

**EVALUACIÓN DE LA HISTOMORFOLOGÍA PLACENTARIA MURINA
(*Mus musculus*) LUEGO DE UNA ENTEROCOLITIS POR *Salmonella* Enteritidis
EN UN ESTADIO TARDÍO DE LA GESTACIÓN**

DIANA MARCELA BETANCOURT GORDILLO

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD, ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA
SANTIAGO DE CALI
2018**

**EVALUACIÓN DE LA HISTOMORFOLOGÍA PLACENTARIA MURINA
(*Mus musculus*) LUEGO DE UNA ENTEROCOLITIS POR *Salmonella* Enteritidis
EN UN ESTADIO TARDÍO DE LA GESTACIÓN**

DIANA MARCELA BETANCOURT GORDILLO

Trabajo de Investigación para optar al título de
Magister en Ciencias Biomédicas

Tutor

MÒNICA GIACOMODONATO

Doctora en Química Biológica
Investigadora Adjunta CONICET- JTP Microbiología
Facultad de Medicina
Universidad de Buenos Aires

Tutor

MARÍA CAROLINA PUSTOVRH RAMOS

Doctora en Ciencias Biológicas
Investigador Senior Colciencias
Docente del Departamento de Morfología
Universidad del Valle

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD, ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA
SANTIAGO DE CALI
2018**

Nota de aceptación:

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Ciudad y fecha _____

DEDICATORIA

Fueron tantas las personas que de una u otra forma me aportaron durante mi formación en la maestría, que dedico este logro a cada una de ellas. **A mi hermana, mi madre, mis abuelos**, por ser el motor de mi vida. **A mis grandes amigos del Departamento de Morfología Univalle**, por su apoyo incondicional, su compañía, por todas las carcajadas y todos los buenos momentos que pasamos dentro y fuera de la universidad. **A Edison Molina**, por estar siempre presente en los momentos que más necesitaba. Al grupo de investigación **TEBLAMI y el IMPaM**, por acogerme y darme la oportunidad de formar parte de ustedes.

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Carolina Pustovrh, gracias por haberme guiado en todo momento, por ser amiga, profesora y un gran ejemplo de persona.

A la Doctora Mónica Giacomodonato, gracias por la confianza, el apoyo y por poner una sonrisa y buen humor en cada situación que compartimos, profe eres la “Reina”.

Un agradecimiento muy especial a la profesora Liliana Salazar, por todo su apoyo y colaboración, por abrirme las puertas al grupo TEBLAMI y por transmitir todos sus conocimientos para culminar con éxito esta investigación. Mil Gracias a la docente y a la amiga.

Gracias a Martha Ceballos, Norha Holguín y Gustavo Villa por su orientación y asesoría durante mi trabajo en el Laboratorio de Histología y ante todo por su paciencia frente alguna “travesura” que ocasione en el laboratorio.

A mis amigos, Yhoiss, Anita, Jennifer, Marcela, Luis, Andrés, Daniela, Lina, Sindy, Sebastian, gracias por su apoyo, por los momentos de alegría y diversión, su ayuda también fue invaluable en mi formación.

A los miembros de TEBLAMI, gracias por sus aportes y sugerencias que fueron vitales para sacar adelante este trabajo. Gracias por hacer de TEBLAMI la gran Familia Académica.

A los doctores miembros del IMPaM de la Universidad de Buenos Aires, María-Angeles Noto-Llana, Ailin Garófalo, Cristina Cerquetti y Sebastian Sarnacki, gracias por su apoyo en el laboratorio y por todos los conocimientos adquiridos durante mi estancia en el instituto.

TABLA DE CONTENIDO

	pág.
1. RESUMEN	13
2. INTRODUCCIÓN	14
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. MARCO TEÓRICO	18
4.1 Enfermedades Transmitidas por los Alimentos (ETA).....	18
4.2 Generalidades de <i>Salmonella</i>	19
4.2.1 <i>Salmonella</i> : Un agente patógeno de transmisión por alimentos	21
4.2.2 Patogenia de la infección por <i>Salmonella</i> entérica	23
4.3 Mujeres embarazadas, población vulnerable frente a las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)	23
4.4 Modelo de enterocolitis murina.....	24
4.5 Estudio de las complicaciones originadas durante la preñez asociadas a enterocolitis por <i>Salmonella</i> Enteritidis durante la etapa tardía de la gestación.....	26
4.6 Reportes de casos clínicos.....	27
4.7 Características de la placenta murina.....	29
5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	31
6. OBJETIVOS	32
OBJETIVO GENERAL	32
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32

7. METODOLOGÍA.....	33
7.2. Primera fase experimental.....	35
7.2.1 Animales.....	35
7.2.2 Condiciones de confinamiento y apareamiento del biomodelo experimental....	35
7.2.3 Cepa bacteriana y condiciones de crecimiento.	35
7.2.4 Diseño experimental del modelo de enterocolitis murino.....	36
7.2.5 Obtención de órganos maternos y unidades feto-placentarias.....	37
7.2.6 Análisis de colonización bacteriana en muestras de órganos maternos y unidades feto-placentarias	40
7.3. Segunda fase experimental	41
7.3.1 Estudio de los cambios histomorfológicos placentarios.....	41
7.3.2 Mediciones morfométricas macroscópicas de la placenta.....	42
Peso placentario (PP).....	42
Diámetro placentario (DP) y superficie placentaria (SP).	40
Grosor placentario..	42
7.3.3 Procesamiento histoquímico de las placentas.....	43
Criterios de inclusión de cortes histológicos.....	43
Criterios de exclusión de cortes histológicos.....	43
7.3.4 Observación y análisis histológico de las placentas..	44
7.3.5 Captura de imágenes para análisis morfométrico microscópico.....	44
7.3.6 Mediciones morfométricas microscópicas de la placenta.....	44
7.3.7 Medición del grosor placentario (GP) y del grosor de la zona de laberinto (GZL)	45
7.3.8 Medición del área placentaria (AP) y el área de la zona del laberinto (AZL).....	45
7.3.9 Prueba de concordancia intra e inter observador	46

Mediciones macroscópicas.....	46
Mediciones microscópicas.....	46
7.4 Análisis Estadístico	47
8. RESULTADOS	48
8.1 Estudio de la colonización de los órganos internos por <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	48
8.2 Análisis de correlación de las variables de medición macroscópica y microscópica de la placenta.....	49
8.3 Efecto de <i>Salmonella</i> Enteritidis sobre la morfometría macroscópica placentaria en un estadio tardío de la preñez	50
8.4 Efecto de <i>Salmonella</i> Enteritidis sobre la morfometría microscópica placentaria en un estadio tardío de la preñez	51
8.5 Caracterización histológica de la placenta de 18 dg en condiciones de normalidad	60
Caracterización de la zona decidual placentaria.	60
Caracterización de la zona de unión.	60
i) Células trofoblásticas gigantes..	60
ii) Las células espongiotrofoblásticas.....	60
iii) Las células glucogénicas..	61
9. DISCUSIÓN.....	66
9.1 Efecto de <i>S. Enteritidis</i> sobre la morfometría placentaria	68
9.2 Efecto de <i>Salmonella</i> Enteritidis sobre la morfología placentaria.....	69
CONCLUSIONES	73
BIBLIOGRAFIA	
ANEXOS	

LISTAS DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Efecto de la infección por <i>Salmonella</i> en pacientes embarazadas.....	27
Tabla 2. Placentas de estudio.....	40
Tabla 3. Variables macroscópicas placentarias.....	42
Tabla 4. Variables microscópicas placentarias.....	44
Tabla 5. Valoración del coeficiente kappa.....	47
Tabla 6. Colonización de <i>S. Enteritidis</i> (UFC/g) a nivel de órganos maternos y unidad feto-placentaria.....	48
Tabla 7. Prueba intra-observador e inter-observador de las variables macroscópicas.....	50
Tabla 8. Prueba intra-observador e inter-observador de las variables microscópicas..	50
Tabla 9. Alteraciones histomorfológicas en placentas procedentes de hembras gestantes infectadas con <i>S. Enteritidis</i>	55

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Principales patógenos que produjeron ETA en el año 2016 en EE.UU.....	19
Figura 2. Características de la placenta murina vs la placenta humana.....	30
Figura 3. Modelo de enterocolitis con <i>Salmonella</i> Enteritidis en hembras gestantes BALB/c en la etapa tardía de la preñez.....	37
Figura 4. Esquema de ubicación de las placentas en los cuernos uterinos del biomodelo murino.....	39
Figura 5. Toma de mediciones macroscópicas de la placenta murina.....	43
Figura 6. Representación de las mediciones microscópicas del grosor placentario (GP) y grosor de la zona de laberinto (GZL).....	45
Figura 7. Representación de las mediciones microscópicas del área placentaria total (AP) y área zona de laberinto (AZL).....	46
Figura 8. Comparación de las variables macroscópicas placentarias entre los tres grupos de estudio.....	52
Figura 9. Comparación de las variables microscópicas placentarias entre los tres grupos de estudio.....	53
Figura 10. Organización histológica de la placenta murina de 18 dg.....	56
Figura 11. Zona decidual de una placenta infectada con <i>Salmonella</i> Enteritidis tres días post-infección.....	57
Figura 12. Zona decidual de una placenta infectada con <i>Salmonella</i> Enteritidis tres días post-infección.....	58
Figura 13. Zona decidual de una placenta infectada con <i>Salmonella</i> Enteritidis tres días post-infección.....	59
Figura 14. Depósitos de calcio en la placenta murina de 18 dg.....	62

Figura 15	Células trofoblásticas gigantes (CTG) en la zona de unión de la placenta murina de 18 dg.....	63
Figura 16.	Células glucogénicas (CG) y espongiotrofoblastos (ES) en la zona de unión de la placenta murina de 18 dg.....	64
Figura 17.	Zona de laberinto de la placenta murina de 18 dg.....	65

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo 1. Aval del comité de ética (CEAS) – Universidad del Valle.....	83
Anexo 2. Aval comité de ética – Universidad de Buenos Aires.....	86
Anexo 3. Procedimiento operativo estándar para la inmovilización de murinos <i>Mus musculus</i> y suministro de sustancias vía oral.....	88
Anexo 4. Procedimiento operativo estándar para la eutanasia de <i>Mus musculus</i> BALB/c a través de la cámara de dióxido de carbono.....	97
Anexo 5. Procedimiento operativo estándar para la obtención de placentas de murinos <i>Mus musculus</i> en la gestación tardía.....	103
Anexo 6. Procedimiento operativo estándar para el procesamiento histoquímico de la placenta murina (<i>Mus musculus</i>).....	110

RESUMEN

Las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) por *Salmonella* representan un gran riesgo durante el embarazo. El objetivo de este estudio fue analizar las alteraciones histomorfológicas placentarias que se originan a partir de una ETA por *Salmonella* Enteritidis durante un estadio tardío de la gestación en murinos. Para ello, se aplicó un modelo de enterocolitis: 26 ratones BALB/c gestantes se distribuyeron aleatoriamente en tres grupos. **Grupo experimental:** 10 biomodelos preñados pretratados con estreptomicina e infectados al día 15 de gestación con una dosis subletal (10^3 UFC) de *Salmonella* Enteritidis. **Grupo control:** ocho biomodelos preñados sin infección ni tratamiento con estreptomicina. **Grupo sham:** ocho biomodelos preñados tratados con estreptomicina al día 14 de la gestación. Al día 18 de la preñez, todas las hembras se sacrificaron y explantaron sus órganos (intestino, bazo, útero) y unidades feto-placentarias, para posteriores ensayos. Los resultados demostraron una alta eficiencia del patógeno para colonizar los órganos maternos, la placenta y el feto a los tres días post-infección. A partir de las mediciones de las variables morfométricas macroscópicas, se observó una disminución significativa en los diámetros (mayor y menor) y en el área superficial de las placentas del grupo experimental, con respecto a las placentas del grupo control y sham ($p < 0.05$). El peso placentario no difirió en los tres grupos de estudio ($p > 0.05$). Por el contrario, las variables de medición microscópica: grosor placentario, grosor zona de laberinto, área placentaria y área zona de laberinto, no evidenciaron diferencias significativas entre los grupos evaluados ($p > 0.05$). A su vez, las placentas infectadas mostraron grandes focos de necrosis con infiltración inflamatoria de tipo neutrófilo (PMNs) a nivel decidual, acompañado de células en cariorrexis o cariólisis. Mientras que en la zona de unión y la zona de laberinto se observaron cambios histomorfológicos normales compatibles con la edad gestacional. En este trabajo se demuestra que una ETA por *Salmonella* Enteritidis en un modelo murino preñado induce una significativa colonización de la placenta que se traduce en alteraciones morfométricas e histomorfológicas en la zona materna sin compromiso aparente de las zonas fetales, sugiriendo un tropismo diferencial de la bacteria en esta zona luego de tres días post-infección.

INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud define a las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) como una enfermedad de naturaleza infecciosa o debida a toxinas, causada por agentes que ingresan al organismo a través del consumo de agua y alimentos (OMS, 2007). Se han descrito más de 250 agentes causales de ETA entre los que se incluye a *Salmonella enterica*, una bacteria Gram negativa distribuida en prácticamente todas las regiones del planeta, capaz de contaminar agua y alimentos (CDC & MMWR, 2011). En Estados Unidos, el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) estimó que en el año 2013, *Salmonella* spp. no tifoidea, produjo 1.2 millones de casos de ETA siendo, además la primera causa de hospitalización y muerte (Scallan et al., 2011; CDC, 2012; Painter et al., 2013). En Colombia, en el periodo 2000-2013 fueron reportados 7.424 aislamientos de *Salmonella*, 97.2% procedentes de coprocultivos y 2.8% de muestras de agua y alimentos. Entre los brotes de *Salmonella* confirmados la serovariedad Enteritidis fue la más común, seguida por Typhimurium (Instituto Nacional de Salud, 2016). Esta misma prevalencia se registra en EEUU (Chai et al., 2012) y en Argentina (Boletín epidemiológico, 2006).

Las poblaciones en riesgo para las infecciones extraintestinales por serovariedades no tifoideas de *Salmonella* incluyen a los adultos mayores, los niños, los pacientes transplantados y/o con HIV y las mujeres embarazadas (Doffinger et al., 2005). En este sentido, el embarazo, estado de tolerancia inmunológica, es una condición predisponente para el desarrollo de infecciones con patógenos intracelulares. En el embarazo, la infección por *Salmonella* puede causar complicaciones tales como endometritis, salpingitis, corioamnionitis, infección transplacentaria fetal, aborto séptico, septicemia neonatal y materna, parto pretérmino y preeclampsia (Hedriana et al., 1995; Van der Klooster et al., 1997; Schloesser et al., 2004; Mor, 2008; Pejic-karapetrovic et al., 2007). Una clara evidencia son los casos clínicos expuestos por Scialli & Rarick (1992), Van der Klooster & Roelofs (1997), Gyang & Saunders (2008), Ozer et al. (2009), donde se manifiesta que *Salmonella* puede ser altamente letal para el feto o recién nacido y sin efecto aparente sobre la madre.

Recientemente, se encontró que una infección subletal oral por *Salmonella* Enteritidis en un modelo murino preñado de enterocolitis es suficiente para generar una masiva colonización del

intestino, placas de Peyer, bazo, útero, placenta y feto que resulta incompatible con el mantenimiento de una preñez saludable. Los resultados obtenidos demuestran una exacerbación de la infección en las hembras gestantes respecto de los controles (animales no preñados). Sin embargo, no se observó un efecto negativo sobre la madre, presentando una supervivencia del 100% (Noto-Llana et al., 2014).

El mecanismo por el cual se producen las complicaciones en el embarazo luego de una infección entérica por *Salmonella enterica* se desconoce. Se asume que es un proceso multifactorial, que combina tanto las características del microorganismo como las del huésped. Por lo tanto, evaluar los cambios histomorfológicos placentarios luego de la infección bacteriana en un biomodelo murino (*Mus musculus*), contribuirá no solo al establecimiento de una herramienta para el diagnóstico de infecciones placentarias, sino que además permitirá ponderar la importancia del estudio de la placenta cuando se producen anomalías durante la gestación a causa de una ETA.

3. JUSTIFICACIÓN

Durante el embarazo la placenta desempeña un papel crucial en el desarrollo y crecimiento fetal. La conexión que este órgano establece entre la madre y el feto, además de facilitar el intercambio de nutrientes, oxígeno y desechos, contribuye a la síntesis y transporte selectivo de hormonas y neurotransmisores (Catov et al., 2015; Roescher., 2014)

A pesar de las múltiples funciones que desencadena la placenta en pro del mantenimiento saludable del feto y de la madre gestante, es quizás el órgano menos comprendido (Guttmacher et al., 2014) y sin duda uno de los que menor interés despierta para ser investigado en el ámbito médico y científico, e incluso hasta se considera un “órgano olvidado” (Yoshizawa et al., 2013).

Al respecto, según Cortés & Muñoz (2007), en el campo médico se desconoce la verdadera utilidad clínica que representa el estudio de la placenta, por lo que es común que este órgano se deseche junto con otros residuos médicos luego de confirmarse que está completo, pues se cree que no aporta información útil para el obstetra. Únicamente en casos específicos como abortos y defectos metabólicos la unidad feto-placentaria se conserva para ser analizada.

Ante la limitada comprensión de la placenta humana y la poca relevancia que despierta su estudio en los profesionales de la salud, muchas de las anomalías que se presentan durante el embarazo no son explicadas y por lo tanto se consideran de difícil diagnóstico. Un claro ejemplo son las complicaciones que ocurren durante la gestación y que pueden estar asociadas a una enterocolitis por *Salmonella enterica*, un agente patógeno que luego de haber sido ingerido mediante el consumo de agua o alimentos contaminados, es capaz de desencadenar corioamnionitis, infección fetal transplacentaria, muerte neonatal, parto prematuro, abortos espontáneos, septicemia neonatal y materna (Schloesser et al., 2004; Krishnan et al., 2013).

Aunque en Colombia entre los años 2000 y 2013 *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Enteritidis, fueron las serovariedades que se aislaron con más frecuencia a partir de muestras clínicas, de agua y de alimentos (Instituto Nacional de Salud (2014), no hay un señalamiento claro si estos patógenos procedían de alguna mujer gestante. Esto no significa que las embarazadas

no hayan sido un blanco de este tipo de agentes nocivos, pues durante su gestación es donde hay una mayor predisposición para el desarrollo de infecciones con patógenos intracelulares, con lo cual no se descarta un posible sub-registro de casos de salmonelosis en este tipo de población en particular.

En este sentido, utilizar la placenta como una herramienta para el diagnóstico de patologías asociadas a microorganismos patógenos durante el embarazo, constituye un avance potencial para tratar de esclarecer muchas de las alteraciones que se pueden presentar durante el embarazo, tras un proceso infeccioso. En el caso de esta investigación, el estudio de la histomorfología placentaria en biomodelos murinos, ofrece no solamente información relevante sobre los cambios y/o alteraciones que ocurren en la placenta luego de un proceso infeccioso por *Salmonella*, sino que además aporta información acerca de los posibles efectos nocivos que puede generar su patogenicidad sobre la función placentaria.

Pese a la magnitud del problema, poco se conoce aún sobre los mecanismos específicos por los cuales la infección por *Salmonella* transmitida por alimentos puede desencadenar una patología placentaria. Es por ello que, en el presente trabajo, se propone analizar la histomorfología placentaria luego de una enterocolitis por *Salmonella* Enteritidis en un estadio tardío de la gestación. Si bien el proyecto es de carácter básico, los resultados que surjan a partir de esta investigación permitirán ponderar no sólo la importancia del problema planteado sino también aportar al conocimiento científico acerca de los efectos de dicha infección durante el embarazo.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR LOS ALIMENTOS (ETA)

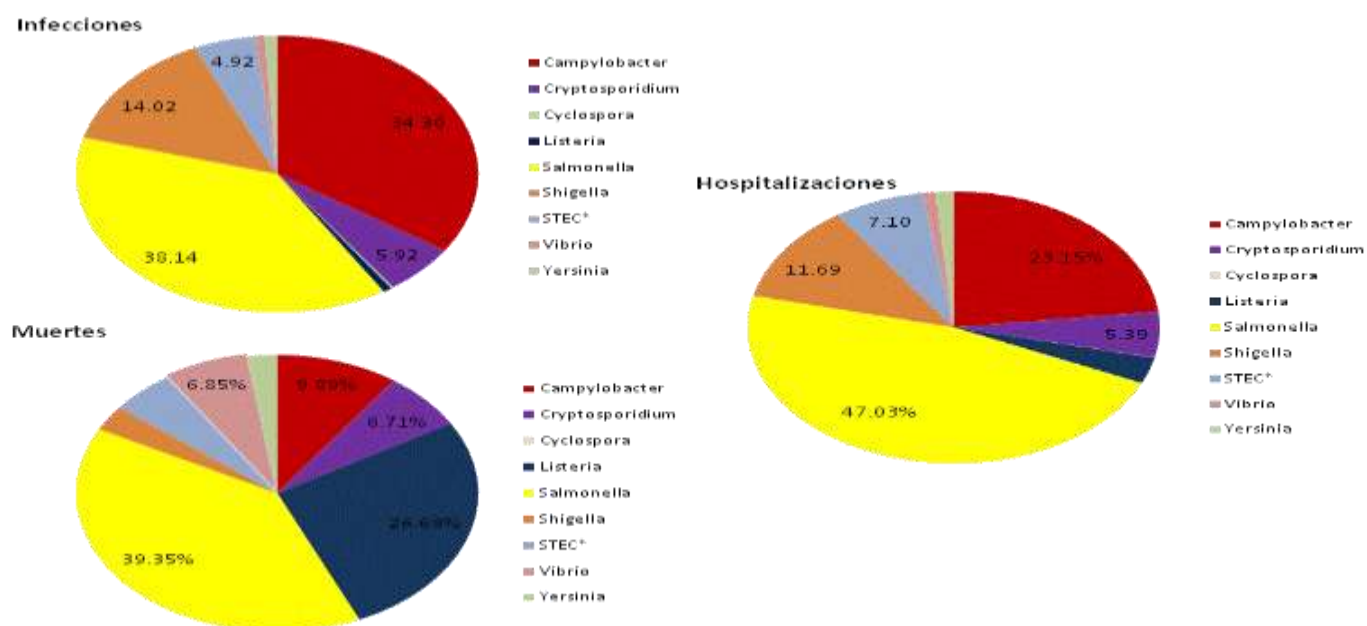
En los últimos años se ha considerado que las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son uno de los problemas de Salud Pública más extendidos en el mundo (Instituto Nacional de Salud, 2016), debido a los continuos cambios en los sistemas de vida y los hábitos alimentarios de la población (Prado et al., 2002). Según la Organización Mundial de la Salud (2007), las ETA, constituyen una enfermedad de naturaleza infecciosa o debida a toxinas, causada por agentes que ingresan al organismo a través del consumo de alimentos y agua contaminada. Comúnmente se manifiestan con una sintomatología caracterizada por vómito, diarrea, fiebre, dolor abdominal y cefalea, pero también puede conducir a síntomas que amenazan la vida, incluyendo trastornos neurológicos, ginecológicos o inmunológicos.

Se han descrito más de 250 agentes causales de ETA entre los que se incluyen bacterias, virus, hongos, parásitos, priones, toxinas y metales, siendo más frecuentes las dos primeras. La carga mundial de ETA es considerable, cada año afecta a 1 de cada 10 personas y se cobran la vida de 420.000, en su mayoría niños. Se estima que en la región de las Américas de la OMS (incluye todo el continente americano) las enfermedades diarreicas representan el 95% de las ETA en la región, siendo los principales patógenos Norovirus, *Campylobacter* spp., *E. coli* y *Salmonella* no tifoidea (www.who.int).

Existe un grupo de personas que son particularmente más susceptibles a patógenos transmitidos por los alimentos. La susceptibilidad se incrementa cuando se alteran las defensas del huésped y la función del sistema inmune se ve modificada. Factores como la edad (recién nacidos, bebés y niños pequeños, debido a la inmadurez de su sistema inmune, y los ancianos, como resultado de una inmunosenescencia progresiva), el embarazo (tolerancia inmune para el feto), condiciones inherentes a la salud (VIH) y las terapias inmunosupresoras (trasplante de órganos), son algunas de las causas por las que la respuesta inmune se modifica y a la vez se aumenta la vulnerabilidad de estas personas a una ETA (Rocourt, 2014).

En la Figura 1, se observan los principales patógenos que produjeron ETA en el año 2016 en EEUU. Es importante destacar que *Salmonella* produjo el mayor porcentaje de enfermedades, hospitalizaciones y muertes (CDC, 2017). La identificación de pacientes integrantes de un brote de ETA es difícil en los servicios de urgencia y se sub-reportan los casos, retrasando al sistema de vigilancia epidemiológica (Garcia-Huidrobo et al., 2012).

Figura 1. Principales patógenos que produjeron ETA en el año 2016 en EEUU



Fuente: CDC (2017).

4.2 GENERALIDADES DE SALMONELLA

El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae y constituyen bacilos gram-negativos, no esporulados (Dunkley et al., 2009; Hur et al., 2012), móviles y anaerobios facultativos (Haeusler & Curtis, 2013).

De acuerdo con la nomenclatura, *Salmonella* se divide en dos especies *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. Esta última reside principalmente en los reptiles y es poco frecuente que cause enfermedad en animales de sangre caliente (Valdez et al., 2009). A su vez *S. enterica* se divide en seis subespecies que incluyen *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI). En el caso de *S. bongori* (antiguamente subespecie V) no existe un reporte de clasificación en subespecies (Pegues et al., 2005; Sánchez-Vargas et al., 2011).

Cada subespecie de *Salmonella* contiene a su vez varios serotipos o serovariedades (más de 2500 serotipos reportados), que se definen de acuerdo a las combinaciones de antígeno presente en la superficie: antígeno somático (O), flagelar (H) y el antígeno capsular (Vi). (Dunkley et al., 2009; Haeusler & Curtis, 2013). El nombre de los serotipos son los que frecuentemente se han utilizado como principal descriptor taxonómico de los aislamientos de *Salmonella* (Hur et al., 2012). Actualmente se las nombra como *Salmonella enterica* serovar Typhi, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis etc. En este trabajo se optó por una nomenclatura abreviada, es decir *Salmonella* Enteritidis o simplemente SE.

Esta bacteria también se clasifica en función de dos espectros clínicos, en *Salmonella* tifoidea y *Salmonella* no tifoidea (NTS) (Haeusler & Curtis, 2013). La primera más conocida como fiebre tifoidea, se caracteriza por un cuadro febril sistémico cuyos agentes etiológicos son *Salmonella* Typhi y *Salmonella* Paratyphi, donde el hombre se comporta como su único huésped; y la NTS, constituye un amplio rango de *Salmonellas* que dan lugar a la gastroenteritis y síntomas como dolor abdominal, malestar general, vómito, diarrea y en algunos casos fiebre, estas bacterias a diferencia de *Salmonella* tifoidea pueden albergarse en una amplia gama de huéspedes vertebrados (Gordon, 2008). Se estima que 93.8 millones de episodios y 155.000 muertes cada año son atribuibles a NTS (Majowicz et al., 2010).

