

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

Identificación, evaluación y caracterización de posibles
factores de virulencia de *Neospora caninum*

Identification, evaluation and characterisation of potential
Neospora caninum virulence factors

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Laura Rico San Román

Directores:

Luis Miguel Ortega Mora
Esther Collantes Fernández
Pilar Horcajo Iglesias

Madrid

COMPLUTENSE UNIVERSITY OF MADRID
VETERINARY FACULTY



Identification, evaluation and characterisation of potential
Neospora caninum virulence factors

Identificación, evaluación y caracterización de posibles
factores de virulencia de *Neospora caninum*

Supervisors:

Luis Miguel Ortega Mora

Esther Collantes Fernández

Pilar Horcajo Iglesias

DOCTORAL THESIS
Doctorate in Veterinary Science

Laura Rico San Román

Madrid, May 2023

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA



Identificación, evaluación y caracterización de posibles factores de virulencia de *Neospora caninum*

Identification, evaluation and characterisation of potential *Neospora caninum* virulence factors

Directores:

Luis Miguel Ortega Mora

Esther Collantes Fernández

Pilar Horcajo Iglesias

TESIS DOCTORAL
Doctorado en Veterinaria

Laura Rico San Román

Madrid, mayo 2023

Memoria presentada por Dña. Laura Rico San Román para optar al
grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid

Madrid, 24 de mayo de 2023

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la financiación del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, mediante un contrato predoctoral para la Formación de Personal Investigador (BES-2017-079810) del cual he sido beneficiaria.

La financiación de las investigaciones ha sido posible gracias a los siguientes proyectos:

- Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades del Gobierno de España (AGL2016-75935-C2-1-R).
- Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades del Gobierno de España (PID2019-104713RB-C21).
- Plataforma Tecnológica de Sanidad Animal de la Comunidad de Madrid (PLATESA) (PLATESA2-CM P2018/BAA-4370).

D. Luis Miguel Ortega Mora, Doctor en Veterinaria y Catedrático de Universidad adscrito al Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, Dña. Esther Collantes Fernández, Doctora en Veterinaria y Profesora titular adscrita al Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y Dña. Pilar Horcajo Iglesias, Doctora en Veterinaria y Profesora contratada doctora adscrita al Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral titulada “Identificación, evaluación y caracterización de posibles factores de virulencia de *Neospora caninum*” que presenta la Graduada en Veterinaria Dña. Laura Rico San Román ha sido realizada en las dependencias del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinarias de la Universidad Complutense de Madrid bajo su supervisión y cumple todas las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid con Mención Internacional.

De acuerdo con la normativa vigente, firmamos el presente certificado, autorizando su presentación como directores de la mencionada Tesis Doctoral.

En Madrid, a 24 de mayo de 2023

Fdo. Prof. Dr. Luis
Miguel Ortega Mora

Fdo. Prof. Dra. Esther
Collantes Fernández

Fdo. Prof. Dra. Pilar
Horcajo Iglesias

DOCTORADO CON MENCIÓN INTERNACIONAL

La presente tesis doctoral cumple con los requisitos exigidos por la Universidad Complutense de Madrid para obtener la mención de Doctor Internacional:

1. Realización de una estancia mínima de tres meses en una institución de enseñanza superior o centro de investigación fuera de España:
 - Centro receptor: Institute of Parasitology, University of Bern, Bern, Switzerland.
 - Investigador principal: Prof. Dr. Andrew Hemphill.
 - Duración de la estancia: 3 meses (01/03/2022-01/06/2022).
2. Los apartados de resumen, resultados y conclusiones de la Tesis Doctoral han sido redactados en una de las lenguas habituales para la comunicación científica en su campo de conocimiento, distinta a cualquiera de las lenguas oficiales en España (inglés).
3. La tesis doctoral ha sido evaluada por expertos pertenecientes a alguna institución de educación superior o instituto de investigación no español.
4. El Tribunal evaluador de la tesis está compuesto por, al menos, un experto perteneciente a alguna institución de educación superior o centro de investigación no español.

AGRADECIMIENTOS. LAS ENTRAÑAS DEL TEXTO

¿Cómo nace una tesis? ¿Cuántos experimentos fallidos? ¿cuántas horas dedicadas? ¿Cuántos intentos y repeticiones? ¿cuántos borradores del trabajo hasta que damos con el definitivo? Y, sobre todo, ¿cuántas personas implicadas y necesarias? Todo forma parte del proceso, forma parte de las entrañas del texto.

En estas líneas me gustaría recordar a todas las personas que me han acompañado, que sirviera como un pequeño homenaje a todos los personajes que han intervenido y con los que he compartido muchas horas de trabajo, de aprendizaje, de viajes y experiencias.

Gracias a mis **directores de tesis**, Luis, Esther y Pilar. Gracias, Luis, por darme la oportunidad de unirme a este proyecto, de trabajar en el grupo SALUVET y por dirigir y revisar todos los trabajos. Por poner a mi alcance todos los recursos. Gracias, Esther y Pilar, por guiarme más de cerca en la investigación, por ayudarme en la escritura y por todas las ideas para saber por dónde continuar. Esther, muchas gracias por las sugerencias de figuras para ilustrar la tesis doctoral y que quede más bonita, por tu gran colaboración en el experimento en ratones. Pilar, muchas muchas gracias por ser la primera puerta de consulta, por introducirme en ToxoDB y por enseñarme a trabajar con plásmidos y bacterias. Gracias por aguantar mis dudas y ayudarme a resolverlas con más de un quebradero de cabeza.

También quiero agradecer al resto de **personal académico, de responsables y post-docs** del grupo SALUVET y SALUVET-innova que dirigen y colaboran en todas las investigaciones realizadas. Gema, mi primera jefa en el laboratorio, tus ideas, tu organización y tu implicación hacen que sea un placer trabajar contigo, gracias por confiar en mi para trabajar con *Besnoitia*, aunque al final terminara en *Neospora*. Ignacio, gracias por tu ayuda en todos los temas del animalario, por colaborar y por no poner obstáculos. Rafa Calero, gracias por tu pasión contagiosa al hablar del trabajo y tus ganas de que todo salga bien, es asombrosa tu dedicación. En especial, gracias a Iván, por implicarte tanto en este trabajo, por ser tan accesible y tener siempre la puerta abierta. Gracias por tu ayuda en el laboratorio siempre que la he necesitado y por ser una pieza importante en la generación de complementarios. Y hablando de piezas importantes, no puedo olvidarme de Javier Regidor, porque has sido una pieza clave para lograrlo. Gracias por estar siempre en la sombra, por tus sacrificios y por todos tus conocimientos. Valoro mucho tu ayuda recibida. Gracias también a los nuevos postdocs (aunque algunos ya no lo sean tanto), David, Yanina y Ana, por ayudar a que todo funcione bien y enriquecer al grupo, me da pena no haber coincidido más tiempo con vosotros. Y al eterno Rober, presente desde mis inicios en el grupo. Porque no pasas desapercibido, gracias por tu ayuda en la granja, tus ánimos en la recta final y por ponerle banda sonora a las tareas de laboratorio con música de verbena, villancicos o marchas procesionales. Extiendo mis agradecimientos a Lola, nuestra mejor secretaria, por facilitarnos la labor administrativa. Gracias por tu interés y por alegrarnos las mañanas al llegar al lab 9.

Me gustaría dedicar un espacio especial a todos **mis compañeros** del día a día en el

laboratorio, a los presentes y a los pasados, porque habéis sido un apoyo fundamental en esta tesis y os habéis convertido en buenos amigos. Gracias, de corazón, por estos años, porque gracias a un equipo como este una va contenta a trabajar. Por los buenos ratos, y por los no tan buenos, por ayudarme siempre de buen humor y por hacer que las comidas sean un momento de desconexión. Por ser grandes trabajadores. Me da pena que el COVID nos haya quitado tiempo de estar juntos (aunque todavía recordemos con nostalgia el sistema de turnos).

A **los presentes**. María, gracias por tus habilidades sociales, por ser la relaciones del grupo y porque siempre tienes historias estupendas que contar. Gracias por alegrarme con tus recibimientos, por comprenderme y por mantenerme siempre al día. Nadia, por tu fortaleza, responsabilidad y determinación. Gracias por ser una luchadora incansable, por saber lo que quieres y por tus mensajes ánimo. Me alegra mucho saber que puedo contar con vosotras. Calentad, chicas, ¡que sois las siguientes!. Rafa Amieva, gracias infinitas por compartir tantas horas de trabajo conmigo, por todo lo que me has ayudado en los últimos años de la tesis y por ser el rey del salseo. Estoy segura de que vas a continuar y mejorar este trabajo, ójala en un futuro pudiéramos averiguar el misterio de NcROP. Pablo, muchas gracias por aguantarme todo un verano de escritura en el “apar” y no poner nunca una mala cara, por ser el mejor compañero de escritura. A las chicas innova, Carmen, Silvia y Andrea, porque me gusta vuestra compañía y por toda vuestra ayuda. Carmen, gracias por traer paz, arte y dulzura a nuestro grupo. Silvia, por cuidar de innova y demostrar ser una madraza antes de que llegara Mateo. Por dar un gran impulso a las extracciones de ADN y a las qPCRs mientras que yo no salía del microscopio de inmunofluorescencia. Andrea, por ser tan buena, por tu espíritu fiestero y por tu risa contagiosa. Y a las nuevas incorporaciones, Martha, Diego y Sara, siento no haberos conocido más, os deseo mucha suerte en los próximos años. Tampoco me puedo olvidar de nuestros vecinos más cercanos, Jaime y Juanjo. Jaime, gracias por todos los debates y charlas en la sala de cultivos o en el lab 7, por hacer que los procesos rutinarios de laboratorio sean más entretenidos y divertidos. Juanjo, por traer la patatera a nuestras instalaciones, por tu falta de prejuicios y por alegrarme con tu compañía en el animalario.

Y a **los pasados**. A las anteriores neosporitas, Marta y Laura, por todo lo que me habéis enseñado. Marta, la diosa de los macrófagos. Gracias por TODO lo que me has ayudado. Por tu capacidad de gestión, la sencillez con la que ves algunas cosas y tus consejos. Por asegurarte que nunca faltara chocolate y bollos en el laboratorio. Laura, la mejor organizadora de eventos y anfitriona. Gracias por esforzarte en buscar los mejores planes y en hacer que todos estemos bien. Por dar tanto por los demás y por regalarme tu amistad. A Alex, gracias por ser mi mentor en el laboratorio y en GOT. Por transmitir tanta confianza y por ser mi “salvador” ante cualquier cagada o duda en el laboratorio. Por leerte y revisar esta tesis. A Carlos, gracias por estar tan presente, por ser tan bueno y por hacernos reír a carcajadas. Por hacer que cualquier momento contigo sea más divertido. A mis vascas preferidas, Nerea y Patri. Patri, por ser todo corazón, por acompañarme siendo vagón de cola en tantas ocasiones

y porque hablar contigo siempre me tranquiliza. Nerea, por ser tan alegre, por compartir tanto clases de inglés como agobios. Porque en muchas cosas se que me entiendes muy bien. También a Ángela y a Raquel, porque me encanta que sigáis estando en mi vida, por ser tan divertidas y por todos los ratos que hemos pasado juntas. Ángela, gracias por dedicarme tu tiempo para enseñarme la extracción y electroforesis de proteínas, por saber tanto y aclararme todas las dudas. A Aly, por su paciencia, calma y cuidado. Y a Merche, por su tesón y energía, por ser puro nervio y por conseguir todo lo que se propone. Gracias porque el tiempo compartido en cultivos consiguió que se redujera a la mitad, y por los buenos recuerdos que guardo.

También a aquellos que pasaron más rápidamente por el grupo durante mi estancia, Sheila, Sofía, David González, Gaba, Sara y Cristina. Y a los que me haya podido dejar. Porque ha sido una suerte trabajar con todos. Y a Darío y Bárbara, por compartir vuestra alegría y energía y haber aportado vuestra chispa al laboratorio. Darío, gracias por el buen rollo que transmites, por hacernos reír con tu humor tan especial y tus recreaciones de situaciones absurdas. Bárbara, gracias por ser única y auténtica. Y a Javier Moreno, por enseñarme tantas técnicas de diagnóstico durante mis inicios, siempre con alguna broma y entre risas. Gracias también a Nati, la estudiante de TFG con la que aprendí un poquito a cómo enseñar, y a los visitantes del extranjero (Müller, Luca, Cristina, Dennis, Kai. . .) que tuve la suerte de conocer y coincidir en otros congresos.

Además, agradecer a toda la gente del Institute of Parasitology Bern, por acogerme tan bien durante **mis estancias**. First, many thanks to Andrew, for giving me the opportunity to belong to his group for a few months and for perfectly combining kindness, closeness and all his knowledge. Thank you for your helpful guidance on electron microscopy. Thanks also to Ghalia, for her patience and understanding, for getting so involved in the work. To Joachim, for counting on me for his experiments and explaining all the processes in detail, and to the rest of the lab staff, with whom I was lucky to share many seminars, lab meetings and parties. Thanks to all my colleagues, Kai and Dennis, with whom I also coincided in Madrid, and Arthyan, Alice, Stefanie, Matías, Sheena, Toby, Anitha, Noé... for welcoming me as one more, for showing me the life of the city and for all the good moments I keep.

Gracias a todo el personal del **Departamento de Sanidad**, en especial a Reyes, por su labor administrativa que todos necesitamos en algún momento, a Anabel, por resolverme todas las dudas sobre normativas de la tesis, a los profesores de parasitología, por acogerme en la preparación y docencia de prácticas, y a nuestros vecinos del grupo InMiVet (Alicia, Abel, Clara, Gustavo y Javier Carrión), por lo agradable que es compartir pasillo con ellos y por su generosidad a la hora de prestarnos ayuda o equipos en cualquier momento, siempre con una sonrisa. También destacar a los profesores Cinta, Javier Lobo e Isabel Simarro, con los que también compartimos no sólo pasillo sino laboratorios. Gracias por vuestra compañía los fines de semana, festivos o a altas horas cuando no se espera a nadie, por vuestra cercanía y confianza que tanto aprecio, por hacerlo todo tan fácil. Gracias, también, al resto de personal de la **Facultad de Veterinaria**. Desde Manuela, por tu comprensión,

ayuda y guía en todos los pasos de la tesis doctoral, hasta el Servicio de Secretaría de la Facultad, pasando por el servicio de limpieza (Daimi, Eva, Yoli..) que tanto cuidan nuestras instalaciones y las técnicas de nuestro departamento (Vane, Reme, Izakun y María), por su ayuda en la preparación de prácticas y en todo momento. Vane, gracias por tu cercanía, tu energía y tu bondad. Gracias también al CAI de Proteómica de la UCM, por su gran ayuda en el análisis del proteoma, por acogerme y enseñarme todas las instalaciones al detalle y resolverme las dudas una y mil veces. En especial a Lola, gracias por el trabajo que hiciste y por tu trato tan amable.

Gracias a la escritora María Sánchez, por inspirarme con el título de los agradecimientos. Y a la Biblioteca Elena Fortún, por cederme tantas veces espacios para trabajar.

Por último, y muy importante, gracias a mi **familia y amigos**. Tengo mucha suerte por contar con una red de apoyo tan fuerte como vosotros.

Gracias a mis amigas de siempre, los Clángeles y las Gordacas. Por ser las primeras y las más importantes, porque cada vez que nos vemos es un chute de energía. Gracias por formar parte de mi vida y de tantos recuerdos, por ser mi otra familia. Porque desde pequeños éramos capaces de crear una burbuja ajena donde nos reíamos de cosas que nadie entendía. Gracias por crecer juntas y compartir la vida, por conocerme y por enseñarme tanto, por todo lo que me habéis ayudado y lo que nos queda por vivir. Y gracias también a mis amigas las Vets, mis compañeras de la universidad, con las que he compartido tantos episodios y que tanto se preocupan y me entienden, mi otro gran apoyo. No puedo estar más feliz y tranquila de saber que cuento con vosotras.

Gracias a mis padres, Gonzalo y Rosa, por dármelo todo. Porque se que os preocupáis por mí, que me cuidáis y que seríais capaces de cruzar medio mundo para seguirme y estar conmigo. Gracias por darme todas las oportunidades, por vuestros sacrificios y por buscar y desear siempre lo mejor para nosotras, aunque a veces no estemos de acuerdo. Y gracias a mi hermana, Lucía, por hacerme reír, por crecer conmigo y por comprenderme. Porque aprendo mucho de ti. Gracias porque, a pesar de no ser perfectos, os quiero y se que somos un apoyo que siempre va a estar. Gracias también al resto de la familia Rico y la familia San Román, por estar unidos y por esos encuentros que tanto me gustan y disfruto. Y gracias infinitas a ti, Javi, por tanto y tan todo. Por ser mi gran apoyo estos últimos años, por tu ayuda, por tu cariño, por aguantarme (que no ha sido fácil) y por hacerme sentir bien. Por ser tan bueno y generoso, no tengo palabras suficientes para expresar lo que significa. Gracias a todos, os quiero.

