respuesta a la primoinfección por *C. abortus* a través de dos vías; una es al activar los linfocitos citotóxicos para destruir células infectadas (iniciando esta lisis durante la multiplicación clamidial causando el decremento de estadios no-infectantes de *C. abortus*), y la otra vía es a través de la producción de IFN- γ , una citocina activadora de macrófagos que potencializa la acción bactericida de éstos y estimula la producción de TNF- α (Buzoni-Gatel *et al.*, 1992; Lampe *et al.*, 1998; Buendía *et al.*, 1999b).

Son los linfocitos T-CD4⁺ quienes intervienen de forma limitada en la resolución de la infección por *C. abortus*. La inmunidad en la infección secundaria se ha estudiado en *C. trachomatis*, donde se muestra que la respuesta inmune depende

fuertemente de las células T-CD4⁺, mientras que, en *C. pneumoniae*, la inmunidad se concreta a células T-CD8⁺. (Montes de Oca *et al.*, 2000).

En la respuesta celular anteriormente descrita y de forma adicional, la activación de IL-8 (por células NK), promueven el arribo de un mayor número de neutrófilos, con la subsecuente llegada de linfocitos T-CD4⁺, T-CD8⁺ y macrófagos, donde estos últimos son un nexo entre la respuesta inespecífica y la específica (Cassatella *et al.*, 1995; Ward, 1995). Los macrófagos intervienen en todas las fases de la infección clamidial al participar en la fagocitosis y por consiguiente, en la destrucción de la bacteria al internalizar y procesar los antígenos para su posterior presentación, estimulando la proliferación de linfocitos a través de un mecanismo dependiente de citocinas (Ojcius *et al.*, 1997). En estudios *in vitro*, Entrican (2002a) reporta que son los macrófagos fetales activados quienes liberan TNF- α , la cual es una citocina que aparece de forma posterior a la infección por *C. abortus in vivo*; esta citocina es incompatible con una gestación normal, ya que al activar células NK promueve el ataque del epitelio coriónico infectado, causando vasoconstricción y trombosis en el endotelio vascular como respuesta de la liberación de IL-8 por los neutrófilos, produciendo el aborto. La importancia de las células NK en la respuesta temprana a la infección por *Chlamydiae*, radica en la capacidad para secretar IFN- γ (McCafferty *et al.*, 1994).

1.7 INFECCIÓN EXPERIMENTAL EN PEQUEÑOS RUMIANTES

Buxton *et al.*, (1990) reportan que la inoculación subcutánea (s.c.) en el hombro de ovejas gestantes con *C. abortus* produce una reacción febril al día 5 post-infección (p.i.), y aborto; histológicamente se observa una pronunciada infiltración neutrofílica con extensa área de necrosis en las uniones materno-fetales, características de la infección clamidial de la placenta en condiciones naturales. Es a través de la vía s.c., que en hembras preñadas se mantiene una infección latente hasta después de los 90 días de gestación.

Los hallazgos por Buxton *et al.*, (1996) en ovejas con inoculación s.c. cerca de los linfonodos prefemorales, demuestran al corte histológico, tanto en médula como en corteza, una marcada estimulación de linfocitos T y B en respuesta a la infección por *C. abortus*, con la producción local de IFN- γ .

Análisis inmunopatológicos de placentas ovinas abortadas, revelan la presencia de abundantes células fagocíticas; macrófagos activados que producen TNF- α (Buxton *et al.*, 2002).

1.8 MODELO MURINO

El modelo murino se ha utilizado para estudiar distintos aspectos a la infección por *C. abortus* como son:

- La patogenia (Buzoni-Gatel *et al.*, 1990; Sánchez *et al.*, 1996; Kerr *et al.*, 2005).
- La respuesta inmune (Rodolakis y Bernard, 1984; Buendía *et al.*, 1998, 1999a).
- La clasificación biológica de cepas invasivas o no invasivas (Anderson, 1986; Buendía *et al.*, 1999b).

- Respuesta a la infección al utilizar diferentes rutas de inoculación, tanto en ratonas gestantes como no gestantes (cuadro 1.8.1).
- Estrategias vacunales (Rodolakis *et al.*, 1982, 1989; Caro *et al.*, 2003; Buendía *et al.*, 2007).
 - Como testigo.
 - En la búsqueda de antígenos apropiados para el desarrollo de adyuvantes.
 - En el desarrollo de vacunas vivas termosensibles.

En los años 70's se observó que la infección experimental con *C. abortus* en ratonas gestantes, producía un cuadro similar al de la infección natural en los pequeños rumiantes, con la colonización de la placenta y la manifestación del aborto (Rodolakis, 1976). Estudios recientes indican que, tras la infección intraperitoneal, los primeros órganos colonizados por la bacteria son el hígado y el bazo. Aunque la infección se realice al inicio o a la mitad de la gestación, el aborto se produce -al igual que ocurre en los rumiantes- en el último tercio. *C. abortus* se detecta durante los primeros días de la infección en la decidua basal; no obstante, las bacterias no se multiplican masivamente en la placenta, sino, hasta los días 17-18 de gestación, observándose incluso cambios que ocurren en la infección experimental de ovinos y caprinos (Blewett *et al.*, 1982; Sánchez *et al.*, 1996; Buendía *et al.*, 1998).

Cuadro 1.8.1				
Vías de inoculación de <i>C. abortus</i> y dosis infectante en el modelo murino.				
VÍA DE INOCULACIÓN	RATONAS NO GESTANTES	RATONAS GESTANTES	DOSIS INFECTANTE	REFERENCIA
Intranasal	*		8x10 ⁷ UFI/ratona	Lammert, 1982
	*		Desde 8.2x10 ⁴ hasta 1.9x10 ⁶ UFI/30µl	Huang <i>et al.</i> , 1999
Intraperitoneal	*		2x10 ⁴ ó 1x10 ⁶ UFI/10µl	Buendía <i>et al.</i> , 2002
	*		5x10 ⁶ UFI/20µl	Caro <i>et al.</i> , 2003
	*		10 ⁶ UFI/20µl	Buendía <i>et al.</i> , 2007
	*		10 ⁶ UFI/20µl	Buendía <i>et al.</i> , 2004; Del Río 2001; Martínez <i>et al.</i> , 2006; McCafferty <i>et al.</i> , 1994; Ortega <i>et al.</i> , 2007
		*	Varia por grupos desde 7x10 ³ hasta 3.8x10 ⁶ UFI/ratona	Rodolakis, 1983
		*	5x10 ⁵ UFI/200µl	Sánchez <i>et al.</i> , 1996
		*	5x10 ⁵ UFI/20µl	Buendía <i>et al.</i> , 1998
	*	*	10 ⁶ UFI/20µl	Buendía <i>et al.</i> , 1999a
	*	*	4x10 ⁴ UFP	Hécharad <i>et al.</i> , 2003
	*	*	1.5x10 ⁵ UFP	Hécharad <i>et al.</i> , 2004
	*	*	Varia entre cepas de <i>C. abortus</i> desde 4.3x10 ⁵ hasta 7x10 ⁵ UFP	Bouakane <i>et al.</i> , 2003
Intravenosa	*		10 ⁵ UFP/ratón	Buzoni-Gatel <i>et al.</i> , 1992
	*		Diferentes especies de <i>Chlamydophila</i> , entre ellas <i>C. abortus</i> con una dosis de 2x10 ⁵ UFI/100µl	Buendía <i>et al.</i> , 1999b
	*		2x10 ⁵ UFI/100µl	Del Río <i>et al.</i> , 2000
		*	2x10 ⁵ UFP	De Sa <i>et al.</i> , 1995
Subcutánea en cojinete plantar	*		5x10 ⁴ UFI/ratona	Rodolakis, 1983

Dentro de las similitudes del modelo murino con el hospedador natural, en el endometrio ovino, se encuentran las células funcional y morfológicamente análogas a las células granulocíticas de la glándula metrial (GMG) del ratón, éstas, son células inmunitarias presentes en la placenta durante la gestación que se encuentran relacionadas funcionalmente con células NK (Hansen y Lee, 1996), confiriendo protección contra agentes infecciosos (Croy, 1994). Sánchez *et al.*, (1996) demostraron que estas células son susceptibles a la infección por *C. abortus* alrededor del día 16 de gestación, por lo que se produce la liberación de proteínas citotóxicas en la zona, lo que unido a la infiltración de neutrófilos, y la acción directa de la infección bacteriana sobre el tejido placentario, debe ser suficiente para iniciar el proceso abortivo en las últimas fases de la gestación (Rodolakis *et al.*, 1998); sin embargo, Bouakane *et al.*, (2003) reportaron que no existe evidencia directa de que el aborto sea por el desarrollo clamidial en el tejido placentario y fetal, ya que no se encuentra relación directa entre el número de bacterias presentes en la placenta y la lisis de células infectadas.

Se ha observado que la infiltración de neutrófilos en la placenta de hembras infectadas con *C. abortus* causa el aborto al final de la gestación, independientemente del momento de la infección, ya sea de forma directa (relacionada con la actividad lisosomal en las células adyacentes a la decidua), o indirecta debido a los PMNs.

En la infección por *C. abortus*, los niveles de IFN- γ en el suero no se han relacionado con el número de bacterias clamidiales en placenta y tejidos fetales (Sánchez *et al.*, 1996; Buendía *et al.*, 1999a; Bouakane *et al.*, 2003).

Los PMNs son la primera línea de defensa del hígado en una infección sistémica en ratonas gestantes (Buendía *et al.*, 1999a).

Después de la inoculación intraperitoneal (i.p.) de *C. abortus*, se manifiestan signos clínicos como fiebre a partir del segundo día p.i., aunado a letargia, erizamiento del pelo, hacinamiento, conjuntivitis bilateral y, en hembras gestantes,

se manifiesta el aborto, así como la multiplicación de la bacteria en hígado y bazo. Es a través de esta vía de inoculación que Buendía *et al.*, (1998) describen que el hígado y el bazo, son los órganos blanco en una infección sistémica, y al ser colonizada la placenta de forma tardía, existe una respuesta inflamatoria mediada por macrófagos y altos niveles de TNF- α , sugiriendo que TNF- α puede ser un componente importante en la infección clamidial del tipo agudo. De igual modo a través de la inoculación i.p., Buendía *et al.*, (1999a) hallaron en el modelo murino, que *C. abortus* promueve la producción de IL-12 durante los primeros días de infección. La presencia de esta citocina en el suero fue seguida de un importante incremento de linfocitos T-CD4⁺ a partir del día 7 p.i., que aunado al IFN- γ , la respuesta inmune a este agente es del tipo Th1, similar a lo reportado con *C. trachomatis*. La presencia de IL-10 en suero a partir del día 7 p.i., es esencial para el hospedador, ya que controla los efectos excesivos de la respuesta inmune celular a los daños producidos por la inflamación.

En la inoculación intravenosa (i.v.) de *C. abortus*, se observa fiebre a partir del día 2 p.i., y es a partir de ese momento que se manifiestan los mismos signos que en la inoculación i.p. Los linfocitos T-CD4⁺ son la población celular que predomina en el parénquima hepático, incrementando el porcentaje celular de forma sustancial desde el día 5 p.i., aunque linfocitos T-CD8⁺ fueron observados de forma muy temprana en respuesta a la infección.

En experimentos con ratas infectadas con *C. trachomatis*, organismo muy relacionado con *C. abortus* por sus características inmunogénicas (Héchar *et al.*, 2004), se demuestra que la progesterona realza la susceptibilidad a la enfermedad al deprimir la respuesta inmune; sin embargo, la producción tanto de IFN- γ como de IL-10, se incrementa *in vitro* al tratamiento con progesterona, sugiriendo que la respuesta del hospedador a la infección clamidial es compleja y no totalmente polarizada en una respuesta Th1 o Th2 (Kaushic *et al.*, 2000).

La infección por *Chlamydiae* en el modelo murino es el resultado de la suma de interacciones con el organismo susceptible, cuya modulación es determinada en forma alterna por la bacteria y la célula hospedadora (Moulder, 1974; Escalante-Ochoa *et al.*, 1998, 1999). Así, aunado a lo anteriormente escrito, la raza de roedor, especie, cepa y dosis de *Chlamydiae* utilizada, duración de la infección y órgano analizado, pueden determinar los hallazgos obtenidos durante una investigación (Cuadro 1.8.2).

A pesar de esto, no se pueden extrapolar totalmente los resultados obtenidos en el ratón a la infección en rumiantes, ya que existen diferencias sustanciales entre estas especies en el tipo de placenta, así como en las bases fenotípicas de la respuesta inmune local (Bouakane *et al.*, 2003); sin embargo, al ser un animal de laboratorio con un período corto de gestación, permite reproducir de forma controlada la infección, y estudiar en detalle algunos de los parámetros relacionados con la respuesta inmune, con los que no es posible trabajar en rumiantes.