La vía de exposición más importante para los brotes de salmonelosis, se debe principalmente al consumo de alimentos y agua contaminada (Hallstrom & McCormick, 2011), aunque también puede ser el resultado del contacto con animales infectados o a la exposición nosocomial (Haeusler & Curtis, 2013). Entre los alimentos que favorecen su transmisión se incluye el consumo deliberado de leche y derivados sin pasteurizar, carne, aves de corral, los huevos,

pescados, mariscos, las frutas y verduras, todos considerados como fuentes de ingreso potenciales de patógenos cuando se ingieren crudos o poco cocidos (Scott, 2003).

La infección con *Salmonella* posee un período de incubación de 6-72 horas caracterizada por diarrea, fiebre, dolores abdominales y por infiltración de leucocitos polimorfonucleares (PMN) en la mucosa intestinal. En general, estos casos de enterocolitis se autolimitan en 5-7 días sin la necesidad de un tratamiento antibiótico. Sin embargo, dadas las secuelas que pueden desarrollarse, los casos que ocurren en niños, personas de edad avanzada, inmunodeprimidos e inmutolerantes pueden requerir terapia antimicrobiana u otro tratamiento médico (Shaw, 2016). Hay que resaltar, que la severidad de la infección por *Salmonella* depende en gran medida del grado de “virulencia” de la bacteria, de la dosis infecciosa y de la genética y estado inmunológico del huésped (Mastroeni, 2002).

4.2.1 *Salmonella*: Un agente patógeno de transmisión por alimentos. A nivel mundial, dentro de los agentes etiológicos mayormente implicados en los brotes de ETA se encuentra *Salmonella*, uno de los patógenos que representa un problema de salud pública, tanto en países industrializados como los países subdesarrollados (Sánchez-Vargas 2011; Pérez & Cardozo, 2014).

En la Unión Europea por ejemplo, la Salmonellosis continúa siendo la segunda infección gastrointestinal más frecuente, a causa del consumo de alimentos contaminados. En el año 2011 fueron reportados 96.883 casos confirmados de Salmonellosis. Los dos serotipos de *Salmonella* más comunes fueron *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, representados por el 44% y 25% de todos los serotipos registrados, respectivamente (European Centre for Disease Prevention and Control, 2013).

En Norte América, en el año 2008 los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) a través del Sistema de Vigilancia de Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, registró que el 23% de los brotes y el 31% de las enfermedades de origen alimentario fueron producto de la infección por *Salmonella*, donde las aves y los huevos fueron los alimentos más comunes implicados en estos hallazgos (CDC, 2011a). Tres años después, estos centros

estimaron que cada año, al menos 1 de cada 6 estadounidenses (o 48 millones de personas) se enferman, 128.000 se hospitalizan y 3.000 mueren por causa de ETA (CDC, 2011b).

En Colombia el Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud (INS) como Laboratorio Nacional de Referencia, en unión con otros laboratorios de salud pública del país (LSP), ha establecido un programa de vigilancia de serovares y susceptibilidad antimicrobiana de patógenos como *Salmonella* spp. A partir de este programa recopilamos información sobre los resultados de vigilancia de los aislamientos de *Salmonella* spp. desde el año 2000 al 2013 en todo el país.

A partir de este informe, se registran 7.424 aislamientos de *Salmonella* spp. Provenientes de los 32 departamentos de Colombia, de los cuales 7.219 (97,2%) procedían de muestras clínicas y 205 (2,8%) de muestras de agua y alimentos. La mayor parte de estos aislamientos bacterianos fueron remitidos por los LSP de Antioquia (33.1%), Bogotá (29.2%), Valle (6.8%) y Nariño (4.4%). El 33.7% y el 28.6% del total de los aislamientos correspondieron a las serovariedades de Typhimurium y Enteritidis respectivamente. Los grupos de edad más afectados por *Salmonella* fue el de 1-4 años (18%), 30-39 años (18%) y 15-29 años (15.4%) (685 de los aislamientos no reportaron la edad) (Instituto Nacional de Salud, 2014).

En ciudades como Bogotá la ciudad capital, según reportes de la Secretaría Distrital de Salud en el año 2010, 2.715 personas manifestaron enfermedades transmitidas por alimentos, entre ellas 241 fueron hospitalizadas y dos fallecieron. Se encontró que *Salmonella* spp. fue uno de los agentes causales en un 14% de estos brotes (Secretaría Distrital de Salud de Bogotá, 2011). En el primer semestre del año 2012, se reportó que los alimentos posiblemente implicados en las ETA fueron los alimentos mixtos (430 brotes), seguido de leche, productos lácteos y sus derivados (173 brotes), mezclas de arroz (103 brotes) y alimentos derivados de pesca y sus derivados (89 brotes). En estos grupos, el alimento con mayor frecuencia, fue: alimento listo para consumo, queso, arroz con pollo y camarones, respectivamente (Secretaría Distrital de Salud, 2015)

Hasta la fecha de acuerdo al boletín epidemiológico que se reporta en la página web del INS, hasta la semana 17 del año 2016, fueron notificados al Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) 2596 casos de ETA. Dentro de los casos que fueron notificados para esta semana (24 abril- 30 abril de 2016) la procedencia registrada fue Arauca, Bogotá, Boyacá, Sucre, Chocó y Caldas con el 77,7 % de los casos. *Salmonella* spp. fue uno de los agentes etiológicos identificados en las muestras biológicas procedentes de brotes de ETA (Instituto Nacional de Salud, 2016b).

4.2.2 Patogenia de la infección por *Salmonella* entérica. La infección por *Salmonella entérica* comienza con la ingestión de la bacteria presente en alimentos o agua contaminada. Una vez que la bacteria supera la barrera del estómago, coloniza el intestino y atraviesa el epitelio intestinal. Ya en la lámina propia, *Salmonella* se replica dentro de células fagocíticas (dendríticas y macrófagos) en las placas de Peyer. Los serotipos de *Salmonella* que están asociados a la enfermedad sistémica se diseminan a través del sistema reticuloendotelial. Por el contrario, las serovariedades de *Salmonella* no tifoideas inducen una respuesta inflamatoria temprana local la cual resulta en la infiltración de polimorfonucleares (PMN) en el lumen intestinal y en diarrea (Majowicz et al., 2010)

4.3 MUJERES EMBARAZADAS, POBLACIÓN VULNERABLE FRENTE A LAS ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (ETA)

Algunas personas son particularmente más susceptibles a patógenos transmitidos por los alimentos. Esta proporción incluye a las personas con VIH, pacientes tratados con radiación o con fármacos inmunosupresores, personas con síndrome de Down, con enfermedades hepáticas o renales o con exceso de hierro en la sangre, diabéticos, niños, ancianos y mujeres embarazadas (Lund & O'Brien, 2011). La susceptibilidad a una ETA se debe a la supresión del sistema inmune ya sea a través de los procesos de la enfermedad o los medicamentos que se utilizan para su tratamiento (Rocourt, 2014).

En el caso particular del embarazo, la vulnerabilidad a la invasión por patógenos se asocia a los cambios del sistema inmune de la mujer gestante, que debe sobrellevar la presencia de un feto

semialogénico y al mismo tiempo conservar eficazmente la reactividad inmune para protegerse a ella misma y al feto de los efectos deletéreos de las infecciones (Krishnan et al., 2013). Sin embargo y pese al riesgo al que está expuesta este tipo de población, pocos subregistros existen sobre los casos de Salmonellosis en embarazadas, lo que limita la información disponible a nivel epidemiológico (Gyang & Saunders, 2008).

En el año 2007, se ha agregado a *Salmonella* spp. a la lista de patógenos como *Toxoplasma* spp., *Chlamydia* spp., *Listeria* spp. y *Plasmodium* spp. que preferencialmente invaden la placenta y que pueden causar abortos (Pejcic-Karapetrovic et al, 2007). Esta situación resulta alarmante, dado que la infección por este patógeno puede causar complicaciones tales como corioamnionitis, infección fetal transplacentaria, muerte neonatal, parto prematuro, abortos espontáneos, septicemia neonatal y materna (Schloesser et al., 2004; Krishnan et al., 2013).

Los estudios científicos con biomodelos reportan una asociación directa de la invasión de *Salmonella* a nivel placentar con las complicaciones que se desencadenan durante el periodo de gestación de los ratones. Mediante dichos modelos se ha podido demostrar la capacidad de *S. enterica* subs. *enterica* para proliferar rápidamente en placenta y generar una enfermedad fetal invasiva (14 h post-infección) (Pejcic-Karapetrovic et al., 2007), además se ha encontrado su versatilidad para invadir diferentes regiones placentarias como la zona del laberinto, zona trofoblástica y la decidua (Chattopadhyay et al., 2010).

4.4 MODELO DE ENTEROCOLITIS MURINA

En el ratón, especialmente en cepas genéticamente susceptibles, la infección oral o intragástrica con *Salmonella enterica* produce una infección sistémica por la diseminación de la bacteria a través del tejido linfoide asociado al intestino. La bacteriemia y las lesiones tisulares se asemejan a las producidas en la fiebre tifoidea del humano (Carter & Collins, 1974)

En los últimos años ha tenido gran aceptación entre los investigadores el modelo murino de enterocolitis (Hapfelmeier, 2005; Stecher, 2004). Éste consiste en la administración de estreptomicina por vía oral a los ratones, 24 horas antes de la inoculación con *Salmonella*

enterica. De esta forma, al afectarse la flora comensal, se incrementa en gran medida la colonización del intestino por el patógeno (Bohnhoff et al., 1964; Meynell & Subbaiah.,1963; Murray & Lee., 2000).

La escasa colonización del intestino murino por *Salmonella* se ha conocido por décadas como resistencia a la colonización. Este fenómeno está directamente relacionado a la presencia de las bacterias comensales del intestino y puede ser afectada por el uso de antibióticos. Los mecanismos por los cuales la microbiota intestinal produce la resistencia a la colonización son materia actual de estudio y discusión.

Las bacterias comensales del intestino pueden liberar metabolitos inhibitorios, como ácidos grasos, y competir con los microorganismos patógenos por los nutrientes y los sitios de colonización (Bohnhoff et al., 1964). Más aún, dichas bacterias son moduladoras de la fisiología intestinal y proveen un estímulo constante para el sistema inmune intestinal que favorece el mantenimiento de la homeostasis inmune (Macpherson & Harris, 2004). En este sentido, se ha demostrado que la microbiota intestinal regula negativamente la señalización mediada por el factor nuclear κB (NF κB) (Kelly et al., 2004). De esta manera, la resistencia a la colonización puede ser el resultado de una interacción compleja entre *Salmonella*, la flora residente, la mucosa intestinal y el sistema inmune asociado al intestino (Thaiss et al., 2016). La alteración de la flora comensal por el uso de antibióticos inclinaría la balanza en beneficio de los patógenos infectantes. En el ratón, el tratamiento con estreptomycin previo a la infección oral con *Salmonella* induce inflamación intestinal, colonización del intestino grueso y colitis (inflamación severa, aguda y difusa del ciego y colon); los síntomas comienzan rápidamente (aproximadamente 8 horas) luego de la infección (Hapfelmeier, 2005; Hu, 2008). Un gran número de científicos coinciden en que este biomodelo comparte algunas de las características de la enterocolitis humana por *Salmonella* (Watson et al., 2010). Por lo tanto, ha sido ampliamente utilizado en nuestro laboratorio para analizar las secuelas asociadas a la infección (Noto Llana et al., 2013, 2014, 2017).

4.5 ESTUDIO DE LAS COMPLICACIONES ORIGINADAS DURANTE LA PREÑEZ ASOCIADAS A ENTEROCOLITIS POR *SALMONELLA* ENTERITIDIS DURANTE LA ETAPA TARDÍA DE LA GESTACIÓN

El modelo animal de enterocolitis consiste en la inoculación por la ruta natural de infección de dosis subletales (10^3 UFC) de *Salmonella* Enteritidis a ratones BALB/c preñados en la etapa tardía de la gestación (día 15), previamente tratados con estreptomycin (Noto-Llana et al., 2012).

Los resultados obtenidos demuestran una exacerbación de la infección en las hembras preñadas respecto de los controles (animales no preñados). Esta alta eficiencia del patógeno para colonizar las placas de Peyer, bazo e intestino se correlacionó con su capacidad para atravesar la placenta e infectar al útero y al feto a los 3 días post infección (día 18 de gestación). Asimismo, se observó que en el 40% de las hembras preñadas infectadas se indujo parto prematuro y un 33% de abortos. Dado que una infección oral con dosis subletales de *Salmonella* generó un efecto negativo para el feto, se decidió analizar los niveles de citoquinas anti y proinflamatorias en la placenta. En respuesta a la infección por *Salmonella* se observó -a los 3 días post inoculación- un incremento significativo ($p < 0.05$) en los niveles de IL-10, IFN-gamma, IL-17 y TNF-alpha en las placentas infectadas (determinado mediante PCR en tiempo real) respecto de las placentas controles. Dichos resultados fueron corroborados por ELISA. Del mismo modo, se hallaron elevados niveles de IFN-gamma e IL-10 ($p < 0.05$) en el suero de las hembras preñadas infectadas respecto de los controles (no infectados). Asimismo, en sus hallazgos demuestran que una ETA por *Salmonella* Enteritidis durante los estadios tardíos de la gestación induce una disfunción placentaria caracterizada por hipoxia, infiltración celular, apoptosis y restricción del crecimiento fetal. En resumen, en este trabajo se demuestra que una infección subletal oral por *Salmonella* Enteritidis en un modelo preñado es suficiente para generar una masiva colonización del útero, placenta y feto e inducir una fuerte respuesta inflamatoria en la placenta, líquido amniótico y suero materno que resulta incompatible con el mantenimiento de un embarazo saludable (Noto Llana et al., 2014).

4.6 REPORTES DE CASOS CLÍNICOS

En la tabla 1, se citan algunos reportes clínicos destacados, en los que ponen en evidencia que *Salmonella* puede ser altamente letal para el feto o recién nacido, mientras que el pronóstico para la madre aparentemente no representa mayor peligro.

Tabla 1. Efecto letal de la infección por *Salmonella* en pacientes embarazadas

Paciente	Lugar donde se registra el caso clínico	Agente infectivo	Caso clínico	Reporte
Mujer de 28 años con 14 semanas de embarazo	Noruega	<i>Salmonella Enteritidis</i>	La paciente con malestar abdominal, sangrado vaginal y fiebre presentó aborto séptico por infección con <i>Salmonella</i> .	Dalaker et al. (1988)
Mujer de 22 años con 12 semanas de embarazo	Estados Unidos	<i>Salmonella Enteritidis</i> serotipo oranienburg	Se presentó un aborto séptico por infección con <i>Salmonella</i> . El ultrasonido reveló que el feto no presentaba actividad cardiaca.	Zettell et al. (1995)
Mujer de 23 años con 27 semanas de embarazo	Alemania	<i>Salmonella Enteritidis</i>	Un infante prematuro con 27 semanas de gestación, presentó taquicardia, baja frecuencia cardiaca y problemas de respiración. Su condición fue deteriorando y 4h después de su nacimiento murió.	Roll et al. (1996)
Mujer de 26 años que llevó su embarazo a termino	Austria	<i>Salmonella Enteritidis</i>	La madre presentó fiebre y diarrea dos días antes del parto. El neonato con dos días de nacido murió. Su autopsia reveló gastroenteritis hemorragia aguda y peritonitis difusa.	Pumberger & Novak (2000)
Mujer de 34 años con 16 semanas de embarazo	Reino Unido	<i>Salmonella Virchow</i>	Se presentó un aborto involuntario producto de una infección por <i>Salmonella</i> , posterior al consumo de huevos mal cocidos. La tinción	Coughlin et al. (2003)

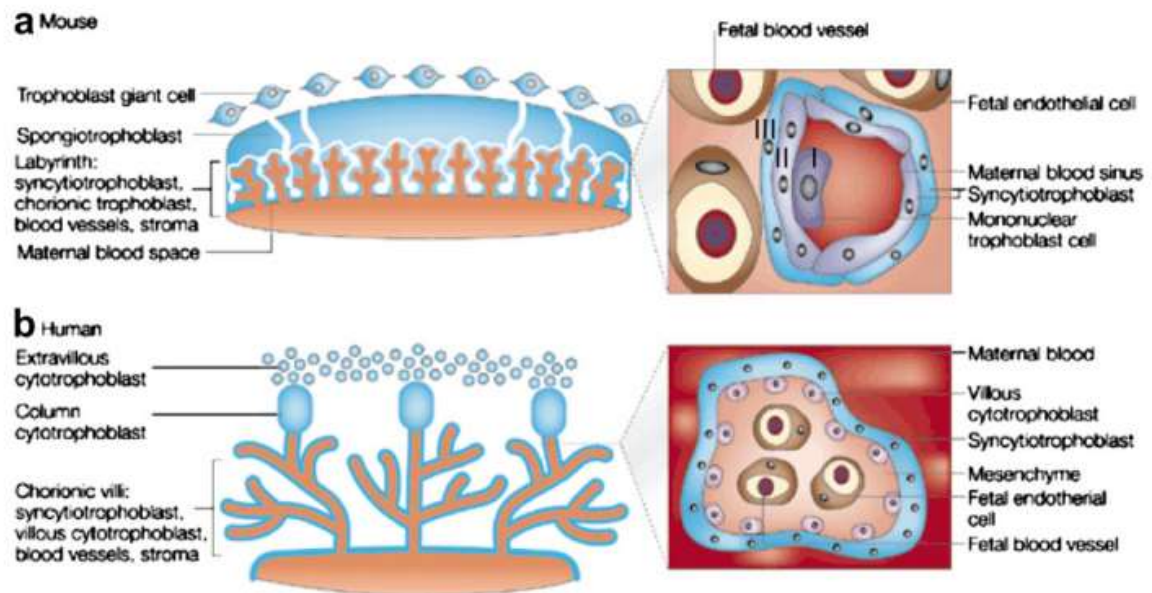
			con Gram del tejido placentar, evidenció la presencia de bacilos gram-negativos.	
Mujer de 36 años con 25 semanas de embarazo	Alemania	<i>Salmonella Virchow</i>	La infección masiva con el agente patógeno dio lugar a una cesárea de emergencia. Él bebe prematuro tuvo muchas complicaciones y al cuarto día murió debido a la hipotensión refractaria, hipoxia y acidosis metabólica.	Schloesser et al. (2004)
Mujer de 19 años con 18 semanas de embarazo	Australia	<i>Salmonella</i> Mississippi	La transmisión transplacentaria del agente patógeno desencadenó en un aborto involuntario espontáneo a las 18 semanas de gestación.	Gyang & Saunders (2008)
Mujer de 27 años con 6 semanas de embarazo	India	<i>Salmonella</i> Typhi	La paciente presentó sangrado vaginal seguido de un aborto incompleto, por lo que fue necesario un legrado.	Ravneet & Purabi (2011)
Mujer de 24 años con 16+3 semanas de embarazo	India	<i>Salmonella</i> Typhi	Mediante ultrasonido encontraron feto sin actividad cardiaca y se interrumpió el embarazo con el consentimiento de la paciente.	Kaistha et al. (2013)
Mujer de 23 años con 11+6 semanas de embarazo	Estados Unidos	<i>Salmonella</i> Typhi	La mujer embarazada persistió con fiebres y sangrado recurrente, a las 16 semanas dio a luz a un bebe que murió a los 15 minutos de su nacimiento. Se comprobó una transmisión vertical del patógeno a partir del aislamiento bacteriano del pulmón fetal.	Vigliani & Bakardjiev (2013)

4.7 CARACTERÍSTICAS DE LA PLACENTA MURINA

Tanto la placenta humana como la placenta en el ratón, son de tipo hemocorial, lo que significa que el tejido del trofoblasto derivado del feto se baña directamente en la sangre materna (Enders & Blankenship, 1999). Sin embargo, a diferencia de la placenta humana, la placenta del ratón está organizada en tres zonas principales, denominadas i) decidua que conforma la zona materna, ii) la zona de unión y iii) zona laberíntica, que componen la zona fetal. A su vez, la zona de unión consiste principalmente de células trofoblásticas gigantes, células glucogénicas y espongiotrofoblastos y está asociada con la función endocrina. La zona laberíntica por su parte es la capa de intercambio materno-fetal y es una variación de la arquitectura vellosa de la placenta humana. A diferencia del humano, donde las vellosidades se extienden al espacio de sangre materna, los espacios de sangre materna y los capilares fetales en el ratón están dispuestos en forma de laberinto (Georgiades et al., 2002).

La placenta del ratón es hemotricorial, es decir, presenta tres capas de trofoblasto entre las circulaciones materna y fetal en comparación con el sincitiotrofoblasto de una sola capa en la placenta humana. Las tres capas en el ratón se denotan I, II y III, siendo la capa I la que está próxima a los espacios de la sangre materna. Se cree que la Capa I consiste en una capa intermitente de células gigantes de trofoblasto que debe ser altamente permeable a la mayoría de los solutos de bajo peso molecular, mientras que la capa II, que es sincicial, presenta la barrera inicial para el intercambio materno-fetal

Figura 2. Características de la placenta murina vs la placenta humana. (A) Estructura de la placenta de ratón



El recuadro detalla la interfaz materna fetal en el laberinto y muestra las tres capas de trofoblasto, capa I (capa de células trofoblásticas mononucleares) y las capas II y III (syncytiotrofoblasto). (B) Estructura de la placenta humana, el recuadro muestra una sección transversal a través de una vellosidad coriónica. Fuente: tomado de Dilworth & Sibley (2013).

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La enterocolitis por *Salmonella* Enteritidis en un estadio tardío de la gestación murina induce cambios histomorfológicos placentarios?

6. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la histomorfología placentaria murina luego de una enterocolitis por *Salmonella* Enteritidis

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la colonización bacteriana en la placenta murina luego de una enterocolitis por *Salmonella* Enteritidis en un estadio tardío de la gestación
2. Caracterizar los cambios histomorfológicos de la placenta murina luego de una enterocolitis por *Salmonella* Enteritidis en un estadio tardío de la gestación

7. METODOLOGÍA

Esta investigación que se planteó como trabajo de grado para optar por el título de Magister en Ciencias Biomédicas, formó parte de un proyecto macro denominado “Enterocolitis por *Salmonella enterica*: estudio de las complicaciones originadas durante la gestación” y se desarrolló en colaboración entre el grupo de investigación de **Tejidos Blandos y Mineralizados (TEBLAMI) de la Universidad del Valle** y el **Instituto de Investigación en Microbiología y Parasitología Médica (IMPaM-UBA-CONICET) de la Universidad de Buenos Aires (UBA)**, con la idea de fortalecer el estudio de los tejidos placentarios afectados por agentes patógenos como *Salmonella*.

Para dar respuesta al objetivo general del estudio, esta investigación se llevó a cabo en dos fases experimentales. La **primera fase experimental** se realizó en el IMPaM-UBA-CONICET e incluyó el desarrollo del modelo de enterocolitis con *Salmonella* Enteritidis en murinos gestantes y la toma de muestras y análisis microbiológico de órganos maternos y de unidades feto-placentarias. En tanto que la **segunda fase**, que comprendió el procesamiento histoquímico placentario y análisis morfométrico e histológico de la placenta murina, se efectuó en el Laboratorio de Histología del Departamento de Morfología de la Universidad del Valle.

Varios de los procedimientos descritos en esta metodología se describirán en detalle en los **procedimientos operativos estándar (POE)** que se adjuntan como documentos anexos.

7.1 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Todos los procedimientos metodológicos y condiciones de manejo implementados con los biomodelos murinos que se utilizaron en esta investigación, fueron revisados y aprobados por el **Comité Institucional de Revisión de Ética con Animales de Experimentación Biomédica (CEAS)** – Universidad del Valle, mediante acta de aval N° 003-016 (anexo 1) y el **Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAL)** – Universidad de Buenos Aires (anexo 2) mediante resolución N° 2551. Ambos

comités están comprometidos con el bienestar animal y el cumplimiento de las normativas internas, nacionales e internacionales que reglamentan todas las prácticas y procesos de la ciencia del animal de laboratorio.

El **CEAS** está regido por el Estatuto Nacional de Protección de los animales – **Ley 84 de 1989** - y la Norma Científico-Técnica para la investigación en salud – **Resolución No. 8430 de 1993** del Ministerio de Salud. En estas normas colombianas se encuentran establecidos los aspectos más importantes que se deben cumplir para intervenir los animales en la investigación, las exigencias de protección contra el sufrimiento y el dolor, además de las normas científicas, técnicas y administrativas de la investigación en salud.

En tanto que el **CICUAL** de la Facultad de Ciencias Veterinarias se apoya en el **“Reglamento para el cuidado y uso de animales de laboratorio en la facultad de medicina”** de la Universidad de Buenos Aires, el cual se acoge principalmente en la Ley 14346 sobre la Protección de los Animales de República Argentina, además de otras normas estrictas basadas en la reglamentación mundial como la **“Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio”**, auspiciada por el National Institutes of Health (NIH), USA y la **Directiva 86/609/CEE** relativa a la Aproximación de las Disposiciones Legales, Reglamentarias y Administrativas de los Estados Miembros de la Comunidad Económica Europea respecto a la Protección de los Animales Utilizados para Experimentación y otros fines Científicos.

Cabe mencionar que la experimentación con los biomodelos murinos, fueron liderados por la Doctora Mónica Giacomodonato, la Doctora y médica veterinaria Mariángeles Noto Llana y su equipo de trabajo, quienes cuentan con 15 años de experiencia en la realización de investigaciones que involucran el manejo de murinos como biomodelos de experimentación, trabajos que les permitió adquirir en el transcurso de los años experticia en la manipulación y manejo de estos animales, reduciendo al mínimo los impactos de estrés que estén asociados con la metodología que se planteó.

Tipo de estudio: Experimental

7.2. PRIMERA FASE EXPERIMENTAL

7.2.1 Animales. Como biomodelo de experimentación se utilizaron 26 hembras *Mus musculus* endocriadas de la cepa BALB/c de seis a ocho semanas de edad. Todos los animales fueron obtenidos en el bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires (UBA).

7.2.2 Condiciones de confinamiento y apareamiento del biomodelo experimental. Los biomodelos se alojaron en jaulas de policarbonato cuya base fue recubierta con viruta de madera. Todas las jaulas fueron dispuestas en una de las salas del bioterio del IMPaM bajo condiciones estándares: una temperatura de 20 ± 2 °C, un ciclo luz/oscuridad (12h/12h) y una humedad relativa 60-70%. Para su alimentación se utilizó un concentrado balanceado (alimento rata-ratón extrusado – ACA Industria Argentina) y provisión de agua, ambos *ad-libitum*.

Para el apareamiento, las hembras en proestro fueron trasladadas a las jaulas de los machos adultos. A la mañana siguiente (7-9 AM), se realizó la detección de los tapones vaginales y se consideró como el día cero de la preñez.

Las hembras preñadas se trasladaron de manera independiente a las jaulas de experimentación. Cada jaula contaba con una ficha de registro que incluía los siguientes datos: N° de jaula, persona responsable, fecha, cepa, sexo, edad, grupo de estudio, cantidad de individuos y observaciones. A cada uno de los animales se le asignó una codificación que incluía la letra **H** seguida de dos números enteros. Por ejemplo, H24 significa hembra número 24.

7.2.3 Cepa bacteriana y condiciones de crecimiento. Las infecciones se realizaron con la cepa salvaje *Salmonella enterica* serovar Enteritidis #5694. Una cepa de colección que fue otorgada al cepario del IMPaM por la Dra. Anne Morris Hooke de la Universidad de Miami, originalmente de la colección del Dr. F. Collins, Instituto Trudeaum, Saranac Lake, New York. Con fines prácticos a esta cepa de estudio se la abreviará con las letras **SE** o con el nombre **S. Enteritidis**.