ÍNDICE GENERAL

	Página
Índice de tablas	v
Índice de figuras	vii
Índice de abreviaturas	ix
Resumen/Abstract	1
1 Introducción	7
1. <i>Neospora caninum</i> y la neosporosis bovina	7
1.1. Clasificación taxonómica, morfología y biología	8
1.1.1. Taxonomía	8
1.1.2. Morfología	9
1.1.3. Ciclo biológico	12
1.2. Modos de transmisión	13
1.3. Patogenia, signos clínicos y lesiones	14
1.3.1. Patogenia	14
1.3.1.1. Factores dependientes de la madre y del feto	15
1.3.1.2. Factores dependientes del parásito	16
1.3.2. Signos clínicos	17
1.3.3. Lesiones	17
1.4. Inmunidad	18
1.5. Diagnóstico	20
1.6. Control	22
1.6.1. Bioseguridad y medidas de manejo	22
1.6.2. Tratamiento e inmunoprofilaxis	23
2. Virulencia en <i>Neospora caninum</i>	27
2.1. Diversidad fenotípica	27
2.1.1. Diversidad en modelos murinos	27
2.1.2. Diversidad en modelos experimentales bovinos	29
2.1.3. Diversidad en modelos <i>in vitro</i>	31
2.1.3.1. Ciclo lítico	32

2.1.3.2.	Variabilidad intraespecífica	34
2.2.	Bases moleculares de la diversidad intraespecífica	36
2.2.1.	Estudios genómicos y poblacionales en <i>Neospora caninum</i>	36
2.2.2.	Estudios transcriptómicos	38
2.2.3.	Estudios proteómicos	39
2.3.	Factores de virulencia en <i>Neospora caninum</i>	42
2	Justificación y objetivos	49
3	Plan de trabajo y metodología	55
Resultados y discusión/Results and discussion		
Objetivo 1. Identificación de posibles factores de virulencia en <i>Neospora caninum</i>		
4	Comparative tachyzoite proteome analyses among six <i>Neospora caninum</i> isolates with different virulence (Objective 1)	65
1.	Introduction	66
2.	Materials and methods	67
2.1.	Panel of isolates	67
2.2.	Parasite culture	67
2.3.	Tachyzoite production and protein extraction	69
2.4.	LC-MS/MS analyses	69
2.4.1.	Digestion and desalting of peptides	69
2.4.2.	LC-MS/MS	70
2.4.3.	Protein identification	70
2.4.4.	Protein quantification	71
2.4.5.	Data analysis	71
2.4.6.	Principal components analysis (PCA)	72
3.	Results and discussion	72
3.1.	LC-MS/MS analysis	73
3.2.	Pairwise comparison analyses	73
3.2.1.	Proteins involved in host cell attachment and invasion	75
3.2.2.	Rhoptry and dense granule proteins	76
3.2.3.	Metabolism and redox mechanisms	77
3.2.4.	DNA, RNA and protein metabolism	79
3.3.	Comparative proteome of high virulence versus low virulence isolates	80
3.3.1.	Proteins involved in host cell attachment and invasion	81
3.3.2.	Rhoptry and dense granule proteins	82
3.3.3.	Metabolism and redox mechanisms	82
3.3.4.	DNA, RNA and protein metabolism	82

3.4.	Concluding remarks	83
Objetivo 2. Evaluación y caracterización de los posibles factores de virulencia de <i>Neospora caninum</i> NcGRA7 y NcROP40		
5	NcGRA7 and NcROP40 play a role in the virulence of <i>Neospora caninum</i> in a pregnant mouse model (Objectives 2.1 & 2.2)	87
1.	Introduction	88
2.	Materials and methods	89
2.1.	Generation of knockout parasites and complemented strains	89
2.1.1.	PCR	91
2.1.2.	Western blot	92
2.1.3.	Immunostaining of NcROP40 and NcGRA7	92
2.2.	Parasite culture and inoculum preparation	92
2.3.	Mice and ethics statement	93
2.4.	Assays of parasite virulence in mice	93
2.4.1.	Parasite detection and quantification	95
2.4.2.	Real-Time PCR of cytokine expression	95
2.4.3.	Humoral immune responses	96
2.5.	Statistical analysis	96
3.	Results	96
3.1.	Successful construction of the NcROP40 knockout and NcROP40 and NcGRA7 complemented strains	96
3.2.	Evaluation of NcGRA7 and NcROP40 knockout parasite virulence in the BALB/c model for congenital and cerebral neosporosis	97
3.3.	Similar cytokine response induced by NcGRA7 and NcROP40 knockout and wild-type parasites during the acute phase of infection	100
3.4.	Humoral immune response induced by NcGRA7 and NcROP40 knockout and wild-type parasites	101
4.	Discussion	103
6	Characterization of <i>Neospora caninum</i> virulence factors NcGRA7 and NcROP40 in bovine target cells (Objective 2.3)	109
1.	Introduction	110
2.	Materials and methods	111
2.1.	Ethics statement	111
2.2.	Parasites and cell cultures	111
2.3.	<i>In vitro</i> assays in the F3 bovine trophoblast cell line	112
2.3.1.	Proliferation kinetics assays	112
2.3.2.	Growth competition assay	113
2.4.	<i>In vitro</i> assays in bovine monocyte-derived macrophages	113

2.4.1.	Determination of proliferation kinetics in naïve macrophages	113
2.4.2.	Parasite susceptibility to IFN- γ -mediated growth inhibition in bovine monocyte-derived macrophages	114
2.4.3.	Analysis of pattern recognition receptors and cytokine expression in bovine monocyte-derived macrophages	114
2.5.	DNA extraction and parasite quantification by real-time PCR	114
2.6.	Immunofluorescence staining	115
2.7.	Statistical analysis	115
3.	Results	116
3.1.	Deletion of <i>NcGRA7</i> and <i>NcROP40</i> has no impact on lytic cycle progression in bovine trophoblast cells	116
3.2.	<i>NcΔGRA7</i> and <i>NcΔROP40</i> strains show fitness defects in naïve bovine macrophages	116
3.3.	<i>NcΔGRA7</i> , <i>NcΔROP40</i> and WT parasites have similar susceptibility to IFN- γ -mediated growth inhibition in bovine macrophages	117
3.4.	The <i>NcΔGRA7</i> and <i>NcΔROP40</i> knockout strains induce higher expression of TLR3 than the wild-type strain in bovine macrophages	119
4.	Discussion	120
7	Discusión	127
	Conclusiones/Conclusions	139
	Bibliografía	143

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	Página
1.1. Clasificación de distintos aislados de <i>Neospora caninum</i> según su virulencia, de acuerdo a su comportamiento en modelos gestantes <i>in vivo</i> (murino y bovino) y en modelos <i>in vitro</i>	30
1.2. Estudios comparativos transcriptómicos y proteómicos realizados por el grupo SALUVET utilizando aislados de <i>Neospora caninum</i> de distinta virulencia y técnicas de alta resolución.	40
1.3. Parásitos <i>knockout</i> (KO) generados en <i>Neospora caninum</i>	45
4.1. The number of proteins with differential abundance between <i>Neospora caninum</i> (Nc) isolates in pairwise comparisons with high confidence (false discovery rate <1%), abundance ratio variability <30%, q-value <0.05 and fold change >1.5. . .	75
5.1. Guide RNAs (gRNAs) and primers used to generate the knockout parasites and complemented strains.	90
5.2. Effect of <i>Neospora caninum</i> infections in BALB/c pregnant dams and their pups.	99
5.1. Sequences of primers used for cytokine real-time PCR (qPCR).	107
6.1. Sequences of primers used for cytokine real-time PCR (qPCR).	124

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	Página
1.1. Clasificación taxonómica de <i>Neospora caninum</i>	9
1.2. Imágenes microscópicas de los estadios parasitarios de <i>Neospora caninum</i> . Imágenes de microscopía óptica de un ooquiste de la familia Toxoplasmatinae sin esporular y otro esporulado (A). Imágenes de microscopía electrónica de un taquizoíto (B) y un quiste con bradizoítos (C) obtenidos <i>in vitro</i> . Fuente: Pastor-Fernández, Tesis Doctoral, 2016.	10
1.3. Ultraestructura del taquizoíto. A) Representación gráfica de la ultraestructura del taquizoíto con mención a los distintos orgánulos, fuente: Reid et al., 2012. B) Detalle de las estructuras que forman el complejo apical. C) Imagen de microscopía electrónica (TEM) de un taquizoíto, con mención a distintos orgánulos.	11
1.4. Ciclo biológico de <i>Neospora caninum</i> y principales modos de transmisión.	13
1.5. A) Cambios inmunitarios producidos en la placenta a lo largo de la gestación. B) Hallazgos patológicos e inmunitarios en la placenta observados en bovinos desafiados experimentalmente con aislados de alta virulencia en distintos momentos de la gestación.	16
1.6. Diagnóstico laboratorial de <i>Neospora caninum</i> . Imagen modificada de https://parasitxpert.es/el-parasito-del-mes-neospora-caninum-y-neosporis/	21
1.7. Medidas de control en una explotación no infectada. Fuente: https://parasitxpert.es/control-de-la-neosporosis-bovina/	23
1.8. Medidas de control en una explotación con neosporosis epidémica. Fuente: https://parasitxpert.es/control-de-la-neosporosis-bovina/	24
1.9. Medidas de control en una explotación con neosporosis endémica. Fuente: https://parasitxpert.es/control-de-la-neosporosis-bovina/	25
1.10. Representación gráfica del ciclo lítico de <i>Neospora caninum</i>	34
3.1. Esquema de trabajo del Objetivo 1.	56
3.2. Esquema de trabajo para la generación de mutantes de <i>Neospora caninum</i> mediante CRISPR/Cas9.	58
3.3. Diseño experimental del modelo murino.	59
3.4. Plan de trabajo.	60

4.1. Phenotypic description of the <i>Neospora caninum</i> (Nc) isolates included in the study, <i>in vitro</i> (A), in a pregnant BALB/c mouse model (B) and in a 70-day pregnant cattle model (C).	68
4.2. Upset plot of protein identifications for <i>Neospora caninum</i> (Nc) isolates (Nc-Ger6, Nc-Bahia, Nc-Spain7, Nc-Spain1H, Nc-Spain2H and Nc-Spain4H) by LC-MS/MS analysis.	74
4.3. Principal component analyses of <i>Neospora caninum</i> (Nc) isolate replicates, Nc-Spain2H (2H), Nc-Bahia (Bahia), Nc-Ger6 (Ger6), Nc-Spain1H (sp1H) and Nc-Spain7 (Sp7), by LC-MS/MS analyses in isolate pairwise comparisons.	74
4.4. Selected differentially abundant proteins in more than two comparisons between high (Nc-Spain7, Nc-Spain4H and Nc-Bahia) and low (Nc-Spain1H (Sp1), Nc-Spain2H (Sp2) and Nc-Ger6 (Ge6)) virulence <i>Neospora caninum</i> (Nc) isolates quantified by LC-MS/MS analysis.	78
4.5. Principal component analyses of high and low virulence <i>Neospora caninum</i> (Nc) isolate groups comparison.	80
4.6. Functional classification of the differently abundant proteins (>1.5 and <i>q</i> -value <0.05) in the comparison between high (Nc-Spain7, Nc-Spain4H, Nc-Bahia) and low (Nc-Spain1H, Nc-Spain2H, NcGer6) virulence <i>Neospora caninum</i> (Nc) isolates.	81
5.1. Construction and verification of the knockout and complemented strains by CRISPR/Cas9.	91
5.2. Verification of the knockout and complemented strains.	98
5.3. Effect of <i>Neospora caninum</i> infection in the offspring during a period of 30 days pp (postpartum; Kaplan-Meier survival curves).	99
5.4. Clinical signs of dams infected with <i>Neospora caninum</i> tachyzoites (10 ⁵ tachyzoites/mouse).	100
5.5. Cerebral parasite burden at 30 days postinfection in mice infected with 10 ⁵ tachyzoites of different <i>Neospora caninum</i> strains and the uninfected group (negative control).	101
5.6. Cellular immune response in <i>Neospora caninum</i> -infected mice during the acute phase (5 days postinfection).	102
5.7. Humoral immune responses in challenged mice at 30 days postinfection.	102
6.1. Analyses of parasite fitness in trophoblast cell line F3.	117
6.2. Analyses of parasite fitness in bovine monocyte derived macrophages (boMØ).	118
6.3. Relative mRNA expression levels of PRRs (A) and cytokines (B) in bovine monocyte derived macrophages (boMØ) infected with the parental strain Nc-Spain7 (wild-type; WT) or the knockout (KO) strains NcΔ <i>GRA7</i> and NcΔ <i>ROP40</i> at 8 h pi.	119

Las figuras 1.4, 1.10 y 3.4 fueron creadas con BioRender

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Término	Descripción	Description
2-DE	Electroforesis bidimensional	Two-dimensional electrophoresis
2D-DIGE	Electroforesis bidimensional diferencial	Two-dimensional difference gel electrophoresis
3Rs	Reemplazar, reducir y refinar	Replace, reduce and refine
ACT	Proteína actina	Actin protein
AMA1	Antígeno apical de membrana 1	Apical membrane antigen 1
ARNg	ARN guía	Guide RNA
BAG	Antígeno de bradizoíto	Bradyzoite Antigen
BCEC-1	Células epiteliales de la carúncula bovina	Bovine caruncular epithelial cell line
BKIs	Inhibidores de las proteínas quinasas dependientes del calcio	Calcium-dependent protein kinase inhibitors
BMDM	Macrófagos derivados de la médula ósea	Bone marrow-derived macrophage
boMØ	Macrófagos bovinos derivados de monocitos	Bovine monocyte-derived macrophages
BPK1	Pseudoquinasa 1 de bradizoíto	Bradyzoite pseudokinase 1
BSA	Albumina sérica bovina	Bovine serum albumin
BSR	Antígeno de superficie de bradizoíto	Bradyzoite Surface Antigen
Cas9	Endonucleasa 9 asociada a sistema CRISPR	CRISPR-associated endonuclease
CB	Ciclo biológico	Life cycle
CDPK	Proteína quinasa dependiente de calcio	Calcium dependent protein kinase
CPAs	Células presentadoras de antígenos	Antigen-presenting cells
CRISPR	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
Ct	Ciclo umbral	Cycle threshold
DA	Diferencialmente abundantes	Differentially abundant
DHFR-TS	Dihidrofolato reductasa-timidilato sintasa	Dihydrofolate reductase-thymidylate synthase
DMEM	Medio Dulbecco's modified eagle	Dulbecco's modified eagle medium
ELISA	Ensayo inmunoenzimático	Enzyme-linked immunosorbent assay
EST	Marcador de secuencia expresada	Expressed sequence tag
F3	Línea celular de trofoblasto bovino	Bovine placental trophoblast cell line
FCS	Suero fetal bovino	Foetal calf serum
FDR	Índice de falsos descubrimientos	False discovery rate
FUDR	5-Fluorodeoxiuridina	5-Fluorodeoxyuridine
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GO	Ontología génica	Gene ontology
GRA	Proteína de los gránulos densos	Dense granule protein
gRNA	ARN guía	Guide RNA

Término	Descripción	Description
h	horas	hours
HD	Hospedador definitivo	Definitive host
HFF	Fibroblastos humanos de prepucio	Human fibroblast foreskin
HI	Hospedador intermediario	Intermediate host
HRP	Peroxidasa de rábano	Horseradish peroxidase
IFAT	Inmunofluorescencia indirecta	Indirect immunofluorescence assay
IFI	Inmunofluorescencia indirecta	Indirect immunofluorescence assay
IgG	Inmunoglobulina isotipo G	Immunoglobulin isotype G
IgG1	Inmunoglobulina G subclase 1	Immunoglobulin G subclass 1
IgG2	Inmunoglobulina G subclase 2	Immunoglobulin G subclass 2
IMC	Complejo de membrana interna	Inner membrane complex
iNcΔGRA7	Parásitos complementados con la copia NcGRA7	Parasites complemented with NcGRA7
iNcΔROP40	Parásitos complementados con la copia NcROP40	Parasites complemented with NcROP40
indels	Inserciones y deleciones	Insertions and deletions
IRG	GTPasas relacionadas con la inmunidad	Immunity-Related GTPases
ITS1	Espaciador transcrito interno 1	Internal transcribed spacer 1
KEGG	Enciclopedia de genes y genomas de Kioto	Kyoto Encyclopedia of genes and genomes
KO	Mutante defectivo	Knockout
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem	Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry
MAb	Anticuerpo monoclonal	Monoclonal antibody
MALDI	Desorción/Ionización láser asistida por matriz	Matrix-assisted laser desorption/ionization
MIC	Proteína de los micronemas	Microneme protein
MOI	Multiplicidad de la infección	Multiplicity of infection
MPS	Secuenciación masiva en paralelo	Massively parallel sequencing
MS	Espectrometría de masas	Mass spectrometry
Nc	<i>Neospora caninum</i> (prefijo)	<i>Neospora caninum</i> (prefix)
NcΔGRA7	Parásitos deficientes en NcGRA7	NcGRA7-deficient parasites
NcΔROP40	Parásitos deficientes en NcROP40	NcROP40-deficient parasites
NGS	Secuenciación de nueva generación	Next generation sequencing
NK	Células <i>natural killer</i>	Natural killer cells
NLR	Receptores <i>Nod-like</i>	Nod-like receptors
OD	Densidad óptica	Optical density
PAb	Anticuerpo policlonal	Polyclonal antibody
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Tampón fosfato salino	Phosphate-buffered saline
PCA	Análisis de componentes principales	Principal components analysis
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	Polymerase chain reaction
pi	Post-infección	Post-infection
PL1	Proteína perforina	Perforin-like 1
pp	post-parto	postpartum
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones	Pattern recognition receptors
PV	Vacuola parasitófora	Parasitophorous vacuole
qPCR	PCR cuantitativa a tiempo real	Real-time quantitative PCR
RAPD-PCR	Amplificación aleatoria de ADN polimórfico	Random amplification of polymorphic DNA
RIPC	Índice relativo por ciento	Relative index percentage
RNA-Seq	Secuenciación del transcriptoma entero para clonación al azar	RNA-Sequencing

Término	Descripción	Description
RON	Proteína del cuello de las roptrias	Rhoptry neck protein
ROP	Proteína de las roptrias	Rhoptry protein
ROS	Especies reactivas de oxígeno	Reactive oxygen species
RT-qPCR	PCR a tiempo real con transcriptasa inversa	Real-time reverse transcription PCR
SAG	Antígeno de superficie	Surface antigen
SAGE	Análisis en serie de la expresión génica	Serial analysis of gene expression
SNC	Sistema nervioso central	Central nervous system
SNPs	Polimorfismos de nucleótido único	Single nucleotide polymorphisms
SRS	Secuencia SAG-1 relacionada	SAG1-Related Sequence
TALEN	Nucleasa de actividad similar a activador de transcripción	Transcription activator-like effector nuclease
TBS	Solución salina tamponada con Tris	Tris-buffered saline
Tc	Linfocito T citotóxico	Cytotoxic T lymphocyte
Td	Tiempo de duplicación	Doubling time
Th	Linfocito T colaborador	T helper lymphocyte
TLR	Receptores <i>Toll-like</i>	Toll-like receptors
TOF	<i>Time-Of-Flight</i> (detector de iones)	Time-Of-Flight (ion detector)
TY	Producción de taquizoítos	Tachyzoite yield
UPRT	Uracil fosforibosiltransferasa	Uracil phosphoribosyltransferase
UTR	Regiones no traducidas de los genes	Untranslated region
VP	Vacuola parasitófora	Parasitophorous vacuole
WT	Cepa parental	Wild-type
ZNF	Nucleasas con dedos de zinc	Zinc-finger nucleases

Título: Identificación, evaluación y caracterización de posibles factores de virulencia de *Neospora caninum*.