Cuadro 1.8.2: Relación de razas de ratonas y aislamiento bacteriano en primoinfección de <i>Chlamydiae</i> .							
RAZA	ESPECIE DE <i>Chlamydiae</i>	DOSIS Y VÍA DE INOCULACIÓN	AISLAMIENTO				REFERENCIA
			ÓRGANO	CC	DÍA p.i.	UFI/g	
BALB/c C57/BL6	<i>C. trachomatis</i> LGV/L2	i.v. 10 ⁶	Bazo	McCoy	14	10 ³	Lampe <i>et al.</i> , 1998
Swiss OF1	<i>C. abortus</i> AB7	i.p. 10 ⁶	Bazo	McCoy	3 5 7	10 ⁶ 10 ⁴ 10 ³	Buendía <i>et al.</i> , 1999a
CBA/J (H-2 ^k)	<i>C. abortus</i> AB7	i.v. 2x10 ⁵	Bazo	McCoy	6	10 ⁴	Buendía <i>et al.</i> , 1999b
BALB/c (H-2 ^d)	<i>C. abortus</i> B577	i.n. 10 ⁶	Hígado	BGMK	12	10 ⁵	Huang <i>et al.</i> , 1999
C57BL/6J (H-2 ^b)	<i>C. abortus</i> AB7	i.p. 10 ⁶	Hígado	McCoy	4 10 15	10 ⁷ < 10 ² < 10 ²	Del Río <i>et al.</i> , 2001
			Bazo		4 10 15	10 ⁷ 10 ⁴ < 10 ²	
Swiss OF1	<i>C. abortus</i>	i.p.	Placenta	McCoy	8		Bouakane <i>et al.</i> , 2003
	AB7	4.3x10 ⁵				10 ⁵	
	AB16	6.1x10 ⁵				10 ⁶	
	POS	5.5x10 ⁵				10 ⁴	
	LLG	7x10 ⁵				10 ⁴	
C57BL/6Ha (H-2 ^b)	<i>C. abortus</i> AB7	i.p. 10 ⁶	Hígado	McCoy	4	10 ⁷	Ortega <i>et al.</i> , 2003
BALB/c	<i>C. pneumoniae</i> AR-39	i.n.		HEp-2	14		Little <i>et al.</i> , 2005
		5x10 ⁴	Cerebro			ND	
			Hígado			10 ¹	
		5x10 ⁵	Corazón			ND	
			Cerebro			ND	
			Hígado			10 ⁴	
Corazón	10 ⁵						
Swiss Webster	<i>C. pneumoniae</i>	i.n. 10 ⁷	Pulmón	HL	3 7	10 ⁵ 10 ⁶	Campbell <i>et al.</i> , 2006
	<i>C. trachomatis</i> E			HeLa	3 7	10 ⁶ 10 ³	
	<i>C. trachomatis</i> L2				3 7	10 ⁶ 10 ⁵	
C57BL/6J (H-2 ^b)	<i>C. abortus</i> AB7	i.p. 10 ⁶	Hígado	McCoy	3	10 ⁵	Martínez <i>et al.</i> , 2006
					6	10 ⁵	
					10	10 ³	
					>10	ND	
C57BL/6J	<i>C. abortus</i> AB7	i.n. 10 ⁶	Hígado	McCoy	6	10 ⁴	Buendía <i>et al.</i> , 2007

CC: cultivo celular i.n.: intranasal i.p.: intraperitoneal i.v.: intravenosa ND: no detectable
p.i.: post-infección UFI: Unidades Formadoras de Inclusión g: gramos

2. HIPÓTESIS

El desarrollo de *Chlamydophila abortus* en un tipo particular de célula hospedadora, y administrada por vía oral, influye en la infección ulterior en animales susceptibles.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar diferencias en ratonas no gestantes y gestantes a la infección oral por *Chlamydomphila abortus* propagada en dos líneas celulares.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar el efecto del pH gástrico de las ratonas sobre la viabilidad de *Chlamydomphila abortus*.

- Infectar a ratonas gestantes y no gestantes por vía oral con *C. abortus* replicada tanto en la línea celular L929, como en la línea celular HeLa.

- Detectar el antígeno clamidial y cambios histológicos en hígado y útero mediante la prueba de Inmunohistoquímica.

- Detectar *C. abortus* en los órganos de ratonas infectadas.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 EFECTO DEL pH SOBRE LA VIABILIDAD DE *Chlamydophila abortus*

4.1.1 Medio de transporte y pH

Se preparó medio simple de transporte para mantenimiento y cultivo de clamidias [SPG (Sucrose-Phosphate/Glutamate diluent)], de acuerdo a Spencer *et al.*, (1983) (ver anexo 1).

Manejando siempre material estéril, en 8 botellas con 250 µl de SPG se ajustó el pH agregando solución de NaOH al 0.1N, y solución de HCl al 0.8N para alcalinizar o acidificar el medio respectivamente. Se midió el pH en cada una de las botellas utilizando un potenciómetro (Beckman ®) obteniendo mediciones de 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, y 7.2, mismos que se mantuvieron en refrigeración hasta el momento en que fueron empleados.

4.1.2 Bacteria

Se utilizó la cepa de *Chlamydophila abortus* A22, mantenida en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ-UNAM.

C. abortus A22 fue propagada con anterioridad en dos líneas celulares diferentes, en cultivo celular L929 (con una titulación de 3.133×10^{12} Unidades Formadoras de Inclusión [UFI]/ml), y cultivo celular HeLa (con una titulación de 6.716×10^{12} UFI/ml), de acuerdo a Escalante-Ochoa *et al.*, (1999). Las progenies resultantes se colectaron al tiempo promedio de la cepa bacteriana en formar inclusiones maduras (70 hrs), purificadas de acuerdo a McClenaghan *et al.*, (1991), se titularon y distribuyeron en alícuotas para su mantenimiento en volúmenes de 200 µl en SPG, con pH de 7.2, a -70°C . Los inóculos fueron titulados de acuerdo a Schramm y Wyrick, (1995).

4.1.3 Monoestratos celulares

Monoestratos celulares de fibroblastos L929 de ratón, se propagaron en botellas de poliestireno de 75 cm² (NUNC™). Las células fueron cultivadas en condiciones de humedad en incubadora (NUAIRE™) a 37°C con un 5% de CO₂ en un Medio Mínimo Esencial (MEM) Eagle (InVitro, México) complementado (MEM-C) (ver anexo 1).

Previo a la infección con la cepa de *C. abortus*, se prepararon monoestratos celulares en placas de poliestireno (NUNC™) de 24 pozos con cubreobjetos de vidrio estériles de 12 mm de diámetro, a una concentración de 0.9x10⁵ células/ml MEM-C/pozo, dejándose incubar 24 hrs en las condiciones antes descritas hasta obtener un 60-70% de confluencia.

4.1.4 Preparación del inóculo

El inóculo previamente descrito, mantenido a -80°C de *C. abortus*, se dejó descongelar a temperatura ambiente para realizar, posteriormente, una dilución 1:100 con SPG a un pH de 7.2. Homogeneizado este inóculo, se procedió a la dilución en cada una de las mediciones de pH (3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, y 7.2) para que la bacteria quedara en una dilución final de trabajo de 1:1000. Estos inóculos se identificaron y se incubaron en condiciones de humedad 1 hr a 37°C con 5% de CO₂. Una vez pasado el tiempo de incubación, se realizaron diluciones décuples seriadas desde 1x10⁻⁵ hasta 1x10⁻¹⁰ por triplicado en el volumen necesario para infectar los monoestratos, a razón de 150 µl por pozo correspondiente a cada valor de pH.

4.1.5 Infección de monoestratos

Al monoestrato celular con la línea L929, con un 60-70% de confluencia, se le desechó el medio de cultivo de cada pozo, y de forma inmediata, se agregaron 150 µl del inóculo mantenido en diferentes condiciones de pH. Para establecer la infección de las células, los monoestratos ya infectados se mantuvieron 1 hr en incubadora con agitación baja (+/- 50 rpm) a 37 °C en condiciones de humedad. Se adicionaron 850 µl de MEM-C a cada pozo manteniéndose así durante el proceso de infección, por 72 hrs en incubación a 37°C en humedad con 5% de CO₂, obteniendo así una dilución final del antígeno de 1:6.67 (150 µl del antígeno + 850 µl de MEM-C).

4.1.6 Cuantificación del antígeno clamidial

Finalizada la incubación de 72 hrs, a cada pozo se le retiró la totalidad del MEM-C y se realizaron 3 lavados con Solución Salina de Fosfatos (PBS) pH 7.2 (ver anexo 1) de 5 minutos cada uno. Posteriormente, una vez retirado todo el líquido, se detuvo la infección utilizando metanol frío por 10 min. Finalmente se retiró el metanol de las placas y se dejaron secar completamente.

Para la identificación de las inclusiones citoplasmáticas producidas por *C. abortus* aplicando el kit comercial IMAGEN *Chlamydia* (DakoCytomation®), se utilizó la técnica de inmunofluorescencia directa de acuerdo a las indicaciones del producto. Los anticuerpos marcados con fluoresceína, ponen de manifiesto el LPS clamidial sobre los monoestratos infectados ya fijos.

Los cubreobjetos de cada pozo en las placas infectadas y preparadas, se montaron sobre portaobjetos limpios con medio de montaje Vectashield®, observando las preparaciones en microscopio de luz ultravioleta con objetivo de 40x.

Se procedió a la titulación del antígeno clamidial, contando el número de cuerpos de inclusión (visualizados de forma fluorescente en cada uno de los cubreobjetos montados en laminillas, las cuáles, se identificaron de acuerdo a la dilución y pH correspondiente; experimento realizado por triplicado). Tras la observación, y en aquella dilución de la muestra en que se observaron de forma clara y sin error las inclusiones intracitoplasmáticas, se emanó a contar cada una de ellas, obteniendo de esta forma el número promedio de UFI.

Para obtener las UFI/ml, se procedió a utilizar la siguiente fórmula:

Número de inclusiones promedio de tres cubreobjetos X factor de dilución en el que se observaron las inclusiones X dilución final del antígeno (6.67).

4.2 INFECCIÓN EN ANIMALES SUSCEPTIBLES

4.2.1 Ratonas

Se utilizaron 120 hembras SPF de la raza NIH (laboratorio Biotinox, México), 60 nulíparas y 60 gestantes, con un peso aproximado de 24-26g, de 6-8 semanas de edad al tiempo de infección.

Los animales se dividieron en grupos y se mantuvieron en un ambiente controlado con agua y alimento *ad libitum* en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal (CENID Microbiología Animal) del INIFAP.

4.2.2 Grupos

GRUPO 1: 20 Ratonas Gestantes infectadas con *C. abortus* propagada en la línea celular HeLa.

GRUPO 2: 20 Ratonas Gestantes infectadas con *C. abortus* propagada en la línea celular L929.

GRUPO 3: 20 Ratonas Gestantes no infectadas. Control.

GRUPO 4: 20 Ratonas No Gestantes infectadas con *C. abortus* propagada en la línea celular HeLa.

GRUPO 5: 20 Ratonas No Gestantes infectadas con *C. abortus* propagada en la línea celular L929.

GRUPO 6: 20 Ratonas No Gestantes no infectadas. Control.

Se utilizaron 20 animales para cada grupo, las cuales, se colocaron en subgrupos de 5 ratonas por jaula de acuerdo al tiempo de sacrificio p.i. En cada grupo, los animales fueron sacrificados en los días 5, 7, 10 y 15 p.i. mostrados en el cuadro 4.2.2.1.

Cuadro 4.2.2.1: Grupos de ratonas de acuerdo al estado reproductivo y al grupo infectado con <i>C. abortus</i> propagada en las diferentes líneas celulares.										
GESTANTES					NO GESTANTES					TOTAL
GRUPO 1					GRUPO 2					40
HeLa	5 S=5	5 S=7	5 S=10	5 S=15	HeLa	5 S=5	5 S=7	5 S=10	5 S=15	
GRUPO 3					GRUPO 4					40
L929	5 S=5	5 S=7	5 S=10	5 S=15	L929	5 S=5	5 S=7	5 S=10	5 S=15	
GRUPO 5					GRUPO 6					40
Control	5 S=5	5 S=7	5 S=10	5 S=15	Control	5 S=5	5 S=7	5 S=10	5 S=15	
TOTAL	15	15	15	15	TOTAL	15	15	15	15	120

* S= Día de sacrificio Post-Inoculación.

* TOTAL= Número total de ratonas.

4.2.3 Desafío

Previo ayuno de 4 hrs, se procedió a instilar por vía oral 50 µl de SPG pH 7.2, con una dosis infectante de 3×10^6 UFI de *C. abortus* propagada en la línea celular L929 y HeLa respectivamente.

A las ratonas del grupo control se le administró SPG pH 7.2 únicamente. El grupo de ratonas vacías se infectaron de acuerdo al protocolo antes descrito, y el grupo de ratonas gestantes se infectaron cuando tenían 10 días +/- 1 día de gestación.

4.2.4 Sacrificio

Una vez concluidos los tiempos de infección a evaluar (5, 7, 10 y 15 días p.i.), se llevó a cabo la eutanasia mediante desnucamiento cervical de forma establecida en el manejo adecuado de animales de laboratorio de acuerdo a Estrada, (2004).

4.2.5 Colección de muestras

Realizada la necropsia en condiciones estériles, y en una campana de flujo laminar con filtros HEPA, se colectó de todas las ratonas el bazo, el cual, de forma inmediata se conservó en SPG pH 7.2 a -70°C para el aislamiento bacteriano.

El lóbulo derecho del hígado de todas las ratonas, el cuerno uterino derecho de las ratonas vacías, así como los fetos y la unión fetoplacentaria de las ratonas gestantes se fijaron en formaldehído al 10% para que, de forma ulterior, se incluyeran en bloques de parafina en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Sección de Histopatología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México, y así realizar la evaluación histopatológica y el diagnóstico del antígeno clamidial por la prueba de inmunohistoquímica.

4.3 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

4.3.1 Aislamiento clamidial

Las muestras de bazo fueron pesadas (balanza electrónica MARNE®) y maceradas, y en una relación 1:10 (peso/volumen en SPG) se procedió a la centrifugación a 3000 x g x 30 min a 4°C (Vanrompay *et al.*, 1992). Se colectó el sobrenadante, y en proporción 1:1 con SPG (peso/volumen), se incubó 1 hora a temperatura ambiente para la eliminación aquellas bacterias inespecíficas que pudieran infectar el monoestrato celular. De forma sucesiva, este inóculo se centrifugó de nuevo para la liberación del antígeno clamidial de la membrana celular y de la membrana de inclusión. El sobrenadante final se almacenó en 120 viales (60 de ratonas vacías y 60 de hembras gestantes) los cuales se identificaron y congelaron a -70°C para su análisis posterior.

Para la realización del aislamiento clamidial, se infectaron monoestratos de la línea celular L929 en la forma previamente descrita, utilizando los inóculos de las muestras de bazo a razón de 100 µl de inóculo por pozo.

Tras una incubación de 72 hrs a 37°C, 5% de CO₂ en condiciones de humedad, las microplacas se congelaron inmediatamente a -70°C. Se realizaron 5 procesos de descongelación lenta y congelación rápida para producir la lisis celular y la liberación de *C. abortus*. De forma sucesiva, se tomaron 100 µl del sobrenadante de los inóculos lisados infectando así monoestratos celulares, repitiendo el proceso por dos ocasiones más como “pases ciegos”. El monoestrato infectado del segundo pase se fijó con metanol frío conservándose a -20°C hasta la identificación por la prueba de inmunofluorescencia directa la presencia del LPS clamidial.