Para preparar el inóculo infeccioso, se tomó de un cultivo puro de 24 h de crecimiento de SE, dos o tres colonias bacterianas que fueron cultivadas en 20 mL de caldo estéril tripticasa de soja (TSB) e incubadas a 37°C bajo agitación constante (200 ciclos/min) hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0.6 a 600 nm. Posteriormente, con la DO adecuada, el cultivo se centrifugó a 10.000 rpm por 10 min a 4°C y los sedimentos se resuspendieron en solución fisiológica estéril al 0.9%. A partir de esta suspensión, se realizó la determinación del número de unidades formadoras de colonias (UFC) de SE por mL, mediante la siembra de diluciones seriadas específicas en placas de petri con medio de cultivo TSA (agar tripticasa de soja) estéril, que fueron incubadas a 37°C durante 16 a 18 h.

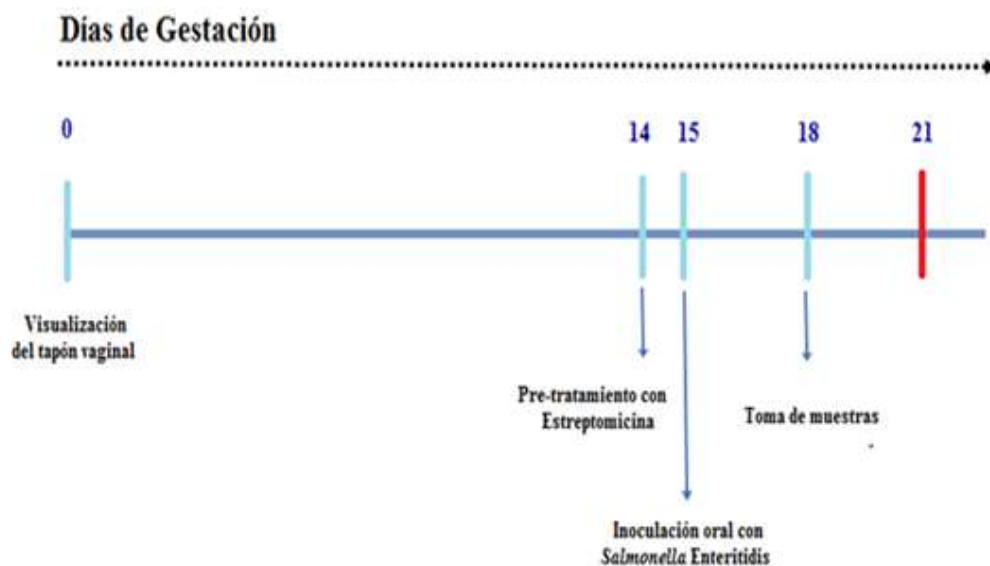
7.2.4 Diseño experimental del modelo de enterocolitis murino. Este modelo se desarrolló en la etapa tardía de la gestación en dos fases experimentales (Noto-Llana et al., 2014). La primera fase incluyó la administración de estreptomicina y la segunda consistió en la inoculación intragástrica (i.g) con *S. Enteritidis*. En ambas fases, se retiró el abastecimiento de agua de los animales 4 h previas al suministro del antibiótico y/o del inóculo infeccioso.

- **Preparación y administración de estreptomicina.** A cada individuo, se le administró una dosis oral de 20 mg de estreptomicina (Sigma-Aldrich) diluida en 50 µl de PBS 1X (buffer fosfato salino), mediante una micropipeta graduada y acoplada a una punta, 24 h antes de la infección con SE.
- **Inoculación intragástrica (i.g) con *S. Enteritidis*.** Se administró 0.1 mL de una dosis no letal de SE de 10^3 UFC/ratón, mediante una sonda curvada estéril de polietileno (B-TR 50, Laboratorio Barcat) acoplada a una jeringa de plástico de 1 mL (anexo 3). En este experimento, se utilizó una dosis subletal de SE tomando como referencia datos previos que reportan que la dosis letal 50 (DL50) fue de 5×10^4 UFC/ratón (Noto-Llana et al., 2009).

Ambos procedimientos se realizaron siguiendo protocolos de administración previamente probados en el IMPaM por Noto-Llana et al. (2014) (anexo 3).

Para el desarrollo del modelo de enterocolitis en murinos gestantes, se estudiaron tres grupos de animales: **Grupo 1: (experimental)** 10 biomodelos preñados tratados con estreptomicina e infectados al día 15 de gestación con *Salmonella* Enteritidis. **Grupo 2: (control)** ocho biomodelos preñados sin infección ni tratamiento con estreptomicina. **Grupo 3: (sham)** ocho biomodelos preñados tratados con estreptomicina día 14 de la gestación. Todos los animales que conformaban los tres grupos, fueron sacrificados al día 18 de la gestación mediante inhalación de CO₂ (anexo 4). Este ensayo se resume en la Figura 3.

Figura 3. Modelo de enterocolitis con *Salmonella* Enteritidis en hembras gestantes BALB/c en la etapa tardía de la preñez



La asignación de grupo para cada biomodelo se realizó de manera aleatoria y quedó especificada en su ficha de registro en el ítem grupo de estudio.

7.2.5 Obtención de órganos maternos y unidades feto-placentarias. Al día 18 de la gestación todos los animales fueron sacrificados en una cámara de dióxido de carbono (CO₂), a una velocidad de flujo de gas no mayor al 20%. A medida que fluía el CO₂, el animal se mantuvo en observación y se verificaron signos de muerte: cese del latido cardiaco y de

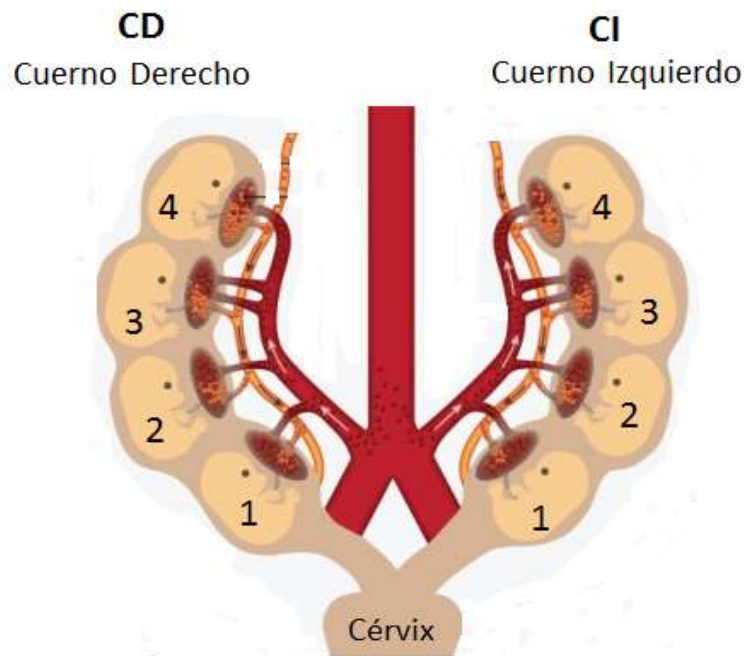
respiración, la presentación de córnea opaca y relajación de esfínteres. Luego de observar estos signos, se continuó con el suministro de gas por 1 minuto más y finalmente se verificó con pinzas la ausencia de reflejos plantares de la extremidad inferior (anexo 4). El protocolo de eutanasia descrito anteriormente es un método seguro y rápido, que evita excesos de sufrimiento siempre y cuando el flujo de CO₂ se mantenga dentro de los límites establecidos.

Posterior a la interrupción de la preñez de los biomodelos mediante la inhalación con CO₂, se realizó el proceso de disección para obtención de muestras de órganos maternos: intestino (I), bazo (B) y útero (U) y de unidades feto-placentarias (anexo 5).

Para la explantación de dichas unidades se enumeró la posición de cada una de las implantaciones en ambos cuernos uterinos (cuerno uterino derecho = **CD**; cuerno uterino izquierdo = **CI**) partiendo desde el cérvix, como se observa en la figura 4. Luego de registrar su enumeración, las placentas y los fetos que fueron separados durante la disección (anexo 6), se codificaron con las letras **P** y **F** respectivamente, seguido del número de identificación del biomodelo, su ubicación con respecto al cérvix y la letra **D (derecho)** o **I (izquierdo)**, según la lateralidad de procedencia.

Las muestras de órganos maternos, las placentas y fetos, fueron puestos de manera independiente en cajas de Petri pequeñas con solución fisiológica al 0.9% y rotuladas para su respectivo procesamiento y/o análisis.

Figura 4. Esquema de ubicación de las placentas en los cuernos uterinos del biomodelo murino. Numeración: Ubicación de la placenta en relación al cérvix. Siendo 1 la más próxima y 4 la más alejada



Fuente: Imagen modificada de Raz et al. (2012)

Luego de la explantación, se obtuvo un total de 217 unidades feto-placentarias (87 del grupo **experimental**, 61 del grupo **control** y 69 del grupo **sham**). Para fines de esta investigación, se tuvo en cuenta los siguientes criterios de selección placentaria.

Criterios de inclusión para la selección de placentas. Fueron seleccionadas aquellas placentas provenientes de la parte intermedia de cada cuerno uterino.

Criterios de exclusión para la selección de placentas. Se excluyeron las placentas que sufrieron daños a causa de la disección.

Siguiendo estos criterios, fueron seleccionadas un total de 79 placentas que se utilizaron para estudio morfométrico, histológico y microbiológico. El número de placentas estudiadas

por grupo, se detalla en la Tabla 2. Las placentas restantes (138 de las 217 placentas totales) se destinaron para responder a otros objetivos propios del proyecto macro que estaban en curso.

Tabla 2. Placentas de estudio

Análisis Morfométrico e Histológico	Análisis microbiológico	Nº total de placentas/grupo de experimentación
20	27	47 / Grupo 1 (experimental)
16	-----	16 / Grupo 2 (control)
16	-----	16 / Grupo 3 (sham)
52	27	79 placentas estudiadas

Los 27 fetos que fueron separados de las 27 placentas que se destinaron para análisis microbiológico, se pesaron y se sometieron al mismo análisis microbiológico como se describe más adelante.

A continuación se describirá la metodología que se implementó para cada uno de los objetivos específicos propuestos.

7.2.6 Análisis de colonización bacteriana en muestras de órganos maternos y unidades feto-placentarias. Las muestras que se tomaron para realizar este análisis fueron las correspondientes a : intestino (I), bazo (B), útero (U), placenta (P) y feto (F), todas procedentes de las hembras del **grupo experimental**, al día 18 de la gestación. Para este análisis se procesaron 27 placentas (Tabla 2) y 27 fetos, como se detalló previamente.

Posterior a su extracción, cada muestra de órgano y unidad feto-placentaria se pesó en una balanza analítica (precisión 0.0001 g) y colocó de manera independiente en cajas de petri con 1 mL de solución fisiológica estéril al 0.9%. Todas las muestras excepto los fetos fueron macerados con una *mesh* estéril, mientras que estos últimos fueron disgregados por completo con un homogeneizador ultraturrax. Luego se realizaron diluciones seriadas específicas, y de cada dilución se sembró por duplicado 0.1 mL en cajas con medio

de cultivo Levine, un medio selectivo y diferencial para enterobacterias. Los cultivos se incubaron durante 16 - 18 h a 37°C. Para identificar la procedencia de cada muestra, todas las cajas fueron rotuladas con el código designado al biomodelo, junto con la letra inicial de cada muestra de órgano, por ejemplo, H27B (muestra del bazo de la hembra número 27).

Transcurrido este tiempo, se realizó el recuento en placa para cada muestra, y se estimó el número de UFC/g de órgano, siguiendo la fórmula:

$$\text{UFC/g} = \frac{\text{Nº de colonias por placa} \times \text{factor de dilución}}{\text{g de muestra procesada}}$$

7.3. SEGUNDA FASE EXPERIMENTAL

7.3.1 Estudio de los cambios histomorfológicos placentarios. Para evaluar la histomorfología placentaria murina se procesaron un total de 52 placentas (Grupo experimental = 20 placentas; Grupo control = 16 placentas y Grupo sham = 16 placentas) (Tabla 2), las cuales se estudiaron mediante:

- i) Análisis morfométrico: mediciones macroscópicas y microscópicas de la placenta
- ii) Análisis de la histomorfología placentaria: mediante descripción histológica de las tres zonas constituyentes de la placenta (decidua, zona de unión y zona de laberinto)

Las placentas seleccionadas para este análisis fueron inmediatamente puestas en una caja de petri rotuladas y cubiertas con solución fisiológica al 0.9%. Posteriormente luego de registrar sus pesos en una balanza analítica (precisión 0.0001 g), se fijaron en formol bufferado al 10%. Una vez culminó este proceso de fijación, se realizó la toma de mediciones macroscópicas y procesamiento histoquímico para el estudio de la histomorfología placentaria y las mediciones microscópicas placentarias.

7.3.2 Mediciones morfométricas macroscópicas de la placenta. Para conocer la morfometría placentaria de los biomodelos que fueron sometidos a la experimentación, se tuvieron en cuenta las siguientes variables: (i) el peso, (ii) diámetro mayor, (iii) diámetro menor, (iv) grosor placentario y (v) área de superficie placentaria (Tabla 3).

Tabla 3. Variables macroscópicas placentarias

Variable	Unidades / denominación	Tipo	Escala
Peso placenta	Gramos (g)	Cuantitativa continua	Razón
Diámetro mayor	Milímetros (mm)	Cuantitativa continua	Razón
Diámetro menor	Milímetros (mm)	Cuantitativa continua	Razón
Grosor placentario	Milímetros (mm)	Cuantitativa continua	Razón
Área de superficie placentaria	Milímetros cuadrados (mm ²)	Cuantitativa continua	Razón

Peso placentario (PP). Cada placenta seleccionada para el estudio morfométrico fue pesada en una balanza digital calibrada con precisión 0.0001 g.

Diámetro placentario (DP) y superficie placentaria (SP). Con la ayuda de un calibrador de precisión 0.01 mm se midió el diámetro mayor (**DP1**) y menor (**DP2**) de la placenta a lo largo de dos ejes perpendiculares entre sí (Figura 5). Con estas dos mediciones se calculó la superficie placentaria de la cara fetal, a partir de la siguiente fórmula:

$$DP = DP2 \cdot DP1 \cdot \pi / 4$$

Grosor placentario. Con el calibrador de precisión 0.01 mm, se midió el grosor de cada placenta desde la línea media o punto de inserción del cordón (Figura 5).

Figura 5. Toma de mediciones macroscópicas de la placenta murina



Fuente: Muñoz, Yhoiss 2018.

7.3.3 Procesamiento histoquímico de las placentas. Las placentas fijadas fueron deshidratadas en soluciones de concentración creciente de etanol (70%, 80%, 95%, 100%), aclaradas con dos pasos de xilol, embebidas en parafina (punto de fusión 56-57°C) (Croy et al., 2013) y seccionadas transversalmente a 4 µm de espesor. Posteriormente, los cortes obtenidos se fijaron sobre láminas portaobjetos y fueron almacenados en cajas porta-láminas hasta el momento de tinción (anexo 6).

Para la caracterización de la morfología placentaria de los tres grupos de estudio, se realizó la tinción de rutina hematoxilina y eosina – H&E (anexo 6). Los cortes placentarios teñidos con H&E fueron seleccionados siguiendo estos criterios.

Criterios de inclusión de cortes histológicos. Se seleccionaron cortes con buena tinción, sin pliegues y donde fue posible diferenciar cada una de las zonas placentarias (decidua, zona de unión y zona de laberinto).

Criterios de exclusión de cortes histológicos. Se excluyeron aquellos cortes que sufrieron daños a causa del procesamiento histoquímico.

7.3.4 Observación y análisis histológico de las placentas. Para observar los detalles histológicos de las zonas placentarias, se utilizó un microscopio de luz acoplado a una cámara digital (LEICA DM750). Mediante este equipo se realizó el reconocimiento de la organización histológica de las tres zonas placentarias, la identificación de las estructuras de cada una de las zonas y la identificación de los detalles celulares, con las magnificaciones de 4x, 10x y 40x, respectivamente.

7.3.5 Captura de imágenes para análisis morfométrico microscópico. Para las mediciones microscópicas placentarias se realizó una reconstrucción de imagen que implicó la captura en 10X de aproximadamente 20-25 imágenes por placenta, mediante el software Leica Application Suite (LASV4.7). Posteriormente con el paquete de imágenes de cada placenta, se utilizó la herramienta de reconstrucción Image Builder.

7.3.6 Mediciones morfométricas microscópicas de la placenta. A partir de las imágenes placentarias reconstruidas en 10x, se realizó la medición del grosor placentario (GP), grosor zona de laberinto, (GZL), área placentaria (AP) y área de la zona del laberinto (AZL) (Tabla 4) mediante el programa Image-Pro Plus 7.0.

Tabla 4. Variables microscópicas placentarias

Variable	Unidades / denominación	Tipo	Escala
Área placentaria	Micrómetros cuadrados (μm^2)	Cuantitativo continua	Razón
Área de zona de laberinto	Micrómetros cuadrados (μm^2)	Cuantitativo continua	Razón
Grosor placentario	Micrómetros (μm)	Cuantitativo continua	Razón
Grosor de zona de laberinto	Micrómetros (μm)	Cuantitativo continua	Razón

7.3.7 Medición del grosor placentario (GP) y del grosor de la zona de laberinto (GZL). Para determinar el **GP**, se tomó como referencia el punto de inserción del cordón umbilical y se trazó una línea central hasta la parte superior de la decidua. Paralelo a esta línea y a una distancia de 850 μm con respecto a la línea central, se trazaron dos líneas adicionales. Este mismo procedimiento se aplicó para determinar el **GZL**, la diferencia en esta medición fue que las tres líneas se trazaron en la zona que abarcaba el laberinto placentario. Las mediciones se realizaron por triplicado (Figura 6).

Figura 6. A. Representación de las mediciones microscópicas del grosor placentario (GP) y B. grosor de la zona de laberinto (GZL)

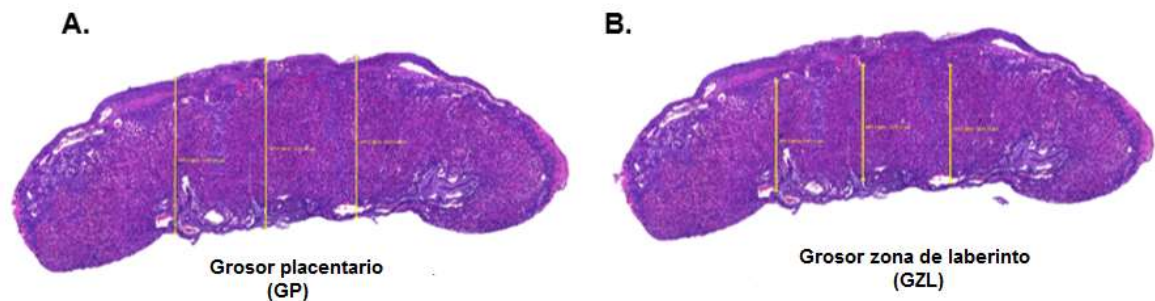


Imagen reconstruida de un corte histológico de placenta teñido con H&E sobre la cual se trazaron tres líneas en paralelo para medir el GPT y el GZL mediante el programa Image-Pro Plus 7.0. La distancia entre cada línea trazada sobre la imagen fue de 850 μm .

7.3.8 Medición del área placentaria (AP) y el área de la zona del laberinto (AZL). Para delimitar el AP y el AZL, se utilizó la herramienta de selección del programa Image-Pro Plus 7.0, que permitió demarcar el borde externo de la placenta y bordes externos de la zona del laberinto, respectivamente. Las mediciones se realizaron por triplicado para cada placenta (Figura 7).

Figura 7. A. Representación de las mediciones microscópicas del área placentaria total (AP) y **B.** área zona de laberinto (AZL)

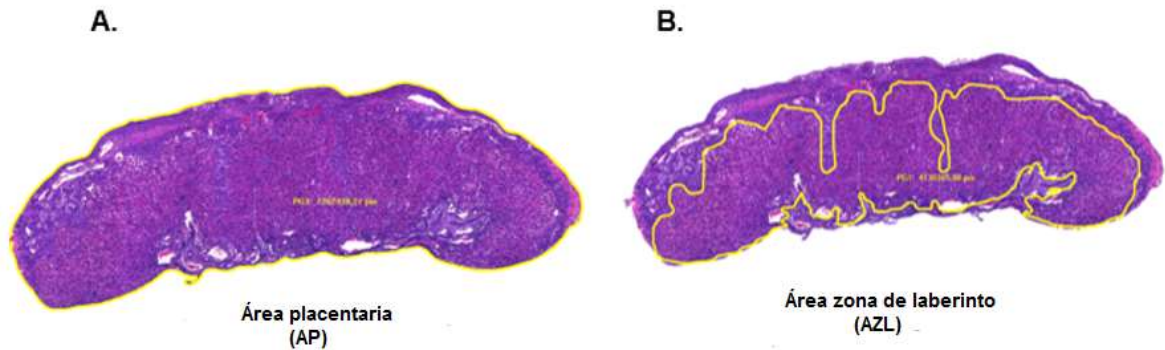


Imagen reconstruida de un corte histológico de placenta teñido con H&E sobre la cual se demarcaron en amarillo los bordes externos de la placenta y de la zona de laberinto para medir AP y AZL, respectivamente, mediante el programa Image-Pro Plus 7.0.

7.3.9 Prueba de concordancia intra e inter observador.

Mediciones macroscópicas. Para la prueba intra observador se realizaron mediciones por triplicado de las variables de medición macroscópica (GP, DP1, DP2) a todas las placentas que fueron seleccionadas para el análisis morfométrico. Para la prueba inter observador el experto midió por triplicado las mismas variables en cinco placentas de cada grupo de estudio.

Mediciones microscópicas. Para la prueba intra observador, se realizaron mediciones por triplicado de cada una de las variables de medición microscópica (AP, AZL, GP, GZL) de todas las placentas que fueron seleccionadas para el estudio morfométrico. Para realizar la prueba inter observador, se suministró al experto imágenes de cinco placentas: dos imágenes de placentas del Grupo experimental, dos imágenes de placentas del Grupo control y una imagen de placenta del Grupo sham, para que realice las mismas medidas de las variables de estudio por triplicado con el programa Image-Pro Plus 7.0.

Los datos reportados por parte del investigador y los del experto se analizaron con el índice de correlación intraclass como se detalla en el acápite 7.4

7.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la evaluación del supuesto de normalidad de cada una de las variables, se utilizó la prueba de Shapiro Wilks, La homogeneidad de varianza se evaluó por medio de la prueba de Levene. Como los datos se ajustaron a estos supuestos se utilizó la prueba paramétrica de comparación de medias ANOVA con el fin de encontrar la existencia de diferencias significativas entre los tres grupos de estudio. Posteriormente se utilizó la prueba post hoc de Tukey para identificar la ubicación de la o las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Se trabajó con un nivel de significancia del 5%. Los datos morfométricos se expresaron como media $\pm$ desviación estándar y en el caso de los recuentos bacterianos las UFC/g se denotaron con la mediana y entre paréntesis el rango intercuartílico.

Para estimar la variabilidad inter e intra-observador en las mediciones morfométricas placentarias, se usó el coeficiente de correlación intraclass con los estándares de referencia propuestos por Landis y Koch (1977) (Tabla 5).

Tabla 5. Valoración del coeficiente kappa	
Coeficiente kappa	Grado de acuerdo
0.00	Pobre
0.01 – 0.20	Leve
0.21 – 0.40	Regular
0.41 – 0.60	Moderada
0.61 – 0.80	Substancial
0.81 – 1.00	Casi perfecta

Fuente: Landis y Koch (1977)

8. RESULTADOS

8.1 ESTUDIO DE LA COLONIZACIÓN DE LOS ÓRGANOS INTERNOS POR *SALMONELLA* ENTERITIDIS

El efecto de una enterocolitis por *S. Enteritidis* durante la etapa tardía de la gestación puede ser estudiado mediante la utilización del modelo de enterocolitis ampliamente desarrollado en el laboratorio del IMPaM (ver Metodología). Los animales fueron inoculados el día 15 de gestación con una dosis no letal de *S. Enteritidis* (10^3 UFC/ratón) con el objetivo de evaluar los cambios histomorfológicos que puede generar este patógeno a nivel placentario.

En primer lugar se evaluó la colonización de *S. Enteritidis* en el intestino, bazo y útero de las hembras gestantes a los tres días post infección (día 18 de gestación). Los resultados demuestran una masiva colonización de dichos órganos que presentaron una alta carga bacteriana (entre 10^4 - 10^5 UFC/g) (Tabla 6).

Tabla 6. Colonización de *S. Enteritidis* (UFC/g) a nivel de órganos internos maternos y unidad feto-placentaria

Grupo de estudio	Intestino (I)	Bazo (B)	Útero (U)	Placenta (P)	Feto (F)
Grupo I (experimental)	9×10^5 (10^4 - 10^6)	1.2×10^5 (10^4 - 10^6)	3.7×10^4 (10^2 - 10^8)	5.7×10^4 (10^3 - 10^7)	5.4×10^1 (10^1 - 10^2)

Estudio de la colonización de los órganos internos por *S. Enteritidis*. Ratones del Grupo experimental (n=10) pretratados con 20 mg de estreptomicina recibieron al día 15 de gestación $3-4 \times 10^3$ UFC de *S. Enteritidis*. A los tres días post infección (día 18 de gestación) fueron eutanasiados y se tomaron las muestras correspondientes para recuento de UFC/g órgano. Los resultados se expresan como la mediana y entre paréntesis el rango.

La infección experimental de ratones gestantes con *S. Enteritidis*, también resultó en la colonización bacteriana a nivel de la unidad feto placentaria. Luego de tres días post-infección (dpi) 15 de las 27 placentas seleccionadas para este análisis, presentaron una carga bacteriana equivalente a 5.4×10^4 UFC/g placenta (Tabla 6). Mientras que las 12

placentas restantes no demostraron colonización por el patógeno, aunque procedían de hembras cuyos órganos internos (intestino, bazo y útero) habían sido colonizados por *SE* (Tabla 6). Además, se evidenció que placentas donde se reportó colonización por *S. Enteritidis*, se encontraban rodeadas de placentas donde no hubo reporte de crecimiento bacteriano aunque su procedencia fuera de la misma hembra gestante.

En el caso de los recuentos de *S. Enteritidis* en los fetos, se encontró la siguiente situación.

- (i) 10/27 fetos cuya placenta registró colonización por el patógeno, presentaron un recuento promedio de 5.4×10^1 UFC/g,
- (ii) 5/27 fetos cuya placenta registró colonización por el patógeno, pero no presentaron recuento bacteriano,
- (iii) 12/27 fetos cuya placenta no registro colonización por el patógeno, y no presentaron recuento bacteriano

Posterior a verificar mediante el análisis microbiológico que la bacteria tuvo la capacidad de colonizar los órganos maternos y propagarse hasta la unidad feto-placentaria, se continuó con el estudio de las variables morfométricas y de la histología placentaria.