Neospora caninum es un parásito apicomplejo intracelular obligado, agente etiológico de la neosporosis bovina. Esta enfermedad es una de las principales causas de aborto bovino, ocasionando importantes pérdidas económicas en el sector en todo el mundo. Las consecuencias de la primoinfección o de la reactivación de la infección en la hembra gestante pueden ser el aborto, el nacimiento de un ternero sano o el nacimiento de un ternero clínicamente sano pero congénitamente infectado. La patogenia de la enfermedad es compleja y depende de múltiples factores, siendo la virulencia del aislado implicado un factor determinante en la presentación y gravedad de la misma. Hasta el momento, se ha demostrado una gran variabilidad en el comportamiento *in vitro* y en la virulencia *in vivo* (en modelos murinos y bovinos) de un amplio número de aislados, estableciéndose una correlación entre determinados fenotipos *in vitro* (mayor invasión y proliferación) con comportamientos más virulentos en modelos murinos (mayores tasas de mortalidad). Estos estudios han permitido clasificar los aislados en alta, moderada y baja virulencia. Adicionalmente, diversas comparaciones proteómicas y transcriptómicas entre aislados de distinta virulencia han revelado diferencias en la abundancia/expresión de un conjunto de proteínas/genes. Sin embargo, los estudios realizados hasta la fecha han abarcado un número limitado de aislados y los mecanismos que rigen la diversidad intra-específica y virulencia de *N. caninum* son, en su mayor parte, desconocidos. En este contexto, el objetivo general de esta tesis doctoral fue la **identificación y caracterización de posibles factores de virulencia de *N. caninum***. Para su consecución se plantearon los siguientes objetivos específicos:

El **primer objetivo** fue la comparación del proteoma del taquizoíto de un amplio número de aislados mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem sin marcado de la muestra. En el panel se incluyeron aislados de alta virulencia -Nc-Bahia, Nc-Spain4H y Nc-Spain7- y aislados de baja virulencia -Nc-Ger6, Nc-Spain2H y Nc-Spain1H-. Para su comparación se realizaron dos tipos de análisis: por pares de aislados y entre grupos de alta y baja virulencia. Los aislados de alta virulencia mostraron una mayor abundancia de proteínas implicadas en el metabolismo energético y en el procesamiento del ADN/ARN, lo que podría determinar sus mayores tasas de crecimiento, y en algunas proteínas específicas de parásitos apicomplejos que podrían estar implicadas en la invasión y desarrollo intracelular de *N. caninum* o en la modulación de la respuesta inmunitaria del hospedador. Entre ellas cabe destacar un miembro de la familia de las roptrias ROP20, la pseudoquinasa 1 de bradizoíto (BPK1) y las proteínas de los gránulos densos GRA32, GRA6 y GRA7. Además, la única proteína con mayor abundancia en todos los aislados de alta virulencia y en todas las comparaciones fue la ADN polimerasa.

El **segundo objetivo** fue la caracterización del papel de las proteínas NcGRA7 y

NcROP40 en la virulencia de *N. caninum*. Los criterios para la selección de estas proteínas fueron su mayor abundancia en los aislados de alta virulencia y su importante papel durante distintas fases del ciclo lítico. Para ello, se generaron mutantes defectivos en dichas proteínas y las cepas complementadas mediante la tecnología CRISPR/Cas9 (**subobjetivo 2.1**), utilizando el aislado Nc-Spain7 como cepa parental.

Para la caracterización de las cepas defectivas se utilizó un modelo murino gestante y no gestante (**subobjetivo 2.2**). La infección se realizó a mitad de gestación, con 10^5 taquizoítos/ratón, evaluándose los siguientes parámetros: la mortalidad/morbilidad de las madres y crías, el tiempo medio de supervivencia de las crías, las cargas parasitarias cerebrales en las madres y la respuesta inmunitaria tras la infección. La delección de NcGRA7 (Nc Δ GRA7) y NcROP40 (Nc Δ ROP40) se asoció con una reducción de la virulencia. Las madres infectadas con las cepas defectivas mostraron signos clínicos más leves, menor carga parasitaria y menores tasas de mortalidad en comparación con las infectadas con la cepa parental. El tiempo medio de supervivencia de las crías nacidas de las madres infectadas con las cepas defectivas fue significativamente mayor, siendo el grupo infectado con Nc Δ GRA7 el que registró el mayor tiempo medio de supervivencia. También se observaron niveles de IgG1 significativamente mayores en las hembras infectadas con la cepa parental, mientras que las infectadas con Nc Δ GRA7 tuvieron los niveles más bajos.

Posteriormente, se analizó el efecto de la delección de los dos factores de virulencia a lo largo del ciclo lítico del parásito en células diana bovinas: trofoblasto (línea celular F3) y macrófago procedente de monocito (boM \emptyset) (**subobjetivo 2.3**), como primer paso para profundizar en el papel de estas proteínas en su hospedador natural. La capacidad de proliferación de los mutantes defectivos fue similar a la de la cepa parental en las células F3, tanto en la cinética de crecimiento como en un ensayo de competición. Estos resultados, junto con los datos de mortalidad neonatal del subobjetivo 2.2 (cerca al 100% en todos los grupos infectados), sugieren que los parásitos defectivos serían capaces de multiplicarse en el trofoblasto bovino y transmitirse al feto. Sin embargo, en boM \emptyset se observó una disminución significativa de la proliferación de las cepas deficientes a las 48, 60 y 72 horas postinfección (pi). La estimulación de boM \emptyset con IFN- γ antes de la infección mostró una inhibición similar del crecimiento de los taquizoítos en todas las cepas de forma dosis-dependiente. Por último, los boM \emptyset infectados con cepas deficientes mostraron mayores niveles de expresión del receptor TLR3, lo que sugiere que estas proteínas podrían estar implicadas en la manipulación de los mecanismos de la defensa inmunitaria innata frente a *N. caninum*.

La presente Tesis Doctoral permitió identificar posibles nuevos factores de virulencia en *N. caninum*. La utilización de un modelo murino gestante bien establecido permitió confirmar la proteína NcGRA7 como factor de virulencia y describir por primera vez NcROP40 como un nuevo factor de virulencia. Además, ha sido pionera en la caracterización de factores de virulencia de *N. caninum* utilizando líneas celulares bovinas y confirmando la utilidad del boM \emptyset para la evaluación de los mecanismos de virulencia.

ABSTRACT

Title: Identification, evaluation and characterisation of potential *Neospora caninum* virulence factors.

Neospora caninum is an obligate intracellular apicomplexan parasite, the aetiological agent of bovine neosporosis. This disease is one of the main causes of bovine abortion, causing important economic losses in the cattle industry worldwide. The consequences of primary infection or reactivation of infection in the pregnant cow may be abortion, birth of a healthy calf or birth of a clinically healthy but congenitally infected calf. The pathogenesis of the disease is complex and depends on multiple factors, being the virulence of the isolate involved a determinant factor in the presentation and severity of the disease. To date, *N. caninum* isolates have shown great variability in their *in vitro* behaviour and *in vivo* virulence (in murine and bovine models), and certain *in vitro* phenotypes (increased invasion and proliferation) have been correlated with more virulent behaviour in murine models (higher mortality rates). Consequently, isolates have been classified into high, moderate or low virulence. In addition, several proteomic and transcriptomic comparisons between isolates of different virulence have revealed differences in the abundance/expression of a set of proteins/genes. However, available studies have covered a limited number of isolates and the mechanisms governing intraspecific diversity and virulence of *N. caninum* are largely unknown. Therefore, the general objective of this doctoral thesis was the **identification and characterisation of putative *N. caninum* virulence factors**. For this purpose, the following specific objectives were proposed:

The **first objective** was the comparison of the tachyzoite proteome of a large number of isolates by label-free liquid chromatography-tandem mass spectrometry. High virulence isolates -Nc-Bahia, Nc-Spain4H and Nc-Spain7- and low virulence isolates -Nc-Ger6, Nc-Spain2H and Nc-Spain1H- were included. Two types of analysis were performed: comparison by pairs of isolates and between high and low virulence groups. High virulence isolates showed a higher abundance of proteins involved in energy metabolism and DNA/RNA processing, which could determine their higher growth rates, and in some apicomplexan parasite-specific proteins that could be involved in the invasion and intracellular development of *N. caninum* or in the modulation of the host immune response. These include a member of the rhoptry family ROP20, the bradyzoite pseudokinase 1 (BPK1) and the dense granule proteins GRA32, GRA6 and GRA7. In addition, the only protein with higher abundance in all high virulence isolates throughout all comparisons was the DNA polymerase.

The **second objective** was the characterisation of the role of NcGRA7 and NcROP40 proteins in *N. caninum* virulence. The criteria for selecting these proteins were their higher abundance in highly virulent isolates and their important role during different phases of the lytic cycle. For this purpose, defective mutants in these proteins and the complemented strains were generated using CRISPR/Cas9 technology (**sub-objective 2.1**), using the

Nc-Spain7 isolate as the parental strain.

A pregnant and non-pregnant murine model was used to characterise the defective strains (**sub-objective 2.2**). Infection was performed at mid-gestation, with 10^5 tachyzoites/mouse, and the following parameters were assessed: mortality/morbidity of dams and pups, median survival time of pups, brain parasite burdens in dams and immune response after infection. Deletion of *NcGRA7* (*NcΔGRA7*) and *NcROP40* (*NcΔROP40*) was associated with reduced virulence. Dams infected with the defective strains showed milder clinical signs, lower parasite burdens in brains and lower mortality rates compared to those infected with the parental strain. The median survival time of pups born to dams infected with the defective strains was significantly longer, being the group infected with *NcΔGRA7* the one with the highest median survival time. Significantly higher IgG1 levels were also observed in dams infected with the parental strain, while those infected with *NcΔGRA7* had the lowest levels.

Subsequently, the effect of the deletion of the two virulence factors along the lytic cycle of the parasite was analysed in bovine target cells: trophoblast (cell line F3) and monocyte-derived macrophage (boMØ) (**sub-objective 2.3**), as a first step to further investigate the role of these proteins in their natural host. The proliferation capacity of the defective strains was similar to that of the parental strain in F3 cells, both in growth kinetics and in a competition assay. These results, together with the neonatal mortality data for sub-objective 2.2 (close to 100% in all infected groups), suggest that the defective parasites would be able to multiply in the bovine trophoblast and be transmitted to the foetus. However, a significant decrease in the proliferation capacity of the defective strains was observed at 48, 60 and 72 hours post-infection (pi) in boMØ. Stimulation of boMØ with IFN- γ prior to infection showed similar inhibition of tachyzoite growth in all strains in a dose-dependent manner. Finally, boMØ infected with defective strains showed increased expression levels of TLR3 receptor, suggesting that these proteins may be involved in modulating innate immune defence mechanisms against *N. caninum*.

This Doctoral Thesis identified new putative virulence factors in *N. caninum*. The use of a well-established pregnant murine model confirmed the *NcGRA7* protein as a virulence factor and described for the first time *NcROP40* as a new virulence factor. Furthermore, it has pioneered the characterisation of *N. caninum* virulence factors using bovine cell lines and confirms the usefulness of boMØ for the evaluation of virulence mechanisms.

Introducción

INTRODUCCIÓN

1. *Neospora caninum* y la neosporosis bovina

Neospora caninum es un parásito apicomplejo intracelular obligado y filogenéticamente relacionado con *Toxoplasma gondii* (Dubey et al., 2017). El género *Neospora* y la especie *N. caninum* fueron propuestas por Dubey y colaboradores en 1988, al identificar un parásito similar a *T. gondii* en un perro con signos clínicos neuromusculares (Dubey et al., 1988a,b). El mismo agente fue identificado años antes en Noruega, en perros jóvenes que presentaban un síndrome caracterizado por encefalomiелitis y miositis (Bjerkas et al., 1984). En 1989, el parásito fue identificado en el encéfalo y riñón de fetos abortados de un rebaño de vacas Holstein en Nuevo México, describiéndose por primera vez a *N. caninum* como agente etiológico de aborto en el ganado bovino (Thilsted & Dubey, 1989). Posteriormente, se demostró que la infección por este parásito era la primera causa de aborto en el ganado lechero de California (Anderson et al., 1991; Barr et al., 1991a). El descubrimiento del perro como hospedador definitivo (HD) en el ciclo biológico (CB) de *N. caninum* se realizó en 1998 (McAllister et al., 1998), poniéndose en evidencia la posibilidad de transmisión horizontal de la infección. Finalmente, en 1999 se completó el conocimiento del CB del parásito, describiéndose al perro y al ganado bovino como los principales hospedadores definitivo e intermediario (HI), respectivamente (Lindsay et al., 1999; Marez et al., 1999).

En la actualidad, la neosporosis bovina está considerada como una enfermedad parasitaria de distribución cosmopolita, llegando a ocasionar entre el 12-40% de los abortos bovinos (Dubey et al., 2007; Dubey & Schares, 2011). Además, en los últimos años se ha demostrado la creciente importancia de la neosporosis como causa de aborto en pequeños rumiantes (Benavides et al., 2022; Mendoza-Morales et al., 2022). La prevalencia en el ganado bovino es muy variable en función de la zona geográfica; la edad y la aptitud de los animales; el sistema de producción; o el tipo de prueba utilizada para evaluarla (Lindsay & Dubey, 2020).

Los datos de seroprevalencia oscilan entre el 0,5 y 97,2%, tanto en ganado de leche como de carne (revisado por Dubey et al., 2017). Cabe destacar el estudio realizado por Bartels et al. (2006), en el que se utilizaron técnicas serológicas previamente estandarizadas y se compararon las prevalencias de ganado de carne y leche de Alemania, Países Bajos, España y Suecia. La magnitud de las pérdidas económicas asociadas a la neosporosis bovina supera los 1298 millones de dólares al año a nivel mundial y el impacto económico es mayor en las granjas de leche que de carne (Reichel et al., 2013). Estas pérdidas económicas son debidas tanto a los efectos directos de la enfermedad, los abortos, como a efectos indirectos, los gastos derivados del diagnóstico y la asistencia veterinaria, el mayor intervalo entre partos o la reposición de animales (Dubey et al., 2007). Hasta la fecha, no hay fármacos ni vacunas disponibles para tratar la enfermedad (Sánchez-Sánchez et al., 2018b), por lo que su desarrollo se presenta como una tarea urgente, para lo cual es imprescindible avanzar en el conocimiento molecular del parásito, identificar y caracterizar factores responsables de la virulencia y descubrir nuevas dianas terapéuticas.

Desde el descubrimiento del parásito, se han realizado numerosas investigaciones para tratar de conocer más a fondo su biología, la epidemiología y la patogenia de la enfermedad, y los métodos de diagnóstico y control. En los siguientes apartados se describirá con mayor detenimiento los distintos aspectos del parásito y de la enfermedad.

1.1. Clasificación taxonómica, morfología y biología

1.1.1. Taxonomía

Neospora caninum es un parásito perteneciente al reino Cromista e infraphylum Apicomplexa, entre los que se encuentran géneros tan conocidos como *Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Cryptosporidium*, *Sarcocystis* o *Eimeria*, responsables de enfermedades muy importantes desde el punto de vista veterinario y médico (Swapna & Parkinson, 2017). Asimismo, este parásito se incluye en la clase Coccidiomorpha, orden Eimeriida y familia Sarcocystidae (Ruggiero et al., 2015; Rees et al., 2020; Delgado et al., 2022), caracterizada esta última por comprender parásitos formadores de quistes, con ciclos biológicos heteroxenos, fases de reproducción sexual y asexual y esporulación de ooquistes en el ambiente (Tenter et al., 2002). En el género *Neospora*, además de *N. caninum*, se encuentra la especie *N. hughesi*, aislada del tejido nervioso de un caballo adulto con signos clínicos nerviosos y con diferencias morfológicas, antigénicas y genéticas respecto a *N. caninum* (Marsh et al., 1996, 1998; Walsh et al., 2001). Es importante señalar que el género *Neospora* está filogenéticamente relacionado con el género *Toxoplasma*, más ampliamente estudiado, con el que comparte muchas características y que ha servido como modelo para extrapolar parte del conocimiento disponible.

La clasificación taxonómica de *N. caninum* se detallada en la Figura 1.1.

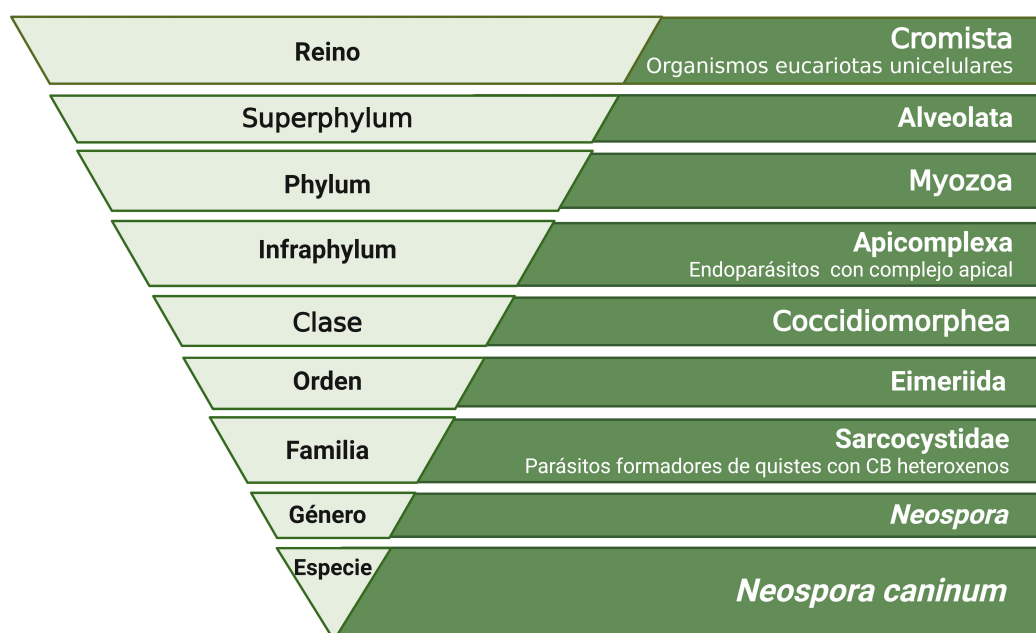


Figura 1.1: Clasificación taxonómica de *Neospora caninum*.