4.3.2 Cuantificación de UFI en el Bazo

Para establecer las UFI/ml de inóculo, se procedió de acuerdo a la siguiente fórmula:

Número de inclusiones promedio de los 5 aislamientos provenientes al grupo determinado, X factor de dilución 1:1 peso/volumen (2), X factor de dilución del segundo pase ciego ($100 \times 100 = 10^4$), X los ml del inóculo final (3.5 ml en el caso de las ratonas vacías, y 7 ml en el caso de las ratonas gestantes).

Para establecer las UFI/g de bazo, la fórmula fue la siguiente:

Número de inclusiones promedio de los 5 aislamientos provenientes al grupo determinado, X factor de dilución 1:1 peso/volumen (2), X factor de dilución del segundo pase ciego ($100 \times 100 = 10^4$), X los ml del inóculo final, X peso en g del bazo.

4.4 INMUNOHISTOQUÍMICA

En el Departamento de Anatomía y Anatomía Comparada de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, España, se realizó la prueba de inmunohistoquímica para demostrar la presencia del antígeno clamidial. Se evaluaron las muestras previamente mencionadas y conservadas en bloques de parafina, en las cuales, se realizaron cortes, utilizando un microtomo de rotación Leica modelo RM 2155 (Leica ®) de 5 μm de grosor, montando la muestra de tejido en cubreobjetos para realizar el estudio básico de tinción por la técnica de hematoxilina y eosina (H y E) para la evaluación histopatológica (Hsu *et al.*, 1981). Para el estudio inmonohistoquímico, se trabajó con la técnica Avidina-Biotina-Peroxidasa (ABC) (Martínez *et al.*, 2005), utilizando como anticuerpo primario anticuerpo policlonal anti-LPS de *Chlamydiae* desarrollado en conejo (AbCam, Cambridge, UK) en dilución 1:250.

4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Mediante la técnica de Análisis de Varianza (ANDEVA) se analizó la diferencia estadística entre las medias de los grupos en cuestión. Posteriormente, se usó la técnica de Dunnett's Method para comparar las medias de los grupos contra las medias del grupo control.

5. RESULTADOS

5.1 ESTUDIO SOBRE LA VIABILIDAD DE *Chlamydomphila abortus* A DIFERENTES pH's EN CULTIVO CELULAR L929.

Después de la incubación en diferentes pH's (desde 3.5 hasta 7.2) de la cepa A22 de *C. abortus*, se apreció una marcada disminución en la concentración de las UFI/ml conforme el medio de desarrollo tiende hacia la acidez, que va de 1.13×10^{13} UFI/ml en un pH de 7.2 hasta 4.74×10^6 UFI/ml en un pH de 3.5 mostrados en la Figura 5.1.1.

En estos resultados, cuando se somete a la bacteria a un pH de 7.2 la concentración es de 1.13×10^{13} UFI/ml y se aprecia que la mayor disminución en la concentración bacteriana se dio cuando se expuso la bacteria a un pH de 6.5 ya que la concentración logarítmica bajó a 1.68×10^8 UFI/ml.

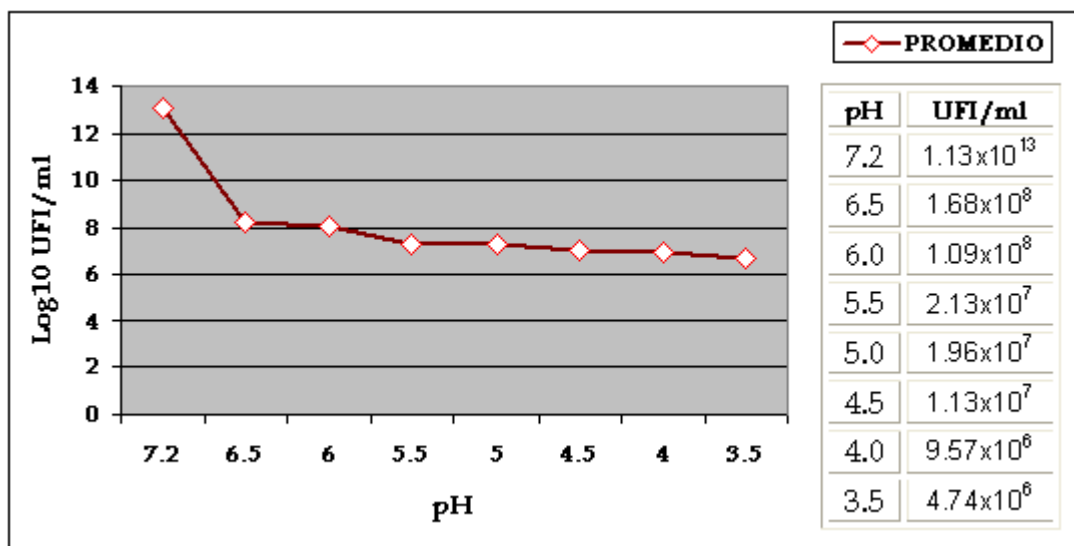


Figura 5.1.1: Desarrollo de *Chlamydomphila abortus* propagada en la línea celular L929 bajo diferentes condiciones de pH. Los resultados se expresan como el promedio de 3 experimentos independientes.

5.2 DESAFÍO EN ANIMALES SUSCEPTIBLES

5.2.1 Signos Clínicos

No se mostró signología en los grupos de ratonas infectadas con *C. abortus*.

5.2.2 Cambios macroscópicos

Se encontró evidencia de aborto en sólo una ratona del grupo gestante infectada con la bacteria replicada en células HeLa al día 10 p.i., hecho comprobado por la presencia de un moco café a nivel de la vagina. Sin embargo, no se observaron cambios sugerentes de infección por *C. abortus* en la necropsia de ninguna ratona.

En el grupo de ratonas gestantes se observaron, a la necropsia, 2 úteros vacíos en aquellas ratonas infectadas con la bacteria replicada en la línea celular L929, y 1 útero vacío con la bacteria replicada en la línea celular HeLa, ambos al día 7 p.i., siendo probable que no hayan llegado gestantes al momento de la infección, o bien, que los productos de estas ratonas hayan sido reabsorbidos.

Al día 15 p.i. todas las ratonas gestantes de ambos grupos infectados con *C. abortus*, así como los animales Control, habían parido, y en los ratoncitos no se encontraron diferencias en cuanto al tamaño de la camada, peso y tamaño entre los diferentes grupos de ratonas, tanto del grupo Control, como del grupo L929 y el grupo HeLa.

5.2.3 Peso del Bazo

Antes de procesar el bazo de todas las ratonas, se pesaron utilizando una balanza electrónica en condiciones de esterilidad.

En cuanto a las ratonas no gestantes, el peso del bazo fue variable entre los grupos de ratonas mostrados en la Figura 5.2.3.1. Dentro del análisis estadístico de estos datos, al día 7 p.i., sólo el grupo Control mostró diferencia significativa en cuanto a un peso menor con respecto al grupo HeLa y L929; y al día 15 p.i., el grupo L929 mostró ser significativamente mayor al grupo Control al tener un peso mayor en gramos del bazo.

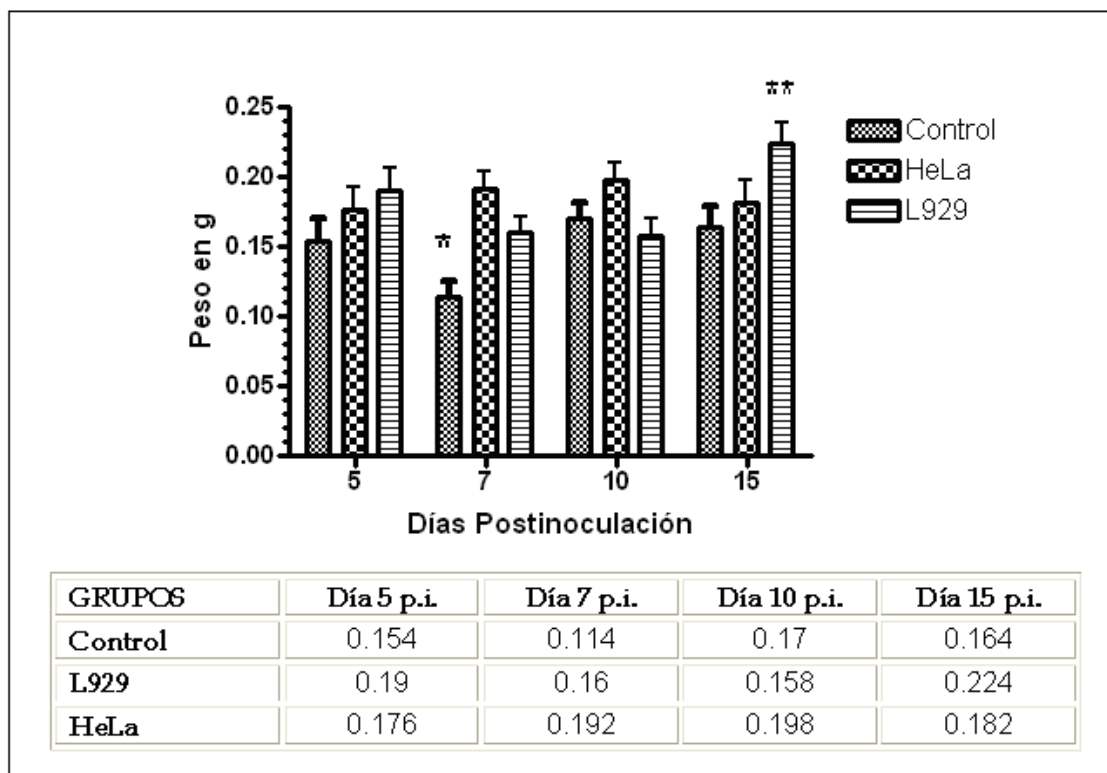


Figura 5.2.3.1: Peso del bazo en ratonas no gestantes tras la infección por vía oral con *C. abortus* propagada de forma previa en células L929 y HeLa. Los resultados se expresan como el promedio de 5 ratonas por grupo y día de sacrificio p.i.

*** Diferencia significativa ($p < 0.05$) al día 7 p.i. entre el grupo Control y los demás.**

**** Diferencia significativa ($p < 0.05$) al día 15 p.i. entre el grupo L929 y el grupo Control.**

En las ratonas gestantes, el peso del bazo varió de igual forma entre los diferentes grupos, sin embargo al análisis estadístico de los datos mostrados en la Figura 5.2.3.2 no se demuestra diferencia estadística entre los grupos de ratonas.

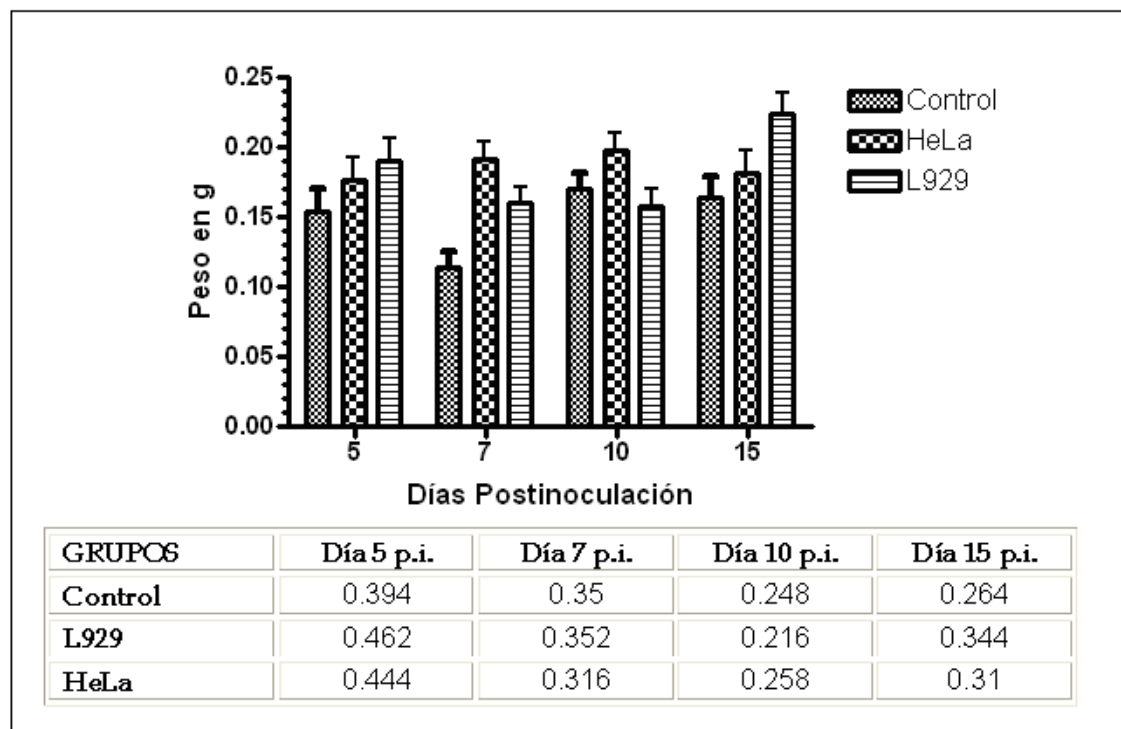


Figura 5.2.3.2: Peso del bazo en ratonas gestantes tras la infección por vía oral con *C. abortus* propagada de forma previa en células L929 y HeLa. Los resultados se expresan como el promedio de 5 ratonas por grupo y día de sacrificio p.i.

Al analizar estos resultados en relación a los datos obtenidos en las ratonas no gestantes, se observa que el peso del bazo es mayor en las ratonas gestantes, y que éste se incrementa no únicamente conforme avanza la gestación, sino también, aparentemente en relación al periodo p.i. (Cuadro 5.2.3.1).

Cuadro 5.2.3.1: Evaluación en porcentajes de la diferencia entre el peso del bazo promedio en el grupo de ratonas no gestantes con respecto al peso promedio del bazo en el grupo de ratonas gestantes de acuerdo a los días p.i. por vía oral de *C. abortus* y los días de sacrificio.

GRUPOS	Día 5 p.i.	Día 7 p.i.	Día 10 p.i.	Día 15 p.i.
Control	59%	62%	260%	141%
L929	73%	87%	242%	193%
HeLa	68%	104%	303%	157%

5.2.4 Aislamiento Bacteriano

C. abortus cepa A22 se aisló en los diferentes grupos de ratonas (Figura 5.2.4.1), demostrando en el gráfico que fue mayor el porcentaje de aislamiento en las ratonas gestantes en comparación con las ratonas no gestantes, aunque no hay evidencia de diferencia significativa entre los grupos.