8.2 ANÁLISIS DE CORRELACIÓN DE LAS VARIABLES DE MEDICIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DE LA PLACENTA

Antes de entrar a analizar en detalle el efecto de un patógeno de transmisión alimentaria como *S. Enteritidis* sobre las variables de medición placentaria, fue necesario determinar mediante el coeficiente de correlación intraclase (CCI), el grado de acuerdo entre las mediciones que se tomaron en este estudio para cada una de las variables, con las mediciones realizadas por un par evaluador. A partir del análisis de correlación se encontró un grado de acuerdo **casi perfecto**, para las pruebas intra observador e inter observador, tanto de las variables macroscópicas (Tabla 7) y las variables microscópicas (Tabla 8) según rangos establecidos por Landas y Koch (1977) (Tabla 5).

Tabla 7. Prueba intra observador e inter observador de las variables macroscópicas

Variable de medición	Prueba Intra observador		Prueba Inter observador	
	ICC	Grado de acuerdo	ICC	Grado de acuerdo
GP	0,949	Casi perfecto	0.986	Casi perfecto
D1M	0,987	Casi perfecto	0.997	Casi perfecto
D2M	0,982	Casi perfecto	0.997	Casi perfecto

GP: grosor placentario, D1M: diámetro mayor, D2M: diámetro menor

Tabla 8. Prueba intra observador e inter observador de las variables microscópicas

Variable de medición	Prueba Intra observador		Prueba Inter observador	
	ICC	Grado de acuerdo	ICC	Grado de acuerdo
GP- 1	0,993	Casi perfecto	0,999	Casi perfecto
GP- 2	0,997	Casi perfecto	0,999	Casi perfecto
GP- 3	0,994	Casi perfecto	0,998	Casi perfecto
GZL-1	0,997	Casi perfecto	0,995	Casi perfecto
GZL- 2	0,994	Casi perfecto	0,978	Casi perfecto
GZL-3	0,997	Casi perfecto	0,999	Casi perfecto
AP	1,000	Casi perfecto	0,996	Casi perfecto
AZL	0,999	Casi perfecto	0,998	Casi perfecto

GP: grosor placentario, GZL: grosor zona de laberinto, AP: área placentaria, AZL: área zona de laberinto

8.3 EFECTO DE SALMONELLA ENTERITIDIS SOBRE LA MORFOMETRÍA MACROSCÓPICA PLACENTARIA EN UN ESTADIO TARDÍO DE LA PREÑEZ

En respuesta a la infección por *S. Enteritidis* se observó -a los tres días post inoculación- una disminución significativa en las variables de medida macroscópicas de las placentas procedentes del grupo experimental: diámetro mayor (**DP1**) (7.32 ± 0.39 mm; Figura 8C), diámetro menor (**DP2**) (7.19 ± 0.50 mm; Figura 8D) y área superficial placentaria (**SP**) (41.28 ± 4.54 mm²; Figura 8E), en comparación con las placentas del grupo control vs el grupo sham, cuyas dimensiones macroscópicas de diámetro mayor (**DP1**) (7.82 ± 0.46 mm y 7.73 ± 0.47 mm; Figura 8C), diámetro menor (**DP2**) (7.75 ± 0.32 mm y 7.68 ± 0.31 mm; Figura 8D) y área superficial placentaria (**SP**) (47.66 ± 4.07 y 46.55 ± 3.83 mm²; Figura 8E), respectivamente, fueron mayores. Adicional a estos resultados, el grosor placentario (**GP**)

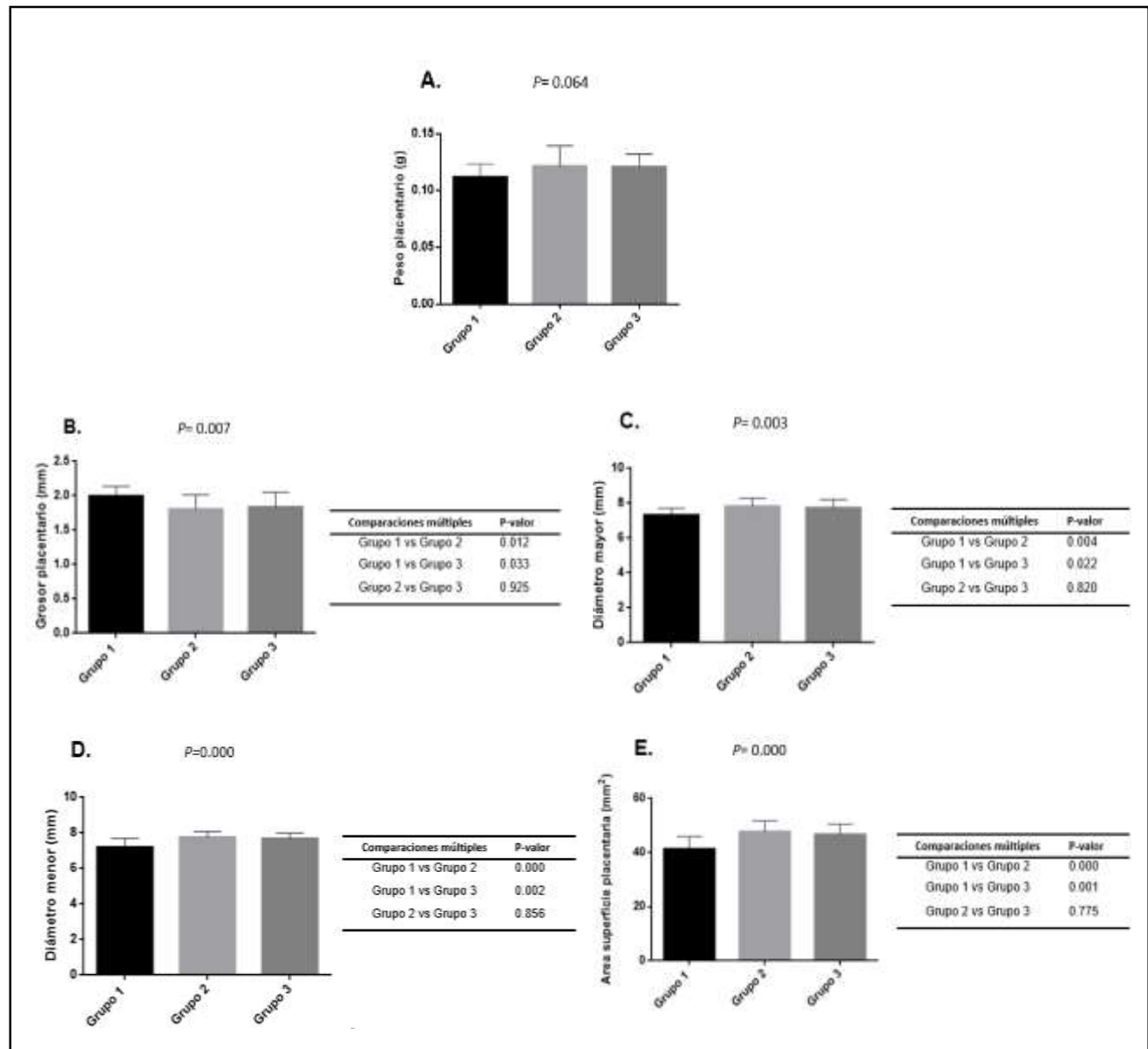
fue mayor en el grupo experimental (2.00 ± 0.14 mm; Figura 8B) en relación al **GP** del grupo control (1.80 ± 0.20 mm, Figura 8B) y grupo sham (1.83 ± 0.22 mm; Figura 8B). A partir de estos hallazgos, se confirma que *SE* propicia una alteración en la morfometría macroscópica placentaria en lo que respecta a estas cuatro variables de medición, excepto el peso placentario, el cual fue la única variable morfométrica que no evidenció diferencias significativas en los tres grupos de estudio (grupo experimental = 0.11 ± 0.01 g, grupo control = 0.12 ± 0.02 g, grupo sham = 0.12 ± 0.01 g; Figura 8A).

8.4 EFECTO DE *SALMONELLA* ENTERITIDIS SOBRE LA MORFOMETRÍA MICROSCÓPICA PLACENTARIA EN UN ESTADIO TARDÍO DE LA PREÑEZ

A diferencia de los resultados obtenidos con las mediciones macroscópicas, las variables de medición microscópica como el grosor placentario (**GP**) (experimental: $1708,52 \pm 97.42$ μm ; control: $1723,95 \pm 95.95$ μm ; sham: $1770,66 \pm 97.72$ μm , Figura 9A), el grosor de la zona de laberinto (**GZL**) (experimental: 1153.46 ± 81.77 μm , control: 1126.89 ± 77.61 μm ; sham: $1161,43 \pm 72.15$, Figura 9B), el área placentaria (**AP**) (experimental: $7.9 \times 10^6 \pm 9.4 \times 10^5$ μm^2 , control: $8.5 \times 10^6 \pm 6.7 \times 10^5$ μm^2 , sham: $8.0 \times 10^6 \pm 6.5 \times 10^5$ μm^2 , Figura 9C), y el área de la zona de laberinto (**AZL**) (experimental: $5.1 \times 10^6 \pm 6.1 \times 10^5$ μm^2 , control: $5.3 \times 10^6 \pm 4.2 \times 10^5$ μm^2 , sham: $5.4 \times 10^6 \pm 4.3 \times 10^5$ μm^2 , Figura 9D), no mostraron diferencias significativas entre los tres grupos evaluados ($P > 0.05$).

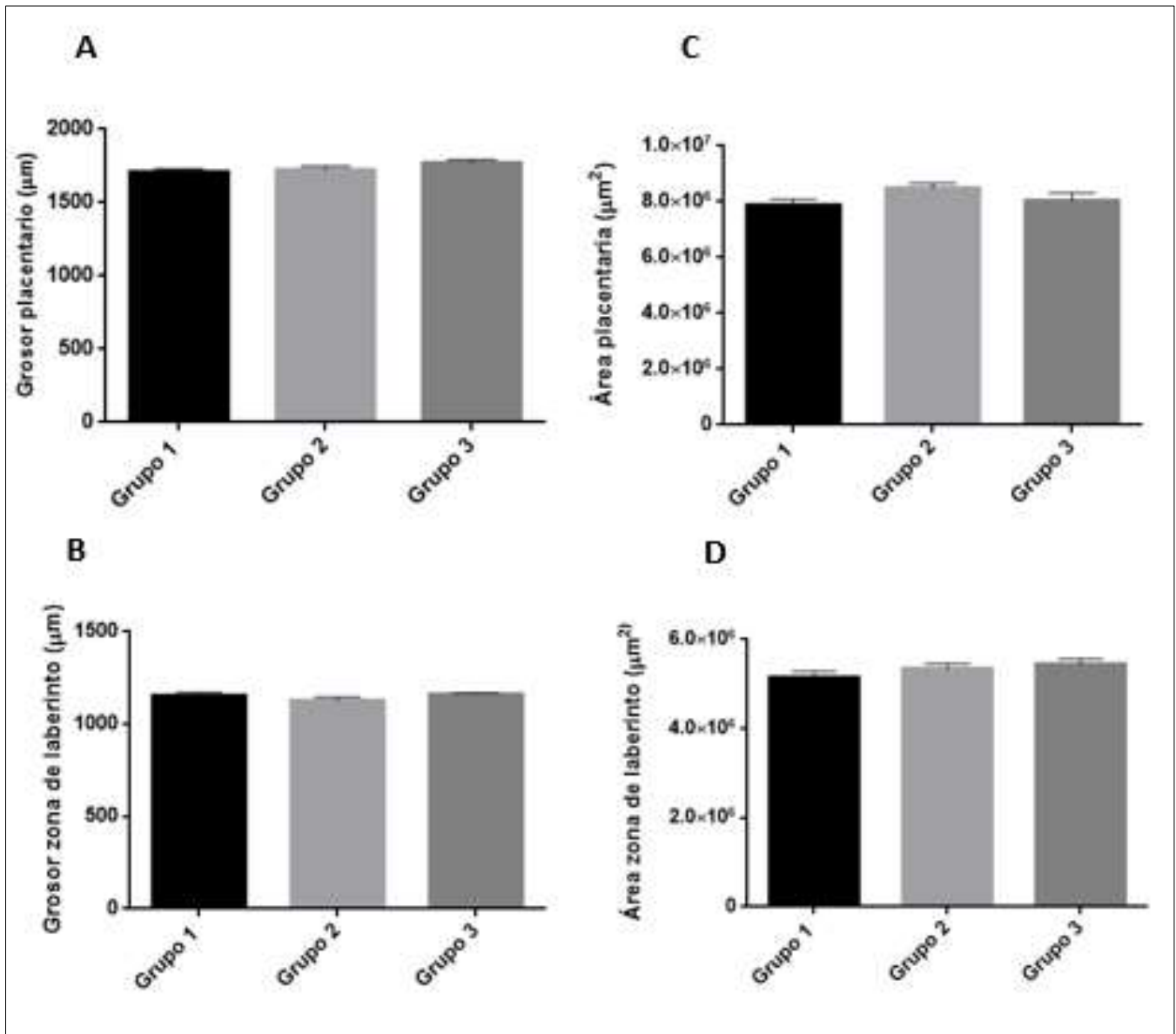
Los resultados hasta aquí presentados demuestran que luego de tres días p.i, *S. Enteritidis* induce cambios significativos a nivel de la morfometría placentaria macroscópica, sin aparentes alteraciones en las variables de medición microscópica que fueron contempladas para analizar en este estudio.

Figura 8. Comparación de las variables macroscópicas placentarias entre los tres grupos de estudio



A. el peso placentario fue igual para los tres grupos evaluados. Se encontraron diferencias significativas ($P<0.05$) en el **B.** grosor placentario, **C.** diámetro mayor, **D.** diámetro menor y **E.** área de superficie placentaria, entre el grupo experimental vs el grupo control y grupo sham. Entre estos dos últimos grupos no hubo diferencias significativas ($P>0.05$). El análisis se realizó con una ANOVA y las diferencias entre grupos con una prueba post hoc de Tukey. Grupo 1: experimental, Grupo 2: control y Grupo 3: sham. Las barras de error demuestran la desviación estándar.

Figura 9. Comparación de las variables microscópicas placentarias entre los tres grupos de estudio



No se evidenció diferencias significativas ($P > 0.05$) en el **A.** grosor placentario, **B.** grosor de la zona de laberinto, **C.** área placentaria y **D.** área zona de laberinto. El análisis se realizó con una ANOVA. Grupo 1: experimental, Grupo 2: control y Grupo 3: sham. Las barras de error demuestran la desviación estándar

8.4 ANÁLISIS HISTOMORFOLÓGICO PLACENTARIO

Luego de evidenciar que SE generó cambios significativos a nivel de las variables morfométricas macroscópicas de la placenta y sumado a la capacidad que demostró el patógeno para llegar hasta la placenta, atravesarla e infectar al feto (Tabla 6), se decidió analizar si una enterocolitis por *S. Enteritidis* en baja dosis infectiva, induce alteraciones histológicas placentarias que puedan incidir en el mantenimiento de una preñez normal.

Para ello, se observó y caracterizó cada una de las zonas que componen a la placenta: decidua materna, zona de unión (compuesta de espongiotrofoblastos, células trofoblásticas gigantes y células glucogénicas) y la zona de intercambio materno-fetal conocida como zona de laberinto (Figura 10). La zona unión y la zona de laberinto constituyen lo que se conoce como la zona fetal de la placenta

A partir de la observación de las zonas placentarias se encontró que en las placentas procedentes del grupo experimental, presentaban alteraciones histomorfológicas asociadas principalmente a la zona decidual, caracterizadas por la presencia de grandes focos de necrosis con infiltración leucocitaria aguda de tipo neutrófilo (PMNs) (Figura 11, Figura 12 y Figura 13), mientras que en la zona de unión y la zona de laberinto no se observó alteraciones que fueran visibles con la tinción de H&E, solamente cambios histomorfológicos normales compatibles con la edad gestacional, que fueron los mismos observados en las placentas del grupo control y grupo sham (Tabla 9).

Tabla 9. Alteraciones histomorfológicas en placentas procedentes de hembras gestantes infectadas con *Salmonella* Enteritidis

Zonas placentarias	Placentas infectadas	Alteraciones
Zona decidual	presencia de cambios	- Grandes focos de necrosis - Infiltrado inflamatorio agudo tipo neutrófilo
Zona de unión	sin alteraciones aparentes p.i	-----
Zona de laberinto	Sin alteraciones aparentes p.i	-----

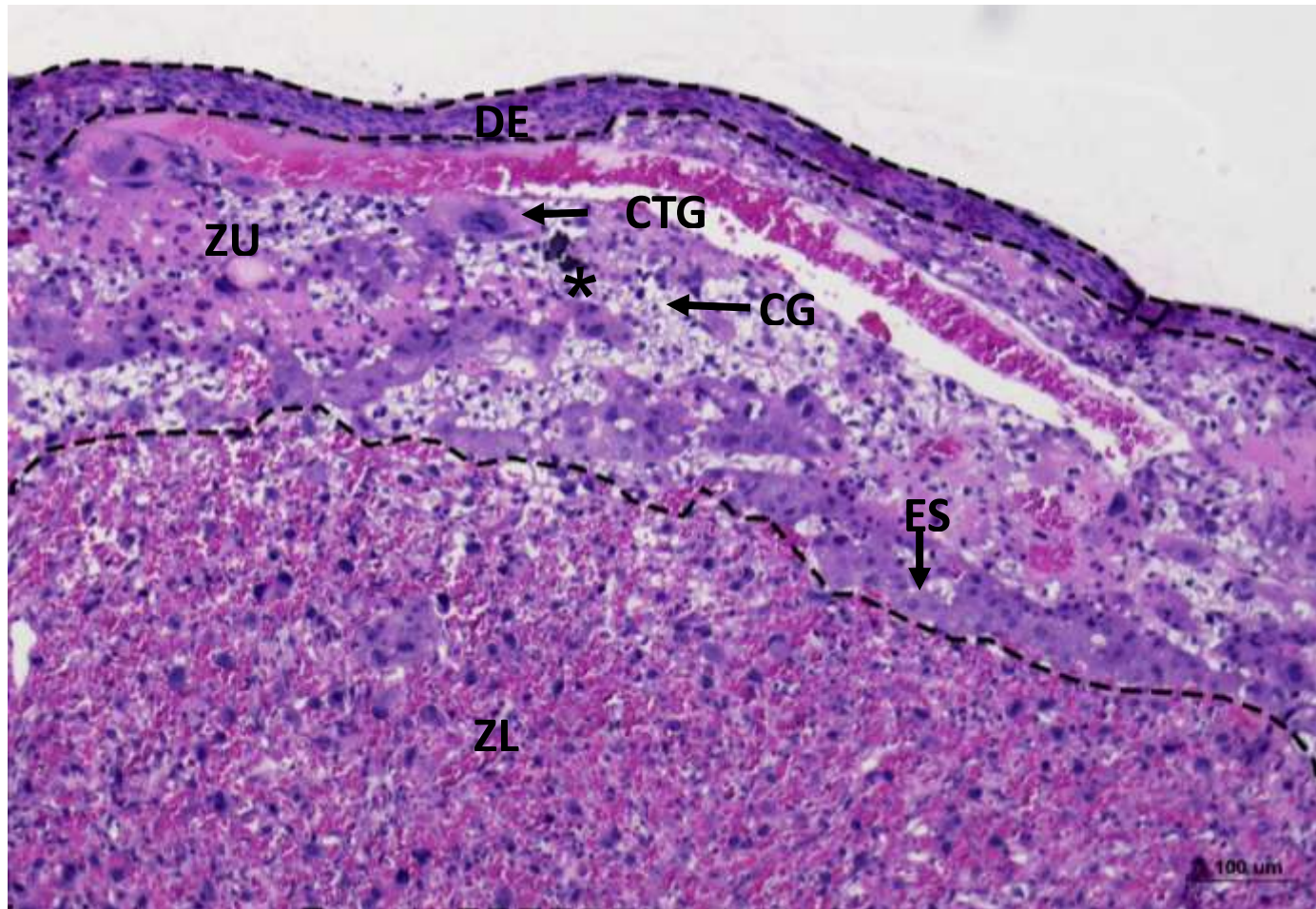


Figura 10. Organización histológica de la placenta murina de 18 dg. Las líneas punteadas (- - -) demarcan las tres zonas que componen a la placenta. Hacia la cara materna, se encuentra la decidua (DE), y hacia la cara fetal está la zona de unión (ZU) (compuesta de espongiotrofoblastos (ES), células trofoblásticas gigantes (CTG) y células glucogénicas (CG)) y la zona de laberinto (ZL). (*) Depósitos de calcio. Tinción H&E 40X.

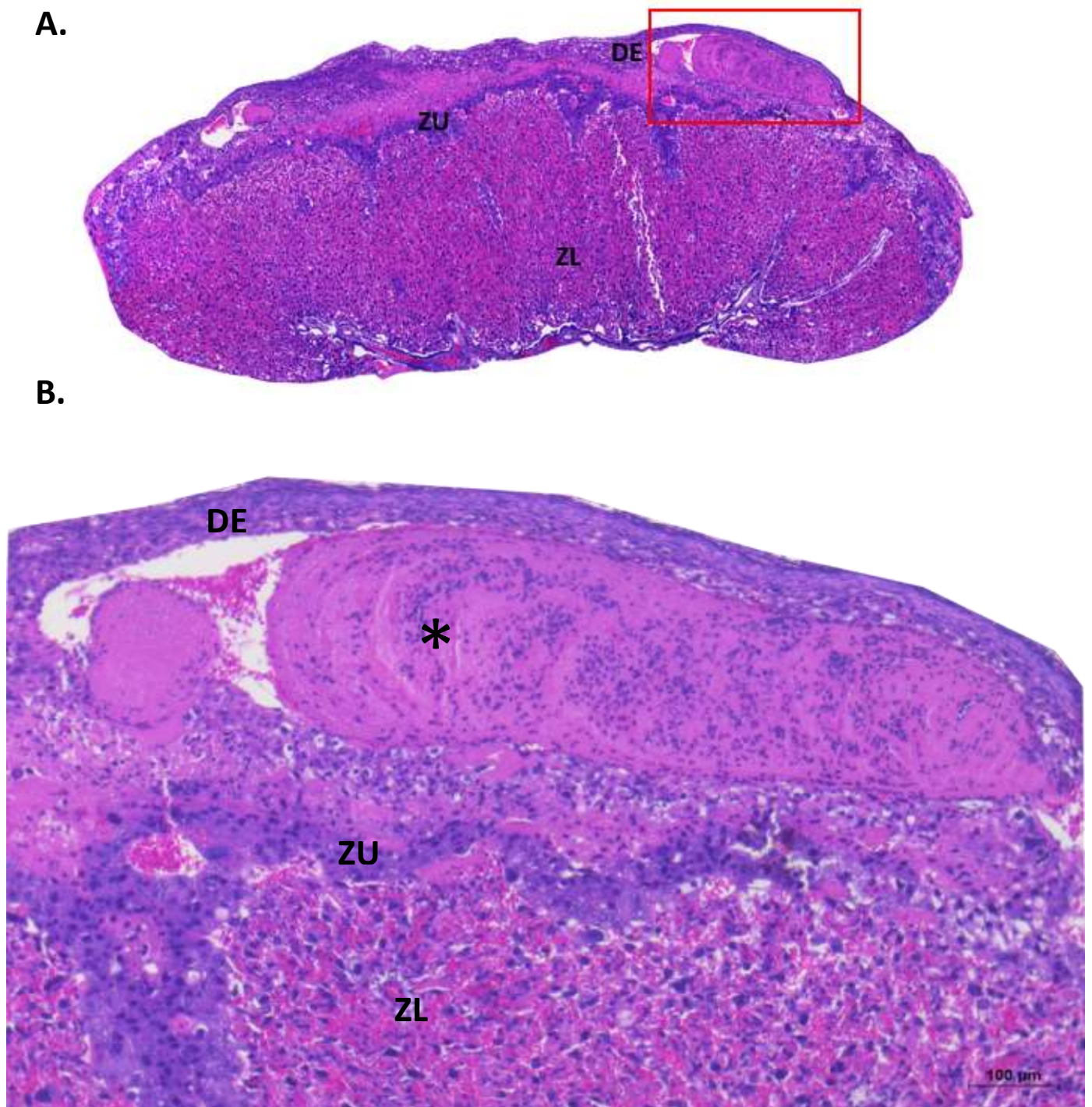


Figura 11. Zona decidual de una placenta infectada con *Salmonella* Enteritidis tres días post-infección. Se observa un gran foco de necrosis con infiltrado inflamatorio agudo tipo neutrófilo a nivel de la decidua (*). (A) Imagen reconstruida a 10X, (B) Imagen 40x. Tinción H-E. ZU: zona de unión, ZL: zona de laberinto, DE: decidua.

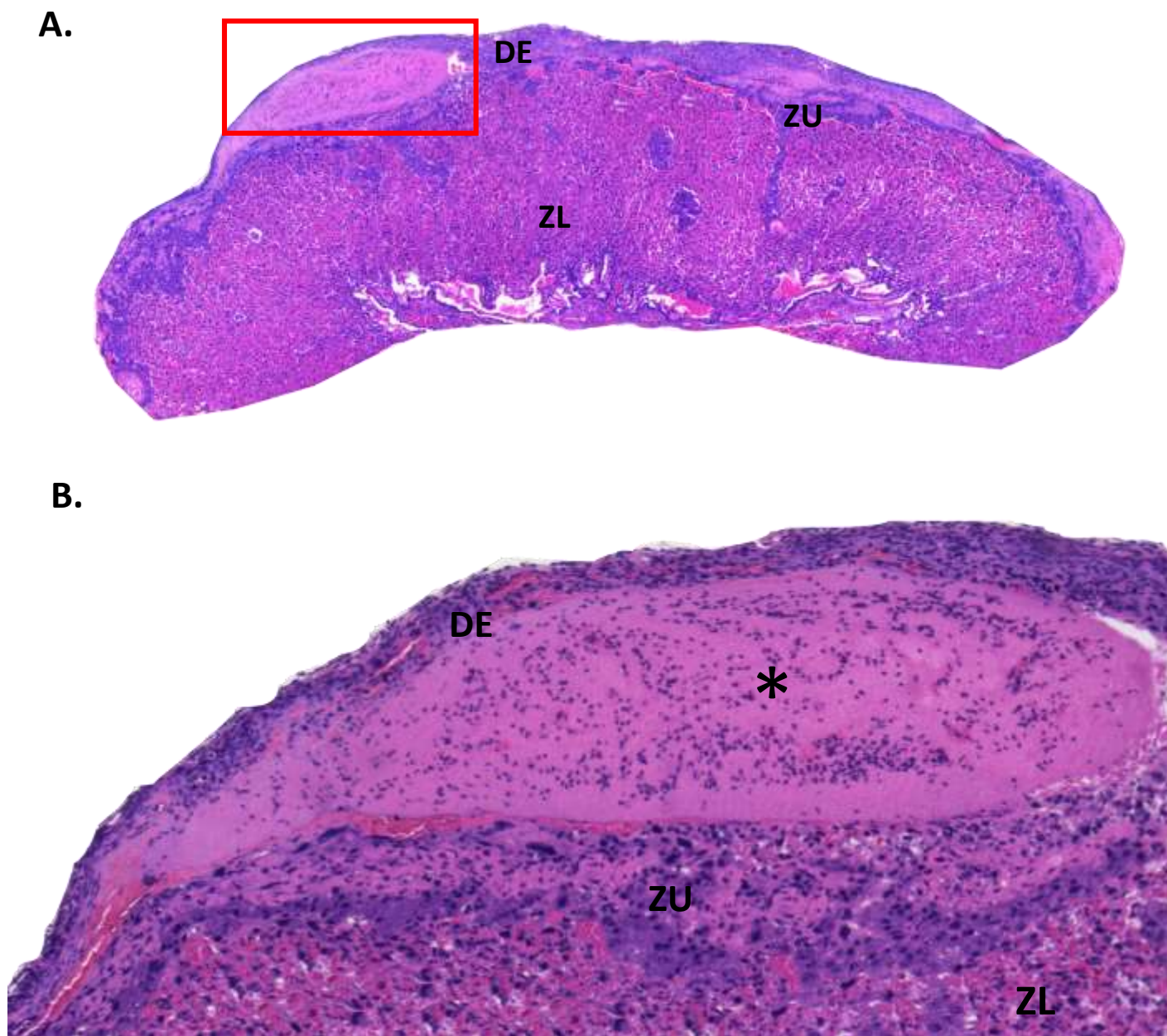
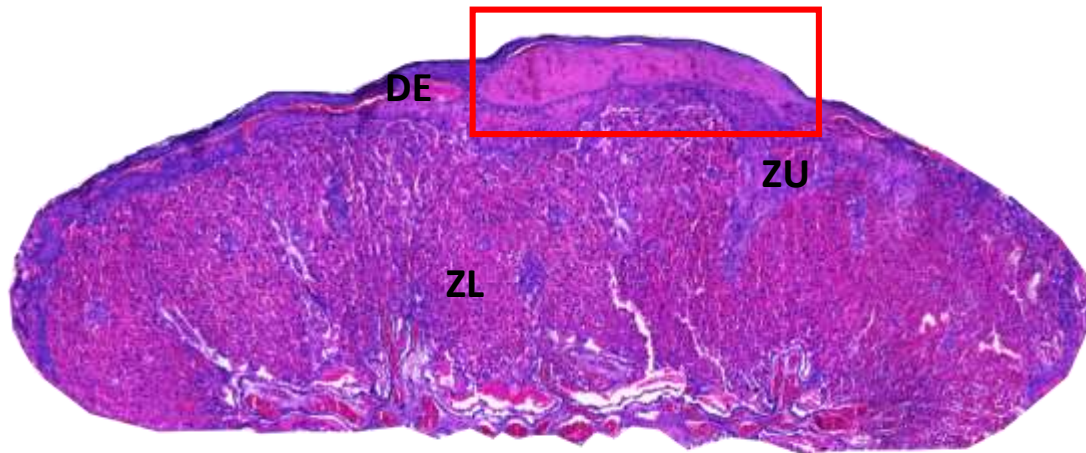


Figura 12. Zona decidual de una placenta infectada con *Salmonella* Enteritidis tres días post-infección. Se observa un gran foco de necrosis con infiltrado inflamatorio agudo tipo neutrófilo a nivel de la decidua (*). **(A)** Imagen reconstruida a 10X, **(B)** Imagen a 40X. Tinción H-E. **ZU:** zona de unión, **ZL:** zona de laberinto, **DE:** decidua.