1.1.2. Morfología

En relación con los estadios del parásito, se han descrito tres fases infectantes en el CB: el esporozoíto, el taquizoíto y el bradizoíto, utilizando el término zoíto para referirse a cualquiera de ellos (Figura 1.2).

Los **esporozoítos** se encuentran en el interior de los ooquistes esporulados, que son la fase de resistencia ambiental. Los ooquistes presentan una forma esférica de unos 10-11 μm de diámetro y, una vez esporulados, en su interior presentan dos esporoquistes elipsoidales con cuatro esporozoítos cada uno (tipo isosporoide) (Lindsay et al., 1999). Los ooquistes son excretados con las heces al medio por el HD y, en condiciones adecuadas de temperatura y humedad, tardan aproximadamente un día en esporular (McAllister et al., 1998).

Los **taquizoítos** son los estadios de multiplicación rápida, responsables de la fase aguda de la infección y de la diseminación intraorgánica, produciendo el daño tisular en el hospedador (Dubey et al., 2006; Dubey et al., 2017). Se multiplican asexualmente por endodiogenia en el interior de las células, dentro de la vacuola parasitófora (VP). Una vez la VP alcanza un tamaño crítico, se produce la lisis celular y se liberan los taquizoítos al medio extracelular, invadiendo las células adyacentes y continuando el ciclo lítico (ver sección 2.1.3.1. Ciclo lítico) (Hemphill et al., 2006). Los taquizoítos tienen forma de semiluna, con un tamaño aproximado de $2 \times 6-7,5 \mu\text{m}$, y son el estadio más estudiado y más ampliamente usado en estudios de investigación debido a su facilidad de mantenimiento y crecimiento *in vitro*. Tras la multiplicación rápida y bajo la presión inmunitaria del hospedador, se diferencian a bradizoítos (Buxton et al., 2002; Dubey et al., 2017).

Los **bradizoítos** son los estadios de replicación lenta, responsables de la fase crónica de la enfermedad. Los bradizoítos son morfológicamente muy similares a los taquizoítos, también presentan forma semilunar y tienen un tamaño de 1,5-6,5 μm . Se multiplican asexualmente por endodiogenia, aunque a un ritmo menor que el taquizoíto. Los bradizoítos se encuentran en el interior de los quistes tisulares que se localizan principalmente en tejidos inmunoprivilegiados del HI, preferentemente en el sistema nervioso central (SNC) y, en ocasiones, en el músculo esquelético (Barr et al., 1991a,b; Peters et al., 2001; Dubey et al., 2017), y pueden llegar a tener un tamaño de 70-100 μm . El bradizoíto es un estadio quiescente y puede persistir en el animal durante toda su vida o transformarse a taquizoíto en condiciones que induzcan una inmunomodulación e inmunosupresión en el animal (como durante la gestación o en determinadas enfermedades) (Hemphill et al., 2006; Dubey & Schares, 2011; Goodswen et al., 2013) y dar lugar de nuevo a la fase aguda de la infección.

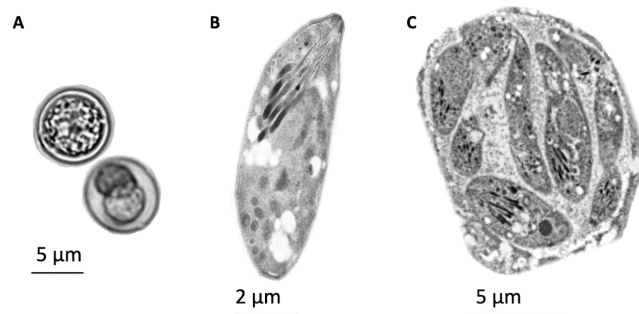


Figura 1.2: Imágenes microscópicas de los estadios parasitarios de *Neospora caninum*. Imágenes de microscopía óptica de un ooquiste de la familia Toxoplasmatinae sin esporular y otro esporulado (A). Imágenes de microscopía electrónica de un taquizoíto (B) y un quiste con bradizoítos (C) obtenidos *in vitro*. Fuente: Pastor-Fernández, Tesis Doctoral, 2016.

En la **ultraestructura** de los zoítos vamos a encontrar, además de los orgánulos clásicos de una célula eucariota (núcleo, aparato de Golgi, mitocondrias, retículo endoplasmático), componentes propios de los parásitos apicomplejos que describiremos a continuación (Figura 1.3). Los zoítos están recubiertos por una película semirrígida compuesta por la membrana plasmática externa y el complejo de membrana interna (IMC), el cual está formado por vesículas aplanadas, adyacentes a la membrana plasmática, que interactúan con el glideosoma y con los microtúbulos subpediculares (Ouologuem & Roos, 2014). El glideosoma constituye el sistema motor de actina/miosina, responsable de la motilidad del parásito y necesario para aproximarse a la célula e invadirla (Boucher & Bosch, 2015). Por su parte, los microtúbulos subpediculares recorren longitudinalmente el citoplasma de los zoítos, fijándose a los anillos polares anteriores, o apicales, y a los anillos polares posteriores y actuando de citoesqueleto (Goodswen et al., 2013). En los anillos polares apicales se encuentra el conoide, cono truncado y móvil constituido por filamentos de tubulina dispuestos helicoidalmente (Speer & Dubey, 1989; Speer et al., 1999). El conjunto del conoide, los anillos polares y los microtúbulos subpediculares, junto con los micronemas y roptrias (orgánulos citoplasmáticos del parásito),

van a formar el complejo apical, implicado en las funciones de unión e invasión (Hu et al., 2006). Además de los ya mencionados micronemas y roptrias, el citoplasma va a albergar distintos orgánulos como el apicoplasto, los gránulos densos y los gránulos de amilopectina, cuyo número y distribución tienen valor taxonómico (Figura 1.3).

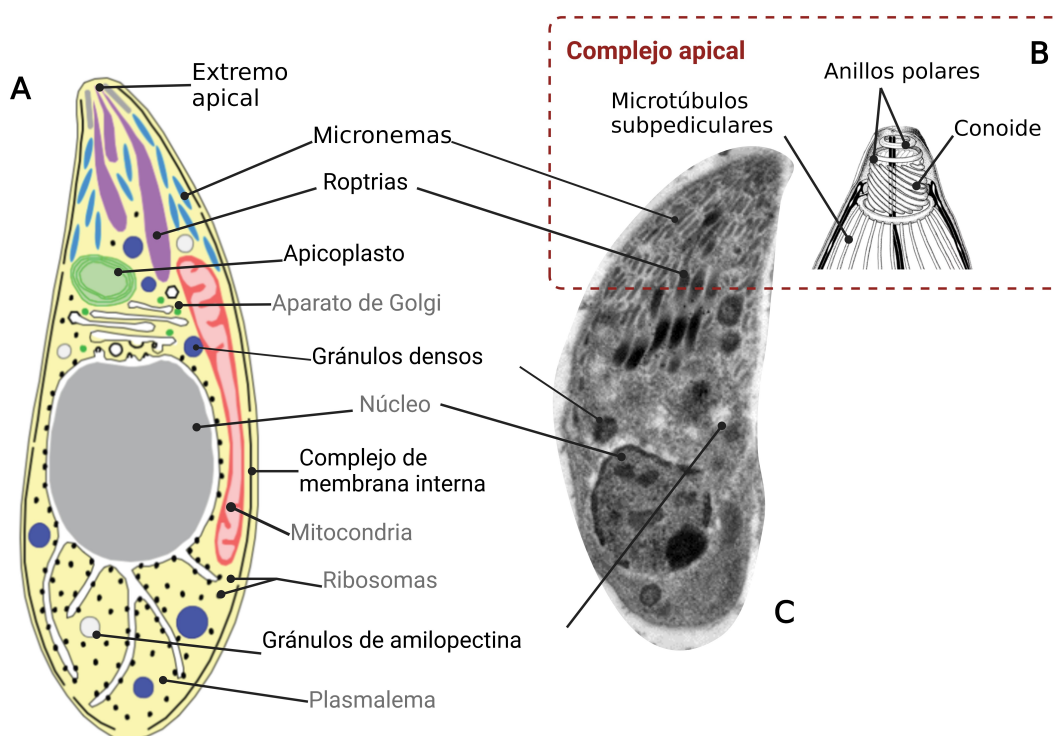


Figura 1.3: Ultraestructura del taquizoíto. A) Representación gráfica de la ultraestructura del taquizoíto con mención a los distintos orgánulos, fuente: Reid et al., 2012. B) Detalle de las estructuras que forman el complejo apical. C) Imagen de microscopía electrónica (TEM) de un taquizoíto, con mención a distintos orgánulos.

Asimismo, también se van a encontrar diferencias entre los estadios de taquizoíto y bradizoíto, por ejemplo, los gránulos de amilopectina, distribuidos por el citoplasma y con función de almacenamiento, van a ser más abundantes en los bradizoítos (Dubey et al., 2002). Los gránulos densos, micronemas y roptrias son orgánulos secretores que liberan las proteínas GRA, MIC y ROP/ RON, respectivamente, algunas de las cuales han sido descritas como factores de virulencia y cuya función está implicada en distintos procesos del ciclo lítico y en la interacción con la célula hospedadora (Hemphill et al., 2013). Los micronemas y roptrias se localizan en el extremo apical. Los micronemas son pequeñas organelas de forma ovoide, mientras que las roptrias tienen forma alargada constituida por un cuello que va ensanchándose hasta dar lugar al cuerpo. Los gránulos densos son microesferas abundantes localizadas homogéneamente en el citoplasma. Por último, el apicoplasto es un orgánulo vestigial con estructura similar a los plástidos de algas, pero sin capacidad fotosintética. Contiene material genético propio codificante para rutas esenciales del metabolismo del

parásito, por lo que podría ser una importante diana terapéutica (Dubey et al., 2017) (Figura 1.3).

Las características de los esporozoítos no están completamente descritas, se sabe que tienen núcleo central y poseen gránulos de amilopectina (Dubey et al., 2017).

1.1.3. Ciclo biológico

El CB de *N. caninum* es un ciclo heteroxeno facultativo en el que interviene un HD, donde se desarrolla la fase de multiplicación sexual, y un HI, donde tiene lugar la fase de multiplicación asexual. El perro y otros cánidos actuarán como HD, aunque en ellos también se puede desarrollar la fase de multiplicación asexual y actuar como HI (Bandini et al., 2011). El principal HI es el ganado bovino, aunque se ha detectado la presencia de *N. caninum* en un amplio espectro de animales, tanto domésticos (ovejas, cabras, búfalos, perros) como silvestres (bisontes europeos, ciervos de cola blanca, lobos) (Dubey et al., 2017). De hecho, además de la existencia de un ciclo doméstico, en el que participan principalmente el perro y los bóvidos, se ha descrito un ciclo silvestre, en el que participarían especies como el lobo, el coyote y los cérvidos, pudiendo el parásito circular entre ambos (Donahoe et al., 2015; Gondim et al., 2004b; Gondim, 2006). La neosporosis no es una zoonosis ya que, a pesar de que se han reportado bajos niveles de anticuerpos en humanos, no hay evidencias de la presencia del parásito en sus tejidos (Dubey et al., 2007; McCann et al., 2008; Calero-Bernal et al., 2019).

El CB comienza con la eliminación de ooquistes por parte del HD, los cuales una vez en el ambiente y bajo condiciones favorables de temperatura y humedad esporularán, convirtiéndose en la forma infectante para el HI (McAllister et al., 1998; Dubey et al., 2007). Tras la ingestión de los ooquistes por el HI, los esporozoítos son liberados en el tracto gastrointestinal y se transforman a taquizoítos, los cuales alcanzan el torrente sanguíneo y se diseminan por el organismo e invaden distintos tejidos y órganos, siendo los responsables de la fase aguda de la infección (Dubey et al., 2006). Finalmente, el hospedador desarrolla una respuesta inmunitaria capaz de controlar y eliminar la mayor parte de los taquizoítos. Algunos taquizoítos serán capaces de evadir dicha respuesta mediante su conversión a bradizoítos, localizándose en el interior de quistes tisulares en tejidos inmunoprivilegiados, principalmente en el SNC y, algo menos frecuente, en la musculatura estriada, cronificándose de esta forma la infección (Peters et al., 2001; Buxton et al., 2002). Durante la gestación, se puede producir la reactivación de los bradizoítos y su diferenciación en taquizoítos, los cuales pueden cruzar la placenta e infectar el feto, produciéndose la muerte fetal y el aborto, el nacimiento de terneros sanos, o el nacimiento de terneros crónicamente infectados con quistes en el cerebro y en la musculatura (Dubey et al., 2006). Por último, la ingestión por parte del HD de tejidos infectados con quistes conteniendo bradizoítos es el único modo de transmisión del HI al HD, cerrándose de esta forma el ciclo (Dubey & Schares, 2011) (Figura 1.4). En el HD tendrá lugar el ciclo entero-epitelial para culminar con el desarrollo

de ooquistes, tras la esquizogonia y gametogonia, tal y como sucede en *T. gondii* (Elmore et al., 2010; Kul et al., 2015).

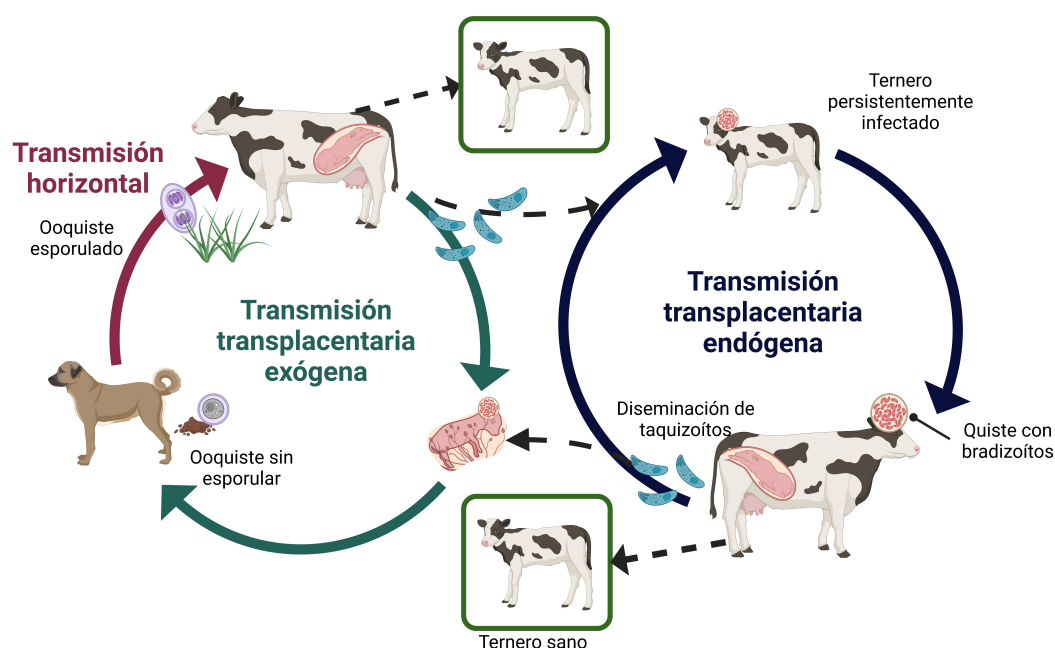


Figura 1.4: Ciclo biológico de *Neospora caninum* y principales modos de transmisión.

1.2. Modos de transmisión

En el ganado bovino se han descrito dos modos de transmisión de la infección, por ingestión de ooquistes esporulados presentes en el alimento o agua contaminada (transmisión horizontal), o por transmisión de taquizoítos de la madre al feto durante la gestación (transmisión vertical transplacentaria). La transmisión vertical es la vía de transmisión más eficiente y frecuente, pudiendo ocurrir en varias gestaciones consecutivas o de manera intermitente en el mismo animal y jugando un papel fundamental en la propagación de la infección en el rebaño, ya que el ganado bovino permanece infectado de por vida (Barr et al., 1993; Guy et al., 2001; Dubey et al., 2017). Sin embargo, la eficiencia de la transmisión vertical disminuye con las sucesivas gestaciones, lo que sugiere que los animales pueden desarrollar cierto grado de inmunidad (Dijkstra et al., 2003). Actualmente, se considera que la combinación de la transmisión vertical y horizontal es de gran relevancia para el mantenimiento de la infección (French et al., 1999; Dubey et al., 2007). Según el origen de la transmisión transplacentaria podemos diferenciar entre transmisión transplacentaria exógena y endógena (Trees & Williams, 2005). La transmisión transplacentaria exógena es debida a una primoinfección de la hembra gestante por la ingestión de ooquistes esporulados durante la gestación, transmitiendo la infección a su descendencia una vez el parásito alcanza el torrente circulatorio y atraviesa la placenta (Dubey, 2003). Este tipo de transmisión se

asocia con un patrón epidémico de abortos en el rebaño (Dubey et al., 2007; Williams et al., 2009). La transmisión transplacentaria endógena ocurre en animales congénitamente infectados y es debida a la reactivación de una infección crónica durante la gestación. Está asociada a un patrón endémico de abortos, siendo el principal modo de transmisión y jugando un papel relevante en el mantenimiento de la infección en el rebaño (Björkman et al., 1996; Schares et al., 1998; Anderson et al., 2000; Dubey et al., 2006; Dijkstra et al., 2008; Williams et al., 2009) (Figura 1.4).

Otros modos de transmisión (lactogénico y venéreo) no se han demostrado como probables en la naturaleza (Ferre et al., 2008; Osoro et al., 2009; Dubey & Schares, 2011).