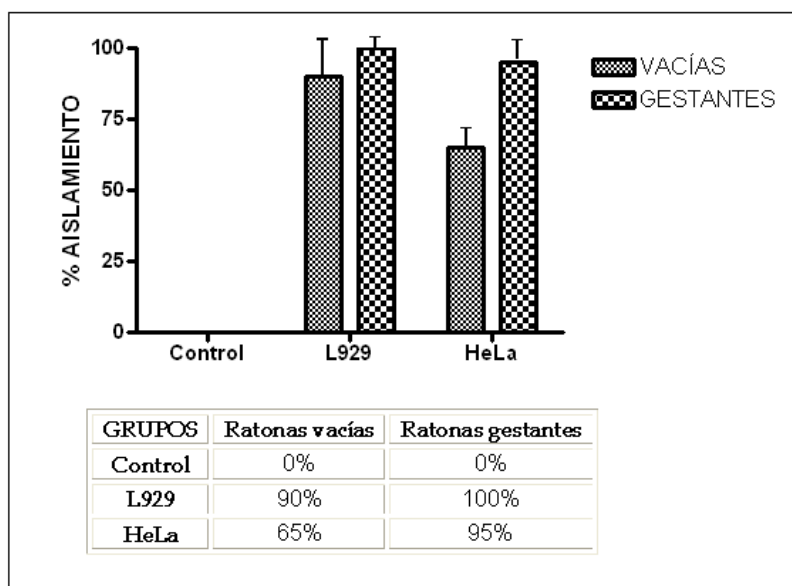


Figura 5.2.4.1: Aislamiento de *C. abortus* cepa A22 a partir del bazo de ratonas no gestantes y gestantes inoculadas con la bacteria desarrollada de forma previa en líneas celulares L929 y HeLa respectivamente.

5.2.5 Ratonas No Gestantes

Se encontró una mayor cantidad de *C. abortus* en las ratonas inoculadas con la bacteria replicada en la línea celular L929 con respecto a los grupos Control y HeLa, diferencia estadística significativa a los días 10 y 15 p.i. (Figura 5.2.5.1).

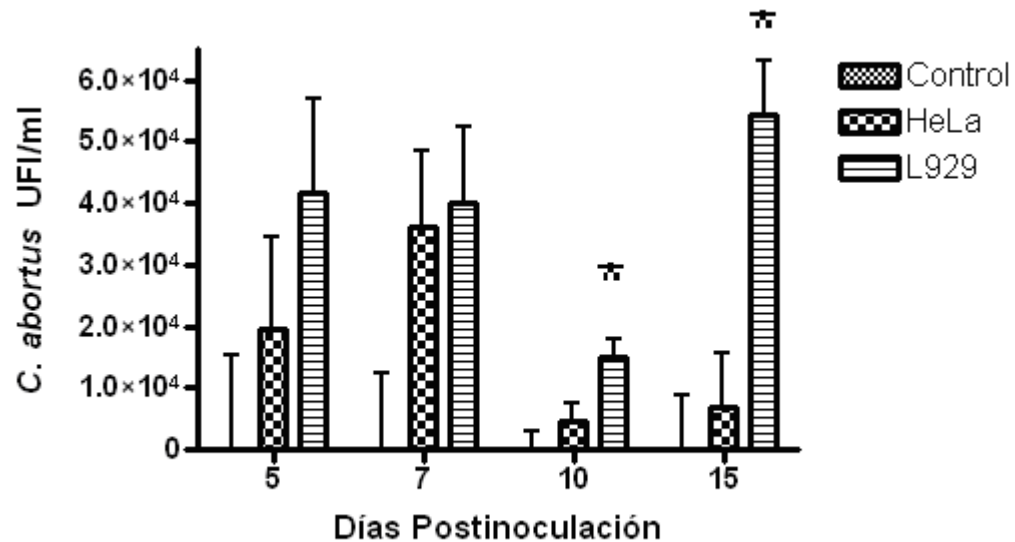


Figura 5.2.5.1: *C. abortus* aislada de bazo en Ratonas No Gestantes inoculadas con la bacteria desarrollada previamente en células L929 y HeLa. Los valores gráficos demuestran el promedio del aislamiento de los 5 bazos analizados por día p.i., así como el error estándar de los mismos.

* Diferencia significativa $p < 0.05$.

5.2.6 Ratonas Gestantes

En contraste, en este grupo de ratonas en todos los días p.i., se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos Control, las infectadas con la bacteria replicada en la línea celular L929, y aquellas infectadas con la bacteria replicada en la línea celular HeLa (Figura 5.2.6.1).

De igual manera, siempre fue mayor la cantidad de UFI/ml de *C. abortus* obtenida en el grupo L929 en comparación con la del grupo HeLa, siendo el día 5 p.i. en el que se encontraron mayor número de inclusiones, el cual fue de 7×10^4 UFI/ml, disminuyendo hasta 5.14×10^3 al día 15 p.i.

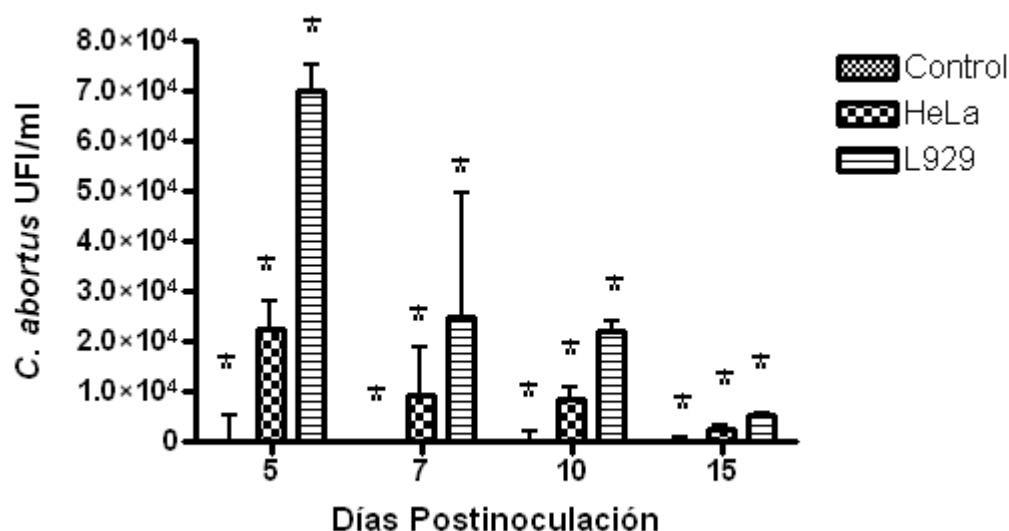


Figura 5.2.6.1: Aislamiento de *C. abortus* del bazo de Ratonas Gestantes inoculadas con la bacteria desarrollada previamente en células L929 y HeLa respectivamente. Los valores gráficos demuestran el promedio del aislamiento de los 5 bazos analizados por día p.i., así como el error estándar de los mismos.
* Diferencia significativa ($p < 0.05$).

5.2.7 Relación del Peso en g del Bazo y UFI/ml de *C. abortus*

Habiendo aislado a la bacteria en los grupos infectados con *C. abortus* propagada en dos líneas celulares en el bazo tanto de ratonas no gestantes como gestantes, se procedió al análisis de las UFI/ml por g de bazo.

En las ratonas no gestantes, el análisis estadístico de los datos, mostró que en los días 5 y 7 p.i. no hubo diferencia significativa entre los grupos muestreados ($p > 0.05$). En el día 10 p.i., el grupo L929 muestra una diferencia significativa con respecto al grupo Control, y al día 15 muestra diferencia significativa con todos los demás grupos (Control y HeLa) (Figura 5.2.7.1).

La mayor cantidad de inclusiones se observan al día 15 p.i. en el grupo L929 siendo de 1.22×10^4 UFI/g de bazo.

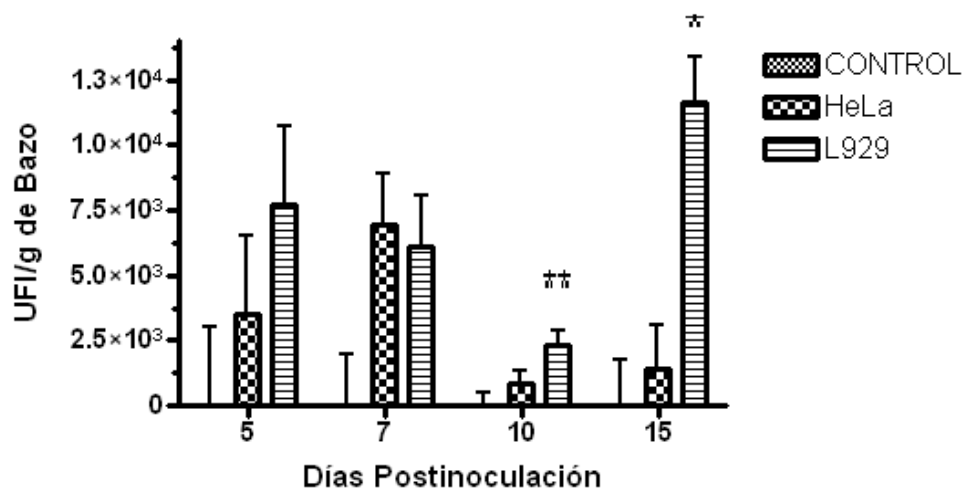


Figura 5.2.7.1: Análisis gráfico de las UFI de *C. abortus* A22 al aislamiento con respecto al valor promedio del peso en gramos del bazo en el grupo de ratonas No Gestantes. Los valores gráficos demuestran el promedio del aislamiento de los 5 bazos analizados por día p.i., así como el error estándar de los mismos.

* Diferencia significativa ($p < 0.05$) al día 15 p.i. entre el grupo L929 con respecto al grupo Control y HeLa.

** Diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el grupo L929 y el grupo Control al día 10 p.i.

En las ratonas gestantes se observa que tanto al día 5 como al día 7 p.i., se encuentra una cantidad mayor ($p < 0.05$) de microorganismos en el bazo de las ratonas infectadas del grupo L929 con respecto a los grupos Control y HeLa. Así, al día 5 p.i. la cantidad promedio de *C. abortus* en bazo encontrada en el grupo L929 fue de 3.34×10^4 UFI/g, mientras que en el grupo HeLa fue de 9.77×10^3 UFI/g. Tanto al día 10 como 15 p.i. todos los grupos muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) entre ellos (Figura 5.2.7.2).

En todos los casos, la concentración bacteriana en bazo disminuyó a lo largo del periodo de infección. En el grupo infectado con *C. abortus* propagada en células L929 se observó un decremento de aproximadamente 1.5 log, de 3.34×10^4 UFI/g al día 5 p.i. a 1.77×10^3 UFI/g al día 15 p.i., mientras que en el grupo HeLa los valores decrecieron en aproximadamente 1.0 log, de 9.77×10^3 UFI/g al día 5 p.i. a 7.94×10^2 UFI/g al día 15 p.i.

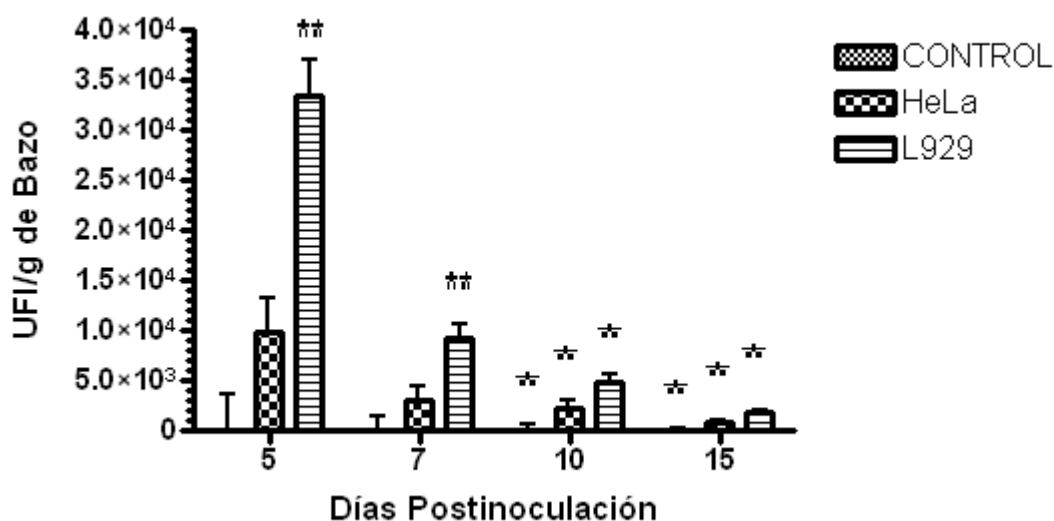


Figura 5.2.7.2: Concentración de *C. abortus* A22 en bazo (UFI/g) de ratonas gestantes inoculadas con la bacteria desarrollada previamente en células L929 y HeLa respectivamente. Los valores muestran el promedio del aislamiento de los 5 bazos analizados por día p.i., así como el error estándar de los mismos.

* Diferencia significativa entre todos los grupos ($p < 0.05$) al día 10 y 15 p.i.

** Diferencia significativa ($p < 0.05$) al día 5 y 7 p.i. entre el grupo L929 con respecto a los grupos Control y HeLa.

El análisis gráfico de la relación del peso en g del bazo y UFI/ml de *C. abortus* en ratonas no gestantes y gestantes, indican que la multiplicación del microorganismo, así como el grado de infección, fue mayor en el grupo de la bacteria replicada en la línea celular L929 a diferencia del grupo HeLa.

5.2.8 Descripción Histopatológica

Una vez colectados los órganos (hígado y útero), se procedió a su procesamiento y tinción con hematoxilina-eosina (H y E) para la observación histopatológica, cuya descripción se enumera a continuación.

En las secciones de hígado en la mayoría de las ratonas, tanto no gestantes como gestantes, y de todos los grupos (Control, L929 y HeLa), se observaron focos ocasionales y discretos de necrosis hepatocelular con escasos agregados de histiocitos y neutrófilos (Figura 5.2.8.1). En algunas áreas se observó cambio vacuolar de los hepatocitos (citoplasma claro) (Figura 5.2.8.2). Dicho cambio sugiere la presencia de glucógeno.