A.



B.

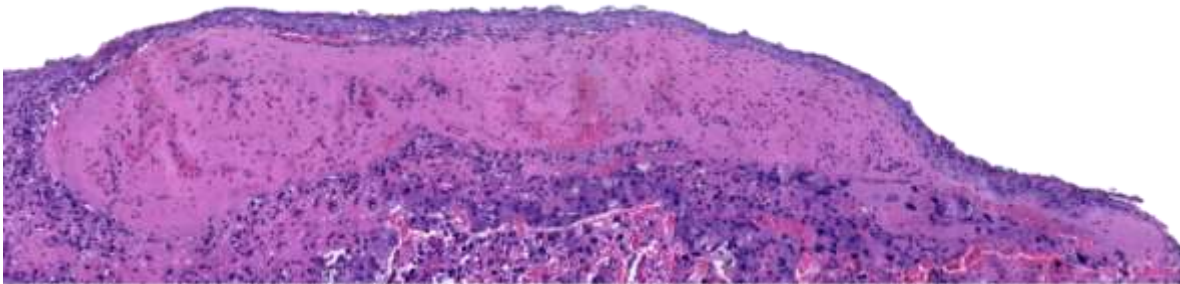


Figura 13. Zona decidual de una placenta infectada con *Salmonella* Enteritidis tres días post-infección en el que se observa un gran foco de necrosis con infiltrado inflamatorio agudo tipo neutrófilo a nivel de la decidua (*). **(A)** Imagen reconstruida a 10X, **(B)** Imagen reconstruida a 40X Tinción H-E. **ZU:** zona de unión, **ZL:** zona de laberinto, **DE:** decidua.

8.5 CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA DE LA PLACENTA DE 18 d.g EN CONDICIONES DE NORMALIDAD

Caracterización de la zona decidual placentaria. En las placentas procedentes de los tres grupos de estudio, fue evidente la presencia de pequeños depósitos de calcio en zonas de degeneración celular y necrosis. Estos depósitos se encontraron dispersos en la decidua limitando con la zona de unión (Figura 14). En esta zona también se visualizaron células apoptóticas, caracterizadas por núcleos en cariorrexis o en cariólisis.

Caracterización de la zona de unión. Esta zona está compuesta por tres tipos celulares (i) células trofoblásticas gigantes, (ii) células espongiotrofoblásticas y (iii) células glucogénicas. Las placentas experimentales, controles y sham, no mostraron alteraciones notorias en esta zona, por lo tanto las características histológicas que se describen a continuación fueron comunes para todos los grupos. En esta etapa tardía de la gestación la zona de unión se observó reducida y al igual que la decidua presentó detritos celulares producto del proceso de apoptosis (células en cariorrexis o en cariólisis) y depósitos de calcio entre las células glucogénicas y los espongiotrofoblastos.

i) Células trofoblásticas gigantes. Morfológicamente las células se observaron alargadas y/o ovoides, con núcleo irregular y cromatina laxa, algunas con citoplasma vacuolado y ligeramente basófilo. Estas células se hallaron dispersas entre la decidua y la zona unión, y otras formando un borde externo delgado hacia la parte lateral de la placenta limitando con la membrana de Reichner y la zona de laberinto en la parte más distal. La mayoría de las células presentaron núcleos característicos en etapa de cariorrexis y cariólisis, lo cual indica un proceso de apoptosis (Figura 15).

ii) Las células espongiotrofoblásticas. presentaron un núcleo irregular, de cromatina laxa, algunas con múltiples nucléolos y citoplasma vacuolado (Figura 16). Estas células se encuentran rodeando las células glucogénicas y algunas formando pequeñas agrupaciones dispuestas en la parte intermedia de la zona del laberinto.

iii) Las células glucogénicas. se observaron con núcleos basófilos, excéntricos y límites celulares definidos. Los citoplasmas se presentan vacíos debido al proceso histoquímico empleado que arrastra el contenido de glucógeno. Estas células se organizan en islas de tamaño variable en medio de los espongiotrofoblastos (Figura 16).

Caracterización de la zona de laberinto. Esta zona ocupa la mayor parte de la placenta y es altamente vascularizada. Se identifican los espacios de forma irregular llenos de sangre materna sin endotelio, que pasan entre los septos trofoblásticos; los capilares fetales que mostraron un revestimiento de células endoteliales y los septos del trofoblasto que se componen de sincitiotrofoblasto que presentaron núcleos de forma irregular, cromatina densa sin límite citoplasmático definido y citotrofoblasto cuyo núcleo se observó ovalado y con cromatina ligeramente laxa (Figura 17).

A lo largo del laberinto de las placentas de los tres grupos de estudio, también se evidenció un escaso infiltrado inflamatorio, constituido principalmente por leucocitos polimorfonucleares de tipo neutrófilo (PMNs) y algunos linfocitos ocasionales.

Es importante destacar que no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en ninguno de los parámetros analizados entre los grupos control y sham. Por lo tanto, ninguna de las alteraciones reportadas en la placenta murina bajo las condiciones metodológicas de este estudio, pueden ser producto del suministro del antibiótico.

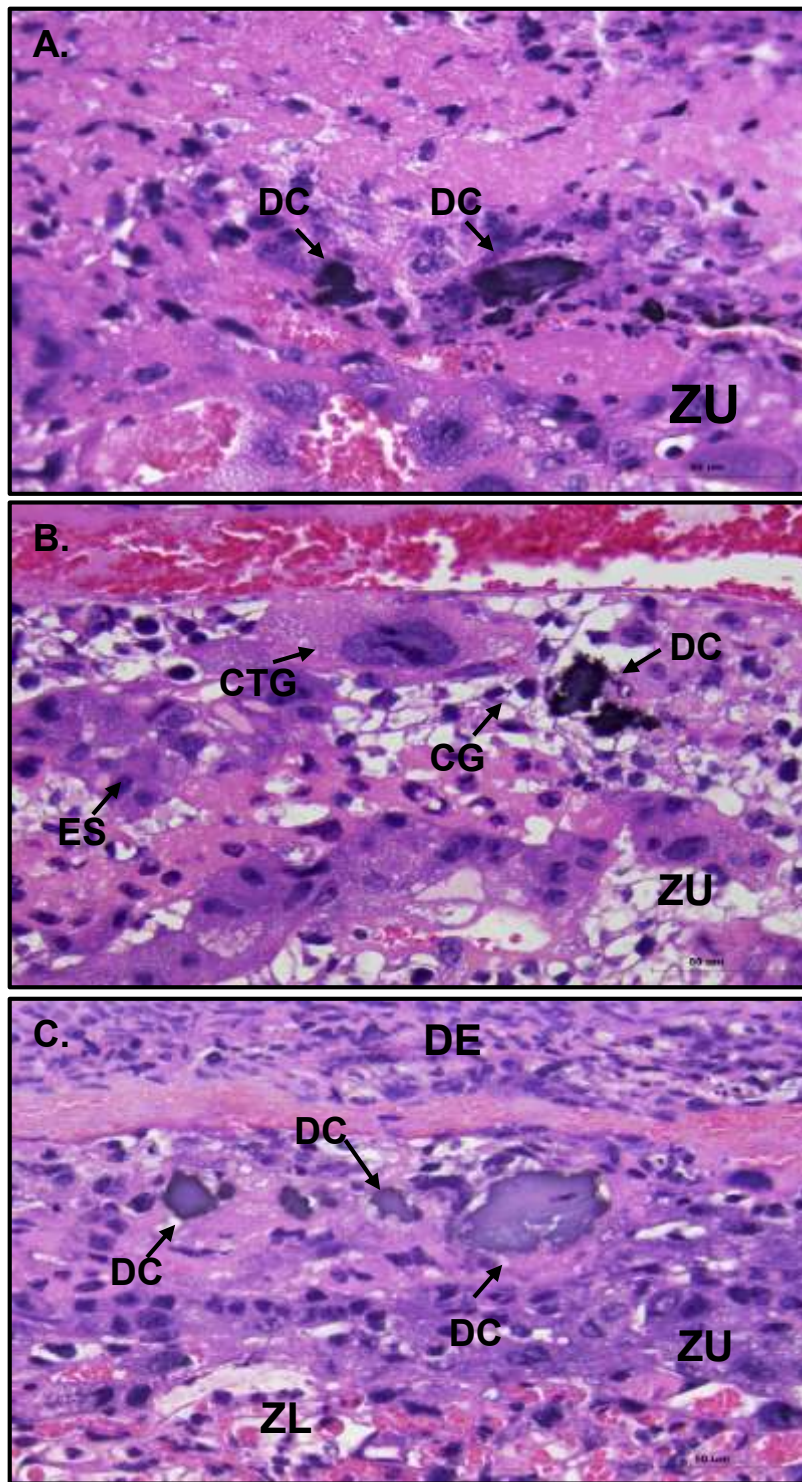


Figura 14. Depósitos de calcio en la placenta murina de 18 dg. Estas estructuras de forma irregular se encontraron en las placentas **A.** experimentales, **B.** control y **C.** sham. DE: decidua, ZU: zona de unión, ZL: zona de laberinto, DC: depósito de calcio. Tinción H&E 40X

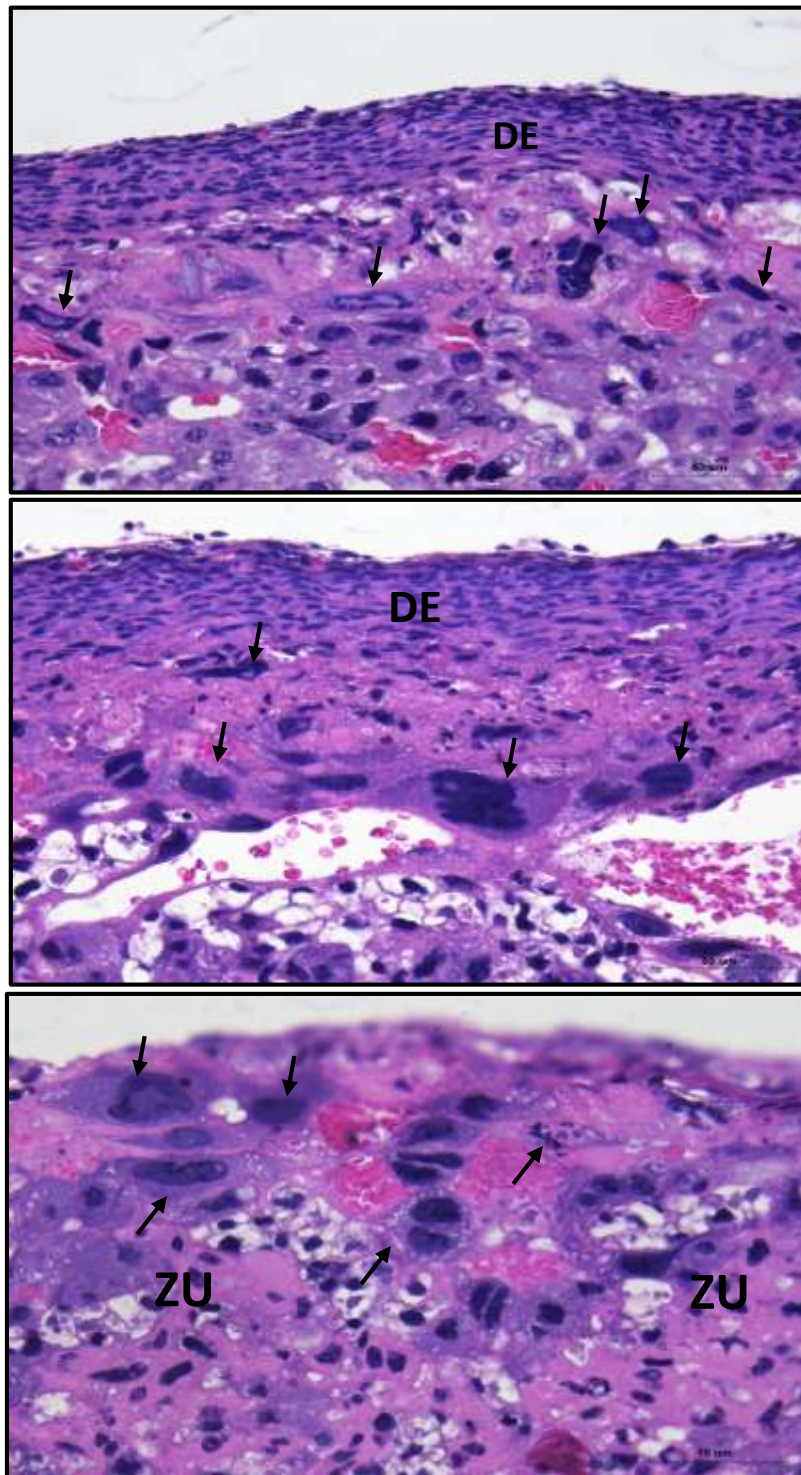


Figura 15. Células trofoblásticas gigantes (CTG) en la zona de unión de la placenta murina de 18 dg, Las CGT en las placentas **A.** experimentales, **B.** control, **C.** sham se observan en cariorrexis o en cariolisis. ZU: zona de unión. Tinción H&E 40X.

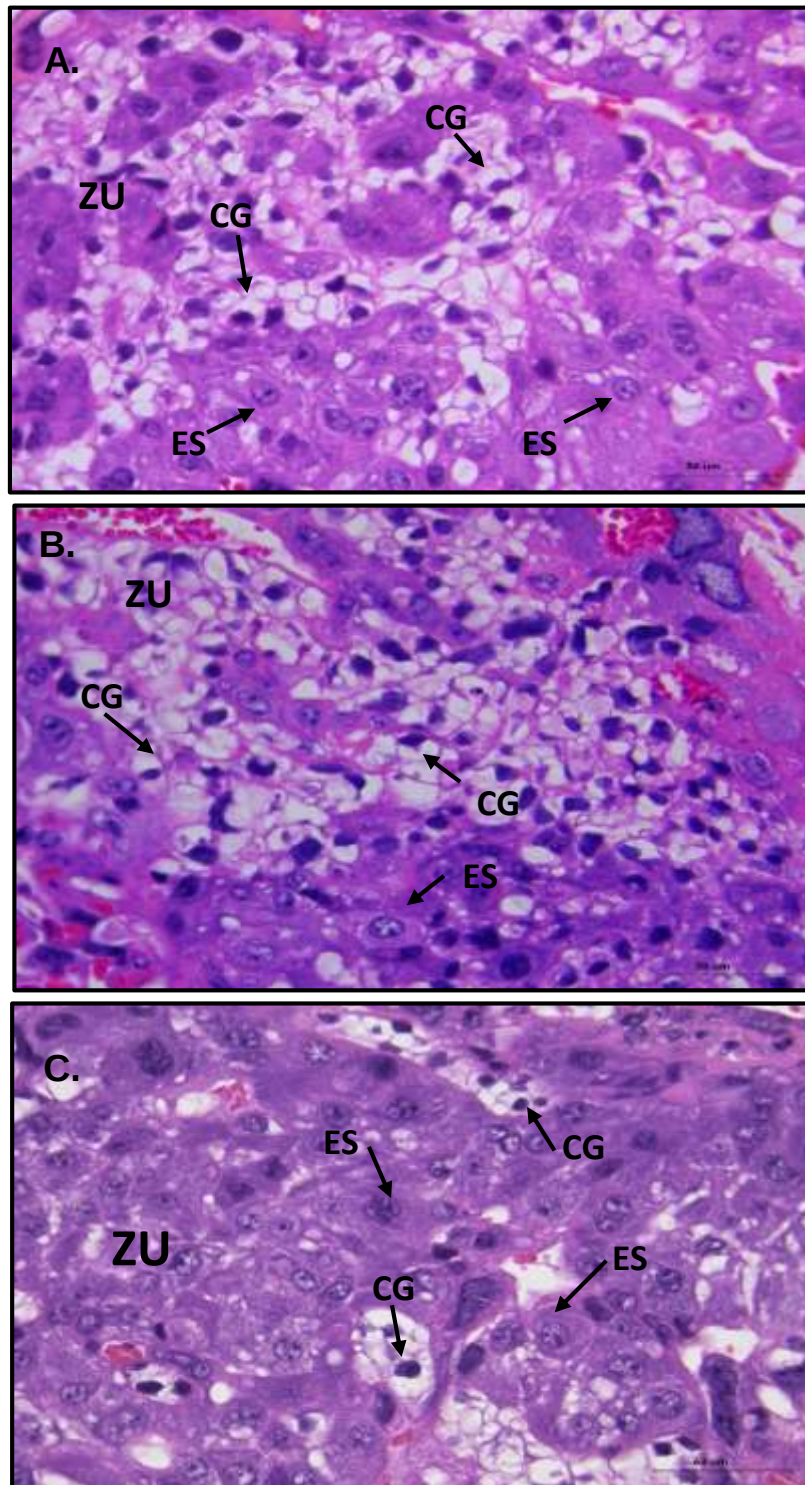


Figura 16. Células glucogénicas (CG) y espongiotrofoblastos (ES) en la zona de unión de la placenta murina de 18 dg. Placenta **A.** experimental **B.** control y **C.** sham. ZU: zona de unión, ZL: zona de laberinto, H&E 40X.

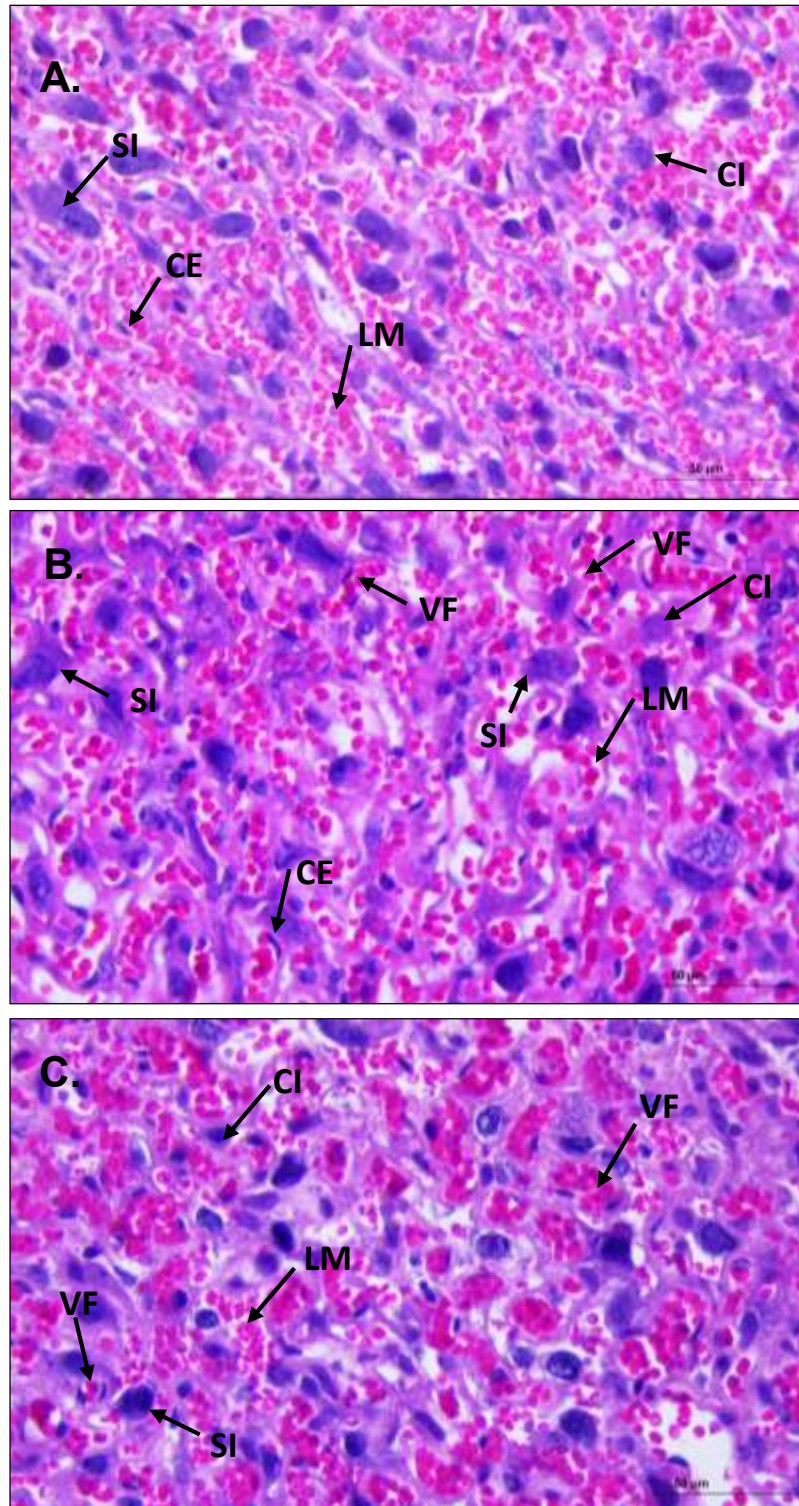


Figura 17. Zona de laberinto de la placenta murina de 18 dg. Placenta A. experimental, B. control, C. sham. LM: laguna materna, VF: vaso fetal, CI: citotrofoblasto, SI: sincitiotrofoblasto, CE: célula endotelial. H&E 40X

9. DISCUSIÓN

Las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) han sido reconocidas como el problema de Salud Pública más extendido del mundo actual ya que han aumentado en forma considerada en los últimos años. Se estima que en la región de las Américas de la OMS las enfermedades diarreicas representan el 95% de las ETA, siendo *Salmonella* no tifoidea uno de los principales patógenos. *Salmonella enterica* comprende miles de serovariedades capaces de causar un amplio rango de enfermedades, desde gastroenteritis hasta infecciones sistémicas. El tipo de enfermedad causada es dependiente de la serovariedad de *Salmonella* y del estado inmunológico del huésped infectado.

El embarazo *per se* constituye un estado de tolerancia inmunológica, y por lo tanto es una condición predisponente para el desarrollo de infecciones con patógenos intracelulares. Durante la gestación, la infección por *Salmonella* puede causar complicaciones tales como endometriitis, salpingitis, corioamnionitis, infección transplacentaria fetal, aborto séptico, septicemia neonatal y materna, parto pretérmino y preeclampsia (Hedriana et al., 1995; Van der Klooster & Roelofs., 1997; Schloesser et al., 2004; Mor, 2008; Pejic-karapetrovic et al., 2007). Una clara evidencia son los casos clínicos expuestos por Scialli & Rarick (1992), Van der Klooster & Roelofs (1997), Gyang & Saunders (2008), Ozer et al. (2009), donde se manifiesta que *Salmonella* puede ser altamente letal para el feto o recién nacido y sin efecto aparente sobre la madre.

En este trabajo se aplicó un modelo animal de enterocolitis. Un gran número de científicos coinciden en que este biomodelo comparte algunas de las características de la enterocolitis humana por *Salmonella* (Watson et al., 2010). Por lo tanto, ha sido ampliamente utilizado en el IMPaM para analizar las secuelas asociadas a la infección (Noto-Llana et al., 2013, 2014, 2017). Dicho modelo consiste en la inoculación por la ruta natural de infección de dosis subletales (10^3 UFC) de *S. Enteritidis* a ratones BALB/c al día 15 de gestación. Este modelo permitió analizar el efecto de una ETA por *S. Enteritidis* en la histomorfología placentaria durante un estadio tardío de la gestación.

La elección de evaluar los ratones gestantes en la etapa tardía de la preñez, se contempló por varias razones. El estrés o la infección antes del día 14 tienden a conducir a la

reabsorción de los fetos. El nacimiento prematuro en humanos también ocurre durante las últimas etapas de la gestación, y la infección murina se inició a una edad gestacional proporcional a 28 a 32 semanas en humanos. Además, la estructura de la placenta del ratón en las últimas etapas de la gestación es notablemente similar a la de la placenta humana (Han et al., 2004).

En este estudio se demostró que la inoculación intragástrica con una dosis subletal (10^3 UFC/ratón) de *S. Enteritidis* puede inducir una masiva colonización de los órganos internos de las hembras gestantes (Tabla 6). Asimismo, la bacteria presentó una alta eficiencia para atravesar la placenta e infectar la unidad feto-placentaria. Las hembras gestantes del grupo experimental, dado su estado inmunológico, fueron incapaces de limitar la infección al tracto intestinal y por consiguiente *S. Enteritidis* se diseminó sistémicamente colonizando bazo, útero, placenta y feto. Estos resultados coinciden con los observados por Vigliani & Bakardjiev (2013), quienes sugieren que *Salmonella* tiene predilección por la placenta convirtiéndola en un órgano que aloja a la bacteria, permite su replicación y su posterior diseminación al resto de los órganos, incluido el feto. En este caso la placenta perdería su función como barrera contra infecciones. Por lo tanto, en el año 2007 se ha agregado a *Salmonella* a la lista de patógenos como *Toxoplasma* spp., *Chlamydia* spp., *Listeria* spp. y *Plasmodium* spp. que preferencialmente invaden la placenta y que pueden causar abortos (Pejcic-karapetrovic et al., 2007).