1.3. Patogenia, signos clínicos y lesiones

1.3.1. Patogenia

Cualquiera que sea el origen de la infección en la madre (reactivación de una infección persistente o ingestión de ooquistes esporulados), los taquizoítos se diseminan por el organismo invadiendo distintos tejidos y alcanzando la placenta, donde se multiplican y pueden atravesar la interfaz materno-fetal para llegar al feto, produciendo lesiones que pueden causar la muerte fetal (Innes et al., 2000, 2002). Los mecanismos por los cuales se produce el aborto todavía no se conocen totalmente, pero parece que están relacionados con las lesiones producidas por el parásito al invadir y multiplicarse en la placenta y en los tejidos fetales, y con la respuesta inmunitaria desencadenada en la placenta (Buxton et al., 2002; Dubey et al., 2006; Innes et al., 2005; Innes, 2007; Almería et al., 2017). En este sentido, el equilibrio entre la respuesta proinflamatoria y antiinflamatoria es esencial para el mantenimiento de la gestación y el control de la infección (Entrican, 2002; Innes et al., 2002, 2005). Una respuesta proinflamatoria es necesaria para la eliminación del parásito, pero podría resultar potencialmente dañina e incompatible con la supervivencia fetal si se desencadena en exceso (Maley et al., 2006; Rosbottom et al., 2007; Cantón et al., 2014b). Por su parte, una respuesta de tipo antiinflamatorio, la cual es predominante según avanza la gestación, facilitaría la diseminación y proliferación del parásito en los tejidos maternos y fetales (Wegmann et al., 1993; Raghupathy, 1997a,b; Innes et al., 2002, 2005).

Aunque la patogenia de la neosporosis en las hembras gestantes es compleja y no se conoce totalmente, se ha demostrado que factores dependientes tanto de la madre y del feto como del parásito determinan las consecuencias de la neosporosis bovina (aborto o nacimiento de terneros congénitamente infectados) (Benavides et al., 2014; Pastor-Fernández et al., 2021).

1.3.1.1. Factores dependientes de la madre y del feto

La respuesta inmunitaria materna en la placenta y el grado de desarrollo de la inmunidad fetal en los distintos periodos de gestación van a ser factores muy importantes en el desarrollo de la enfermedad (Pastor-Fernández et al., 2021). Durante el primer trimestre de gestación, el feto es muy sensible a la infección debido a que los órganos linfoides fetales (timo, bazo, ganglios linfáticos periféricos) se encuentran en formación (Quintanilla-Gozalo et al., 2000; Innes et al., 2001; Williams et al., 2000, 2009). En estudios experimentales en bovino, la inoculación de taquizoítos en el día 70 de gestación produce la muerte del feto y el aborto, describiéndose una amplia distribución del parásito y lesiones graves tanto en el feto como en la placenta, así como una respuesta de tipo proinflamatoria en la placenta (Maley et al., 2006; Rosbottom et al., 2008; Cantón et al., 2014a; Regidor-Cerrillo et al., 2014).

Los órganos linfoides del feto empiezan a reconocer y responder a los agentes patógenos en el segundo tercio de gestación (Osburn et al., 1982; Buxton et al., 2002), desarrollando una respuesta inmunitaria frente al parásito según avanza la gestación, que puede ser suficiente o no para resolver la infección. En infecciones experimentales durante este periodo (110-140 días de gestación), se observa tanto la muerte fetal como el nacimiento de terneros congénitamente infectados, por lo que el conocimiento de los mecanismos implicados en cada caso podría ser útil para entender la patogenia. En los casos en los que se produce la mortalidad fetal, se observan lesiones graves y una respuesta proinflamatoria exacerbada en los placentomas, especialmente en la carúncula, con una disminución de la respuesta antiinflamatoria (Almería et al., 2016; Mur-Novales et al., 2016a,b; Jiménez-Pelayo et al., 2020; Horcajo et al., 2022). Sin embargo, en general, las lesiones histológicas encontradas en la placenta y en los fetos tras la infección a mitad de la gestación son más leves que las observadas después de una infección a principios de la gestación (Maley et al., 2003). Por el contrario, en las hembras infectadas durante este periodo en las que no se produce el aborto se observa el aumento de la expresión de las citoquinas en los placentomas, tanto proinflamatorias como antiinflamatorias. Este patrón de expresión de citoquinas podría ser beneficioso para la supervivencia fetal, pero también podría favorecer la transmisión transplacentaria (Almería et al., 2011).

En el tercer trimestre, el feto es inmunocompetente y puede controlar la multiplicación del parásito, limitando el desarrollo de lesiones (Innes et al., 2002; Dubey et al., 2006) y permitiendo la supervivencia fetal (Barr et al., 1994; Williams et al., 2000; Innes et al., 2001; Maley et al., 2003; Benavides et al., 2012). Las infecciones experimentales en este periodo conducen al nacimiento de terneros sanos pero congénitamente infectados (Williams et al., 2000; McCann et al., 2007). En los placentomas de los animales infectados se detecta esporádicamente el parásito, se observan lesiones muy leves con necrosis focal y una modesta expresión de citoquinas antiinflamatorias y proinflamatorias (Rosbottom et al., 2008; Gibney et al., 2008; Benavides et al., 2012). En conjunto, la infección por *N. caninum* al final de la gestación es más leve que al principio o a mitad de gestación, lo que podría explicar, en parte, las diferentes repercusiones clínicas (Pastor-Fernández et al., 2021) (Figura 1.5).

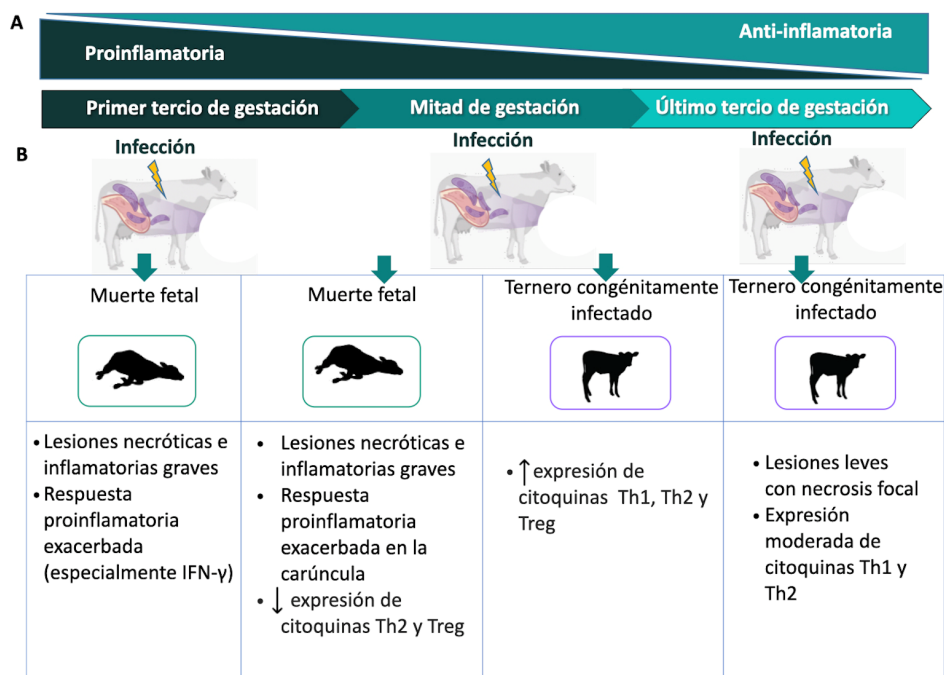


Figura 1.5: A) Cambios inmunitarios producidos en la placenta a lo largo de la gestación. B) Hallazgos patológicos e inmunitarios en la placenta observados en bovinos desafiados experimentalmente con aislados de alta virulencia en distintos momentos de la gestación.

1.3.1.2. Factores dependientes del parásito

La virulencia del aislado de *N. caninum* implicado en la infección también presenta una marcada influencia en los cambios patológicos e inmunológicos producidos en los placentomas de los modelos experimentales bovinos, siendo un factor importante en la patogenia de la neosporosis (Ver sección 2.1.2 Diversidad en modelos experimentales bovinos).

Recientemente, se utilizó un modelo bovino de eutanasia secuencial para estudiar los eventos iniciales (10 y 20 días post-infección, pi) de la infección a mitad de la gestación y comparar el comportamiento del aislado de alta virulencia Nc-Spain7 con el del aislado de baja virulencia Nc-Spain1H (Jiménez-Pelayo et al., 2019b; García-Sánchez et al., 2021; Horcajo et al., 2022). Los taquizoítos de Nc-Spain7 alcanzaron antes la placenta, se transmitieron al feto y provocaron el desarrollo de lesiones y la mortalidad fetal, mientras que el aislado Nc-Spain1H mostró un retraso en la infección de la placenta y no presentó desarrollo de lesiones ni transmisión al feto (Jiménez-Pelayo et al., 2019b) en el periodo estudiado. La dinámica de la respuesta inmunitaria periférica en las madres y fetos fue similar para ambos aislados, pero los resultados del estudio transcriptómico de la placenta mostraron diferencias entre aislados, especialmente en el lado materno de la placenta, la carúncula. En este tejido, el aislado Nc-Spain7 desencadenó una respuesta proinflamatoria a los 10 días pi que fue más intensa en el día 20 pi, mientras que el aislado Nc-Spain1H no estimuló dicha respuesta a ningún tiempo pi, induciendo el aumento de expresión de genes relacionados con

la contención de la respuesta proinflamatoria, sugiriendo que la modulación de la respuesta del hospedador en la carúncula podría ser decisiva para determinar la presentación del aborto o no (Horcajo et al., 2022). La exacerbación de la respuesta inmunitaria proinflamatoria por el aislado Nc-Spain7 podría conducir a un daño tisular grave y al aborto, mientras que el aislado Nc-Spain1H desencadenó la expresión de citoquinas antiinflamatorias y otros mecanismos implicados en el mantenimiento de la integridad de la matriz extracelular para garantizar la supervivencia fetal (Horcajo et al., 2022). La alteración de la organización de la matriz extracelular, los procesos de oxidación-reducción y las vías del complemento y la coagulación, entre otros procesos biológicos, parecen ser aspectos clave en el mecanismo patogénico del aborto por *N. caninum* (Jiménez-Pelayo et al., 2020; Pastor-Fernández et al., 2021).

1.3.2. Signos clínicos

En relación con los signos clínicos, la manifestación clínica más importante es el aborto en vacas gestantes, siendo más frecuente entre el quinto y sexto mes de gestación, no acompañándose, generalmente, de retención de la placenta (Dubey et al., 2007; Almería & López-Gatius, 2013). Los fetos que mueren pueden ser reabsorbidos, observándose repeticiones de celo, o ser expulsados con diferentes grados de autólisis. En algunas circunstancias también puede producirse la momificación del feto (que es abortado o bien es retenido hasta el final de la gestación). Por el contrario, la infección en animales no gestantes generalmente es asintomática (Benavides et al., 2014; Dubey et al., 2017).

La presencia de signos clínicos en terneros congénitamente infectados es poco común y suele ir desde una leve incoordinación, pérdida de propiocepción y flexión/hiperextensión de las extremidades hasta una parálisis completa, pudiéndose observar hidrocefalia, exoftalmia, neumonía, malformaciones de la columna vertebral y estrechamiento de la médula espinal. Los signos aparecen, principalmente, en la primera o segunda semana postparto y los terneros con los signos más graves suelen morir durante el primer mes (Dubey et al., 1992; Dubey & de Lahunta, 1993; Gunning et al., 1994; Dubey & Schares, 2011). Los signos clínicos y lesiones aparecen como consecuencia del daño tisular y la diseminación del parásito en el músculo esquelético y el sistema nervioso (Dubey et al., 1990a,b; Barr et al., 1991b; Bryan et al., 1994). Los terneros sin signos clínicos, pero congénitamente infectados, también pueden presentar lesiones, normalmente restringidas al SNC (Bryan et al., 1994; Sawada et al., 2000).

1.3.3. Lesiones

Las lesiones asociadas a la infección no son patognomónicas, pero van a facilitar el diagnóstico de la enfermedad. Dichas lesiones son, en general, inflamatorias y no supurativas y están localizadas principalmente en el tejido placentario y en el SNC de los fetos, aunque pueden afectar a otros órganos como el corazón, el hígado, el riñón, el pulmón o el músculo

esquelético, en función del estado y gravedad de la infección (Wouda et al., 1997; Dubey et al., 2006). En el tejido placentario normalmente encontramos focos de necrosis con infiltrados de células mononucleares que, en procesos avanzados, pueden progresar hacia fibrosis e incluso calcificaciones (Barr et al., 1994; Maley et al., 2003; Dubey et al., 2017). En los tejidos fetales, las lesiones están principalmente localizadas en la materia gris del SNC y presentan áreas multifocales con infiltración de células del sistema linfoide, manguitos perivasculares, microgliosis, astrocitos reactivos y áreas de necrosis con posibles calcificaciones (Barr et al., 1991a; Dubey & Lindsay, 1996; Dubey et al., 2017). En general, las lesiones van a ser más graves cuando el aborto ocurre durante el primer y segundo tercio de la gestación o en abortos con patrón epidémico tras la transmisión transplacentaria exógena (Collantes-Fernández et al., 2006b; Gibney et al., 2008; Williams et al., 2009). En casos de aborto con patrón epidémico es común encontrar lesiones hepáticas caracterizadas por hepatitis periportal y necrosis multifocal (Wouda et al., 1997; Collantes-Fernández et al., 2006b).

1.4. Inmunidad

La respuesta inmunitaria frente a la infección por *N. caninum* está caracterizada principalmente por ser una **respuesta celular**. Las células dendríticas, macrófagos y células *natural killer* (NK) constituyen la primera línea de defensa y actúan en los primeros momentos tras la infección, eliminando las células infectadas y liberando citoquinas y quimioquinas (Boysen et al., 2006; Klevar et al., 2007; Mineo et al., 2010; Dion et al., 2011; Flynn & Marshall, 2011; Almería et al., 2017; Wei et al., 2018). Su actividad es importante para restringir el crecimiento y multiplicación del parásito y actúan como nexo entre la respuesta inmunitaria innata y adaptativa, reclutando otras células inmunitarias. Por otra parte, el parásito también puede ser capaz de evadir esta respuesta e invadir y multiplicarse en dichas células y, en el caso de las células dendríticas y los macrófagos, inducir un fenotipo migratorio que ayuda a la diseminación del parásito por el organismo (Collantes-Fernández et al., 2012; García-Sánchez et al., 2019b).

Las células inmunitarias van a reconocer los patógenos mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), como los TLR (*Toll-like receptors*) o los NLR (*Nod-like receptors*). Su papel podría ser clave durante las fases iniciales de la infección, actuando en el reconocimiento y estimulando la respuesta inmunitaria frente al patógeno. Estos PRRs se encuentran presentes en las células presentadoras de antígenos (CPAs) y en los linfocitos (Werling et al., 2006; Bartley et al., 2013), así como en las células del trofoblasto y otras células de la placenta (Koga & Mor, 2008). Se ha sugerido un papel importante de los receptores TLR3, TLR8 y TLR7 durante la gestación temprana (70 días) y de los receptores TLR2 y TLR9 durante la gestación tardía (210 días), estimulando la respuesta inmunitaria materna y fetal frente a *N. caninum* (Bartley et al., 2013; Marin et al., 2017). Además, se ha comprobado que los receptores TLR3 y TLR2 median en la respuesta inmunitaria protectora frente a *N. caninum* por parte de las células dendríticas murinas (BMDM) y que los ratones

deficientes en TLR2 son más sensibles a la infección (Mineo et al., 2010; Beiting et al., 2014; Miranda et al., 2019; Fereig et al., 2019). Sin embargo, es importante señalar que se han descrito diferencias en la respuesta de un mismo receptor en distintas especies animales y en el número de TLRs según la especie animal (Werling et al., 2009; Novák, 2014). Todo ello resalta la importancia de estudiar estas cuestiones en la especie diana: el bovino. En esta especie se ha puesto de manifiesto que en macrófagos infectados con *N. caninum* pueden ser relevantes los receptores de tipo TLR (TLR2, TLR3 y TLR9) y de tipo NLR (NAIP, NOD2 y NLRC4) en el reconocimiento de *N. caninum* y en la activación de los macrófagos bovinos (García-Sánchez et al., 2020). Además, en estas células, la ruta NF- κ B fue la principal ruta de señalización celular implicada en la respuesta inmunitaria frente al parásito y la responsable de la sobreexpresión de citoquinas proinflamatorias (García-Sánchez et al., 2020). Por otra parte, los procesos de apoptosis y degradación por lisosomas fueron reprimidos por la infección por *N. caninum*, lo que podría ser una estrategia del parásito para garantizar su supervivencia (García-Sánchez et al., 2020).

La interacción entre el parásito y las células efectoras de la inmunidad innata va a ser crítica para determinar el carácter de la respuesta desarrollada (Taubert et al., 2006a,b). Los linfocitos T CD4+ o linfocitos cooperadores (T *helper*, Th) reconocen los antígenos presentados en la membrana de las CPAs y estimulan la liberación de citoquinas. Según la subpoblación de células Th presentes se liberarán distintos tipos de citoquinas, así las células tipo Th1 estimulan una respuesta caracterizada por citoquinas pro-inflamatorias (IFN- γ , IL-12, TNF- α), las cuales favorecen la respuesta inmunitaria mediada por células y son particularmente efectivas para controlar infecciones intracelulares como *N. caninum*. Por su parte, las células Th2 liberan citoquinas antiinflamatorias o reguladoras (IL-4, IL-10, TGF- β), las cuales inhiben la actividad mediada por células, aumentan la respuesta humoral y van a ser beneficiosas para el mantenimiento de la gestación (Entrican, 2002; Almería et al., 2017). Debido a la condición de parásito intracelular obligatorio, el control de la infección va a estar asociado a una respuesta Th1 mediada por células (Khan et al., 1997; Innes et al., 2000; Hemphill et al., 2006). En los modelos murinos de infección, se ha indicado un papel clave de las citoquinas Th1 IFN- γ e IL-12 en la inmunidad protectora frente al parásito (Khan et al., 1997; Baszler et al., 1999). Un perfil similar se ha observado en infecciones experimentales en modelos bovinos (Quinn et al., 2002a; Innes et al., 2005; López-Gatius et al., 2007). Por su parte, el IFN- γ está directamente implicado en el control de la multiplicación, inhibiendo el crecimiento de taquizoítos *in vitro* (Innes et al., 1995; Yamane et al., 2000). El IFN- γ activa las células T CD4+ y estimula la función de células T CD8+ o citotóxicas (Tc), los cuales liberan más cantidades de IFN- γ y ayudan al control de la infección (Maley et al., 2006; Correia et al., 2013). No obstante, como ya se ha mencionado, una respuesta proinflamatoria exacerbada podría resultar perjudicial. La respuesta inmunitaria periférica en vacas infectadas a mitad de gestación mostró un aumento significativo de linfocitos T CD4+ en los primeros días tras la infección, coincidiendo con los niveles más altos de liberación de IFN- γ e IL-4. En los días siguientes, el aumento de los linfocitos T CD8+ en

las células mononucleares de sangre periférica y la mayor producción de IFN- γ se relacionó con un mayor riesgo de aborto y un peor pronóstico de la enfermedad, demostrándose, además, cómo la virulencia del aislado implicado afecta a la respuesta inmunitaria materna y fetal generada frente a *N. caninum* (García-Sánchez et al., 2021).