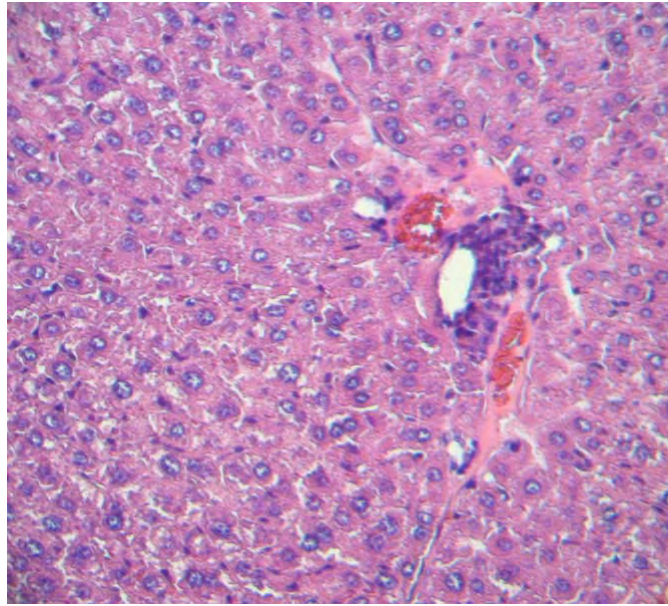


FIGURA 5.2.8.1: Corte histológico de hígado de ratona no gestante infectada con *C. abortus* replicada en la línea celular L929 al día 7 p.i., en el que se observan escasos agregados de células inflamatorias (H y E 40x).

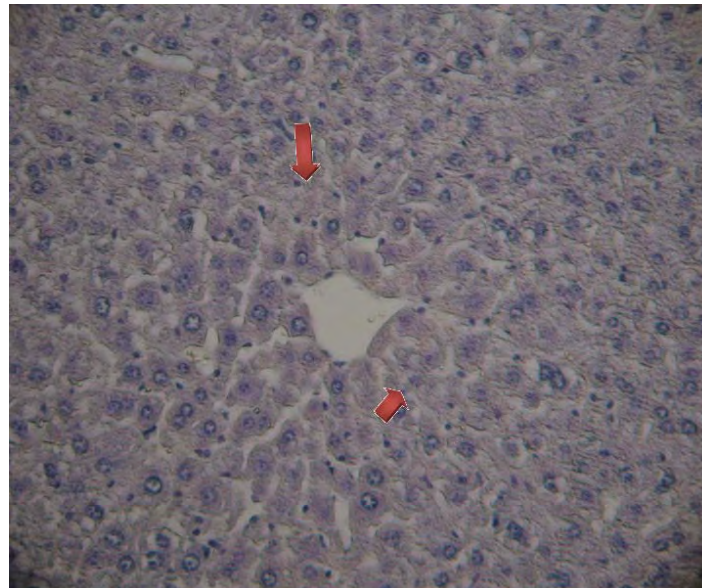


FIGURA 5.2.8.2: Corte histológico de hígado de ratona gestante infectada con *C. abortus* propagada en la línea celular HeLa al día 10 p.i., en el que se observa (flecha ➡) el citoplasma de los hepatocitos con cambio vacuolar. (ABC-Hematoxilina 40x)

En varios de los úteros gestantes, tanto de los grupos Control, L929 y HeLa se observaron pequeños agregados de neutrófilos, con menor número de histiocitos y linfocitos ocasionales distribuidos en el estroma endometrial. Asimismo, había algunos histiocitos repletos de pigmento granular ocre (hemosiderina) en el endometrio y miometrio (Figura 5.2.8.3). Algunos de los úteros gestantes mostraron membranas corioalantoideas (placenta) unidas al endometrio y la presencia de diferentes tejidos y órganos embrionarios de aspecto normal. Asimismo, la mayoría de los úteros postparto mostraron hipereosinofilia, hialinización y detritus cariorréticos en la pared de las arterias uterinas (necrosis fibrinoide). Dicho cambio está relacionado con la involución uterina postparto. Un hallazgo normal.

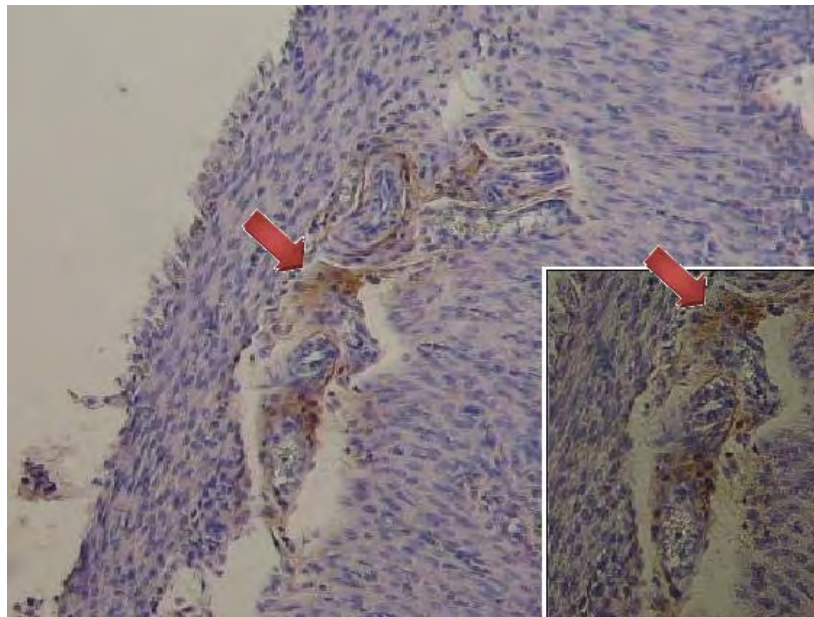


FIGURA 5.2.8.3: Corte histológico de útero de ratona del grupo control, en el que se observa (flecha ➡) hemosiderina en el endometrio (ABC-Hematoxilina 40x).

5.2.9 Inmunohistoquímica

Al estudio de las secciones de hígado y útero de las ratonas no gestantes y gestantes infectadas con *C. abortus* conservadas en formol e incluidas en bloques de parafina, en tiempos de infección de 5, 7, 10 y 15 días, las cuales se procesaron por duplicado, no se encontró evidencia del antígeno clamidial al utilizar un anticuerpo policlonal anti LPS de *Chlamydiae* desarrollado en conejo (AbCam, Cambridge, UK) en dilución 1:250.

6. DISCUSIÓN

Chlamydophila abortus, el agente causal del Aborto Enzoótico de los Pequeños Rumiantes. Se ha estudiado en animales de laboratorio, de forma específica en roedores, por la similitud que tienen las manifestaciones patológicas del aborto clamidial con los pequeños rumiantes (Buzoni-Gatel *et al.*, 1990; Sánchez *et al.*, 1996; Kerr *et al.*, 2005)

Dentro de la patogenia de *C. abortus*, Amin y Wilsmore (1995) establecen que la vía oral es la vía de entrada natural de la infección clamidial, y que a través de la colonización en tracto gastrointestinal se disemina hacia otros órganos.

El no haber detectado a *C. abortus* en las ratonas infectadas, puede estar relacionada a: la vía de administración, la respuesta inmune innata, el pH estomacal, la propagación del procariote en líneas celulares diferentes, características físicas de la membrana bacteriana y la asociación con el hospedador, así como al límite de sensibilidad de la prueba de inmunohistoquímica.

En la investigación de *C. abortus* en el modelo murino, la inoculación de la bacteria se ha realizado por diferentes vías: intranasal, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea en cojinete plantar; sin embargo, la vía de inoculación oral en roedores no se encuentra reportada en la literatura, por lo que se utiliza esta vía para el desarrollo de la infección con la cepa A22 en ratonas gestantes y no gestantes en este trabajo. Al inocular oralmente a las ratonas, no hubo evidencia alguna de signología sugerente de la infección clamidial en ninguno de los grupos analizados, y al estudio histopatológico de ratonas gestantes, no se evidenciaron focos inflamatorios ni áreas de necrosis en la placenta y en las uniones feto-placentarias, contrastando estos resultados con lo que mencionan Buendía *et al.*, (1998), Rodolakis *et al.*, (1998) y Kerr *et al.*, (2005) quienes a la inoculación

por vía i.p. en ratonas gestantes infectadas con *C. abortus*, describen que en la histopatología de la placenta hay evidencia de una fuerte infiltración de células PMNs, así como focos necróticos.

Igietseme *et al.*, (2001), al infectar ratonas con *C. trachomatis* replicada en células HeLa, reportan que la administración del microorganismo por diferentes rutas (intranasal, conjuntival, vaginal y oral), la infección de la mucosa intestinal, posterior a la inoculación oral, no presentó cambios histopatológicos en la mucosa, considerando que puede existir una disparidad a la infección por la sensibilidad de la bacteria hacia distintos tipos de células hospedadoras, lo cual también permite establecer la hipótesis de que existen variantes en cuanto a la adherencia del microorganismo a través de una interacción receptor-ligando.

Esto también ha sido mencionado en estudios efectuados con *Toxoplasma gondii* (Villard *et al.*, 1997), que al igual que *Chlamydomphila* spp. es un procarionte intracelular.

En los resultados del presente trabajo, el desarrollo de la bacteria en el hospedador pudo ser controlado por barreras anatomofisiológicas e inmunológicas en defensa del organismo. Kelly *et al.*, (1996) demostraron en ratonas infectadas con *C. trachomatis*, que el desarrollo de la infección clamidial es variable dependiendo de la ruta de inoculación, por lo que el tipo de respuesta inmune es diferente.

En trabajos de investigación en el que se utiliza al modelo murino para la inoculación oral de *Salmonella (S) enteriditis*, y *S. typhimurium*, se establece que son muchos los factores que juegan un papel importante en la resistencia del hospedador hacia la colonización bacteriana. Uno de ellos, muy importante, es la acidez del jugo gástrico (Bohnhoff *et al.*, 1964; Martinsen *et al.*, 2005), donde cambios ácidos en el pH estomacal de los roedores, ocasionan una disminución

en la concentración bacteriana evitando así la el desarrollo de la infección (Butler *et al.*, 1982; Pasquali *et al.*, 2003).

En investigaciones al desafío *in vitro* en condiciones ácidas de pH con bacterias intracelulares facultativas, Pasquali *et al.*, (2003) y KuoLee *et al.*, (2007) reconocen una disminución con tendencia a la inactivación de *Brucella abortus* a un pH de 3.3. De forma alterna, Butler *et al.*, (1982) describen, en un trabajo realizado con *Yersinia (Y) pestis*, *Y. enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, *S. typhimurium* y *Shigella flexneri*, bajo condiciones similares a las utilizadas en el presente estudio, una marcada disminución en la concentración logarítmica de las Unidades Formadoras de Colonia, hasta una tendencia negativa al cultivo en pruebas *in vitro* en condiciones ácidas de pH.

No hay evidencia en los resultados obtenidos a través de la prueba de inmunohistoquímica que demuestre que la bacteria se diseminó hacia el hígado o útero, conduciendo a la hipótesis que la dilución, del AcPo anti LPS de *Chlamydiae* utilizado en este trabajo, misma que usaron Martínez *et al.*, (2006) para evidenciar al microorganismo, no fue suficiente para detectar a la bacteria bajo las condiciones en que se sometieron a los animales en el presente estudio.

Es probable que *C. abortus* pudiera encontrarse en estado de latencia en el bazo, como lo citan Papp *et al.*, (1993) en ovejas gestantes infectadas con *C. abortus*, en el que concluyen que es difícil aislar a la bacteria cuando los animales no se han expuesto de forma previa al microorganismo, aunado a la raza de ovejas empleadas, así como a la cantidad de inóculo. La raza de ratonas utilizada en este estudio (NIH) pudo variar la resistencia del hospedador a la infección clamidial.

Los resultados de este trabajo también concuerdan con Jones *et al.*, (1988), quienes mencionan que al infectar ovejas gestantes por vía oral, no se aisló al procarionte ni existió la manifestación de aborto en ninguno de los animales; estos

autores ultiman que este hecho pudo deberse al bajo volumen del inóculo empleado.

Smith (1965) e Ilett *et al.*, (1990) reportan que el pH estomacal del ratón varía de 3.1 a 4.5. Esta variación depende del estado de estrés en que se encuentre el animal, así como el período de ayuno previo a la medición del pH. Al evaluar *in vitro* el impacto del pH ácido sobre la viabilidad bacteriana, se obtuvo una disminución logarítmica en la concentración del microorganismo conforme el medio de sostén (SPG) se acidificaba. No hay reportes en la literatura que refieran a qué pH se inhibe el crecimiento de *C. abortus*.

En el presente estudio las ratonas se sometieron a un período corto de ayuno, por lo que el pH estomacal pudo estar entre los rangos antes mencionados. La administración de *C. abortus* a razón de 3×10^6 UFI/ratona administrada por vía oral en primoinfección, no mostró evidencia de signos sugerentes a la infección clamidial. La inoculación i.p. de 10^6 UFI de *C. abortus* propagando a la bacteria en células McCoy es considerada una dosis subletal en ratonas no gestantes (Del Río *et al.*, 2001), siendo esta cantidad de microorganismo letal a la infección i.n. (Buendía *et al.*, 2007). En la administración por vía oral de 10^5 UFI/ratona de *C. trachomatis*, Kelly *et al.*, (1996) propagando a la bacteria en células McCoy, así como Igietseme *et al.*, (2001) propagando a la bacteria en células HeLa, tampoco reportan que haya evidencia de un cuadro clamidial en las ratonas.

Su *et al.*, (1990) describen en trabajos con *C. trachomatis*, que los CEs tienden a perder infectividad durante cambios drásticos de pH, asociados a cambios conformacionales de MOMP en la superficie de la bacteria, por lo que estos cambios en la capacidad infectante de la bacteria, pudieron afectar el desarrollo del procarionte en el hospedador.