Si bien se encontró en las hembras gestantes infectadas con *S. Enteritidis* una significativa colonización de los órganos internos (Tabla 6), se pudo evidenciar que no todas las placentas y fetos procedentes de la misma hembra, presentaban la misma carga bacteriana. Es más, algunas placentas infectadas, estaban rodeadas por placentas no colonizadas por el patógeno, resultado que fue verificado mediante el análisis microbiológico placentario y fetal. Este hallazgo sugiere que las unidades-fetoplacentarias son independientes en lo que respecta a la colonización y proliferación bacteriana, incluso cuando sus placentas vecinas estén infectadas. Estos resultados también fueron corroborados en otros modelos de infección con murinos por Abram & Doric (1997) y Le Monnier et al (2006), con *Listeria monocytogenes*; Tuffrey et al. (1987), con *Chlamydia trachomatis*, Bosseray (1980) con *Brucella abortus*. Frente a este patrón de comportamiento independiente de las placentas en el mismo útero con respecto al grado de infección,

Bosseray et al. (1980) sugiere que las placentas no están colonizadas al mismo tiempo y / o en el mismo nivel inicial. Dichos autores argumentan que cada placenta y/o el feto poseen su propio sistema de defensa, más o menos eficiente de acuerdo con cada unidad fetoplacental.

¿Por qué una infección entérica con *Salmonella* que debería ser autolimitada se transformó en una infección sistémica? Para responder a este interrogante se debe hacer referencia en primer lugar al estado de inmunotolerancia que presenta una hembra preñada, que la vuelve más susceptible a este tipo de infecciones. Por otro lado, también se debe considerar que durante el embarazo se produce un aumento en la permeabilidad intestinal (Astbury et al., 2015) lo cual podría explicar el incremento en la translocación bacteriana y la alta colonización observada en bazo. Durante el embarazo el intestino se vuelve más permeable para facilitar el pasaje de nutrientes. Estos cambios son necesarios para optimizar la salud y para permitir que la madre pueda satisfacer las demandas energéticas (Astbury et al., 2015). Sin embargo, esta condición fisiológica podría facilitar el pasaje de bacterias a la sangre y por consiguiente a la unidad fetoplacentaria durante una infección entérica.

En este trabajo se observó que en algunas placentas donde fue evidente la colonización del patógeno, se desencadenó también la infección a nivel del feto (10/27 fetos analizados), lo que sugiere que SE fue capaz de atravesar la barrera placentaria. Aunque el mecanismo exacto por el cual este patógeno pudo llegar a la unidad feto-placentaria, no pueda ser esclarecido en este estudio, se puede decir que *S. Enteritidis* al ser un patógeno intracelular, puede eludir el reconocimiento del huésped al establecer su residencia dentro de las células sanguíneas circulantes que facilitarían su diseminación sistémica; por lo tanto es de esperar que células infectadas como los monocitos puedan proporcionar transporte hacia la interfaz materno-fetal (Robbins & Bakardjiev., 2012; Vigliani & Bakardjiev., 2013).

9.1 EFECTO DE *S. ENTERITIDIS* SOBRE LA MORFOMETRÍA PLACENTARIA

Una placenta normal y saludable es esencial para el crecimiento adecuado del feto, y defectos en su funcionamiento pueden resultar en retraso del crecimiento fetal o, en su defecto en la terminación del embarazo (Khan et al., 2011; Islam & Owada., 2015). En este

estudio se demostró que una enterocolitis por *S. Enteritis* durante la gestación tardía puede alterar los parámetros morfométricos macroscópicos. El grosor placentario por ejemplo fue significativamente mayor en las placentas del grupo experimental vs las del grupo control y sham. Se asume que esta variación está asociado con los grandes focos de necrosis que desencadenó el patógeno en la zona decidual de las placentas infectadas (como se detalla más adelante).

En general, los resultados del estudio morfométrico, no pueden ser contrastados con otros estudios, debido a que no se encontraron reportes sobre morfometría placentaria murina luego de la infección por un patógeno de transmisión alimentaria como *Salmonella enterica*, de hecho se cree que este podría ser el primer reporte sobre esta temática en la preñez tardía.

Cabe mencionar, que la ausencia de alteraciones en las variables de medición microscópica que fueron definidas para este estudio (GP, AP, AZL, GZL), luego de los tres días post-infección, no significa que el patógeno no pueda desencadenar otras alteraciones a nivel de otras variables morfométricas que no fueron contempladas para este estudio.

9.2 EFECTO DE *SALMONELLA* ENTERITIDIS SOBRE LA MORFOLOGÍA PLACENTARIA

Después de inducir una enterocolitis por *S. Enteritidis* en la etapa tardía de la gestación, se observaron algunas manifestaciones histopatológicas en la placenta que fueron identificadas principalmente en la zona decidual: focos de necrosis acompañados de infiltración inflamatoria aguda – PMNs (Figura 9, Figura 10 y Figura 11). En la zona de unión y zona laberíntica, la bacteria no provocó alteraciones histológicas visibles (con la tinción de rutina H&E) con respecto a la placentas de grupo control y grupo sham (Figuras 13, Figuras 14 y Figuras 15), únicamente cambios histológicos que son propios de la edad gestacional tardía. Por lo tanto se asume que *S. Enteritidis* llegó a invadir el lado materno de la placenta, sin comprometer las zonas fetales. Un resultado similar fue reportado con una cepa mutante de *S. Typhimurium* la cual únicamente se encontró asociada a la decidua y a trofoblastos adyacentes (Chattopadhyay *et al.*, 2010). La vulnerabilidad que representa la decidua como sitio inicial de colonización de patógenos también se evidencia con *Coxiella burnetii* (Baumgartner & Bachmann., 1992), *Toxoplasma gondii* (Ferro *et al.*, 2002), *Brucella*

abortus (Kim *et al.*, 2005) y *Listeria monocytogenes* (Le Monnier *et al.*, 2006), los cuales luego de la infección se han diseminado a lo largo de este órgano.

De igual forma, otra de las manifestaciones histopatológicas que se distinguió a nivel de la decidua en las placentas infectadas a diferencia de las placentas control y sham, fue la presencia de necrosis acompañada de una infiltración inflamatoria caracterizada por la presencia de leucocitos polimorfonucleares de tipo neutrófilo (PMNs) (Figura 11, Figura 12 y Figura 13). Esta respuesta también es evidente en estudios previos, donde reportan que los PMNs fueron la principal población celular infiltrada en la placenta de ratones infectados con *S. Typhimurium*. Su activación e infiltración de tipo masivo a través del laberinto se correlacionó con la pérdida de integridad estructural de la placenta, luego de tres días post-infección (Chattopadhyay *et al.*, 2010). A los cinco días post-infección este patógeno también desencadenó focos de necrosis rodeados de restos cariorrexicos e infiltración de neutrófilos (Shukla *et al.*, 2012). La atracción rápida de neutrófilos al sitio de amenaza contribuye a la “matanza” temprana de *Salmonella* posterior a la infección. Se ha confirmado que en infecciones localizadas el flujo de neutrófilos evita eficientemente la propagación del patógeno, sin embargo en infecciones sistémicas no genera un efecto protector contra una bacteriemia letal (Cheminay *et al.*, 2003).

A partir de estos datos, se puede decir que la decidua uterina es un entorno inmunoprivilegiado que normalmente actúa como primera línea de defensa frente a la respuesta inmune materna. El precio de dicha protección aumenta la susceptibilidad a un pequeño número de bacterias que ingresan al torrente sanguíneo materno, una vez en el entorno de la placenta, la proliferación de organismos no se controla, lo que lleva a una respuesta inmune innata dominada por neutrófilos que en el peor de los casos puede desencadenar a un parto prematuro (Redline *et al.*, 2010).

Adicionalmente, tanto en la zona fetal como en la zona materna de las placentas procedentes de ambos grupos experimentales, se observaron restos celulares y células apoptóticas que se caracterizaron por sus núcleos en cariorrexis o en cariólisis (con secciones teñidas con H&E), un ejemplo muy evidente fue en las células trofoblásticas gigantes (Figura 15). Estos cambios son propios de un fenómeno de apoptosis, que es un proceso normal que experimentan todos los tipos celulares que componen a la placenta y

es recurrente a medida que transcurre la gestación. Algunas de las características morfológicas de la apoptosis incluyen: descomposición de la membrana nuclear, condensación y fragmentación de la cromatina y la formación de cuerpos de apoptóticos (Cots et al., 2013). En este estudio, aunque los mismos cambios de apoptosis se observaron en las placentas control, en las placentas infectadas parecería que dicho proceso alcanza una mayor incidencia, sin embargo se requieren de otros ensayos como por ejemplo de inmunomarcación de células apoptóticas para su respectiva cuantificación luego de la infección.

Dentro de los constituyentes normales de la placenta, están los depósitos de fibrinoide, que consisten en un material acelular, homogéneo y eosinófilo (Kaufmann et al., 1996) y los depósitos de calcio, ambos fueron encontrados en las placentas infectadas y control en la etapa tardía de la gestación. El material fibrinoide incrementa en espesor durante el embarazo sin afectar la función placentaria (Kaufmann et al. 1996), y se cree que confiere protección fetal a las respuestas inmunes maternas, posiblemente ocultando antígenos fetales del sistema inmunológico materno (Neres et al., 2008; Ibrahim et al., 2014). Los depósitos de calcio, no se consideraron como una respuesta a la infección por *Salmonella*, pues su morfología y distribución fue igual en placentas infectadas y control. Estas calcificaciones placentarias están compuestas de cristales de hidroxipatita, son habituales a medida que progresa la gestación, siendo más rarificadas en la etapa tardía (Mastrolia et al., 2015). Akirav et al. (2005), reportaron el primer estudio sobre depósitos de calcio en murinos. En la gestación temprana estos depósitos de calcio los localizaron densamente empaquetados (días 7.5-9.5) bordeando el cono ectoplacentario y en la gestación tardía los ubicaron dispersos en el límite entre la decidua materna y las células trofoblásticas gigantes de la placenta. Este último patrón de distribución fue similar al reportado en este estudio.

Bajo la observación microscópica de las placentas de los tres grupos de estudio, también fue notoria la presencia de pocas células glucogénicas inmersas en la zona vacuolada de los espongiotrofoblastos y muchas de ellas desapareciendo en la zona decidual. Su declinación en la etapa tardía de la gestación (E15.5 y E18.5) es producto de la muerte celular, de su invasión gradual en la decidua o una combinación de ambos factores, dando lugar a una disminución significativa en el volumen de la zona de unión (Georgiades et al., 2002; Coan et al., 2004). En lo que respecta a la zona de laberinto, la congestión vascular

fue una característica común en todas las placentas analizadas. Este flujo sanguíneo se asocia con un aumento en la masa de glóbulos rojos durante la última mitad de la gestación con una mayor producción de eritropoyetina (Sun et al., 2012).

CONCLUSIONES

La ingestión de una dosis subletal de *S. Enteritidis* en un modelo murino gestante es suficiente para inducir efectos adversos en la madre que conllevan a una bacteriemia que se visualiza a través de una masiva colonización del intestino, bazo y útero. Esta alta eficiencia de colonización, se correlacionó con la capacidad del patógeno para atravesar la placenta y llegar al feto.

Se comprobó que la unidad feto-placentaria se comporta como una **unidad independiente** en lo que respecta a colonización bacteriana, sin ajustarse a un patrón de distribución específico en el cuerno uterino.

La enterocolitis por *S. Enteritidis* en la etapa tardía de la preñez, genera cambios en la morfometría macroscópica placentaria y alteraciones histomorfológicas a nivel de la zona decidual, sin compromiso aparente de las zonas placentarias de origen fetal.

Con el biomodelo de enterocolitis en murinos gestantes, se comprobó que la gestación constituye un estado de vulnerabilidad frente a las infecciones transmitidas por los alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

Abram, M., & Dorić, M. (1997). Primary *Listeria monocytogenes* infection in gestating mice. *Folia microbiológica*. 1997, Vol. 42, nro. 1, pp. 65-71.

Akirav, C., Lu, Y., Mu, J., Qu, D. W., Zhou, Y. Q., Slevin, J., ... & Adamson, S. L. Ultrasonic detection and developmental changes in calcification of the placenta during normal pregnancy in mice. *Placenta*. 2005, Vol. 26, nro. 2-3, pp. 129-137.

Astbury, Stuart, Alison Mostyn, Michael E. Symonds, and Rhonda C. Bell. Nutrient availability, the microbiome, and intestinal transport during pregnancy. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. 2015, Vol. 40, nro. 11, pp. 1100–1106.

Baumgärtner, W., & Bachmann. Histological and immunocytochemical characterization of *Coxiella burnetii*-associated lesions in the murine uterus and placenta. *Infection and Immunity*. 1992, Vol. 60, nro. 12, pp. 5232-5241.

Bohnhoff, M, C P Miller, and W R Martin. Resistance of mouse's Intestinal tract to experimental *Salmonella* Infection: I. Factors responsible for its loss following streptomycin treatment. *The Journal of Experimental Medicine*. 1964, Vol. 120, nro. 5, pp. 805-816.

Boletín epidemiológico periódico (2006). Ministerio de Salud Argentina, Abril-Mayo-Junio

Bosseray, N. Colonization of mouse placentas by *Brucella abortus* inoculated during pregnancy. *British Journal of Experimental Pathology*. 1980, Vol. 61, nro. 4, pp. 361-368.

CDC. 2017. "Centers for Disease Control and Prevention." *U.S. Department of Health & Human Services*. <https://www.cdc.gov/>. Fecha de visita: 2 junio-2018

Carter, P. B., & Collins, F. M. The route of enteric infection in normal mice. *Journal of Experimental Medicine*. 1974, Vol. 139, nro. 5, pp. 1189-1203.

Catov, J. M., Peng, Y., Scifres, C. M., & Parks, W. T. Placental pathology measures: Can they be rapidly and reliably integrated into large-scale perinatal studies?. *Placenta*. 2015, Vol. 36, nro. 6, pp. 687-692.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2011a). Surveillance for foodborne disease outbreaks--United States, 2008. *MMWR*. Morbidity and mortality weekly report. Vol. 60, nro. 35, pp. 1197.

Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) (2011b). Estimaciones sobre enfermedades transmitidas por alimentos en los EE. UU. en el 2011. Disponible en: www.cdc.gov/spanish/Datos/EnfermedadesAlimentos/index.html/ Fecha de visita: 16 mayo de 2018

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) & Morbidity and mortality weekly report (MMWR) (2011). Vital Signs: Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly Through Food - Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 1996-2010. Vol. 60, nro. 22, pp. 749-755

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2012). Disponible en: <http://www.cdc.gov/salmonella/general/index.html>. Fecha de visita: 3 abril-2018

CDC. (2017). Centers for Disease Control and Prevention. *U.S. Department of Health & Human Services*. <https://www.cdc.gov/>. Fecha de visita: 3 abril-2018

Chai, S. J., White, P. L., Lathrop, S. L., Solghan, S. M., Medus, C., McGlinchey, B. M., ... & Mahon, B. E. *Salmonella enterica* serotype Enteritidis: increasing incidence of domestically acquired infections. *Clinical Infectious Diseases*. 2012, Vol. 54, nro. 5-1, pp. S488-S497.

Chattopadhyay, A., Robinson, N., Sandhu, J. K., Finlay, B. B., Sad, S., & Krishnan, L. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium-induced placental inflammation and not bacterial burden correlates with pathology and fatal maternal disease. *Infection and Immunity*. 2010, Vol. 78, nro. 5, pp. 2292-2301.

Cheminay, C., Chakravorty, D., & Hensel, M. Role of neutrophils in murine Salmonellosis. *Infection and Immunity*. 2003, Vol. 72, nro. 1, pp. 468-477.

Coan, P. M., Ferguson-Smith, A. C., & Burton, G. J. Developmental dynamics of the definitive mouse placenta assessed by stereology. *Biology of Reproduction*. 2004, Vol. 70, nro. 6, pp. 1806-1813.

Cortés, H., & Muñoz, H. Utilidad clínica del estudio anatomopatológico de la placenta en el Hospital Universitario San Vicente de Paúl. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 2007, Vol. 58, nro. 1, pp. 60-65.

Cots, DS., Rolando, A., Mugnaini, MT., Soñez, CA., Bozzo, A., et al. Determination of cell proliferation and apoptosis in placentas of chronically stressed rats. *Open Access Scientific Reports*. 2013, Vol. 2, nro. 3, pp. 664

Coughlin, L. B., McGuigan, J., Haddad, N. G., & Mannion, P. *Salmonella* sepsis and miscarriage. *Clinical microbiology and infection*. 2003, Vol. 9, nro. 8, pp. 866-868.

Croy, B. A., Yamada, A. T., DeMayo, F. J., & Adamson, S. L. (Eds.). The guide to investigation of mouse pregnancy. 2013. Academic Press.

Dalaker, K., Andersen, B. M., Løvslett, K., Revhaug, A., & Berdal, B. Septic abortion caused by *Salmonella* Enteritidis. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. 1988, Vol. 67, nro. 2, pp. 185-186.

Doffinger, R., Patel, S., & Kumararatne, D. S. Human immunodeficiencies that predispose to intracellular bacterial infections. *Current Opinion in Rheumatology*. 2005, Vol. 14, nro. 4, pp. 440-446.

Dunkley, K. D., Callaway, T. R., Chalova, V. I., McReynolds, J. L., Hume, M. E., Dunkley, C. S., ... & Ricke, S. C. Foodborne *Salmonella* ecology in the avian gastrointestinal tract. *Anaerobe*. 2009, Vol. 15, nro. 1-2, pp. 26-35.

Enders, A.C. & Blankenship, T.N. Comparative placental structure. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1999, Vol. 38, nro. 1, pp. 3-15.

European Centre for Disease Prevention and Control, 2013. *Annual Epidemiological Report Reporting on 2011 Surveillance Data and 2012 Epidemic Intelligence Data*.

Ferro, E. A. V., Silva, D. A. O., Bevilacqua, E., & Mineo, J. R. Effect of *Toxoplasma gondii* infection kinetics on trophoblast cell population in *Calomys callosus*, a model of congenital toxoplasmosis. *Infection and Immunity*. 2002, Vol. 70, nro. 12, pp. 7089-7094.

García-Huidobro, Diego, Mónica Carreño, Sergio Alcayaga, and Jenny Ulloa. Descripción clínica y epidemiológica de un grave brote de Salmonelosis transmitida por alimentos. *Revista Chilena de Infectología*. 2012, Vol. 29, nro. 2, pp. 132-137.

Georgiades, P., Ferguson-Smith, A.C., and Burton, G.J. Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta*. 2002, Vol. 23, nro. 1, pp. 3-19.

Gordon, M. A. *Salmonella* infections in immunocompromised adults. *Journal of Infection*. 2008, Vol. 56, nro. 6, pp. 413-422.

Guttmacher, A. E., Maddox, Y. T., & Spong, C. Y. The Human Placenta Project: placental structure, development, and function in real time. *Placenta*. 2014, Vol. 35, nro. 5, pp. 303-304.

Gyang, A., & Saunders, M. *Salmonella* Mississippi: a rare cause of second trimester miscarriage. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2008, Vol. 277, nro. 5, pp. 437-438.

Hallstrom, K., & McCormick, B. A. *Salmonella* interaction with and passage through the intestinal mucosa: through the lens of the organism. *Frontiers in microbiology*. 2011, Vol. 2, nro. 88, pp. 1-10.

Haeusler, G. M., & Curtis, N. Non-typhoidal *Salmonella* in children: microbiology, epidemiology and treatment. In *Hot Topics in Infection and Immunity in Children IX* (pp. 13-26). 2013, Springer New York.

Han, Y. W., Redline, R. W., Li, M., Yin, L., Hill, G. B., & McCormick, T. S. *Fusobacterium nucleatum* induces premature and term stillbirths in pregnant mice: implication of oral bacteria in preterm birth. *Infection and Immunity*. 2004, Vol. 72, nro. 4, pp. 2272-2279.

Hapfelmeier, S., & Hardt, W. D. A mouse model for *S. Typhimurium*-induced enterocolitis. *Trends in microbiology*. 2005, Vol. 13, nro. 10, pp. 497-503.

Hedriana, H. L., Mitchell, J. L., & Williams, S. B. *Salmonella* Typhi chorioamnionitis in a human immunodeficiency virus-infected pregnant woman. A case report. *The Journal of Reproductive Medicine*. 1995, Vol. 40, nro. 2, pp. 157-159.

Hur, J., Jawale, C., & Lee, J. H. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. *Food Research International*. 2012, Vol. 45, nro. 2, pp. 819-830.

Ibrahim, N.A. & Khaled, D.M. Histological and immunohistochemical study on human placental tissue in normal pregnancy and preeclampsia. *Cell Biology*. 2014, Vol. 2, nro. 6, pp. 72-80.

Instituto Nacional de Salud (2014). Características de los aislamientos de *Salmonella* spp. - Colombia Resultados de la vigilancia 2000-2013. Bogotá, Colombia.

Instituto Nacional de Salud (2016). Protocolo de Vigilancia en Salud Pública Enfermedades Transmitidas por Alimentos. Versión 02, PRO-R02.001.

Instituto Nacional de Salud (2016b). Boletín Epidemiológico Semanal (BES) – Semana epidemiológica número 17 de 2016 (24 abril. - 30 abril.). Disponible en: <http://www.ins.gov.co/boletinepidemiologico/>. Fecha de visita: 21 mayo/2018

Islam, A., & Owada, Y. Fatty Acid Binding Protein 3 (FABP3) Deficiency does not impact on feto-placental morphometry and fatty acid transporters in mice. *Bioresearch Communications*. 2015, Vol. 1, nro. 2, pp. 57-61.

Kaistha, N., Singla, N., Bansal, N., & Chander, J. *Salmonella* Typhi isolation in a pregnant woman: determining the importance. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2013, Vol. 7, nro. 9, pp. 2100-2101.

Kaufmann, P., Huppertz, B., & Frank, H. G. The fibrinoids of the human placenta: origin, composition and functional relevance. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*. 1996, Vol. 178, nro. 6, pp. 485-501.

Kelly, Denise, Jamie I Campbell, Timothy P King, George Grant, Emmelie A Jansson, Alistair G P Coutts, Sven Pettersson, and Shaun Conway. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR- γ and RelA. *Nature Immunology*. 2004, Vol. 5, nro. 1, pp. 104-112.

Khan, H. M., Khan, M. Y., & Minhas, L. A. Histological study of the developing mouse placenta. *Journal of Rawalpindi Medical College*. 2011, Vol. 15, nro. 2, pp. 116-119.

Kim, S., Lee, D. S., Watanabe, K., Furuoka, H., Suzuki, H., & Watarai, M. Interferon- γ promotes abortion due to *Brucella* infection in pregnant mice. *BioMed Central*. 2005, Vol. 5, pp. 1-11.

Krishnan, L., Nguyen, T., & McComb, S. From mice to women: the conundrum of immunity to infection during pregnancy. *Journal of Reproductive Immunology*. 2013, Vol. 97, nro. 1, pp. 62-73.

Landis, J.R. & Koch, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977, Vol. 33, nro. 1, pp. 159-174.

Le Monnier, A., Join-Lambert, O. F., Jaubert, F., Berche, P., & Kayal, S. Invasion of the placenta during murine listeriosis. *Infection and Immunity*. 2006, Vol. 74, nro. 1, pp. 663-672.

Lund, B. M., & O'Brien, S. J. (2011). The occurrence and prevention of foodborne disease in vulnerable people. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2011, Vol. 8, nro. 9, pp. 961-973.
Macpherson, A. J., & Harris, N. L. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature Reviews Immunology*. 2004, Vol. 4, nro. 6, pp. 478.

Majowicz, S. E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F. J., Kirk, M., O'Brien, S. J., ... & Hoekstra, R. M. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*. 2010. Vol. 50, nro. 6, pp. 882-889.

Mastroeni, P. Immunity to systemic *Salmonella* infections. *Current Molecular Medicine*. 2002, Vol. 2, nro. 4, pp. 393-406.

Mastrolia, S. A., Weintraub, A. Y., Sciaky-Tamir, Y., Tirosh, D., Loverro, G., & HersHKovitz, R. Placental calcifications: a clue for the identification of high-risk fetuses in the low-risk pregnant population?. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2016, Vol. 29, nro. 6, pp. 921-927.

Meynell, G. G., & Subbaiah, T. V. Antibacterial mechanisms of the mouse gut: I. Kinetics of infection by *Salmonella* Typhi-murium in normal and streptomycin-treated Mice Studied with abortive transductants. *British Journal of Experimental Pathology*. 1963, Vol. 44, nro. 2, pp. 197.

Mor, G. Inflammation and Pregnancy. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008, Vol. 1127, nro. 1, pp. 121-128

Muñoz, Yhoiss (2018). Características morfológicas de placenta de 16.5 días de gestación proveniente de ratas con obesidad pre gestacional. Trabajo de investigación. Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali-Colombia.

Murray, R. A., & Lee, C.A. Invasion Genes Are Not Required for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to breach the intestinal epithelium: Evidence that *Salmonella* pathogenicity Island 1 has alternative functions during Infection. *Infection and Immunity*. 2000, Vol. 68, nro. 9, pp. 5050-5055

Neres, R., Marinho, C. R., Gonçalves, L. A., Catarino, M. B., & Penha-Gonçalves, C. Pregnancy outcome and placenta pathology in *Plasmodium berghei* ANKA infected mice reproduce the pathogenesis of severe malaria in pregnant women. *PloS one*. 2008, Vol. 3, nro. 2, pp. e1608.

Noto Llana, Mariángeles, Sebastián H. Sarnacki, Mónica N. Giacomodonato, Roberto L. Caccuri, Guillermo A. Blanco, & M. Cristina Cerquetti. Sublethal Infection with *Salmonella* Enteritidis by the natural route induces intestinal and joint inflammation in mice. *Microbes and Infection*. 2009, Vol. 11, nro. 1, pp. 74–82.

Noto-Llana, M., Sarnacki, S. H., Vázquez, M. V., Gartner, A. S., Giacomodonato, M. N., & Cerquetti, M. C. *Salmonella* enterica induces joint inflammation and expression of interleukin-17 in draining lymph nodes early after onset of enterocolitis in mice. *Infection and Immunity*. 2012, Vol. 80, nro. 6, pp. 2231-2239.

Noto-Llana, M., Sarnacki, S. H., Castañeda, M. Bernal, M. I., Giacomodonato, M. N., & Cerquetti, M. C. Consumption of *Lactobacillus casei* fermented milk prevents *Salmonella* reactive arthritis by modulating IL-23/IL-17 expression. *PloS one*. 2013. Vol. 8, nro. 12, pp. e82588

Noto-Llana, M., Sarnacki, S. H., Castañeda, M. D. R. A., Pustovrh, M. C., Gartner, A. S., Buzzola, F. R., ... & Giacomodonato, M. N. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis enterocolitis during late stages of gestation induces an adverse pregnancy outcome in the murine model. *Plos One*. 2014, Vol. 9, nro. 11, pp. e111282.