Además de la respuesta inmunitaria celular, *N. caninum* también estimula una respuesta inmunitaria humoral. La presencia de **anticuerpos específicos** es indicativa de una exposición al parásito (Almería et al., 2017) y las vacas seropositivas van a tener mayores probabilidades de abortar que las seronegativas. Además, la reactivación de la infección crónica junto con una elevación de los títulos de anticuerpos frente a *N. caninum* se ha relacionado con el riesgo de aborto (Quintanilla-Gozalo et al., 2000; Guy et al., 2001; López-Gatius et al., 2004; Andrianarivo et al., 2005; Guido et al., 2016). Sin embargo, no está clara la función de los anticuerpos en la protección, pero, tal y como ocurre en *T. gondii*, podrían tener un papel en la opsonización de parásitos extracelulares (Sibley et al., 1985). En los modelos murinos, los ratones defectivos en linfocitos B mostraron mayor susceptibilidad a la infección, por lo que se ha sugerido un papel protector de los anticuerpos (Eperon et al., 1999).

1.5. Diagnóstico

La recogida de datos clínicos y epidemiológicos es importante a la hora de realizar el diagnóstico de la infección como causa de aborto en una explotación. No obstante, la sospecha de la infección debe confirmarse mediante técnicas laboratoriales, las cuales proporcionan distinta información según el abordaje utilizado, siendo de gran importancia la elección de la técnica diagnóstica más apropiada para cada caso (Ortega-Mora et al., 2006).

Rutinariamente, la detección de anticuerpos específicos mediante ELISA es la metodología diagnóstica de elección para conocer la situación y la evolución de la infección en un rebaño, aunque se han desarrollado otras técnicas diagnósticas serológicas como la inmunofluorescencia indirecta (IFI) o el Western Blot (Álvarez-García et al., 2013). Todas estas técnicas se pueden aplicar en animales mayores de 6 meses o en terneros recién nacidos utilizando sueros precalostrales, ya que los anticuerpos calostrales podrían interferir con el resultado. En el caso del diagnóstico en animales que no han abortado, con fines de compra o de reposición, la técnica más indicada sería el Western blot por su mayor sensibilidad y especificidad (Ortega-Mora et al., 2019). Si el objetivo es conocer la situación del rebaño o el progreso de la infección, el diagnóstico serológico por ELISA en muestras recogidas del tanque de leche es la técnica óptima por su reducido coste económico y su facilidad de desarrollo, al ser una técnica no invasiva y rápida, aunque en caso de bajas prevalencias disminuye la sensibilidad de la técnica, no siendo útil con prevalencias intra-rebaño inferiores a 10-15% (Guido et al., 2016). Es importante señalar que son frecuentes las fluctuaciones de anticuerpos, por lo que es recomendable la repetición del muestreo para confirmar el diagnóstico (Nogareda et al., 2007). Confirmada la infección por *N. caninum* y la situación serológica de la granja, el cálculo de la *odds ratio* permite establecer una asociación entre la serología

positiva y el riesgo de presentación de aborto, ayudando a establecer una causa-efecto entre la infección por *N. caninum* y el aborto (Dubey et al., 2017). Posteriormente, se recomienda realizar un análisis más exhaustivo para detectar la magnitud del problema y el modo de transmisión predominante, determinando la prevalencia intra-rebaño, por grupos de edad y la concordancia serológica entre madres e hijas (Figura 1.6).

Se han realizado distintas modificaciones de la prueba ELISA utilizando como antígeno tanto el parásito entero o lisado, como proteínas recombinantes -ELISA basado en las proteínas NcGRA7 y NcSAG4-, que son específicas de taquizoíto y bradizoíto respectivamente, y permiten diferenciar entre primoinfección, recrudescencia o infección crónica (Aguado-Martínez et al., 2008). El ELISA de avidéz también va a permitir diferenciar entre rebaños donde prevalece la primoinfección y, por tanto, un mayor riesgo de transmisión transplacentaria exógena, de aquellos con infección crónica mantenida por transmisión transplacentaria endógena (Schaes et al., 2002; Aguado-Martínez et al., 2005; Björkman et al., 2006). Un diagnóstico correcto orienta sobre el modo de transmisión predominante en una explotación y ayudará a la elección de las medidas de control más adecuadas.

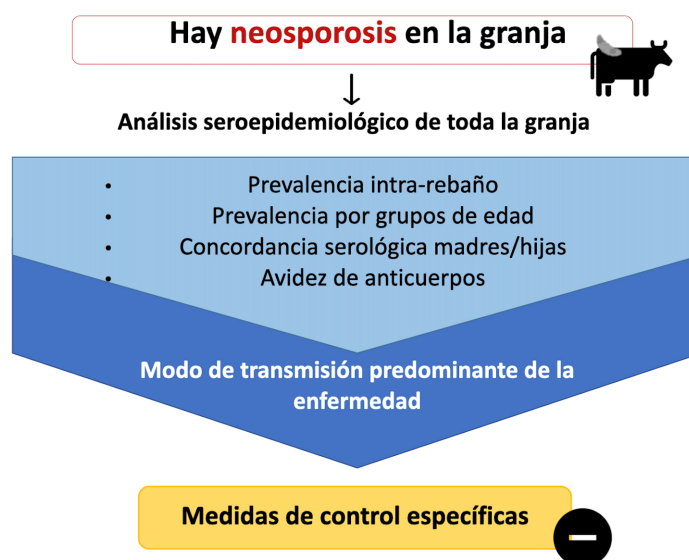


Figura 1.6: Diagnóstico laboratorial de *Neospora caninum*. Imagen modificada de <https://parasitxpert.es/el-parasito-del-mes-neospora-caninum-y-neosporis/>.

Para confirmar el diagnóstico del aborto, el diagnóstico serológico debe acompañarse con técnicas de detección del parásito (PCR o inmunohistoquímica) y/o de lesiones compatibles (histología) en fetos abortados y placentas, en caso de disponer de dichas muestras. En el feto, el órgano diana principal donde se detecta con mayor frecuencia el parásito y las lesiones asociadas es el cerebro, seguido del corazón y el hígado (Lindsay & Dubey, 2020). De forma complementaria, también se puede detectar la presencia de anticuerpos específicos en el líquido torácico o abdominal en fetos mayores de 5 meses mediante técnicas serológicas (Dubey & Schaes, 2006).

1.6. Control

En la actualidad no existen fármacos ni vacunas disponibles para el control de la neosporosis. Los resultados obtenidos por muchos grupos de investigación en este campo son prometedores (Horcajo et al., 2016; Marugán-Hernández, 2017; Sánchez-Sánchez et al., 2018b), sin embargo, hoy en día, las únicas medidas de control frente a la enfermedad se basan en la bioseguridad y en las medidas de manejo.

1.6.1. Bioseguridad y medidas de manejo

El establecimiento de las medidas de control dependerá de la situación epidemiológica de cada granja, la seroprevalencia y el principal modo de transmisión (Dubey et al., 2017). Previo a la aplicación de cualquier programa de control se debe realizar un cálculo coste-beneficio de las medidas a implementar, ya que en ocasiones pueden resultar inviables desde un punto de vista económico (Häsler et al., 2006a,b; Reichel & Ellis, 2006). Posteriormente, una vez aplicado el programa de control, la monitorización serológica del rebaño servirá como indicador de su efectividad (Almería & López-Gatius, 2013).

El mantenimiento de un estado higiénico-sanitario óptimo y de bienestar animal es crucial para evitar la aparición o recrudescencia de la enfermedad. Las medidas aplicadas en las **granjas no infectadas** irán encaminadas a evitar la entrada del parásito en la explotación y mantener un estatus sanitario libre de la infección. Se debe vigilar la situación clínica y epidemiológica del rebaño y realizar análisis serológicos a la recria (tanto interna como externa). Por otra parte, se deben reforzar las medidas básicas de bioseguridad para prevenir la transmisión horizontal, tales como el control de acceso de los perros y otros cánidos potenciales HD a las granjas, especialmente a las zonas de almacenamiento de alimento, comederos y bebederos, y la correcta y rápida eliminación de residuos de abortos y placentas o tejidos animales (Figura 1.7). Estas últimas medidas serán clave en el caso de explotaciones con una **neosporosis epidémica**, donde exista transmisión horizontal (Dubey et al., 2007). En estos casos, se recomienda realizar un seguimiento de los animales seropositivos y eliminar aquellos que aborten o transmitan la infección a la descendencia en posteriores gestaciones (Figura 1.8).

En explotaciones con **neosporosis endémica**, donde el principal modo de transmisión es la transmisión transplacentaria endógena, las medidas estarán dirigidas a frenar la diseminación del parásito a la descendencia mediante el sacrificio selectivo de los animales seropositivos. Cuando la seroprevalencia es baja, se puede realizar drásticamente, eliminando todos los animales seropositivos. En caso de explotaciones con seroprevalencias muy elevadas, esta medida puede ser inviable económicamente, por lo que se recomienda una eliminación progresiva, empezando por aquellos animales con antecedentes de abortos, con descendencia seropositiva o de mayor edad, y su reemplazo con descendientes de vacas seronegativas. En el caso de animales de alto valor genético, se puede realizar la transferencia de embriones a hembras receptoras libres de la infección o inseminarlas artificialmente con



Figura 1.7: Medidas de control en una explotación no infectada. Fuente: <https://parasitxper.t.es/control-de-la-neosporosis-bovina/>

semen de toros de razas de carne, ya que se ha visto que disminuye el riesgo de transmisión (Baillargeon et al., 2001; López-Gatius et al., 2005; Dubey et al., 2007; Dubey & Schares, 2011; Reichel et al., 2014). No obstante, las medidas básicas de bioseguridad dirigidas a eliminar la transmisión horizontal o a mantener un estatus sanitario libre de la infección deben estar presentes en todas las granjas (Figura 1.9).

1.6.2. Tratamiento e inmunoprofilaxis

Hasta la fecha no existe ningún **tratamiento** que haya demostrado ser seguro y eficaz frente a la neosporosis bovina. Se han realizado un gran número de estudios de eficacia de distintos compuestos, mostrando resultados prometedores tanto *in vitro* como en modelos murinos. Sin embargo, los estudios en modelos bovinos son escasos y muestran una eficacia moderada o baja, por lo que se están probando nuevos enfoques en el desarrollo de fármacos (Sánchez-Sánchez et al., 2018b).



Figura 1.8: Medidas de control en una explotación con neosporosis epidémica. Fuente: <https://parasitxpert.es/control-de-la-neosporosis-bovina/>

La administración de triazinonas como el toltrazuril o el ponazuril ha demostrado ser eficaz en terneros experimentalmente infectados, disminuyendo los signos clínicos y logrando eliminar la detección del parásito en el encéfalo y otros órganos diana (Kritzner et al., 2002). Su aplicación junto a inhibidores del folato (sulfadiacina y trimetoprim) en condiciones naturales mostró una reducción significativa de los abortos asociados a *N. caninum* (Cuteri et al., 2005). Otros compuestos como el decoquinato o la monensina también han mostrado ciertos resultados de eficacia (Journel et al., 2002; VanLeeuwen et al., 2011). En los últimos años, nuevos compuestos como los inhibidores de las proteínas quinasas dependientes del calcio (BKIs) se han postulado como herramientas prometedoras para tratar la enfermedad, destacando algunos como el BKI-1553 (Sánchez-Sánchez et al., 2018a).

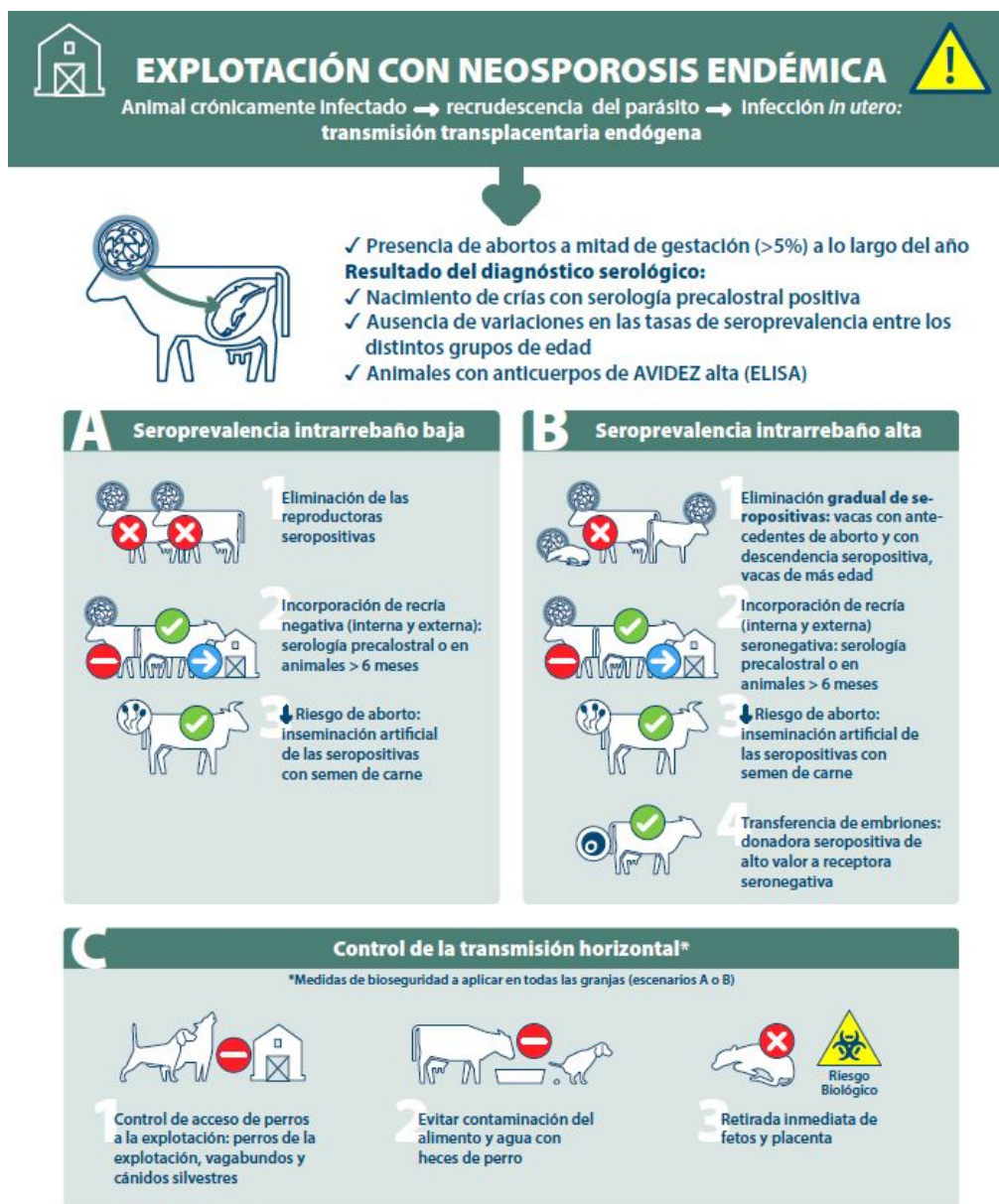


Figura 1.9: Medidas de control en una explotación con neosporosis endémica. Fuente: <https://parasitxpert.es/control-de-la-neosporosis-bovina/>

La gran desventaja del tratamiento farmacológico es determinar el momento de la administración y la posible aparición de residuos en leche y carne, asociados a largos periodos de supresión. Además, la Unión Europea cuenta con estrictas normativas que regulan el uso de medicamentos y otros aditivos en animales destinados a consumo. Por otra parte, no hay evidencias de infección hasta la presencia de abortos, momento en el que podría ser demasiado tarde para administrar un tratamiento (Dubey et al., 2007; Benavides et al., 2014).

Los análisis económicos sugieren que la **vacunación** sería el enfoque más efectivo para el control de la neosporosis bovina en explotaciones con alta prevalencia (Reichel & Ellis, 2006). Se han realizado muchos estudios con el objetivo de desarrollar una vacuna segura y eficaz, capaz de conferir protección frente al aborto y evitar la transmisión vertical. Los resultados más prometedores se han obtenido utilizando vacunas vivas atenuadas, tanto obtenidas de cepas atenuadas *in vitro* por distintos métodos (irradiación, mantenimiento en cultivo celular por largo tiempo, modificaciones genéticas), como obtenidas de aislados con baja virulencia de forma natural (Nc-Spain1H o Nc-Nowra) (Williams et al., 2007; Marugán-Hernández et al., 2011b; Rojo-Montejo et al., 2013; Hemphill et al., 2016). Sin embargo, estas vacunas podrían producir problemas de seguridad por el acantonamiento del parásito y su posterior reactivación, lo que, unido a sus necesidades especiales de conservación y su dificultad de producción a gran escala, complican su comercialización (Reichel et al., 2015; Horcajo et al., 2016). La única vacuna comercializada frente a la neosporosis bovina (Bovilis Neo Guard), constituida por un lisado de taquizoítos, fue retirada del mercado por la falta de datos convincentes sobre su eficacia para prevenir los abortos asociados a *N. caninum* en el ganado bovino (Barling et al., 2003; Romero et al., 2004; Weston et al., 2012). Desde entonces, el esfuerzo de muchos grupos de investigación se ha centrado en la búsqueda de nuevas dianas vacunales y en el desarrollo de vacunas de nueva generación (proteínas recombinantes, ADN o vectores), las cuales son seguras y fáciles de producir. Estas proteínas podrían incorporar marcadores específicos que permitieran diferenciar animales vacunados de infectados. Las proteínas implicadas en el ciclo lítico -en los procesos de adhesión, invasión o formación de la VP (proteínas SRS, MIC, ROP, GRA)- se postulan como potenciales candidatos ya que podrían bloquear procesos específicos del ciclo lítico, desencadenando una respuesta inmunitaria dirigida frente a la proteína implicada (Horcajo et al., 2016; Hemphill et al., 2016; Marugán-Hernández, 2017).