MOMP es una glicoproteína rica en manosa en *C. trachomatis*, en *C. pneumoniae* y en *C. psittaci* (Campbell *et al.*, 2006; Swanson y Kuo, 1991), a la vez que existen otras proteínas glicosiladas en la superficie de *Chlamydiae*. Estudios con

C. trachomatis propagada en células HeLa, Swanson y Kuo (1994) demuestran que los glicanos interfieren con la infectividad de los CEs, y que esta interferencia no permite el proceso de unión de glicanos a células HeLa, por lo que de forma probable, la interrupción en la capacidad infecciosa del microorganismo afectó el desarrollo de la infección en el modelo murino utilizado en este trabajo al propagar la bacteria en dos líneas celulares diferentes (L929 y HeLa), ya que los carbohidratos de superficie son los involucrados en la adhesión bacteriana a la célula hospedadora.

Al utilizar las líneas celulares L929 y HeLa para la propagación de *C. abortus* cepa A22, se concluye que la hipótesis planteada para el desarrollo de este trabajo de investigación es verdadera.

Analizando lo propuesto en el objetivo general de este estudio, los resultados indican que la bacteria fue capaz de replicarse, de forma significativa, en el bazo de las ratonas gestantes cuando la bacteria utilizada para infectar a los roedores se había propagado previamente en células L929 y no cuando la propagación se realizó en células HeLa. De igual manera, al día 10 y 15 p.i. del grupo de ratonas no gestantes, el aislamiento de *C. abortus* en el bazo fue significativamente mayor cuando la bacteria administrada se había propagado en células L929. Esto pudiera deberse a variaciones en la pared celular de la bacteria determinadas por su desarrollo en un tipo particular de célula hospedadora, ya que la investigación *in vitro* para demostrar las variantes en cuanto al ataque e internalización de *Chlamydiae*, Poulakkainen *et al.*, (2005) trabajando con *C. trachomatis* y *C. pneumoniae*, y Escalante-Ochoa *et al.*, (2000b) al trabajar con *C. psittaci*, concluyen que los mecanismos de infección de la bacteria son múltiples, y muchos de ellos difieren dependiendo el tipo de célula hospedadora a infectar.

Al involucrar *Chlamydiae* las moléculas de membrana externa, como lo son los Glicosaminoglicanos (GAG), para la adhesión a la célula hospedadora (Swanson y Kuo 1990), Chen y Stephens (1997), así como Wuppermann *et al.*, (2001) demostraron que *C. trachomatis* y *C. pneumoniae* utilizan GAG-dependiente de un

receptor heparán-sulfato para infectar la célula eucariótica, por lo que la competencia por el mismo receptor pudiera inhibir la infectividad bacteriana. Es posible entonces, que la propagación de la bacteria en células diferentes a las del hospedador final (células eucarióticas epiteliales en el modelo murino), afectaran el proceso de infección en este trabajo, y por consiguiente, el que el microorganismo fuera capaz de replicarse y propagarse hacia otros tejidos. Campbell *et al.*, (2006) demuestran que las moléculas de glicanos median la infectividad bacteriana.

Escalante-Ochoa (2000a) reporta, al estudiar las variantes en el perfil de glicanos de *C. psittaci* en la superficie celular bacteriana tras su desarrollo en diferentes líneas celulares, entre las que destacan HeLa y L929, que los azúcares de las glicoproteínas de la membrana externa de la bacteria varían en relación a la célula hospedadora utilizada, por lo que puede existir una disminución significativa de la infección en células susceptibles, principalmente al afectar los procesos de adhesión; los resultados del presente estudio coinciden al demostrar que existen diferencias dependiendo de la célula en la que la bacteria se propagó, ya que fue mayor la concentración de *C. abortus* en el aislamiento en bazo de las ratonas infectadas cuando la bacteria se propagó en células L929 con respecto a la propagación en células HeLa. Este hecho coincide con Taraktchoglou *et al.*, (2001), ya que describen a la infección de tres líneas diferentes (McCoy, HeLa y Hec-1B) con *C. trachomatis*, que es la competencia a través de GAGs y el establecimiento del mecanismo de interacción bacteria-hospedero, que varía el proceso de infección, siendo claramente GAG-dependiente.

De forma alterna, y tomando en consideración que la infección en las células hospedadoras del modelo murino en el presente estudio no fue la esperada, Beswick *et al.*, (2003) reportan que debe existir una interacción electrostática de las moléculas GAGs como factor fundamental para la adhesión e internalización de la bacteria a la célula hospedadora.

Las diferencias encontradas en este trabajo de investigación, comparando la propagación bacteriana en líneas celulares diferentes, está relacionado con lo que Byrne y Moulder (1978) describen al laborar *in vitro* con *C. psittaci* y *C. trachomatis*, ya que cotejan la internalización de la bacteria en células L929 y HeLa para identificar que es el hospedero y no *Chlamydiae* la que determina el grado de infección, obteniendo como resultado, una semejanza en cuanto al ataque e ingestión de la bacteria en la célula hospedadora. Del mismo modo, Chen *et al.*, (1996) reportan en estudios *in vitro* que la diferencia en el perfil de glicanos de las líneas celulares L929 y HeLa ocasionan cambios en la infección clamidial.

En este trabajo se utilizaron tanto ratonas gestantes como no gestantes a fin de poder evaluar posibles diferencias en cuanto a la infección por *C. abortus*. En ambos grupos, el microorganismo fue aislado en el bazo de los animales infectados. A este respecto, es importante mencionar que el peso del bazo en las ratonas gestantes fue mayor en comparación a las ratonas no gestantes, concluyendo que sólo se vio influenciado por el estado reproductivo en el que se encontraban los animales y no por el grado de infección, aunque la cantidad de bacteria aislada por gramo de bazo fue mayor en el grupo de ratonas gestantes en comparación con el grupo de ratonas no gestantes (Hécharde *et al.*, 2003, 2004; Kerr *et al.*, 2005).

Cotter y Byrne (1996) mencionan en estudios *in vitro*, que el hecho de enfrentar de forma previa a la bacteria con progesterona, resulta en un aumento en la susceptibilidad del hospedador a la infección clamidial. De igual forma, se sabe que las hormonas pueden influenciar de forma significativa la diferencia entre una respuesta inmune del tipo Th1 o Th2, sugiriendo un papel importante en la manifestación del aborto al aumentar, de forma considerable, la producción de IFN- γ (Buendía *et al.*, 1999b). De forma alterna, el IFN- γ es reconocido como un potente clamidiostático (Entrican *et al.*, 1998).

En el presente estudio, la administración por vía oral de *C. abortus* cepa A22 en ratonas NIH se vio sujeta a diversos factores, y no se puede determinar qué factor jugó el papel más importante para desarrollar o no el proceso infeccioso en el modelo. Aún así, los hallazgos obtenidos en este trabajo de investigación, indican diferencias en el curso de la infección de acuerdo al hospedador en que se haya multiplicado previamente la bacteria. Es entonces que, las condiciones *in vitro* de la propagación del microorganismo, así como las características intrínsecas del modelo animal y la vía de inoculación del patógeno, influyen en la manifestación de la enfermedad por *C. abortus*.

Poder determinar el impacto que pueda tener la respuesta inmune específica a la infección clamidial por vía oral en el modelo murino, son aspectos que aún requieren ser investigados, por lo que sueros procedentes de los grupos de ratonas utilizados en este estudio se analizarán mediante la técnica de ELISA (midiendo citocinas como el IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10). Así mismo, se evaluarán mediante la técnica de inmunohistoquímica, en cortes de órganos mantenidos en congelación, células PMNs y macrófagos. De esta forma, se contribuye a producir conocimiento respecto a un problema que no había sido estudiado, lo que coadyuvará a incentivar líneas de investigación en la materia.

7. CONCLUSIONES

1. La dosis de *C. abortus* cepa A22 utilizada para infectar a los grupos de ratonas, no fue suficiente para que la bacteria fuera capaz de establecer la infección.
2. *In vitro*, la concentración logarítmica de *C. abortus* disminuye cuando el medio de cultivo tiende a la acidez.
3. La resistencia del huésped hacia la infección clamidial, fue de importancia para el desarrollo de la enfermedad.
4. La bacteria se aisló en el bazo de ratonas infectadas por vía oral en ambos grupos de ratonas.
5. La susceptibilidad de las ratonas a la infección clamidial fue diferente dependiendo del estado reproductivo, siendo mayor en las hembras gestantes.
6. La propagación *in vitro* de la bacteria en dos líneas celulares diferentes, registró diferencias significativas a la infección.
7. En los grupos de ratonas, gestantes y no gestantes, el aislamiento de la bacteria fue mayor cuando se replicó en la línea celular L929.
8. No hubo evidencia, por la prueba de inmunohistoquímica, del antígeno clamidial en hígado ni en útero de ratonas infectadas usando la dilución 1:250 del anticuerpo policlonal anti-LPS de *Chlamydiae* desarrollado en conejo.

8. REFERENCIAS

- 1.- Aitken I, Clarkson M, Linklater K. Enzootic abortion of ewes. *Vet Rec* 1990; 10: 136-138.
- 2.- Aitken I. Chlamydial abortion. *Diseases in sheep*. Oxford: Blackwell Science 2000.
- 3.- Amin J, Wilsmore J. Studies on the early phase of the pathogenesis of ovine enzootic abortion in the non-pregnant ewe. *Br Vet J* 1995; 151: 141-155.
- 4.- Anderson I. Comparison of virulence in mice of some ovine isolates of *Chlamydia psittaci*. *Vet Microbiol* 1986; 12(3): 213-220.
- 5.- Appleyard W, Aitken I, Anderson I. Attempted venereal transmission to *Chlamydia psittaci* in sheep. *Vet Rec* 1985; 116:535-538.
- 6.- Barbour A, Amano K, Hackstadt T, Perry L, Caldwell H. *Chlamydia trachomatis* has penicillin-binding proteins but not detectable muramic acid. *J Bacteriol* 1982; 151(1): 420-428.
- 7.- Barteneva N, Theodor I, Peterson E, De la Maza L. Role of neutrophils in controlling early stages of a *Chlamydia trachomatis* infection. *Infect Immun* 1996; 64: 4830-4833.
- 8.- Bavoil P, Ohlin A, Schachter J. Role of disulfide bonding in outer membrane structure and permeability in *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 1984; 44(2): 479-485.
- 9.- Beswick E, Travelstead A, Cooper M. Comparative studies of glycosaminoglycan involvement in *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis* invasion of host cells. *J Infect Dis* 2003; 187: 1291-1300.
- 10.- Blewett D, Gisemba F, Miller J, Johnson F, Clarkson M. Ovine enzootic abortion: the acquisition of infection and consequent abortion within a single lambing season. *Vet Rec* 1982; 111(22): 499-501.
- 11.- Bohnhoff M, Miller C, Martin W. Resistance of the mouse's intestinal tract to experimental *Salmonella* infection. I. Factors which interfere with the initiation of infection by oral inoculation. *J Exp Med* 1964; 1 (120): 805-816.
- 12.- Bouakane A, Benchaïeb I, Rodolakis A. Abortive potency of *Chlamydophila abortus* in pregnant mice is not directly correlated with placental and fetal colonization levels. *Infect Immun* 2003; 71(12): 7219-7222.

- 13.- Bourke S, Carington D, Frew C, McSharry C, Boyd G. A comparison of the seroepidemiology of chlamydial infection in pigeon fanciers and farmers in the U.K. *J Infect* 1992; 25: 91-98.
- 14.- Brade L, Zych K, Rozalski A, Kosma P, Boch K, Brade H. Structural requirements of synthetic oligosaccharides to bind monoclonal antibodies against *Chlamydia* lipopolysaccharide. *Glycobiology* 1997; 7(6): 819-827.
- 15.- Brown J, Entrican G. Interferon- γ mediates long-term persistent *Chlamydia psittaci* infection *in vitro*. *J Comp Pathol* 1996; 115: 185-195.
- 16.- Buendía A, Sánchez J, Martínez M, Cámara P, Navarro J, Rodolakis A, Salinas J. Kinetics of infection and effects on placental cell populations in a murine model of *Chlamydia psittaci*-induced abortion. *Infect Immun* 1998; 66(5): 2128-2134.
- 17.- Buendía A, Montes de Oca R, Navarro J, Sánchez J, Cuello F, Salinas J. Role of Polymorphonuclear Neutrophils in a Murine Model of *Chlamydia psittaci*-induced abortion. *Infect Immun* 1999a; 67(5):2110-2116.
- 18.- Buendía A, Sánchez J, Del Río L, Garcés B, Gallego M, Caro M, Bernabé A, Salinas J. Differences in the immune response against ruminant chlamydial strains in a murine model. *Vet Res* 1999; 30: 495-507
- 19.- Buendía A, Del Río L, Ortega N, Sánchez J, Gallego M, Caro M, Navarro J, Cuello F, Salinas J. B-cell deficient mice show an exacerbated inflammatory response in a model of *Chlamydochila abortus* infection. *Infect Immun* 2002; 70(12): 6911-6918.
- 20.- Buendía A, Martínez C, Ortega N, Del Río L, Caro M, Gallego M, Sánchez J, Navarro J, Cuello F, Salinas J. Natural Killer (NK) cells play a critical role in the early innate immune response to *Chlamydochila abortus* infection in mice. *J Comp Path* 2004; 130: 48-57.
- 21.- Buendía A, Nicolás L, Ortega N, Gallego M, Martínez C, Sánchez J, Caro M, Navarro J, Salinas J. Characterization of a murine model of intranasal infection suitable for testing vaccines against *C. abortus*. *Vet Immun Immunopathol* 2007; 15(1-2):76-86.
- 22.- Butler T, Fu Y, Furman L, Almeida C, Almeida A. Experimental *Yersinia pestis* infection in rodents after intragastric inoculation and ingestion of bacteria. *Infect Immun* 1982; 36(3): 1160-1167.