Noto-Llana, Mariángeles, Sebastián H. Sarnacki, Andrea L. Morales, María del R. Aya Castañeda, Mónica N. Giacomodonato, Guillermo Blanco, and María C. Cerquetti. Activation of INKT Cells Prevents *Salmonella*-Enterocolitis and *Salmonella*-Induced Reactive Arthritis by Downregulating IL-17-Producing $\gamma\delta$ T Cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2017, Vol. 7, pp. 398.

Organización Mundial de la Salud (2007). Food Safety and Foodborne Illness. Fact Sheet N° 237. Disponible en: <http://www.who.int/>. Fecha de visita: 30 mayo-2018

Ozer, O., Cebesoy, F. B., Sari, I., & Davutoglu, V. A case of *Salmonella* Typhi endocarditis in pregnancy. *The American Journal of the Medical Sciences*. 2009, Vol. 337, nro. 3, pp. 210-211.

Painter, J. A., Hoekstra, R. M., Ayers, T., Tauxe, R. V., Braden, C. R., Angulo, F. J., & Griffin, P. M. Attribution of foodborne illnesses, hospitalizations, and deaths to food commodities by using outbreak data, United States, 1998–2008. *Emerging Infections Diseases*. 2013, Vol. 19, nro. 3, pp. 407-415.

Pegues, D. A., Ohl, M. E., & Miller, S. I. *Salmonella* species, including *Salmonella* Typhi. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 2005, pp. 2887-903.

Pejcic-Karapetrovic, B., Gurnani, K., Russell, M. S., Finlay, B. B., Sad, S., & Krishnan, L. Pregnancy impairs the innate immune resistance to *Salmonella* Typhimurium leading to rapid fatal infection. *The Journal of Immunology*. 2007, Vol. 179, nro. 9, pp. 6088-6096.

Pérez Rubiano, C. C., & Cardozo Torres, S. M. (2014). Reportes de brotes y aislamientos de salmonella spp. En Colombia. *Cultura Científica*, (12), 74-82.

Prado, V., Solari, V., Alvarez, I. M., Arellano, C., Vidal, R., Carreno, M., ... & Munoz, V. Epidemiological situation of foodborne diseases in Santiago, Chile in 1999-2000. *Revista médica de Chile*. 2002, Vol. 130, nro. 5, pp. 495-501.

Pumberger, W., & Novak, W. Fatal neonatal *Salmonella* Enteritidis sepsis. *Journal of Perinatology*. 2000, Vol. 20, nro.1.

Ravneet, K., & Purabi, B. A case of *Salmonella* Typhi infection leading to miscarriage. *Journal of Laboratory Physicians*. 2011, Vol. 3, nro. 1, pp. 61.

Raz, T., Avni, R., Addadi, Y., Cohen, Y., Jaffa, A. J., Hemmings, B., ... & Neeman, M. The hemodynamic basis for positional-and inter-fetal dependent effects in dual arterial supply of mouse pregnancies. *PloS one*. 2012, Vol. 7, nro. 12, pp. e52273.

Redline, R. W., Han, Y. W., & Lu, C. Y. (2010). Murine fetoplacental infection models. *Infection and immunity*. 2010, Vol. 78, nro. 11, pp. 4965-4966.

Robbins, J. R., & Bakardjiev, A. I. Pathogens and the placental fortress. *Current Opinion in Microbiology*. 2012, Vol. 15, nro. 1, pp. 36-43.

Rocourt, J. Foodborne Diseases: Foodborne Diseases and Vulnerable Groups. *Encyclopedia of Food Safety*. 2014. Vol.1, nro.1 pp. 323-331.

Roescher, A. M., Timmer, A., Erwich, J. J. H., & Bos, A. F. Placental pathology, perinatal death, neonatal outcome, and neurological development: a systematic review. *PloS one*. 2014, Vol. 9, nro. 2, pp. e89419.

Roll, C., Schmid, E. N., Menken, U., & Hanssler, L. (1996). Fatal *Salmonella* Enteritidis sepsis acquired prenatally in a premature infant. *Obstetrics & Gynecology*. 1996. Vol. 88, nro. 4, pp. 692-693.

Sánchez-Vargas, F. M., Abu-El-Haija, M. A., & Gómez-Duarte, O. G. (2011). *Salmonella* infections: an update on epidemiology, management, and prevention. *Travel Medicine and Infectious Disease*. 2011, Vol. 9, nro. 6, pp. 263-277.

Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., ... & Griffin, P. M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerging Infections Diseases Journal*. 2011, Vol. 17, nro. 1, pp. 7-15.

Schloesser, R. L., Schaefer, V., & Groll, A. H. Fatal transplacental infection with non-typhoidal *Salmonella*. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 2004, Vol. 36, nro. 10, pp. 773-774.

Scialli, A. R., & Rarick, T. L. *Salmonella* sepsis and second-trimester pregnancy loss. *Obstetrics and Gynecology*. 1992, Vol. 79, nro. 5 (Pt 2), pp. 820-821.

Scott, E. Food safety and foodborne disease in 21st century homes. *The Canadian Journal of Infectious Diseases*. 2003, Vol. 14, nro. 5, pp. 277-280.

Secretaría Distrital de Salud de Bogotá (2011). Guía para la atención de brotes de ETA (Enfermedades transmitidas por alimentos). Bogotá, Colombia.

Secretaría Distrital de Salud (2015). Boletín brotes y enfermedades transmitidas por alimento primer semestre de 2015 Bogotá D.C. Disponible en: http://www.saludcapital.gov.co/DSP/Brotes/2015/BOLETIN%20I%20SEMESTRE_15%20FINAL.pdf. Fecha de visita: 28 de abril 2016

Shaw, Kristi S., Raul Cruz-Cano, Chengsheng Jiang, Leena Malayil, David Blythe, Patricia Ryan, and Amy R. Sapkota. 2016. "Presence of Animal Feeding Operations and Community Socioeconomic Factors Impact Salmonellosis Incidence Rates: An Ecological Analysis Using Data from the Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet), 2004–2010." *Environmental Research* 150 (October): 166–72.

Shukla, G., Verma, I., & Sharma, L. Effect of *Salmonella enteric* serovar Typhimurium in pregnant mice: a biochemical and histopathological study. *Gastroenterology Research*. 2012, Vol. 5, nro. 3, 103-111.

Stecher, B., Hapfelmeier, S., Müller, C., Kremer, M., Stallmach, T., & Hardt, W. D. Flagella and chemotaxis are required for efficient induction of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. *Infection and Immunity*. 2004, Vol. 72, nro. 7, pp. 4138-4150.

Thaiss, Christoph A., Niv Zmora, Maayan Levy, & Eran Elinav. The microbiome and innate immunity. *Nature*. 2016, Vol. 535, nro. 7610, pp. 65–74.

Tuffrey, M., Falder, P., Gale, J., & Taylor-Robinson, D. Failure of *Chlamydia trachomatis* to pass transplacentally to fetuses of TO mice infected during pregnancy. *Journal of Medical Microbiology*. 1988, Vol. 24, pp. 1-5.

Valdez, Y., Ferreira, R. B., & Finlay, B. B. (2009). Molecular mechanisms of *Salmonella* virulence and host resistance. In *Molecular Mechanisms of Bacterial Infection via the Gut* (pp. 93-127). Springer Berlin Heidelberg.

Van der Klooster, J. M., & Roelofs, H. J. M. Management of *Salmonella* infections during pregnancy and puerperium. *The Netherlands Journal of Medicine*. 1997, Vol. 51, nro. 2, pp. 83-86.

Vigliani, M. B., & Bakardjiev, A. I. First trimester typhoid fever with vertical transmission of *Salmonella* Typhi, an intracellular organism. *Case Reports in Medicine*. 2013, Vol. 2013, pp. 973297

Watson, Kathryn G., and David W. Holden. Dynamics of growth and dissemination of *Salmonella* in vivo. *Cellular Microbiology*. 2010, Vol. 12, nro. 10, pp. 1389-1397.

Yoshizawa, R. S. Review: Public perspectives on the utilization of human placentas in scientific research and medicine. *Placenta*. 2013, Vol. 34, nro. 1, pp. 9-13

Zettell, L., Jelsema, R. D., & Isada, N. B. (1995). First-trimester septic abortion due to *Salmonella enteritidis* Oranienburg. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. 1995, Vol. 2, nro. 5, pp. 239-241.

ANEXOS

ANEXO 1. Aval del comité de ética (CEAS) – Universidad del Valle

Comité Institucional de Revisión de Ética con Animales en Experimentación				
Facultad de Salud				
ACTA DE AVAL A PRACTICA DEL AREA BIOMEDICA N°				
Proyecto: EVALUACIÓN DE LA HISTOMORFOLOGÍA PLACENTARIA MURINA (<i>MUS MUSCULUS</i>) LUEGO DE UNA ENTEROCOLITIS POR <i>SALMONELLA</i> ENTERITIDIS DURANTE LOS ESTADIOS TARDÍOS DE LA GESTACIÓN				
Línea biomédica: Sometido por: Carolina Pustovrh				
Código Interno:	003 - 016	Fecha en que fue sometido:	13	05
			2016	
Fecha Certificación CEAS:	16	05	2016	
El Consejo de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, ha delegado en el Comité Institucional de Revisión de Ética con animales de experimentación biomédica (CEAS) mediante Resolución No. 27-A de Marzo 10 de 1997, el cual está regido por la Ley 84, de 1989 y la Resolución No. 8430 de 1993 del Ministerio de Salud, sobre protección de Animales en experimentación y con esa garantía de cumplimiento, se da el AVAL en los aspectos Éticos para la experimentación, establece las recomendaciones y exigencias que aparecen consignadas adelante.				
Este Comité certifica que:				
1. Sus miembros revisaron los siguientes documentos del presente proyecto:				
☒	Protocolo de Prácticas	☐	Resultado de aval otros comités (si aplica)	
☒	Formato de evaluación CEAS 01	☐	Cartas de las instituciones participantes	
☒	Consentimiento Experto Veterinario	☐	Otro:	
2. El presente proyecto fue evaluado y certificado por el Comité: Según las categorías de riesgo establecidas en el manual de experimentación con animales de la Facultad de Salud, el presente estudio tiene la siguiente Clasificación de Riesgo :				
A X	Procedimientos que no ocasionan malestar al animal o que lo minimizan.	B	Procedimientos que pueden causar molestias momentáneas y que se pueden obviar con la utilización de analgésicos o anestesia	C
D	Animales que serán sacrificados sin ningún tratamiento o manipulación de ensayo, (por ejemplo: para la obtención de tejidos, células, etc.	E	Otro no contemplado antes:	
3. Que los procedimientos que se proponen para proteger a los animales experimentales de la crueldad y sufrimiento, tienen cuidados humanizados que evita excesos o sufrimiento contra ellos.				

Comité Institucional de Revisión de Ética con Animales en Experimentación



Facultad de Salud

4. La forma de obtener las licencias o permisos (si se requieren), presentados por los participantes en el estudio es adecuan a norma

El Comité, estará en la obligación de los siguientes procedimientos de control:

5. Este curso será **revisado** en su ejecución, si es seleccionado; el Comité puede ser convocado a solicitud de algún miembro del Comité o de las directivas institucionales para revisar cualquier asunto relacionado con los derechos y el bienestar de los animales experimentales en este curso.
6. **Informará** oportunamente a las directivas institucionales:
- a. Todo desacato del responsable, a las orientaciones y solicitudes del Comité.
 - b. Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité, ante la negligencia en el tratamiento de los animales experimentales o actos anti-éticos.
7. **Reportará** inmediatamente a las directivas institucionales toda información que reciba acerca de:
- a. Lesiones a animales experimentales por fuera de las estipuladas dentro del marco ético humanizado. Problemas imprevistos que involucren riesgos para los animales experimentales u otras personas.
 - b. Cualquier cambio o modificación a las prácticas, que haya sido revisado y aprobado por el Comité.
8. El presente curso ha sido **certificado** por un periodo de **6 meses** a partir de la fecha de la presente Acta. Los cursos de duración mayor a 6 meses, deberán ser sometidos nuevamente con todos los documentos para revisión actualizados.
9. **El Docente responsable deberá** informar al Comité de Ética con Animales de experimentación:
- a. Cualquier cambio que se proponga introducir a este curso. Estos cambios no podrán iniciarse sin la revisión y aprobación del Comité, excepto cuando sean necesarios para eliminar peligros inminentes para los animales experimentales.
 - b. Cualquier problema imprevisto que involucre riesgos para los animales experimentales o asistentes a la práctica.
 - c. Cualquier evento adverso serio dentro de las primeras 24 horas de ocurrido, a la Vicedecanatura de investigaciones, secretario(a) y al presidente del Comité.
 - d. Cualquier conocimiento nuevo respecto al estudio, que pueda afectar la tasa riesgo/beneficio para los animales en experimentación.
 - e. cualquier decisión tomada por otros comités de ética.
 - f. La terminación prematura o suspensión del curso explicando la razón para esto.
- g. El Docente principal deberá presentar un informe al final del curso, indicando destinos de los sujetos experimentales, indicando cantidades procesadas; comportamiento de los animales experimentales.

NOTA: EXCLUSIVAMENTE PARA SER PRESENTADO ANTE CONVOCATORIA DE COLCIENCIAS No.230456935108.

Firma:	
Nombre: FERNANDO CASTRO HERRERA	
Capacidad representativa:	PRESIDENTE Teléfono: 5185677

CERTIFICACIÓN DE LA FACULTAD DE SALUD DE LA UNIVERSIDAD DEL VALLE

Proyecto: **EVALUACIÓN DE LA HISTOMORFOLOGÍA PLACENTARIA MURINA (*MUS MUSCULUS*) LUEGO DE UNA ENTEROCOLITIS POR *SALMONELLA* ENTERITIDIS DURANTE LOS ESTADIOS TARDÍOS DE LA GESTACIÓN**

Línea
biomédica:

Sometido por: Carolina Pustovrh

Código Interno: 003 - 016 Fecha en que fue sometido: 13 05 2016

Por medio de la presente, certifico que la Facultad de Salud de la Universidad del Valle avala el proyecto arriba mencionado y respeta los principios, políticas y procedimientos Nacionales e Internacionales, de la Ley 84 de 1996 en defensa de los animales, en lo concerniente a los animales de experimentación y decretos reglamentarios relacionados y de la reglamentación vigente en investigación de la Universidad del Valle.

Firma:

Nombre:

Capacidad
representativa:



HERNAN J. PIMENTA J.

VICEDECANO DE LA FACULTAD DE SALUD

Fecha: 16 05 2016

Teléfono: 5185680

ANEXO 2. Aval comité de ética – Universidad de Buenos Aires

 **UBA**
Universidad de Buenos Aires
Facultad de Medicina



CUDAP:
EXP-UBA: 58351/2013

FOLIO
28

SESION DEL CONSEJO DIRECTIVO DEL DIA 24 DE OCTUBRE DE 2013

VISTO: la presentación elevada por la Doctora Mónica Nancy GIACOMODONATO, mediante la cual solicitó el aval del Comité Institucional para el Uso y Cuidado de los Animales de Laboratorio, de acuerdo a lo establecido en la resolución (CS) n° 4081/04; y

CONSIDERANDO:

Que la solicitud fue recibida en la Secretaría de Ciencia y Técnica el día 25 de septiembre de 2013.

Que a la misma se le adjunto la documentación necesaria para su tratamiento.

Que obra a fojas 25 lo dictaminado por el Comité Institucional para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio.

Que se aprueba el dictamen de la Comisión de Investigación.

Que el Estatuto Universitario en su artículo 113°, faculta a este Cuerpo para el dictado de la presente.

Por ello,

EL CONSEJO DIRECTIVO DE LA FACULTAD DE MEDICINA

RESUELVE:

ARTICULO 1°.-Aprobar el protocolo titulado "Enterocolitis por Salmonella enterica: estudio de las complicaciones originadas durante la gestación" presentado por la Doctora Mónica Nancy GIACOMODONATO que se realizará en el Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología.

ARTICULO 2°.- REGISTRESE; pase a la Secretaría de Ciencia y


Prof. Dr. Juan E. Alvarez Rodríguez
SECRETARIO GENERAL


ES COPIA
del original protocolizado
LUCIANO ARIEL MARTINEZ
Jefe División Trámite



UBA

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Medicina



CUDAP:
EXP-UBA: 58351/20



Técnica para su conocimiento, notificaciones que correspondan
y demás efectos.

RESOLUCION N° 2551

Fecha de Protocolización: - 1 NOV 2013

FMed
JC
153205
17-6588

Prof. Dr. Juan E. Alvarez Rodríguez
SECRETARIO GENERAL

Prof. CONS. TIT. DR. MARCELO TORINO
DECANO

ES COPIA
del original protocolizado

LUCIANO ARIEL MARTINEZ
Jefe División Trámites

ANEXO 3. PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR PARA LA INMOVILIZACIÓN DE MURINOS *Mus musculus* Y SUMINISTRO DE SUSTANCIAS VÍA ORAL

INTRODUCCIÓN

Tener la capacidad de inmovilizar con seguridad y eficacia los biomodelos de experimentación como ratones y ratas, es un aspecto fundamental para la realización de investigaciones (Machholz et al., 2012). Las técnicas de manipulación y sujeción son consideradas como no invasivas, pero el impacto de una mala técnica podría generar estrés y ansiedad en los animales frente a un procedimiento. En este contexto, si la manipulación no es la adecuada, los biomodelos se sienten agredidos y toman una actitud defensiva que se manifiesta por mordeduras y huida que dificultan el proceso experimental (Domínguez, 1997; Ward et al., 2008). Por lo tanto, todas las personas involucradas en el uso y cuidado de los biomodelos deben ser entrenados y capacitados en los principios básicos de la ciencia de los animales de laboratorio, con el fin de minimizar situaciones de estrés y de asegurar el bienestar animal (Mourelle et al., 2013).

Con frecuencia, el uso de biomodelos en investigación también implica la administración de sustancias, un procedimiento metodológico que requiere una planificación previa, tanto para optimizar el suministro del agente de interés en el animal, como para tomar medidas que permitan reducir al mínimo los efectos adversos en el individuo (Turner et al., 2011; Zhang, 2011).

Esta guía ofrece un protocolo adecuado que detalla los pasos que se deben realizar para la manipulación de ratón y la administración de sustancias vía oral.

OBJETIVO

Proporcionar las pautas para el desarrollo correcto de una de las técnicas de inmovilización y suministro de sustancias vía oral en murinos *Mus musculus*, tomando como base guías y consideraciones que se consignan en la bibliografía.

MATERIALES

Material de bioseguridad

- Bata de laboratorio
- Tapa bocas
- Guantes de látex

Elementos para el transporte del biomodelo al sitio de experimentación

- Jaulas de transporte

Elementos de inmovilización del biomodelo

- Rejilla de soporte para inmovilización (*opcional)

Elementos para el suministro de sustancias vía oral

- Sonda de alimentación esofágica autoclavable o sonda curvada estéril de polietileno
- Jeringas desechables de 1 mL
- Sustancia a administrar

Equipos

- Autoclave

Material de desinfección y descarte

- Alcohol 70%
- Toallas absorbentes

- Caneca roja de residuos biológicos

Material biológico

Hembras adultas *Mus musculus* de la cepa BALB/c con 18 días de gestación

PROCEDIMIENTO

Consideraciones Previas

Antes de comenzar la manipulación del biomodelo que se recomienda tener en cuenta los siguientes aspectos:

- Este procedimiento debe realizarse por personal entrenado en la ejecución del mismo. En el caso de investigadores o usuarios sin experiencia, el desarrollo de la técnica de manipulación debe ser supervisada por el investigador principal o el personal técnico y veterinario de la unidad
- Propiciar un ambiente tranquilo, evitando movimientos bruscos durante la manipulación
- Evitar hacer ruidos perturbadores que puedan alertar al biomodelo
- Manejar al biomodelo con firmeza pero a la vez con suavidad y sobre todo con confianza
- No levantar los biomodelos por la punta de la cola
- Evitar mantener al biomodelo mucho tiempo colgando de la mano, debido a que hay riesgo de que el animal gire y muerda al operario
- Desinfectar guantes y superficies con frecuencia
- Nunca intente llevar a cabo un procedimiento en un animal hasta que éste se encuentre completamente bien sujeto
- Aunque es latente el peligro de ser mordido por el animal, evite el uso de fórceps o guantes de carnauba para la sujeción del murino, debido a que el sujetador debe ser muy sensible a la presión que está aplicando al animal y

con estos implementos puede ser difícil sentir cuanta fuerza se está ejerciendo, especialmente si se trata de un animal pequeño como un ratón

- Para la administración de sustancias en ratones de laboratorio, se debe tener en cuenta los volúmenes permitidos. Volúmenes excesivos puede llevar a una pérdida del bienestar de los animales
- El procedimiento para suministro de sustancias vía oral que se describe más adelante debe realizarse en animales consientes, debido a que la anestesia o sedación aumenta el riesgo de aspiración

-

Transporte del biomodelo al sitio de experimentación

El protocolo de transporte que se describe a continuación aplica para la movilización de biomodelos murinos dentro de una misma dependencia.

- Obtener la autorización correspondiente del bioterio para sacar los animales de experimentación
- Realizar el transporte del biomodelo en una jaula cubierta y asegurada, con movimientos suaves para reducir el estrés de los animales
- Las jaulas de transporte deben de retornar al bioterio para su respectivo lavado y desinfección por personal autorizado

Inmovilización del biomodelo

- Para iniciar con la técnica de manipulación, el operario debe realizar un acercamiento confiado hacia a los biomodelos
- Abrir la jaula con cuidado y definir que biomodelo se va a extraer de la jaula
- Con los dedos pulgar e índice de la mano derecha levantar el biomodelo seleccionado tomándolo de la zona media de la cola y/o base de la cola, sin ejercer demasiada presión
- Posicionar al biomodelo de forma inmediata sobre una rejilla, la tapa de la jaula o una superficie rugosa contra la que pueda ejercer resistencia con sus patas delanteras (manteniendo el agarre de la cola) (Figura 1a)

- Con la mano izquierda y con la ayuda de los dedos índice y pulgar, recoger firmemente la piel del dorso que esta inmediatamente detrás de las orejas, sin ejercer demasiada presión (Figura 1b)
- Levantar el biomodelo y girarlo 180° de forma que adopte una posición supina (Figura 1c)
- Sujetar la cola entre el dedo meñique y el dedo anular para hacer más firme el agarre

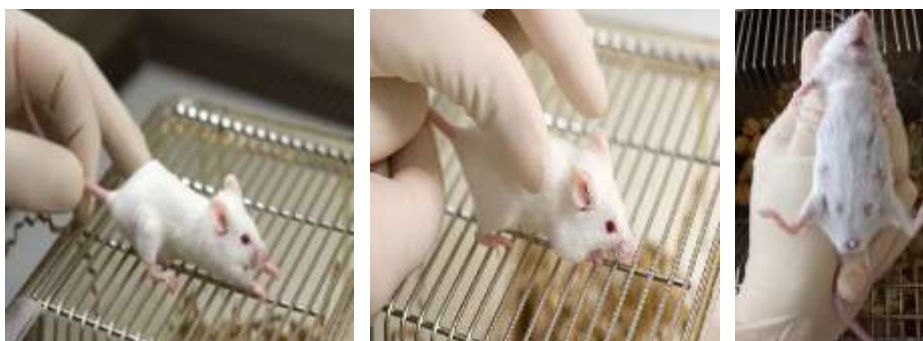


Figura 1. Técnica de manipulación de ratones. **a)** Tomar al biomodelo por la parte media de la cola y colocarlo el sobre una superficie rugosa sobre la cual pueda ejercer presión y extenderse, **b)** Recoger la piel del dorso inmediatamente detrás de las orejas, **c)** levantar, girar y sujetar la cola con el dedo meñique.

Nota: *En el paso metodológico de inmovilización del biomodelo,* tener en cuenta que al ejercer demasiada presión en el área del cuello, podría disminuir la circulación y respiración del animal desencadenando su muerte.

Suministro de sustancias vía oral

Para el suministro oral de la sustancia se debe tener en cuenta las condiciones que se establecen en la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones generales para el suministro de sustancias en ratones

Biomodelo	Volumen máximo a administrar (mL/Kg)	Diámetro del catéter (mm)	Aguja
Ratón	10	1	Sonda de alimentación esofágica

Los pasos metodológicos que se describen a continuación detallan la forma de suministrar sustancias vía oral en los ratones, ya sea a través de una sonda de alimentación esofágica o una sonda curvada estéril de polietileno. Esta última es ampliamente utilizada como herramienta de inoculación intragástrica en el IMPaM.

- Inmovilización

Realizar los pasos previos de inmovilización del biomodelo y mantenerlo en posición vertical, de manera que su cabeza y el cuerpo estén en una línea recta, lo que permite un fácil acceso de la sonda de alimentación esofágica.

- Preparación de la jeringa y la sonda de alimentación esofágica

Precargar la jeringa con el volumen de sustancia a administrar y acoplar a la sonda, luego presionar levemente el embolo de tal forma que la sustancia quede al tope de la boquilla de la aguja, así se evitará la introducción de aire en el estómago. El paso siguiente consiste en determinar hasta donde llegará la sonda dentro del animal, para ello se debe definir su longitud mediante su colocación a lo largo de la parte ventral del biomodelo, de modo que la punta del elemento inyector quede en la última costilla y el otro extremo hacia la nariz del animal. Posterior a este paso, marcar el punto en que llega a la nariz, debido a que si sobrepasa dicha marca se corre el riesgo de perforación del estómago.

- **Ubicación de la sonda de alimentación esofágica**

Introducir lentamente la sonda hacia la parte lateral de la boca y permitir que el animal exponga la lengua por acción refleja. Una vez la sonda llegue a la faringe y se sienta una leve obstrucción por los cartílagos traqueales, se deben hacer leves movimientos giratorios de la jeringa con el fin de facilitar la introducción de la sonda a través de la porción proximal del esófago (Figura 2).

- **Incorporación de la sustancia**

Una vez esté ubicada la sonda, se debe iniciar la administración de la sustancia, esta debe hacerse a una velocidad media observando si hay algún tipo de reacción anormal en el animal (Figura 2).

- **Retiro de sonda de alimentación esofágica y observación del animal**

Cuando se termine la administración de la sustancia retirar la sonda del biomodelo (esto no suele presentar complicaciones) y en caso de sentir resistencia en la extracción, deben realizarse movimientos giratorios leves de la jeringa. Cuando la sonda se retira, observar al animal, en especial su patrón respiratorio y la producción de ruidos inspiratorios anómalos. Estos signos pueden indicar broncoaspiración y en este caso hay que consultar con el veterinario de la unidad que está supervisando el procedimiento.



Figura 2. Técnica de suministro de sustancias en ratones

Limpieza y desinfección de la zona de trabajo

La micción y la defecación son las respuestas que el animal adopta frente al estrés por la manipulación, de manera que durante todo este procedimiento metodológico es necesario limpiar la zonas o mesones de trabajo con toallas desechables y al finalizar desinfectar con alcohol al 70%.

Utilizar un lubricante no adherente, antibloqueante para la limpieza de las sondas y luego autoclavar. En el caso de la sonda curvada de polietileno descartar en el cesto rojo.

Descarte

El material de bioseguridad como guantes, tapabocas y las toallas desechables que se utilizan para la limpieza, deben ser descartados en la caneca roja destinada para residuos biológicos. Las jeringas que se utilizaron durante el procedimiento, deben autoclavarse y descartarse como residuo biológico.