En conclusión, existe la necesidad de desarrollar medidas de control eficaces frente a la neosporosis bovina. El conocimiento de los mecanismos de virulencia de *N. caninum* es fundamental para comprender su biología y desarrollar medidas dirigidas al control de la enfermedad. En los siguientes apartados se describirán los aspectos relacionados con la virulencia de *N. caninum*.

2. Virulencia en *Neospora caninum*

Hasta la fecha, los mecanismos que regulan la virulencia en *N. caninum* son prácticamente desconocidos. En los últimos años, se ha profundizado en el estudio de la variabilidad intraespecífica y de las diferencias en la virulencia, demostrándose la existencia de grandes variaciones entre aislados del parásito. En las siguientes secciones se revisará dicha variabilidad con un enfoque que va desde el animal hasta la molécula.

2.1. Diversidad fenotípica

Uno de los principales factores determinantes en la patogenia de la neosporosis bovina es la virulencia del aislado implicado. La gravedad del proceso dependerá de su capacidad para invadir y replicarse en las células del hospedador, migrar y atravesar la barrera placentaria y hematoencefálica, así como de los mecanismos de modulación de la respuesta inmunitaria del hospedador.

Actualmente, el número de aislados disponibles de *N. caninum* obtenidos a partir de animales domésticos (perros, bovinos, búfalos y ovejas) y silvestres (lobos, bisontes europeos y ciervos de cola blanca), supera el centenar, siendo los orígenes caninos y bovinos los más comunes. Los primeros aislados se obtuvieron del encéfalo de perros con signos clínicos graves de la enfermedad, como es el caso de Nc-1 (Dubey et al., 1988b), Nc-Liverpool (Nc-Liv; Barber et al., 1995) y Nc-Bahia (Gondim et al., 2001). Posteriormente, también se obtuvieron aislados caninos a partir de ooquistes eliminados por perros infectados de forma natural, como los aislados Nc-Ger2, Nc-Ger6 (Schaes et al., 2005) o Nc-6 Arg (Basso et al., 2001). Los aislados bovinos se han obtenido del encéfalo de fetos abortados (Nc-SweB1; Stenlund et al., 1997) o de terneros clínicamente sanos pero congénitamente infectados, como el panel de 10 aislados españoles obtenido por el grupo de investigación SALUVET (Regidor-Cerrillo et al., 2008; Rojo-Montejo et al., 2009b). La caracterización fenotípica de los distintos aislados se ha abordado utilizando modelos *in vivo* (bovino y murino) e *in vitro* (estudio del ciclo lítico, principalmente), encontrándose diferencias significativas entre los aislados.

En los siguientes apartados se revisará la variabilidad entre los distintos aislados de *N. caninum* teniendo en cuenta su diferente efecto patógeno, distribución tisular e inducción de la respuesta inmunitaria en modelos experimentales murinos y bovinos. También se revisarán otros rasgos fenotípicos, las diferencias en el ciclo lítico y las interacciones parásito-célula hospedadora en cultivos celulares *in vitro*.

2.1.1. Diversidad en modelos murinos

Los modelos murinos han demostrado ser adecuados como un primer paso en el estudio de la virulencia de *N. caninum*, a pesar de que los ratones no son hospedadores naturales del parásito. En comparación con el ganado bovino, los ratones son de menor tamaño y más fáciles de manejar, tienen un periodo de gestación más corto y son modelos de menor coste económico y con mayor cantidad de reactivos disponibles. Estos motivos han justificado

su uso para la caracterización y el estudio de la virulencia de los aislados de *N. caninum*, utilizando tanto modelos murinos no gestantes o de infección cerebral (Lindsay et al., 1995; Eperon et al., 1999; Atkinson et al., 1999; Rettigner et al., 2004; Collantes-Fernández et al., 2006a), como modelos murinos gestantes o de infección congénita (Long & Baszler, 1996; Quinn et al., 2002b; Omata et al., 2004; López-Pérez et al., 2006, 2008).

Los parámetros utilizados para evaluar la virulencia en los modelos no gestantes son la mortalidad/morbilidad de los animales, la carga parasitaria, la distribución del parásito en los órganos diana como el SNC y la respuesta inmunitaria humoral y celular producida frente a la infección. Además de los parámetros previamente descritos, los modelos murinos gestantes también permiten evaluar la mortalidad/morbilidad fetal y neonatal, la transmisión congénita y la respuesta inmunitaria en la placenta, siendo modelos más completos debido a la importancia de la transmisión vertical en la neosporosis bovina. Por otro lado, debido a la regulación de la respuesta inmunitaria materna durante la gestación, el modelo gestante es más sensible a la infección por *N. caninum*, permitiendo detectar mejor las diferencias en la virulencia que el modelo no gestante (López-Pérez et al., 2006, 2008; Arranz-Solís et al., 2015).

Existe una gran heterogeneidad de modelos murinos descritos en la literatura, con diferentes resultados en función de la estirpe de ratón (Long et al., 1998; Collantes-Fernández et al., 2004; Rettigner et al., 2004; Mols-Vorstermans et al., 2013), de la fase de gestación (Long & Baszler, 1996; Quinn et al., 2002b; Ramamoorthy et al., 2007; López-Pérez et al., 2008), y de la vía y la dosis de infección utilizada (Quinn et al., 2002b; Teixeira et al., 2007; López-Pérez et al., 2008; Arranz-Solís et al., 2015). En los últimos años, el grupo de investigación SALUVET ha realizado un esfuerzo para armonizar y refinar un modelo murino gestante de transmisión congénita que permita la comparación de estudios no realizados simultáneamente, utilizando ratones BALB/c y realizando la infección a mitad de gestación con una dosis de 10^5 taquizoítos/ ratón por vía subcutánea (Arranz-Solís et al., 2015). Los estudios realizados en este modelo normalizado han mostrado notables diferencias en la virulencia entre aislados (Tabla 1.1). Según los resultados en este modelo, se clasificaron como aislados de alta virulencia aquellos que presentaron tasas de transmisión vertical y mortalidad neonatal que oscilaron en torno al 80-100%, como Nc-Liv, Nc-Bahia, Nc-Spain7, Nc-Spain4H o Nc-Spain5H (Quinn et al., 2002b; Rojo-Montejo et al., 2009b; Regidor-Cerrillo et al., 2010; Dellarupe et al., 2014a), de moderada o moderada/baja virulencia los que presentaron tasas de mortalidad fetal alrededor del 20% y tasas de transmisión vertical de hasta el 60%, como los aislados Nc-Ger3, Nc-Spain2H, Nc-Spain6, Nc-Spain8 o Nc-Spain10 (Regidor-Cerrillo et al., 2010; Dellarupe et al., 2014a), y de baja virulencia los que tuvieron tasas de mortalidad fetal inferiores al 10% y tasas de transmisión vertical de alrededor del 30% o menos, como los aislados Nc-Ger2, Nc-Ger6 o Nc-Spain1H (Rojo-Montejo et al., 2009b; Dellarupe et al., 2014a). Los aislados de alta virulencia también indujeron una mayor respuesta inmunitaria humoral (Regidor-Cerrillo et al., 2010). No obstante, el modelo murino presenta ciertas limitaciones que se deben tener en cuenta a la hora de extrapolar los datos

obtenidos a la especie de destino, como son la diferencia en la estructura placentaria entre ambas especies (hemocorial *vs* sindesmocorial) o en el tiempo de gestación (21 días *vs* 280 días), además de la diferente respuesta inmunitaria.

2.1.2. Diversidad en modelos experimentales bovinos

El modelo ideal para el estudio de la patogenia de la neosporosis y la respuesta inmunitaria del hospedador es el modelo bovino, ya que es la principal especie afectada desde el punto de vista clínico y económico. Sin embargo, debido a las limitaciones económicas, éticas y de infraestructura que implica la infección experimental de grandes animales, los estudios son limitados (Benavides et al., 2014). Los modelos de primoinfección son el único enfoque experimental disponible para estudiar la neosporosis bovina ya que hasta el momento no se ha podido reproducir experimentalmente la transmisión transplacentaria endógena, que es la más frecuente en la naturaleza. Como ocurre en el modelo murino, las comparaciones entre estudios son difíciles ya que presentan un alto grado de variabilidad en el diseño experimental, con diferencias en los aislados utilizados para la infección, las vías de inoculación y dosis, los periodos de gestación cuando se realiza la infección, los animales utilizados (raza, peso, edad) o el tiempo final del experimento, las cuales influirán en los resultados obtenidos (Pastor-Fernández et al., 2021). Es por ello que hace tiempo que se enfatiza en la necesidad de desarrollar un modelo normalizado (Benavides et al., 2014).

Los modelos experimentales bovinos se han usado para comparar la virulencia entre aislados y para tratar de esclarecer los mecanismos patogénicos responsables de la diferente mortalidad fetal observada (Tabla 1.1). Para ello, se han evaluado parámetros como: la tasa de mortalidad fetal, la temperatura rectal, la presencia y gravedad de las lesiones en los fetos y en la placenta, la carga parasitaria y su distribución en diferentes órganos de la madre y del feto, y el estudio de la respuesta inmunitaria humoral y celular producida frente a la infección (tanto sistémica como en la placenta y en el feto). Por ejemplo, el aislado Nc-1 mostró en el ratón una mayor virulencia que el aislado Nc-Spain1H (Rojo-Montejo et al., 2009b). Cuando se compararon en un modelo bovino gestante, las vacas inoculadas con el aislado Nc-Spain1H no presentaron mortalidad fetal tras la infección en una fase temprana de la gestación (70 días de gestación), mientras que las vacas inoculadas con el aislado Nc-1 presentaron mortalidad fetal en 3 de 5 fetos, lesiones más graves y una mayor detección del parásito en los tejidos placentarios y fetales (Rojo-Montejo et al., 2009a). Otro estudio comparó la virulencia de los aislados Nc-1 y Nc-Bahia en vacas y búfalos, también realizando la infección experimental a los 70 días de gestación (Chryssafidis et al., 2014). En él se observó una alta tasa de transmisión vertical en ambos grupos inoculados, pero el aislado Nc-1 mostró una mayor virulencia, con mayor parasitemia y gravedad de las lesiones y mayor número de abortos. Sin embargo, al comparar la virulencia del aislado Nc-1 y del aislado Nc-Spain7 en infecciones en el primer tercio de gestación, se encontró que el grupo infectado con Nc-Spain7 mostró una mayor tasa de mortalidad fetal, lo que indica una mayor virulencia (Caspé et al., 2012). El aislado de alta virulencia Nc-Spain7 también

Tabla 1.1: Clasificación de distintos aislados de *Neospora caninum* según su virulencia, de acuerdo a su comportamiento en modelos gestantes *in vivo* (murino y bovino) y en modelos *in vitro*.

Aislado	Origen	Modelo murino gestante			Modelo bovino gestante			Modelo in vitro			Clasificación por virulencia
		Mortalidad neonatal	Transmisión vertical	Referencias	Mortalidad fetal	Transmisión vertical	Referencias	PIR _{4H}	TY ₅₆	Referencias	
Nc-1	Camino, cerebro de perro con signos neurológicos	Alta	Alta	Rojó-Montejo et al., 2008	Moderada/Alta	Alta	Rojó-Montejo et al., 2009; Chryssafidis et al., 2012	-	Moderada	Schock et al., 2001; Rojo-Montejo et al., 2009	Alta
Nc-Liv	Camino, cerebro de perro con signos neurológicos	Alta	Alta	Regidor-Cerrillo et al., 2010; Dellarrupe et al., 2013; Quinn et al., 2002	Alta	Alta	Williams et al., 2003	Alta	Alta	Regidor-Cerrillo et al., 2011; Dellarrupe et al., 2014	Alta
Nc-Bahia	Camino, cerebro de perro con signos neurológicos	Alta	Alta	Dellarrupe et al., 2013	Baja	Alta	Chryssafidis et al., 2014	Alta	Alta	Dellarrupe et al., 2014	Alta
Nc-Ge2	Camino, heces (ooquistes)	Baja	Baja	Dellarrupe et al., 2013	-	-	-	Baja	Baja	Dellarrupe et al., 2014	Baja
Nc-Ge3	Camino, heces (ooquistes)	Moderada	Baja	Dellarrupe et al., 2013	-	-	-	Moderada	Alta	Dellarrupe et al., 2014	Moderada
Nc-Ge6	Camino, heces (ooquistes)	Baja	Baja	Dellarrupe et al., 2013	-	-	-	Baja	Baja	Dellarrupe et al., 2014	Baja
Nc-6Arg	Camino, heces (ooquistes)	Baja	Moderada	Dellarrupe et al., 2013	Baja	Alta	Baegaluppe et al., 2013	Moderada	Moderada	Dellarrupe et al., 2014	Baja/Moderada
Nc-Nowra	Bovino, cerebro ternero asintomático	Baja	Alta	Miller et al., 2002	-	-	-	-	-	-	Baja/Moderada
Nc-Spain1H	Bovino, cerebro ternero asintomático	Baja	Baja	Rojó-Montejo et al., 2008	Baja	Baja/Moderada	Rojó-Montejo et al., 2009	Baja	Baja	Regidor-Cerrillo et al., 2011	Baja
Nc-Spain2H	Bovino, cerebro ternero asintomático	Moderada	Moderada	Regidor-Cerrillo et al., 2010	-	-	-	Moderada	Baja	Regidor-Cerrillo et al., 2011	Baja/Moderada
Nc-Spain3H	Bovino, cerebro ternero asintomático	Baja	Alta	Regidor-Cerrillo et al., 2010	-	-	-	Baja	Baja	Regidor-Cerrillo et al., 2011	Baja/Moderada
Nc-Spain4H	Bovino, cerebro ternero asintomático	Alta	Alta	Regidor-Cerrillo et al., 2010	-	-	-	Alta	Alta	Regidor-Cerrillo et al., 2011	Alta
Nc-Spain5H	Bovino, cerebro ternero asintomático	Alta	Alta	Regidor-Cerrillo et al., 2010	-	-	-	Moderada	Alta	Regidor-Cerrillo et al., 2011	Alta
Nc-Spain6	Bovino, cerebro ternero asintomático	Moderada	Moderada	Regidor-Cerrillo et al., 2010	-	-	-	Moderada	Alta	Regidor-Cerrillo et al., 2011	Baja/Moderada
Nc-Spain7	Bovino, cerebro ternero asintomático	Alta	Alta	Regidor-Cerrillo et al., 2010; Arranz-Solis et al., 2015	Alta	Alta	Regidor-Cerrillo et al., 2014; Yáñez et al., 2019; Caspe et al., 2012	Moderada	Alta	Regidor-Cerrillo et al., 2011	Alta
Nc-Spain8	Bovino, cerebro ternero asintomático	Baja	Moderada	Regidor-Cerrillo et al., 2010	Alta	Moderada	Regidor-Cerrillo et al., 2014	Moderada	Baja	Regidor-Cerrillo et al., 2011	Baja/Moderada
Nc-Spain9	Bovino, cerebro ternero asintomático	Moderada	Moderada	Regidor-Cerrillo et al., 2010	-	-	-	Moderada	Moderada	Regidor-Cerrillo et al., 2011	Baja/Moderada
Nc-Spain10	Bovino, cerebro ternero asintomático	Moderada	Moderada	Regidor-Cerrillo et al., 2010	-	-	-	Moderada	Moderada	Regidor-Cerrillo et al., 2011	Moderada
Nc-SweB1	Bovino, cerebro feto abortado	Baja	Alta	Quinn et al., 2002	-	-	-	-	Baja	Schock et al., 2001	Moderada

PIR_{4H}- Tasa de invasión del parásito a las 4 horas pi

TY₅₆- Producción total de taquizoitos a las 56 horas pi

produjo mortalidad fetal más temprana, lesiones más graves y mayor carga parasitaria en la placenta y el feto que el aislado de baja-moderada virulencia en ratón Nc-Spain8 (Regidor-Cerrillo et al., 2014). Además, se indujo una mayor expresión de IFN- γ tras la infección con el aislado Nc-Spain7, principalmente en la primera semana de infección, mientras que el aumento de IL-10 en las muestras de animales infectados con Nc-Spain8 podría tener efectos antiinflamatorios (Regidor-Cerrillo et al., 2014). Recientemente, se ha comparado el comportamiento del aislado de alta virulencia Nc-Spain7 con el del aislado de baja virulencia Nc-Spain1H en un modelo bovino gestante (Jiménez-Pelayo et al., 2019b; García-Sánchez et al., 2021; Horcajo et al., 2022). Los animales fueron infectados a mitad de la gestación (110 días de gestación) por vía intravenosa con 10^7 taquizoítos (Vázquez et al., 2019) y fueron sacrificados a los 10 o 20 días pi para el estudio de la dinámica de la infección temprana. Los taquizoítos de Nc-Spain7 alcanzaron antes la placenta y se multiplicaron rápidamente en ella, provocando el desarrollo de lesiones, la transmisión al feto y la mortalidad fetal, mientras que Nc-Spain1H mostró un retraso en la infección de la placenta y no provocó desarrollo de lesiones ni se transmitió al feto (Jiménez-Pelayo et al., 2019b). Posteriormente, el estudio de la respuesta inmunitaria mostró una mayor estimulación de la respuesta proinflamatoria producida por el aislado Nc-Spain7 que por el aislado Nc-Spain1H, lo que podría explicar el daño tisular (Horcajo et al., 2022), como se mencionó en la sección 1.3.1. Patogenia.