- 23.- Buxton D, Barlow R, Finlayson J, Anderson I, Mackellar A. Observations on the pathogenesis of *Chlamydia psittaci* infection of pregnant sheep. J Comp Path 1990; 102: 221-237.
- 24.- Buxton D, Rae A, Maley S, Thomson K, Livingstone M, Jones G, Herring A. Pathogenesis of *Chlamydia psittaci* infection in sheep: detection of the organism in a serial study of the lymph node. J Comp Pathol 1996; 114(3): 221-230.
- 25.- Buxton D, Anderson I, Longbottom D, Livingstone M, Wattegedera S, Entrican G. Ovine chlamydial abortion: characterization of the inflammatory immune response in placental tissues. J Comp Path 2002; 127: 133-141.
- 26.- Buzoni-Gatel D, Rodolakis A, Plommet M. T cell mediated and humoral immunity in a mouse *Chlamydia psittaci* systemic infection. Res Vet Sci 1987; 43(1): 59-63.
- 27.- Buzoni-Gatel D, Bernard F, Andersen A, Rodolakis A. Protective effect of polyclonal and monoclonal antibodies against abortion in mice infected by *Chlamydia psittaci*. Vaccine 1990; 8(4): 342-346.
- 28.- Buzoni-Gatel D, Guilloteau L, Bernard F, Bernard S, Chardès T, Rocca A. Protection against *Chlamydia psittaci* in mice conferred by Lyt-2+ T cells. Immunology 1992; 77(2): 284-288.
- 29.- Byrne G, Moulder J. Parasite-specified phagocytosis of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis* by L and HeLa cells. Infect Immun 1978; 19(2): 598-606.
- 30.- Caldwell H, Kromhout J, Schachter J. Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. Infect Immun 1981 Mar; 31(3): 1161-1176.
- 31.- Campbell L, Kuo C, Grayston J. Structural and antigenic analysis of *Chlamydia pneumoniae*. Infect Immun 1990 Jan; 58(1): 93-97.
- 32.- Campbell L, Lee A, Kuo C. Cleavage of the N-linked oligosaccharide from the surfaces of *Chlamydia* species affects infectivity in the mouse model of lung infection. Infect Immun 2006; 74(5): 3027-3029.
- 33.- Campbell S, Richmond S, Yates P, Storey C. Lipopolysaccharide in cells infected by *Chlamydia trachomatis*. Microbiology 1994; 140 (Pt8): 1995-2002.

- 34.- Carlin J, Weller J. Potentiation of interferon-mediated inhibition of *Chlamydia* infection by interleukin-1 in human macrophage cultures. *Infect Immun* 1995; 63(5): 1870-1875.
- 35.- Caro M, Ortega N, Buendía A, Gallego M, Del Río L, Cuello F, Salinas J. Relationship between the immune response and protection conferred by new designed inactivated vaccines against ovine enzootic abortion in a mouse model. *Vaccine* 2003; 21:3126-3136.
- 36.- Cassatella M, Meda L, Gasperini S, D'Andrea A, Ma X, Trinchieri G. Interleukin-12 production by human polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Immun* 1995; 25(1): 1-5.
- 37.- Chen J, Zhang J, Stephens R. Structural requirements of heparin binding to *Chlamydia trachomatis*. *J Biol Chem* 1996; 271(19): 11134-11140.
- 38.- Chen J, Stephens R. *Chlamydia trachomatis* glycosaminoglycan-dependent and independent attachment to eukaryotic cells. *Microb Pathol* 1997; 22: 23-30.
- 39.- Clark D, Arck P, Chaouat G. Why did your mother reject you? Immunogenetic determinants of the response to environmental selective pressure expressed at the uterine level. *Am J Reprod Immun* 1999; 41(1): 5-22.
- 40.- Cotter T, Byrne G. Immunity to *Chlamydia*: comparison of human infections and murine models. *Res Immun* 1996; 147(8-9): 587-595.
- 41.- Croy B. Granulated metrial gland cells: hypotheses concerning possible functions during murine gestation. *J Reprod Immun* 1994; 27(2): 85-94.
- 42.- Del Río L, Buendía A, Sánchez J, Gallego M, Caro M, Ortega N, Seva J, Pallarés F, Cuello F, Salinas J. Endogenous interleukin-12 is not required for resolution of *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1) infection in mice. *Infect Immun* 2001; 69(8): 4808-4815.
- 43.- Edlinger E. Biologie des *Chlamydiae*. *Bull Mém Soc Méd Paris* 1979; 7: 53-57.
- 44.- Entrican G, Brown J, Graham S. Cytokines and the protective host immune response to *Chlamydia psittaci*. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 1998; 21: 15-26.
- 45.- Entrican G, Buxton D, Longbottom D. Chlamydial infection in sheep: immune control versus fetal pathology. *J R Soc Med* 2001; 94: 273-277.
- 46.- Entrican G. Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. *J Comp Path* 2002a; 126: 79-94.

-
- 47.- Entrican G. New technologies for studying immune regulation in ruminants. *Vet Immunol Immunopathol* 2002b; 87: 485-490.
- 48.- Entrican G, Wattedgedera S, Rocchi M, Fleming D, Kelly R, Wathne G, Magdalenic V, Howie S. Induction of inflammatory host immune responses by organisms belonging to the genera *Chlamydia* / *Chlamydophila*. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; 100: 179-186.
- 49.- Escalante-Ochoa C, Rivera A, Trigo F, Romero J. Detection of *Chlamydophila psittaci* in enteric subclinical infections in adult sheep through cell culture isolation. *Rev Lat-Amer Microbiol* 1996; 38: 17-23.
- 50.- Escalante-Ochoa C, Díaz E, Segundo C, Suárez F. Isolation of *Chlamydia psittaci* involved in abortion of goats in México: First report. *Rev Lat-Amer Microbiol* 1997; 639: 117-121.
- 51.- Escalante-Ochoa C, Ducatelle R, Haesebrouck F. The intracellular life of *Chlamydia psittaci*: how do the bacteria interact with the host cell? *Microbiol Rev* 1998; 22: 65-78.
- 52.- Escalante-Ochoa C, Ducatelle R, Charlier G, De-Vos K, Haesebrouck F. Significance of host cell kinesin in the development of *Chlamydia psittaci*. *Infect Immun* 1999; 67(10): 5441-5446.
- 53.- Escalante OC. *Chlamydophila psittaci* – host cell interactions *in vitro*. (Tesis de Doctorado). Belgium, University of Ghent. 2000a.
- 54.- Escalante-Ochoa C, Ducatelle R, Haesebrouck F. Dynamics of the Development of *Chlamydophila psittaci* inclusions in epithelial and fibroblast host cells. *J Vet Med* 2000b; B (47): 343-349.
- 55.- Escalante-Ochoa C, Lazcano C, Soberón A. *Chlamydophila* spp como agente zoonótico en México. En XXXVIII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria Tuxtla Gutiérrez (Chiapas) México, 2001: 41.
- 56.- Estrada S. Métodos de eutanasia en animales domésticos, animales de laboratorio y fauna silvestre en cautiverio: estudio recapitulativo (Tesis de Licenciatura). México (D.F.), México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 2004.

- 57.- Everett K, Bush R, Andersen A. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organism. *Int J Syst Bacteriol* 1999; 49: 415-440.
- 58.- Everett K. *Chlamydia* and *Chlamydiales*: more than meets the eye. *Vet Microbiol* 2000; 75: 109-126.
- 59.- Galina C, Valencia J, Bayard P. Reproducción de los animales domésticos. 2ª ed. México: Limusa 2006.
- 60.- Grimwood J, Olinger L, Stephens R. Expression of *Chlamydia pneumoniae* polymorphic membrane protein family genes. *Infect Immun* 2001; 69(4): 2383-2389.
- 61.- Hansen P, Lee W. Immunological aspects of pregnancy: concepts and speculations using the sheep as a model. *Anim Reprod Sci* 1996; 42: 483-493.
- 62.- Hatch T. Disulfide cross-linked envelope proteins: the functional equivalent of peptidoglycan in *Chlamydiae*? *J Bacteriol* 1996; 178(1): 1-5.
- 63.- Héchard C, Grépinet O, Rodolakis A. Evaluation of protection against *Chlamydoxiphila abortus* challenge after DNA immunization with the major outer-membrane protein-encoding gene in pregnant and non-pregnant mice. *J Med Microbiol* 2003; 52: 35-40.
- 64.- Héchard C, Grépinet O, Rodolakis A. Molecular cloning of the *Chlamydoxiphila abortus* groEL gene and evaluation of its protective efficacy in a murine model by genetic vaccination. *J Med Microbiol* 2004; 53(Pt9): 861-868.
- 65.- Hsu S, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 577-580.
- 66.- Huang J, Wang M, Lenz s, Gao D, Kaltenboeck B. IL-12 administered during *Chlamydia psittaci* lung infection in mice confers immediate and long-term protection and reduces macrophage inflammatory Protein-2 level and neutrophil infiltration in lung tissue. *J Immun* 1999; 162: 2217-2226.
- 67.- Igietseme J, Portis J, Perry L. Inflammation and clearance of *Chlamydia trachomatis* in enteric and nonenteric mucosae. *Infect Immun* 2001; (69)3: 1832-1840.

- 68.- Ilett K, Tee L, Reeves Ph, Minchin R. Metabolism of drugs and other xenobiotics in the gut lumen and wall. *Pharmacol Ther* 1990; 46: 67-93.
- 69.- Ingalls R, Rice P, Qureshi N, Takayama K, Lin J, Golenbock D. The inflammatory cytokine response to *Chlamydia trachomatis* infection is endotoxin mediated. *Infect Immun* 1995; 63(8): 3125-3130.
- 70.- Jones G, Anderson I. *Chlamydia psittaci*: is tonsillar tissue the portal of entry in ovine enzootic abortion? *Res Vet Sci* 1988; 44(2): 260-261.
- 71.- Kaushic C, Grant K, Crane M, Wira C. Infection of polarized primary epithelial cells from rat uterus with *Chlamydia trachomatis*: cell-cell interaction and cytokine secretion. *Am J Reprod Immun* 2000; 44(2): 73-79.
- 72.- Kelly K, Robinson E, Rank R. Initial route of antigen administration alters the T-cell cytokine profile produced in response to the mouse pneumonitis biovar of *Chlamydia trachomatis* following genital infection. *Infect Immun* 1996; 64(12): 4976-4983.
- 73.- Kerr K, Entrican G, McKeever D, Longbottom D. Immunopathology of *Chlamydia abortus* infection in sheep and mice. *Res Vet Sci* 2005; 78(1): 1-7.
- 74.- KuoLee R, Zhao X, Austin J, Harris G, Conlan J, Chen W. Mouse model of oral infection with virulent type A *Francisella tularensis*. *Infect Immun* 2007; 75(4): 1651-1660.
- 75.- Lammert J. Cytotoxic cells induced after *Chlamydia psittaci* infection in mice. *Infect Immun* 1982; 35(3): 1011-1017.
- 76.- Lampe M, Wilson C, Bevan M, Starnbach M. Gamma interferon production by cytotoxic T lymphocytes is required for resolution of *Chlamydia trachomatis* infection. *Infect Immun* 1998; 66(11): 5457-5461.
- 77.- Lazcano C, Escalante-Ochoa C, Ducoing A. Inmunodetección de *Chlamydia abortus* en caprinos de Ecuandureo, Mich. México, mediante prueba de ELISA. En XLI Reunión Nacional de Investigación Pecuaria: Cuernavaca (Morelos), México, 2005: 29.
- 78.- Livingstone M, Entrican G, Wattedgedera S, Buxton D, McKendrick I, Longbottom D. Antibody responses to recombinant protein fragments of the major outer membrane protein and polymorphic outer membrane protein POMP90 in *Chlamydia abortus* infected pregnant sheep. *Clin Diagn Lab Immun* 2005; 12(6): 770-777.

- 79.- Little C, Bowe A, Lin R, Litsky J, Fogel r, Balin F, Fresa-Dillon K. Age alterations in extent and severity of experimental intranasal infection with *Chlamydophila pneumoniae* in BALB/c mice. *Infect Immun* 2005; 73(3): 1723-1734.
- 80.- Martínez C, Buendía A, Sánchez J, Navarro J. Immunophenotypical characterization of lymphocyte subpopulations of the uterus of non-pregnant and pregnant goats. *Anat Histol Embryol* 2005; 34: 240-246.
- 81.- Martínez C, Buendía A, Sánchez J, Ortega N, Caro M, Gallego M, Navarro J, Cuello F, Salinas J. Relative importance of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the resolution of *Chlamydophila abortus* primary infection in mice. *J Comp Path* 2006; 134: 297-307.
- 82.- Martinsen T, Bergh K, Waldum H. Gastric juice: a barrier against infectious diseases. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005; 96: 94-102.
- 83.- McCafferty M. Immunity to *Chlamydia psittaci* with particular reference to sheep. *Vet Microbiol* 1990; 25(1): 87-99.
- 84.- McCafferty M, Maley S, Entrican G, Buxton D. The importance of interferon- γ in early infection of *Chlamydia psittaci* in mice. *Immunology* 1994; 81: 631-636.
- 85.- McClenaghan M, Inglis NF, Herring AJ. Comparison of isolates of *Chlamydia psittaci* of ovine, avian and feline origin by analysis of polypeptide profiles from purified elementary bodies. *Vet Microbiol* 1991; 1:26(3): 269-278.
- 86.- Meeusen E, Scheerlinck J, Wattedegera S, Entrican G. Advances in mucosal vaccination. *Anim Health Res Rev* 2004; 5(2): 209-217.
- 87.- Montes de Oca R, Buendía A, Sánchez J, Del Río L, Seva J, Navarro J, Salinas J. Limited role of polymorphonuclear neutrophils in a pregnant mouse model of secondary infection by *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1). *Microb Pathog* 2000; 29(6): 319-327.
- 88.- Morales J. Determinación de la presencia de *Chlamydophila psittaci* en aves de compañía, aves silvestres en cautiverio y su relación con la enfermedad en humanos. (Tesis de Maestría). México (D. F.), México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 2006.
- 89.- Morrison R, Feilzer K, Tumas D. Gene knockout mice establish a primary protective role for major histocompatibility complex class II-restricted responses in *Chlamydia trachomatis* genital tract infection. *Infect Immun* 1995; 63(12): 4661-4668.