BIBLIOGRAFÍA

Domínguez, A. Q. (1997). *Introducción al manejo de animales de laboratorio: roedores y pequeñas especies*. UADY.

Machholz, E., Mulder, G., Ruiz, C., Corning, B. F., & Pritchett-Corning, K. R. (2012). Manual restraint and common compound administration routes in mice and rats. *J Vis Exp*, 67(67).

Mourelle, C., Herrero, E., & Ricca, M. (2013). Recomendaciones para manipulación y sujeción de ratas y ratones de laboratorio. *Spei Domus*, 9(19), 39-47.

Turner, P. V., Brabb, T., Pekow, C., & Vasbinder, M. A. (2011). Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 50(5), 600-613.

Ward, J. D. (2008). *A manual for laboratory animal management* (Vol. 5). World scientific.
3RNs Disponible en: <https://www.nc3rs.org.uk/handling-and-restraint> Fecha de visita: 28 de abril del 2016.

Zhang, L. (2011). Voluntary oral administration of drugs in mice. *Protoc. Exch*, 1-11.

ANEXO 4. PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR PARA LA EUTANASIA DE *Mus musculus* BALB/c A TRAVÉS DE LA CÁMARA DE DIÓXIDO DE CARBONO

INTRODUCCIÓN

El dióxido de carbono (CO₂) es un método de eutanasia comúnmente utilizado para los roedores de laboratorio, debido a su facilidad de uso, seguridad relativa, bajo costo y disponibilidad (Niel & Weary, 2006).

La utilización de anestésicos inhalatorios como el dióxido de carbono presenta ciertas ventajas frente a los métodos físicos y las inyecciones. Desde el punto de vista del bienestar animal, la exposición de los animales a un gas letal dentro de una cámara, minimiza la manipulación y/o sujeción del roedor, que puede resultar estresante (Sharp et al., 2002). Por otra parte, las inyecciones en la cavidad peritoneal pueden ser dolorosas y los anestésicos inyectables irritantes (Niel & Weary, 2006), además métodos como la dislocación cervical requieren de una alta competencia técnica, a diferencia de los anestésicos inhalatorios que implican una menor manipulación y una mínima posibilidad de error por parte del operador que realiza el procedimiento (Makowska, 2008).

Cabe resaltar, que no existe un método de eutanasia perfecto que no incurra en el bienestar animal, y el uso de CO₂ no es la excepción. A pesar de su amplio uso como método de eutanasia, varios estudios demuestran que los roedores encuentran aversivo este gas, pues puede provocar malestar (probablemente debido a la disnea) y dolor cuando la concentración alcanza el 50% (o más). Esto se debe a que el CO₂ al entrar en contacto con la humedad de las cavidades nasales (conductos nasales, la tráquea y los ojos) forma el ácido carbónico, el cual provoca dolor e irritación. Después de un corto periodo de tiempo, cantidades excesivas de ácido se acumulan en los fluidos corporales y, por último, el animal

entra en paro cardíaco y muere. Al respecto, el método sugerido para reducir el malestar previo a la muerte por inhalación de CO₂, implica suministrar este gas de forma gradual dentro de la cámara, y no realizar un pre-llenado a alta concentración porque podría ser extremadamente doloroso (Hawkins et al., 2014).

Según la CCAC (Canadian Council on Animal Care), que es una de las organizaciones responsables de mantener y supervisar la aplicación de normas de ética y cuidado animal, apoyado por el estudio de Hawkins et al. (2006), establece que es recomendable suministrar un volumen de gas entre el 20%-30% por minuto, dentro de la cámara que ya contiene a los animales que se pretenden sacrificar. En una reunión internacional que se desarrolló en Reino Unido y en la que participaron 32 delegados de todo el mundo, que incluían investigadores, representantes de organizaciones de bienestar animal, personal de cuidado animal y editores de Journals, concluyeron, que si bien un flujo de gas del 20% de volumen por minuto en la cámara no resuelve todos los problemas asociados al bienestar animal, la técnica de liberación paulatina del gas es preferible a un pre-llenado de la cámara en altas concentraciones.

En conclusión, la eutanasia por CO₂ es un método seguro y rápido, siempre y cuando el flujo de este gas se mantenga dentro de los límites establecidos.

OBJETIVO

Realizar la eutanasia en hembras gestantes *Mus musculus* de la cepa BALB/c a través de la cámara de dióxido de carbono (CO₂)

MATERIALES

Material de bioseguridad

- Bata de laboratorio
- Tapa bocas

- Guantes de látex

Equipos

- Cámara acoplada a tanque de dióxido de carbono
- Tanque de dióxido de carbono

Material de limpieza y desecho

- Toallas absorbentes
- Caneca roja de residuos biológicos

Material biológico

Hembras adultas *Mus musculus* de la cepa BALB/c con 18 días de gestación

PROCEDIMIENTO

Consideraciones generales

- Independientemente del método de eutanasia que se vaya a emplear hay que tratar de minimizar el estrés del animal evitando el miedo, la ansiedad y la aprehensión por parte del personal que lo está manipulando
- Manejar de forma adecuada y cuidadosa al biomodelo
- Es recomendable que la eutanasia se realice en un cuarto independiente para evitar el estrés de otros animales
- Se recomienda una incorporación gradual de CO₂, a una velocidad del 20% del volumen de la cámara por minuto
- El flujo de gas debe mantenerse durante al menos un minuto después de la muerte clínica aparente.

El personal que participe en una eutanasia debe:

- Tener conocimiento de la técnica

- Reconocer los signos de muerte: cese del latido cardiaco y de respiración y ausencia de reflejos. En los animales pequeños de laboratorio, la disminución de la temperatura corporal por debajo de 25°C.

Cálculo de la concentración de CO₂

Antes de someter al biomodelo a la cámara de gas, el primer paso consiste en calcular el volumen de CO₂ que será dispensado de acuerdo al tamaño de la cámara contenedora, considerando una concentración del 20% por minuto, teniendo en cuenta las siguientes fórmulas:

$$\text{Volumen de la cámara (en L)} = \frac{(\text{altura en cm}) \times (\text{ancho en cm}) \times (\text{largo en cm})}{1000}$$

$$\text{Tasa aceptable de flujo (en L/ min)} = (\text{Volumen de la cámara en L}) \times 0.20/\text{min}$$

Eutanasia del biomodelo con la cámara de CO₂

- Colocar al biomodelo dentro de la cámara de eutanasia y cerrarla herméticamente
- Para iniciar el flujo de gas, abra el tanque de CO₂ y ajustar la válvula a una velocidad de flujo que no supere el 20% por minuto (el ajuste de la velocidad dependerá de los cálculos que realice previamente)
- Observar los signos de muerte
- Continuar el suministro de gas por 1 minuto mas
- Cerrar la llave, abrir la cámara y sacar el biomodelo

Limpieza de la cámara

La cámara se lava con solución jabonosa y se seca con toallas desechables.

Descarte

El material de bioseguridad como guantes, tapabocas y las toallas desechables que se utilizarán para la limpieza, deben ser descartados en la caneca roja destinada para residuos biológicos

BIBLIOGRAFÍA

Hawkins, P., Playle, L., Golledge, H., Leach, M., Banzett, R., Coenen, A., ... & Niel, L. (2006). Newcastle consensus meeting on carbon dioxide euthanasia of laboratory animals. *Animal Technology and Welfare*, 5(3), 125.

Hawkins, P., Littlefair, P., Golledge, C., Alden, S., Boden, T., Hendrie, C., Wells, D., ... & Hubrecht, R. (2014). Report of the 2013 RSPCA/UFAW Rodent Welfare Group meeting.

Makowska, I. J. (2008). *Alternatives to carbon dioxide euthanasia for laboratory rats* (Doctoral dissertation, UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA (Vancouver)).

Niel, L., & Weary, D. M. (2006). Behavioural responses of rats to gradual-fill carbon dioxide euthanasia and reduced oxygen concentrations. *Applied Animal Behaviour Science*, 100(3), 295-308.

Sharp, J. L., Zammit, T. G., Azar, T. A., & Lawson, D. M. (2002). Stress-like responses to common procedures in male rats housed alone or with other rats. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 41(4), 8-14.

Páginas web

Canadian Council on Animal Care in science. Disponible en:

http://www.ccac.ca/en_standards/guidelines/additional/additional-information-on-

effects-of-euthanasia-methods-on-research-results/carbon-dioxide-co2 Fecha de visita: 4 de mayo de 2016

Standard Guidelines for Carbon Dioxide Euthanasia of Rodents – Recommended Best Practices. Disponible en:

<http://www.marquette.edu/orc/animal-care-use/documents/IACUCGuidelineCO2Euthanasiaofrodents2015.pdf> Fecha de visita: 4 de mayo de 2016

ANEXO 5. PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR PARA LA OBTENCIÓN DE PLACENTAS DE MURINOS *Mus musculus* EN LA GESTACIÓN TARDÍA

INTRODUCCIÓN

La placenta es un órgano transitorio que une a la madre y el feto durante el embarazo, facilita el intercambio de nutrientes, oxígeno e interviene en el óptimo crecimiento y desarrollo fetal. El estudio de la placenta puede proporcionar información relevante con respecto a la morbilidad y mortalidad de los fetos, como también sobre una serie de anomalías que se pueden presentar durante el embarazo. Por consiguiente, el estudio de la placenta resulta relevante y su análisis dependerá de un procesamiento histológico apropiado ya sea por inmersión en un fijador a base de aldehído o por medio de perfusión.

OBJETIVO

Obtener placentas de un biomodelo murino gestante (*Mus musculus*) cepa BALB/c

MATERIALES

Material para disección del biomodelo

- Pinza con garra
- Pinza lisa
- Pinza Kelly
- Tijera de punta
- Alfileres
- Microtijera
- Bandeja de plástico
- Corcho
- Bandas de latex
- Cajas de petri

Material para preparación de reactivos

- Probeta de 500 mL
- Vasos de precipitado 1000 mL
- Agitadores (imanes)
- Frascos tapa rosca (capacidad mínima 5 mL)

Material para desinfección y descarte

- Toallas absorbentes
- Bolsa roja para material de descarte biológico

Equipos

- Plancha agitadora
- Balanza digital
- Cámara fotográfica
- Cabina de extracción
- Nevera (Congelación de los residuos biológicos)

Reactivos

Tabla 1. Lista de reactivos requeridos para la prueba metodológica

Reactivos para preparación de formol bufferado 10%	Agua destilada
	Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4)
	Fosfato de sodio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
Alcohol	70%

Elementos de Bioseguridad

- Bata de laboratorio
- Guantes de látex
- Tapa bocas
- Gafas de protección

Material Biológico

Se utiliza como biomodelo ratones gestantes (*Mus musculus*) de la cepa BALB/c con 18 días de gestación

PROCEDIMIENTO

Desinfección del área del trabajo

Antes de dar inicio al procedimiento es necesario desinfectar con alcohol al 70% la zona de microcirugía donde se hará la disección del biomodelo.

Preparación de la solución post-fijadora

La solución que se utilizará para la post-fijación de la placenta será formol bufferado al 10%. Para la preparación de esta solución se requieren los siguientes reactivos (Tabla 2).

Tabla 2. Reactivos necesarios para la preparación de formol bufferado al 10%

Componentes	1000 mL de solución
Fosfato de sodio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	4.0 g
Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4)	6.5 g
Agua destilada	900 mL
Formol 40%	100 mL

Para la preparación de esta solución fijadora se disuelven cada uno de los componentes y se mezclan en una plancha agitadora hasta que la solución quede homogénea. Se determina el pH de la solución la cual debe estar en un rango entre 7.2-7.4. La solución se almacena a temperatura ambiente (20-25°C).

Nota: La preparación de esta solución requiere la utilización de la cabina de extracción, dado el peligro que estos reactivos representan para la salud del operario.

Rotulación de la solución fijadora

Las soluciones que se preparen deben ser rotuladas con sus respectivos nombres, fecha de preparación, la concentración, el volumen, los componentes que presenta y el nombre de la persona responsable de su preparación.

Eutanasia del biomodelo

El protocolo de eutanasia mediante inhalación con CO₂ se realiza teniendo en cuenta los pasos metodológicos descritos en el anexo 4.

Explantación de las placentas

Posterior a la eutanasia del biomodelo se debe continuar con la siguiente metodología:

1. Realizar una incisión longitudinal en la zona abdominal del biomodelo y retirar la piel
2. Realizar una incisión para retirar la pared abdominal
3. Desplazar los intestinos para visualizar el cuerno uterino
4. Pinzar el oviducto y retirar la parte superior de cada cuerno
5. Hacer una incisión a nivel del cuello uterino y extraer el útero

6. Colocar el útero sobre una caja petri
7. En cada sitio de implantación realizar dos incisiones verticales a través del eje corto del útero (Figura 1a)
7. Efectuar una incisión a nivel de la pared del útero del lado opuesto a la implantación placentaria, liberando feto y placenta (Figura 1b)
8. Realizar una incisión a nivel del cordón umbilical para liberar el feto de la placenta (Figura 1c)

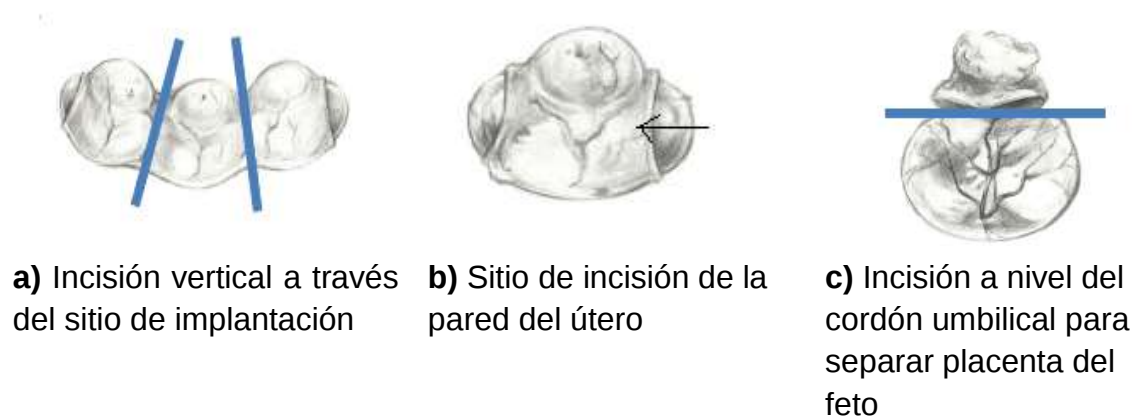


Figura 1. Procedimiento para la obtención de placenta en ratón BALB/c. Fuente: Croy et al. (2013)

Codificación de las placentas extraídas

Teniendo en cuenta que el útero del ratón puede albergar varias implantaciones y por ende varias placentas, se realiza una codificación que permita identificar de qué lado del cuerno uterino y de qué posición procede este órgano. Para ello se toma como referencia el siguiente esquema (Figura 2).

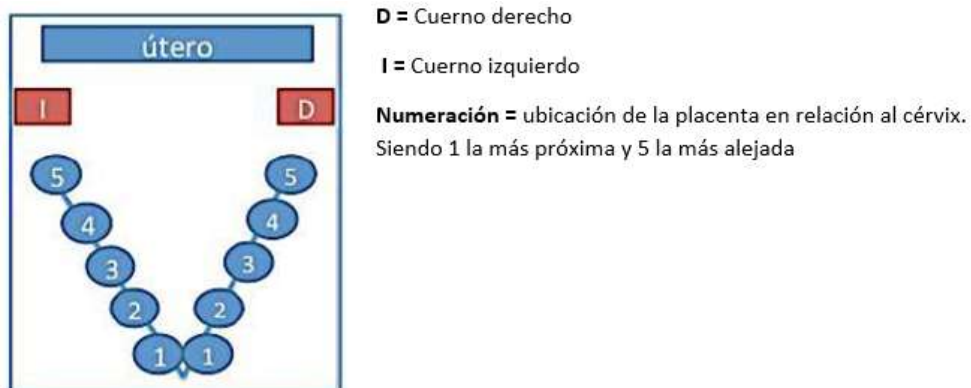


Figura 2. Esquema de ubicación de las placentas en los cuernos uterinos del biomodelo

Las placentas y fetos se codificaron con las letras **P** y **F** respectivamente, seguido del número de identificación del biomodelo, su ubicación con respecto al cérvix y la letra **D** o **I**, según la lateralidad de procedencia (cuerno derecho o cuerno izquierdo). Así por ejemplo, una placenta obtenida de la hembra 21, en la posición 2 del cuerno derecho, se rotula como **P21.2D**.

Proceso de Post-fijación

Las placentas obtenidas se post-fijan en formol bufferado al 10% en una relación v/v 1:20 por frasco. Cada una de las placentas se dispone en un frasco tapa rosca, cuya rotulación incluye: la especie del biomodelo de donde procede la muestra, tipo de muestra biológica, peso del biomodelo, fecha, tipo de fijador, su concentración y la persona responsable de su procesamiento.

Almacenamiento de las placentas post-fijadas

Los frascos que contienen las placentas se almacenan en una caja de icopor a temperatura ambiente (20-25°C) hasta realizar algún procedimiento histoquímico.

Limpieza y desinfección

Cuando finalice todo el proceso de explantación de las placentas, desinfectar muy bien la zona de microcirugía con alcohol al 70%. Lavar todo el material que se utilizó con hipoclorito de sodio y colocarlo en su sitio correspondiente.

Descarte de los residuos

Restos del Biomodelo. Depositar los restos del biomodelo en una bolsa roja y almacenarlos en la nevera que contiene los residuos biológicos.

Residuos de formol buffer con sangre. Estos residuos se descartan en un recipiente bien sellado y se rotula. La rotulación se registra el nombre del residuo, su descripción, fecha de inicio y terminación del llenado, observaciones, el diamante de seguridad, frases R y S.

Elementos de bioseguridad: descartar estos elementos en la caneca roja

BIBLIOGRAFÍA

Catov, J. M., Peng, Y., Scifres, C. M., & Parks, W. T. (2015). Placental pathology measures: Can they be rapidly and reliably integrated into large-scale perinatal studies?. *Placenta*, 36(6), 687-692.

Croy, B. A., Yamada, A. T., DeMayo, F. J., & Adamson, S. L. (Eds.). (2013). *The guide to investigation of mouse pregnancy*. Academic Press.

García del Moral, R. G. (1993). *Laboratorio de anatomía patológica*. McGraw-Hill Interamericana de España.

ANEXO 6. PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR PARA EL PROCESAMIENTO HISTOQUÍMICO DE LA PLACENTA MURINA (*Mus musculus*)

INTRODUCCIÓN

Los especímenes o muestras de estudio anatomopatológicas pueden ser preparados de diversas maneras de acuerdo a las necesidades del estudio. La mayor parte de los análisis histológicos requieren incluir las muestras en medio sólido, esto le confiere a los tejidos dureza que impide la fragmentación durante el corte, mantiene la estructura y las relaciones arquitecturales entre los elementos y asegura la obtención de cortes muy finos, regulares y homogéneos. Con este protocolo se busca tener las condiciones apropiadas de procesamiento histoquímico, para obtener un buen corte histológico de placenta que pueda ser teñido y posteriormente analizado al microscopio.

OBJETIVO

Obtener cortes delgados de placenta a nivel de micras para ser teñidos con H&E

MATERIALES

- Pinzas lisas
- Cassettes de inclusión
- Moldes metálicos
- Cuchillas para micrótomos
- Pinceles
- Láminas portaobjetos
- Canastilla metálica
- Esfera punta diamante
- Lápiz
- Toallas absorbentes
- Cuchillas minora
- Cubre objetos
- Porta objetos

- Papel filtro

Reactivos

- Alcohol 70%
- Alcohol 80%
- Alcohol 95%
- Alcohol 100%
- Xilol
- Parafina Histoplast
- Agua destilada
- Gelatina de piel porcina tipo A (Sigma-Aldrich)
- Hielo
- Batería de tinción de hematoxilina-eosina
- Consult Mount

Equipos

- Procesador automático de tejidos (Leica TP 1020)
- Estación de inclusión (Shandon Histocentre 3)
- Cámara extractora (FEX 120)
- Agitador y magneto (Fisher Cientific)
- Micrótopo LEICA RM 2135
- Baño de flotación (Boekel Scientific)
- Balanza analítica
- Horno (Thelco)
- Plancha (Thermolyne)

Material de limpieza

- Brocha
- Toallas absorbentes
- Jabón suave
- Detergente

Material biológico

- Placentas de 18 días de gestación de murinos (*Mus musculus*) fijadas en formol bufferado 10%

PROCEDIMIENTO

Proceso de deshidratación, aclaramiento e infiltración en parafina

- Rotular con un lápiz cada el cassette en el cual se depositará la placenta con el código que le fue designado
- Sacar las placentas que están fijadas en formol bufferado al 10%, y con la ayuda de una cuchilla minora, dividir la placenta en dos partes iguales (el corte debe hacerse siguiendo el eje mayor placentario, a través de la inserción de cordón umbilical). Las mitades se colocan en el interior del cassette con una pinza lisa
- Depositar el cassette con la placenta en su interior en la cesta porta muestra, la cual debe estar inmersa en el primer contenedor del procesador de tejidos que contiene alcohol al 70%
- Ajustar la cesta porta muestra al procesador automático de tejidos
- En el procesador las muestras son sometidas a un proceso de deshidratación mediante cambios graduales de alcohol de menor a mayor concentración (70%, 80%, 95%, 100%), se aclaran en xilol e incluyen en parafina líquida Histoplast (punto de fusión 56°C). Para este proceso se ajusta un nuevo programa en el procesador automático de tejidos con los tiempos establecidos en la tabla 1.

Las placentas almacenadas en alcohol al 70% se dividen en dos partes iguales utilizando una cuchilla minora, el corte se debe realizar siguiendo el eje mayor placentario, a través de la inserción de cordón umbilical (Figura 1). Las mitades se colocan en casetes rotulados utilizando una pinza lisa mediana.

Tabla 1. Condiciones establecidas en el procesador automático de tejidos para el tratamiento de placentas de murino

Proceso	Solución	Tiempo Establecido
Deshidratación	Alcohol 70%	30 min
	Alcohol 80%	
	Alcohol 95%	
	Alcohol 95%	
	Alcohol 100 %	
	Alcohol 100 %	
Aclaramiento	Xilol	
	Xilol	
Infiltración	Parafina (56°C)	40 min
	Parafina (56°C)	40 min

Proceso de inclusión de parafina

Antes de iniciar el proceso deben ajustarse ciertos detalles de la estación de inclusión:

- Corroborar que el tanque de inclusión este con la temperatura adecuada para la parafina (56°C)
- Encender la zona caliente
- Encender el tanque de tejidos y depósito de moldes, y verificar que la temperatura este a 60°C
- Encender las zonas de enfriamiento que incluye la placa fría y la zona fría
- Activar el encendido de luz del equipo

Una vez ajustadas las condiciones requeridas del equipo

- Trasladar los cassettes desde el procesador de tejidos a la estación de inclusión, y ponerlos en la zona caliente junto con los moldes metálicos en los cuales se van a incluir
- Abrir el dispensador de parafina y llenar el molde metálico
- Con la ayuda de una pinza poner la placenta sobre un molde metálico y orientarla, colocando hacia la cara inferior del molde la sección por donde fue cortada la placenta

- Desplazar el molde de manera cuidadosa hacia la placa fría hasta que se observe que el fondo se solidifica
- Rápidamente colocar la base del cassette sobre el molde metálico y nuevamente dispensar más parafina líquida
- Finalmente, llevar el molde hacia la zona fría para que termine de solidificar. En este punto se retira el molde metálico y la muestra queda lista para ser cortada en el micrótomó

Proceso de corte

Antes del corte, el bloque debe tallarse hasta alcanzar una pirámide truncada

- Fijar el bloque en el portabloques del micrótomó
- Seleccionar el espesor del corte, para este caso 4 μm
- Realizar los cortes a través del movimiento rítmico del volante
- Recoger las secciones de tejido con un pincel
- Disponer la tira de tejido sobre el baño de gelatina
- Recoger cuidadosamente los cortes con láminas portaobjetos
- Los portaobjetos que ya contienen los cortes se colocan sobre una cestilla portaobjetos, se dejan secar a 37°C durante toda la noche
- Las placas deben estar rotuladas con su codificación correspondiente. Para ello utilizar un esfero de punta diamante

Al finalizar y antes de limpiar el equipo, retirar la cuchilla. Los residuos se quitan con un pincel seco. Para eliminar la parafina se puede utilizar detergente suave y agua para su limpieza.

Coloración de cortes con Hematoxilina y Eosina

Para realizar este protocolo hay que disponer de la batería de tinción que se encuentra ya preparada en el laboratorio de histología.

- Llenar las 23 cubetas metálicas con las soluciones correspondientes de la batería H&E y filtrar la hematoxilina

- Las placas con los cortes de placenta se disponen en las gradillas metálicas de tinción. Las gradillas se sumergen en cada una de las cubetas siguiendo los tiempos de tinción descritos en la tabla 2. En este paso metodológico se trata de escurrir bien las gradillas y de secar el exceso resultante de cada reactivo sobre papel absorbente

Tabla 2. Condiciones de tinción de H&E en cortes de placenta

Cubeta No.	Reactivo	Tiempo	Propósito
1	Xilol (1)	3 minutos	Desparafinar
2	Xilol (2)	3 minutos	
3	alcohol 100% (1)	3 minutos	Hidratar
4	alcohol 100% (2)	3 minutos	
5	alcohol 95% (1)	3 minutos	
6	alcohol 95% (2)	3 minutos	
7	alcohol 70% (2)	3 minutos	
8	Agua corriente	3 enjuagues	
9	Hematoxilina	5 minutos	Teñir
10	Lavado con agua corriente	3 cambios	
11	Alcohol ácido	1 tip	
12	Agua corriente	1 tip	
13	carbonato de litio	3 tips	
14	Lavado con agua corriente	3 cambios	
15	Eosina	1 minuto	
16	alcohol 95% (1)	1 tip	Deshidratar
17	alcohol 100% (1)	3 tips	
18	alcohol 100% (2)	3 minutos	
19	alcohol 100% (3)	3 minutos	
20	alcohol 100% (4)	3 minutos	
21	xilol (1)	3 minutos	
22	xilol (2)	3 minutos	
23	xilol (3)	3 minutos	

- Al terminar el proceso de coloración, las placas se dejan en xilol, cubeta No. 23, hasta realizar el montaje de todas ellas.

- El montaje de las placas se realiza colocando una gota del medio de montaje cónsul mount, sobre el cubre objeto evitando se forme burbujas, luego este se coloca sobre los cortes y se deja secar por 24 h.

Limpieza y Desinfección

- El material usado debe desinfectarse con hipoclorito de sodio al 0.5% y lavarse con jabón neutro.
- Para facilitar el retiro de residuos de parafina en los moldes metálicos, se dejan reposar un corto tiempo en agua caliente con jabón y luego se enjuagan con agua corriente.

BIBLIOGRAFÍA

Croy, B. A., Yamada, A. T., DeMayo, F. J., & Adamson, S. L. (Eds.). (2013). *The guide to investigation of mouse pregnancy*. Academic Press.

Gallo, B. G. (1993). *Nociones preliminares para prácticas de histología*. Editorial Complutense.

García del Moral, R. G. (1993). *Laboratorio de anatomía patológica*. McGraw-Hill Interamericana de España.

Páginas Web

<http://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/3-parafina.php>