- 90.- Moulder J. Intracellular parasitism: life in an extreme environment. *J Infect Dis* 1974; 130(3): 300-306.
- 91.- Moulder J. Interaction of *Chlamydiae* and host cells in vivo. *Microbiol Rev* 1991 Mar; 55(1): 143-190.
- 92.- Munn D, Zhou M, Attwood J, Bondarev I, Conway S, Marshall B, Brown C, Mellor A. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 1998; 281: 1191-1193.
- 93.- Newhall W, Jones R. Disulfide-linked oligomers of the major outer membrane protein of *Chlamydiae*. *J Bacteriol* 1983; 154(2): 488-494.
- 94.- Novilla M, Jensen R. Placental pathology of experimentally induced enzootic abortion in ewes. *Am J Vet Res* 1970; 33: 1983-2000.
- 95.- Ojcius D, Hellio R, Dautry-Varsat A. Distribution of endosomal, lysosomal, and major histocompatibility complex markers in a monocytic cell line infected with *Chlamydia psittaci*. *Infect Immun* 1997; 65(6):2437-2442.
- 96.- Ortega N, Buendía A, Salinas J. Ensayo de vacunas inactivadas experimentales contra el aborto enzoótico ovino utilizando ratones resistentes a la infección por *Chlamydomphila abortus*. *An Vet (Murcia)* 2003; 19: 109-120.
- 97.- Ortega N, Caro M, Buendía A, Gallego M, Del Río L, Martínez C, Nicolás L, Cuello F, Salinas J. Role of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and NK cells in the protection conferred by different vaccines against *Chlamydomphila abortus* infection. *Res Vet Sci* 2007; 82: 314-322.
- 98.- Page L. Revision of the family *Chlamydiaceae* Rake (Rickettsiales) unification of the psittacosis-lymphogranuloma venereum-trachoma group of organisms in the genus *Chlamydia*, Rake and Stearns, 1945. *Int J Systematic Bacteriol* 1966; 16: 223-252.
- 99.- Page L. Proposal for the recognition of two species in the genus *Chlamydia* Jones, Rake and Stearns, 1945. *Int J Syst Bacteriol* 1968; 18: 51-66.
- 100.- Papp J, Shewen P, Gartley C. *Chlamydia psittaci* infection and associated infertility in sheep. *Can J Vet Res* 1993; 57: 185-189.
- 101.- Papp J, Shewen P. Pregnancy failure following vaginal infection of sheep with *Chlamydia psittaci* prior to breeding. *Infection and immunity* 1996; 64(4): 1116-1125.

-
- 102.- Pasquali P, Rosana A, Pistoia C, Petrucci P, Ciuchini F. *Brucella abortus* RB51 induces protection in mice orally infected with the virulent strain *B. abortus* 2308. *Infect Immun* 2003; 71(5): 2326-2330.
- 103.- Pérez-Martínez J, Storz J. Género *Chlamydia*: biología básica, propiedades antigénicas y potencial patogénico. En *Ciencia Veterinaria*, vol 4. UNAM México, 1987: 49-61.
- 104.- Perry L, Feilzer K, Caldwell H. Immunity to *Chlamydia trachomatis* is mediated by T helper 1 cells through IFN-gamma dependent and independent pathways. *J Immun* 1997; 158: 3344-3352.
- 105.- Puolakkainen M, Kuo C, Campbell L. *Chlamydia pneumoniae* uses the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor for infection of endothelial cells. *Infect Immun* 2005; 73(8): 4620-4625.
- 106.- Raghupathy R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immun Today* 1997; 18: 478-482.
- 107.- Register K, Morgan P, Wyrick P. Interaction between *Chlamydia* spp. and human polymorphonuclear leukocytes *in vitro*. *Infect Immun* 1986; 52(3): 664-70.
- 108.- Rekiki A, Sidi-Boumedine K, Souriau A, Jemli J, Hammami S, Rodolakis A. Isolation and characterization of local strains of *Chlamydia abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1) from Tunisia. *Vet Res* 2002; 33: 215-222.
- 109.- Rockey D, Scidmore M, Bannantine J, Brown W. Proteins in the chlamydial inclusion membrane. *Microbes Infect* 2002 Mar; 4(3): 333-340.
- 110.- Rodolakis A. Abortive infection of mice inoculated intraperitoneally with *Chlamydia ovis*. *Ann Rech Vet* 1976; 7(2): 195-205.
- 111.- Rodolakis A, Gestin L, Bertin A. Method of control of vaccines against ovine abortive chlamydiosis using pregnant mice. *Ann Rech Vet* 1982; 12(4): 371-377.
- 112.- Rodolakis A. *In vitro* and *In vivo* properties of chemically induced temperature-sensitive mutants of *Chlamydia psittaci* var. *ovis*: screening in a murine model. *Infect Immun* 1983; 42(2): 525-530.
- 113.- Rodolakis A, Bernard F. Vaccination with temperature-sensitive mutant of *Chlamydia psittaci* against enzootic abortion of ewes. *Vet Rec* 1984; 114(8):193-194.

- 114.- Rodolakis A, Salinas J, Papp J. Recent advances on ovine chlamydial abortion. *Vet Res* 1998; 29: 275-288.
- 115.- Rojas M. Aislamiento de *Chlamydia psittaci* en aves de ornato mediante cultivo celular y la prueba de inmunofluorescencia indirecta. (Tesis de Licenciatura). México (D. F.), México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 1996.
- 116.- Sánchez J, Buendía A, Salinas J, Bernabé A, Rodolakis A, Stewart I. Murine granulated metrial gland cells are susceptible to *Chlamydia psittaci* infection *in vivo*. *Infect Immun* 1996; 64(9): 3897-3900.
- 117.- Schramm N, Wyrick P. Cytoskeletal requirements in *Chlamydia trachomatis* infection of host cells. *Infect Immun* 1995; 63(1): 324-332.
- 118.- Shewen P. Chlamydial infection in animals: a review. *Can Vet J* 1980; (21): 2-11.
- 119.- Smith H. Observations of the flora of the alimentary tract of animals and factors affecting its composition. *J Pathol Bacteriol* 1965; 89: 95-122.
- 120.- Souriau A, Salinas J, De Sa C, Layachi K, Rodolakis A. Identification of subspecies-and serotype 1-specific epitopes on the 80-to 90-kilodalton protein region of *Chlamydia psittaci* that may be useful for diagnosis of chlamydial induced abortion. *Am J Vet Res* 1994; 55(4): 510-514.
- 121.- Spears P, Storz J. *Chlamydia psittaci*: growth characteristics and enumeration of serotypes 1 and 2 in cultured cells. *J Infect Dis* 1979; 140(6): 959-967.
- 122.- Spencer W, Johnson F. Simple transport medium for the isolation of *Chlamydia psittaci* from clinical material. *Vet Rec* 1983; 113(23): 535-536.
- 123.- Stephens R. The cellular paradigm of chlamydial pathogenesis. *Trends Microbiol* 2003; 11(1): 44-51.
- 124.- Storz J. Intrauterine chlamydial infection and abortions. *Chlamydia and Chlamydia-induced diseases*. Thomas Ed: Springfield Ill 1971.
- 125.- Stuart E, Tirrell S, MacDonald A. Characterization of an antigen secreted by *Chlamydia*-infected cell culture. *Immunology* 1987; 61(4): 527-533.
- 126.- Su H, Watkins N, Zhang YX, Caldwell H. *Chlamydia trachomatis*-host cell interactions: role of the chlamydial major outer membrane protein as an adhesin. *Infect Immun* 1990; 58(4): 1017-1025.

-
- 127.- Su H, Caldwell H. CD4⁺ T cells play a significant role in adoptive immunity to *Chlamydia trachomatis* infection of the mouse genital tract. *Infect Immun* 1995; 63(9): 3302-3308.
- 128.- Swanson A, Kuo C. Identification of lectin-binding proteins in *Chlamydia* species. *Infect Immun* 1990; 58: 502-507.
- 129.- Swanson A, Kuo C. Evidence that the Major Outer Membrane Protein of *Chlamydia trachomatis* is glycosylated. *Infect Immun* 1991; 59(6): 2120-2125.
- 130.- Swanson A, Kuo C. Binding of the glycan of the Major Outer Membrane Protein of *Chlamydia trachomatis* to HeLa cells. *Infect Immun* 1994; 62(1): 24-28.
- 131.- Taraktchoglou M, Pacey A, Turnbull J, Eley A. Infectivity of *Chlamydia trachomatis* serovar LGV but not E is dependent on host cell heparan sulfate. *Infect Immun* 2001; 69(2): 968-976.
- 132.- Toh H, Miura K, Shirai M, Hattori M. *In silico* inference of inclusion membrane protein family in obligate intracellular parasites *Chlamydiae*. *DNA Res* 2003; 10(1): 9-17.
- 133.- Tuffrey M, Falder P, Taylor-Robinson D. Reinfection of the mouse genital tract with *Chlamydia trachomatis*: the relationship of antibody to immunity. *Br J Exp Pathol* 1984; 65(1): 51-58.
- 134.- Vanrompay D, Ducatelle R, Haesebrouck F. Diagnosis of avian chlamydiosis: specificity of the modified Giménez staining on smears and comparison of the sensitivity of isolation in eggs and three different cell cultures. *Zentralbl Veterinarmed B* 1992 (39)2: 105-112.
- 135.- Villar O, Candolfi E, Ferguson D, Marcellin L, Kien T. Loss of oral infectivity of tissue cysts of *Toxoplasma gondii* RH strain to outbred swiss webster mice. *Int J Parasitol* 1997; 27(12): 1555-1559.
- 136.- Vora G, Stuart E. A role for the glycolipid exoantigen (GLXA) in chlamydial infectivity. *Curr Microbiol* 2003; 46(3): 217-223.
- 137.- Ward M. The immunobiology and immunopathology of chlamydial infections. *APMIS* 1995; 103: 769-796.
- 138.- Webley W, Vora G, Stuart E. Cell surface display of the chlamydial glycolipid exoantigen (GLXA) demonstrated by antibody-dependent complement-mediated cytotoxicity. *Curr Microbiol* 2004; 49: 13-21.

-
- 139.- Williams D, Magee D, Bonewald L, Smith J, Bleicker C, Byrne G, Schachter J. A role *in vivo* for tumor necrosis factor alpha in host defense against *Chlamydia trachomatis*. Infect Immun 1990; 58(6): 1572-1576.
- 140.- Wong S, Gray E, Buxton D, Finlayson J, Johnson F. Acute placentitis and spontaneous abortion caused by *Chlamydia psittaci*: a histological and ultrastructural study. J Clin Pathol 1985; 38: 707-711.
- 141.- Wuppermann F, Hegemann J, Jantos C. Heparan sulfate-like glycosaminoglycan is a cellular receptor for *Chlamydia pneumoniae*. J Infect Dis 2001; 184: 181-187.
- 142.- Yuan Y, Zhang Y, Watkins N, Caldwell H. Nucleotide and deduced amino acid sequences for the four variable domains of the major outer membrane proteins of the 15 *Chlamydia trachomatis* serovars. Infect Immun 1989 Apr; 57(4): 1040-1049.
- 143.- Zhang J, Stephens R. Mechanism of *C. trachomatis* attachment to eukaryotic host cells. Cell 1992; 69(5): 861-869.

9. ANEXO

Técnicas y preparación de medios y reactivos

- SPG
(Sucrose-Phosphate/Glutamate diluent)

Solución para preparar 1 L	
Sucrosa	74.6 g/L
KH ₂ PO ₄	0.512 g/L
K ₂ HPO ₄	1.273 g/L
L-Glutamina	1 %

Esterilizar por autoclave y agregar...

SFB	5 - 10 %
Estreptomicina	100 µg/ml
Gentamicina	50 µg/ml

- MEM-C
(Medio para Cultivo Celular – Complementado)

Aminoácidos No Esenciales	1 %
L- Glutamina	1 %
SFB	10 - 15 %
Gentamicina	10 µg/ml
Estreptomicina	100 µg/ml

- PBS
(Solución Salina de Fosfatos. 0.01 Molar; NaCl 0.15 Molar; pH 7.2)

Solución para preparar 500 ml	
Agua Bidestilada	400 ml
PBx (Solución de Fosfatos)	50 ml
NaCl	4.37 g

- PBx
(Solución de Fosfatos)

Solución para preparar 500 ml	
Agua Bidestilada	100 ml
$\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$	1.31 g
Na_2HPO_4	5.75 g

10. ABREVIATURAS

AcPo	---	Anticuerpo policlonal
ADN	---	Ácido desoxirribonucleico
AEO	---	Aborto enzoótico ovino
AEPR	---	Aborto enzoótico de los pequeños rumiantes
Ag	---	Antígeno
ANDEVA		Análisis de varianza
ARNr	---	Ácido ribonucleico ribosomal
ATP	---	Adenosín-trifosfato
<i>C. abortus</i>	---	<i>Chlamydophila abortus</i>
CE	---	Cuerpo elemental
CO ₂	---	Dióxido de carbono
COMC	---	Complejo externo de la membrana clamidial
CR	---	Cuerpo reticular
FMVZ	---	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
GAGs	---	Glucosaminoglicanos
GLXA	---	Exoantígeno glicolípido
GMG	---	Células granulocíticas de la glándula metrial
i.p.	---	Intraperitoneal
i.v.	---	Intravenosa
IDO	---	Indolamina 2,3-dioxigenasa
IgG	---	Inmunoglobulina G
IL	---	Interleucina
INF- γ	---	Interferón-gamma
INIFAP	---	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
kDa	---	Kilodalton
KDO	---	Ácido 3-deoxi-alfa-D-mano-octulosónico
LPS	---	Lipopolisacárido
MEM	---	Medio mínimo esencial
MEM-C	---	Medio mínimo esencial complementado
MHC	---	Complejo mayor de histocompatibilidad
MOMP	---	Proteína principal de la membrana externa
NK	---	Células destructoras naturales
Omp2	---	Proteína (mayor) de la membrana externa rica en cisteína 2
Omp3	---	Proteína (menor) de la membrana externa rica en cisteína 3
p.i.	---	Post-infección
PBS		Solución salina de fosfatos
PGE ₂	---	Prostaglandina E ₂
pH	---	Potencial de hidrógeno
PMNs	---	Polimorfonucleares
Pmps	---	Proteínas polimórficas de la membrana externa

s.c.	---	Subcutánea
SFB	---	Suero fetal bovino
SPG	---	Sucrose-Phosphate/Glutamate diluent
SST-III	---	Sistema de secreción tipo-III
T-CD4 ⁺	---	Linfocitos T colaboradores
T-CD8 ⁺	---	Linfocitos T citotóxicos
TGB-β	---	Factor transformador de crecimiento-beta
Th1	---	Linfocitos T efectores tipo 1
Th2	---	Linfocitos T efectores tipo 2
TNF-α	---	Factor de necrosis tumoral-alfa
T-γδ	---	Linfocitos T gamma-delta
UFI	---	Unidades formadoras de inclusión
UNAM	---	Universidad Nacional Autónoma de México