2.1.3. Diversidad en modelos *in vitro*

Los modelos *in vitro* ofrecen una alternativa al uso de animales en investigación, permitiendo utilizar un mayor número de muestras y obtener resultados reproducibles y comparables entre laboratorios mediante técnicas estandarizadas de cultivo celular. A pesar de ser modelos menos potentes y completos, aportan una aproximación inicial y son de gran utilidad como herramientas de cribado, ya que ciertas características fenotípicas *in vitro* (mayor invasión o mayor proliferación) muestran una correlación positiva con la virulencia en el ratón (Regidor-Cerrillo et al., 2011). Asimismo, su empleo ha facilitado el estudio de la morfología del parásito, la ultraestructura de las organelas y los procesos implicados en el ciclo lítico, así como la relación parásito-hospedador, la motilidad de los taquizoítos y la capacidad de trans migración, y los mecanismos de modulación y evasión de la respuesta inmunitaria del hospedador (Innes et al., 1995; Hemphill et al., 2006, 2013; Collantes-Fernández et al., 2012; Müller & Hemphill, 2013).

Al tratarse de un parásito intracelular obligatorio, la invasión de la célula hospedadora va a ser crucial para el desarrollo de *N. caninum*. Diversos estudios han demostrado que los taquizoítos de *N. caninum* son capaces de invadir y multiplicarse en una amplia gama de células, tanto células primarias como líneas celulares establecidas, entre las que encontramos macrófagos, monocitos y células endoteliales bovinas (Lindsay & Dubey, 1989; García-Sánchez et al., 2019b), células bovinas de la carúncula y trofoblasto (BCEC-1 y F3; Jiménez-Pelayo et al., 2017), fibroblastos humanos (HFF; Debache & Hemphill, 2012), células de

adenocarcinoma cervical humano (HeLa; Carvalho et al., 2010) y células epiteliales de riñón de mono verde africano (MARC-145, VERO) (Hemphill et al., 2004; Risco-Castillo et al., 2004; Regidor-Cerrillo et al., 2011). El mantenimiento de los parásitos en cultivo celular se puede realizar por un número indeterminado de pases, sin embargo, las características originales del comportamiento *in vitro* del parásito y de su virulencia en ratones parecen modificarse con el mantenimiento *in vitro* durante un número prolongado de pases (Long et al., 1998; Perez-Zaballos, 2004; Pérez-Zaballos et al., 2005; Bartley et al., 2006).

El conocimiento del ciclo lítico del parásito es de gran importancia para tratar de comprender la biología del parásito y los procesos implicados en su diseminación y transmisión, así como para identificar efectores clave en las diferentes fases del ciclo de *N. caninum* (Hemphill et al., 2006) y en las diferencias entre aislados.

2.1.3.1. Ciclo lítico

El ciclo lítico es el proceso mediante el cual el taquizoíto se replica en el interior de la célula. Se trata de un proceso estrechamente regulado por distintas proteínas del parásito y que incluye varias fases, las cuales son necesarias para la supervivencia y propagación del parásito durante la fase aguda de la enfermedad (Black & Boothroyd, 2000; Hemphill et al., 2013; Pastor-Fernández et al., 2016). El conocimiento del ciclo lítico se ha extrapolado, en su mayoría, desde *T. gondii* y consta de las siguientes fases (Figura 1.10):

- Deslizamiento y adhesión a la célula hospedadora: Se produce el acercamiento del parásito hacia la célula hospedadora mediante movimientos de flexión-extensión del taquizoíto, denominado “*gliding motility*”, y mediados por el glideosoma y el citoesqueleto del parásito (Dobrowolski & Sibley, 1996; Jewett & Sibley, 2003). Una vez el parásito alcanza la célula se produce la adhesión, en la que están implicadas proteínas de la superficie del parásito (SRS/SAG) mediante interacciones con receptores de la célula hospedadora (Howe et al., 1997; Carruthers, 2002). La secreción de proteínas MIC también parece estar involucrada en este proceso ya que presentan múltiples dominios adhesivos, cuya función es la interacción proteína-proteína o proteína-célula hospedadora (Soldati et al., 2001; Naguleswaran et al., 2002; Wang et al., 2021b). Además, estas proteínas van a ser importantes en el establecimiento de una unión más fuerte una vez el parásito se ha adherido y reorientado perpendicularmente a la membrana del parásito, necesaria para comenzar la invasión.
- Invasión: La internalización del taquizoíto en la célula hospedadora se realiza a través de la formación de una estructura denominada unión móvil (“*moving junction*”) entre la célula hospedadora y la membrana plasmática parasitaria, la cual va a permitir la internalización progresiva del parásito en el citoplasma de la célula hospedadora, por medio del estrangulamiento de la membrana del parásito apoyado por el glideosoma (Boucher & Bosch, 2015). En la formación de la unión móvil parecen estar implicadas proteínas del cuello de las roptrias, RON, junto con la proteína de los micronemas

AMA1 (Besteiro et al., 2009; Straub et al., 2009). Posteriormente, durante el proceso de la invasión activa del parásito se va a producir la secreción secuencial de proteínas MIC, ROP y GRA, que van a intervenir en este proceso.

- Formación de la VP y multiplicación: A medida que el taquizoíto va penetrando en el interior de la célula se produce la invaginación de la membrana plasmática de la célula hospedadora, quedando englobado en la VP (Carruthers & Boothroyd, 2007). Al mismo tiempo se van a secretar proteínas ROP y GRA (Mercier et al., 2005; Boothroyd & Dubremetz, 2008), las cuales participan en la formación y maduración de la VP, asegurando un ambiente favorable para la supervivencia del parásito. Muchas de ellas se van a asociar a la membrana de la VP para evitar su reconocimiento y fusión con organelas de la célula hospedadora, como los lisosomas, e impedir que sea destruida (Mordue et al., 1999; Beyer et al., 2002). Estas proteínas también van a participar en el establecimiento de la red tubulovesicular, permitiendo la comunicación del parásito con la célula hospedadora, la obtención de nutrientes y energía, o la modulación de determinadas funciones de la célula hospedadora (Hemphill et al., 2013). En el interior de la VP se produce la replicación asexual de los taquizoítos por endodiogenia. La célula hospedadora también sufrirá modificaciones estructurales tras la invasión, con una redistribución del citosqueleto y una reorganización de distintos orgánulos, facilitando la transferencia de nutrientes al parásito (Melo et al., 2001; Coppens et al., 2006).
- Egresión: Una vez la VP ha alcanzado un tamaño crítico para su supervivencia se produce la egresión y lisis celular con la consecuente liberación de los taquizoítos al medio extracelular, los cuales invadirán células adyacentes y comenzarán un nuevo ciclo. Los taquizoítos de *N. caninum*, a diferencia de otros parásitos apicomplejos como *T. gondii*, deben invadir nuevas células en pocas horas para no perder infectividad (Hemphill et al., 1996; Regidor-Cerrillo et al., 2011). Por tanto, la egresión es un proceso estrechamente regulado y coordinado con la invasión, aunque los mecanismos implicados en el mismo no se conocen por completo. En *T. gondii*, se han identificado algunas señales que estimulan la egresión, como el aumento de calcio intracelular (Arrizabalaga & Boothroyd, 2004), el cual determina la activación de quinasas (como proteínas de la familia CDPK) y metiltransferasas, que van a ser esenciales para este proceso (Heaslip et al., 2011; Garrison et al., 2012; Lourido et al., 2012). Además, este proceso se relaciona con la alteración y permeabilización de la membrana de la célula hospedadora, en la que está implicada la proteína PL1 (*Perforin-like 1*) (Lavine & Arrizabalaga, 2008; Kafsack et al., 2009; Roiko & Carruthers, 2013). Por otra parte, la motilidad y secreción de ciertas proteínas MIC podrían favorecer la egresión (Frénal et al., 2017; Bisio & Soldati-Favre, 2019; Dubois & Soldati-Favre, 2019). Recientemente se ha sugerido la implicación de la proteína MIC6 en este proceso en *N. caninum*, la cual podría actuar en sinergia con otras proteínas MIC, como MIC1 o MIC4 (Wang et al., 2021b).

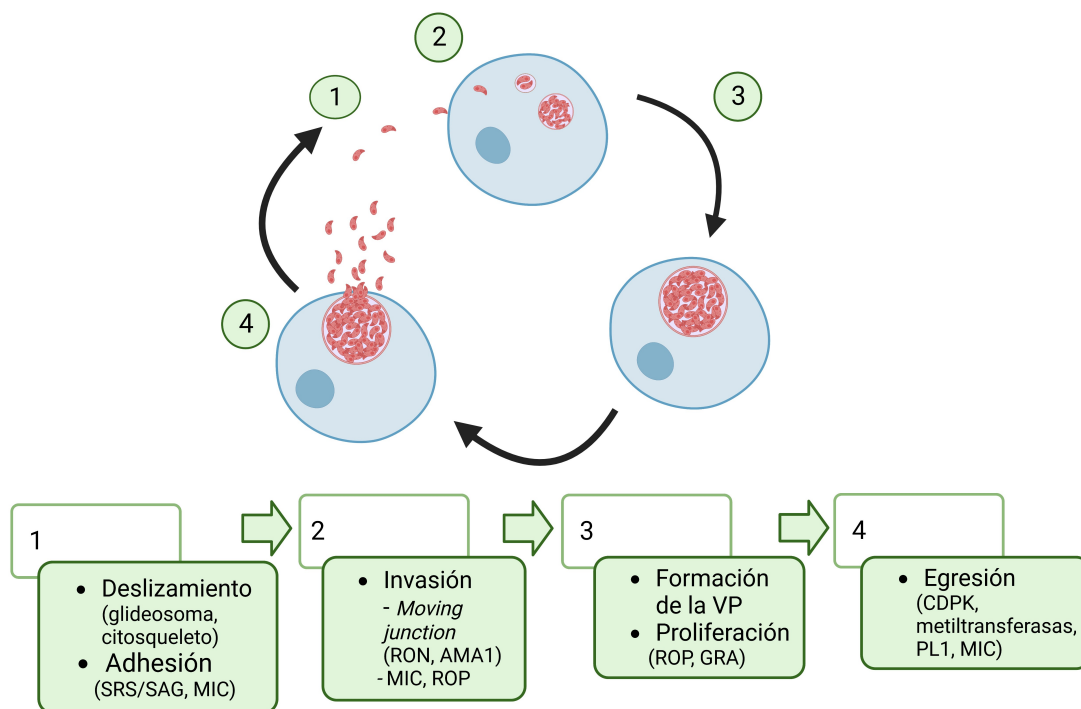


Figura 1.10: Representación gráfica del ciclo lítico de *Neospora caninum*.

2.1.3.2. Variabilidad intraespecífica

Los estudios comparativos *in vitro* han permitido evaluar y analizar las diferencias entre aislados en las distintas fases del ciclo lítico, mostrando notables diferencias en la invasión y proliferación (Tabla 1.1). Un estudio realizado en células MARC-145 mostró que el aislado de baja virulencia en ratón Nc-Spain1H tuvo una menor capacidad de multiplicación en comparación con el aislado Nc-1, confirmando como aislado de baja virulencia (Rojo-Montejo et al., 2009b). Posteriormente, otros estudios también realizados en células MARC-145 usaron el aislado clasificado como de alta virulencia Nc-Liv como aislado de referencia para comparar el comportamiento *in vitro* de diez aislados bovinos de origen español obtenidos de animales asintomáticos (Regidor-Cerrillo et al., 2011) y de cinco aislados caninos obtenidos de ooquistes o del encéfalo de perros con signos neurológicos (Dellarupe et al., 2014b). Estos estudios mostraron una correlación entre ciertos rasgos fenotípicos *in vitro* y la virulencia en ratones gestantes, siendo los aislados más virulentos en el modelo murino los que presentaron una mayor capacidad de invasión y proliferación (Nc-Liv, Nc-Bahia, Nc-Spain4H, Nc-Spain5 H y Nc-Spain7), mientras que los menos virulentos tuvieron una menor capacidad de crecimiento *in vitro* (Nc-Ger2, Nc-Ger6, Nc-Spain1H, Nc-Spain2H y Nc-Spain3H).

Es interesante señalar que también se han observado diferencias en la capacidad y mecanismos de diseminación y migración entre aislados de *N. caninum* en células dendríticas (Collantes-Fernández et al., 2012), al igual que sucede en otros parásitos apicomplejos como

T. gondii (Barragan & Sibley, 2002; Taylor et al., 2006; Lambert et al., 2009, 2011). Los taquizoítos de *N. caninum* fueron capaces de usar dos vías para atravesar las barreras biológicas, con distintas preferencias según el aislado: migración mediada por células dendríticas o migración directa por la motilidad del aislado. Asimismo, la infección de ratones con dichas células dendríticas infectadas con taquizoítos resultó en una mayor transmisión congénita en los ratones que la inoculación de taquizoítos libres (Collantes-Fernández et al., 2012).

Son pocos los estudios realizados en células bovinas. Sin embargo, recientemente se ha estudiado la interacción de dos aislados de distinta virulencia (el aislado de alta virulencia Nc-Spain7 y el de baja virulencia Nc-Spain1H) con **células bovinas diana** de la infección por *N. caninum*: células de la interfaz materno-fetal y macrófagos.

El aislamiento y caracterización de **células bovinas de la placenta** a partir de vacas en el segundo tercio de gestación ha permitido obtener líneas celulares que mantienen las características morfológicas del epitelio fetal del trofoblasto (línea celular F3; Hambruch et al., 2010) y de la carúncula (línea celular BCEC-1; Bridger et al., 2007). Estas células son de gran utilidad para estudiar las interacciones de distintos aislados de *N. caninum* con la placenta bovina, la cual está directamente implicada en la transmisión congénita. Los estudios comparativos entre aislados mostraron que el aislado de alta virulencia Nc-Spain7 presenta una mayor invasión, tasa de infección y producción de taquizoítos que el aislado de baja virulencia Nc-Spain1H en células F3, similar a lo descrito en otras líneas celulares. Curiosamente, la línea BCEC-1 fue más resistente a la infección que la línea celular F3 y las diferencias entre aislados fueron más sutiles, lo que sugiere que las células de la carúncula servirían de barrera para controlar la infección, mientras que el trofoblasto fetal actuaría como célula diana para la multiplicación de los taquizoítos (Jiménez-Pelayo et al., 2017). Por otra parte, se observaron cambios significativos en los niveles de expresión de determinadas citoquinas, quimioquinas y receptores en las células F3 (IL-6, IL-12p40, TLR2, ICAM) y BCEC-1 (TGF- β 1 e IL-8) infectadas, independientemente del aislado, sugiriendo que la infección por *N. caninum* favorece una respuesta proinflamatoria en la placenta (Jiménez-Pelayo et al., 2017, 2019a).

Los **macrófagos bovinos** son uno de los principales mediadores de la respuesta inmunitaria innata frente a infecciones intracelulares como *N. caninum*. Actualmente, la mayoría de los estudios sobre la interacción del parásito con este tipo celular se han realizado utilizando macrófagos murinos (Jin et al., 2017; Li et al., 2018; Wang et al., 2018) o humanos (Boucher et al., 2018). Sin embargo, las diferencias existentes entre la respuesta inmunitaria del ratón con la respuesta inmunitaria bovina hacen que los resultados obtenidos, a menudo, no sean extrapolables a la especie bovina. Recientemente, el grupo SALUVET ha caracterizado por primera vez la infección de dos aislados de *N. caninum* de distinta virulencia (Nc-Spain7 y Nc-Spain1H) en macrófagos bovinos primarios (boM \emptyset). Ambos aislados fueron capaces de sobrevivir y multiplicarse en estas células, aunque el aislado de alta virulencia Nc-Spain7 mostró un mayor crecimiento intracelular, indujo una mayor hipermotilidad de los macrófagos infectados y una mayor habilidad para evadir la respuesta inmunitaria. Por su parte,

la infección con el aislado de baja virulencia Nc-Spain1H indujo una mayor estimulación de la respuesta proinflamatoria, con una mayor expresión de la citoquina IL-12, mayor liberación de IFN- γ por parte de los linfocitos (cuando se co-cultivaron con los macrófagos) y mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que pudo contribuir al menor crecimiento de este aislado (García-Sánchez et al., 2020).

2.2. Bases moleculares de la diversidad intraespecífica

Las bases moleculares responsables de la variabilidad en la virulencia descrita en los apartados anteriores son, a día de hoy, una incógnita. En los últimos años, los esfuerzos de muchos grupos de investigación se han centrado en la identificación de factores determinantes en la virulencia de los aislados, ya que su conocimiento sería muy valioso para comprender los mecanismos patogénicos que subyacen a la infección, así como para diseñar estrategias para combatir esta enfermedad. En este contexto, el desarrollo de las disciplinas ómicas ha sido clave para el progreso en el conocimiento de la genética y biología de los parásitos apicomplejos (Suarez et al., 2017). El empleo de estas herramientas para realizar estudios comparativos entre aislados de distinta virulencia resulta de gran utilidad para comprender la variabilidad intraespecífica de *N. caninum*, ya que nos permite identificar factores que podrían tener un papel importante en el comportamiento biológico de los distintos aislados del parásito.

2.2.1. Estudios genómicos y poblacionales en *Neospora caninum*

Del mismo modo que sucede en *T. gondii*, el amplio espectro de hospedadores y su amplia distribución en distintas regiones geográficas junto con su capacidad para reproducirse sexualmente, sugieren que *N. caninum* podría presentar una alta diversidad genética (Grigg et al., 2001). Los primeros estudios genómicos utilizaron enfoques dirigidos al estudio de marcadores moleculares comunes como el espaciador transcrito interno 1 (ITS1), el ADN ribosómico 18S o la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD-PCR), con objeto de determinar la diversidad genética intraespecífica. El uso de los dos primeros marcadores mostró poca o ninguna variación de nucleótidos entre aislados (Marsh et al., 1995; Holmdahl et al., 1997; Gondim et al., 2004a), mientras que el tercero fue capaz de encontrar ligeras diferencias, aunque los perfiles de productos de RAPD-PCR entre los distintos aislados de *N. caninum* fueron bastante similares (Atkinson et al., 1999; Davison et al., 1999; Schock et al., 2001).

Posteriormente, el análisis de secuencias de mini y microsátélites demostró ser una técnica con mayor poder discriminatorio para el estudio de la diversidad genética en *N. caninum* (Regidor-Cerrillo et al., 2006, 2008; Pedraza-Díaz et al., 2009; Basso et al., 2009, 2010). El análisis de microsátélites de mayor escala en *N. caninum* fue realizado por Regidor-Cerrillo et al. (2013). En él se genotiparon un total de 108 muestras obtenidas de distintos aislados

de referencia y de muestras clínicas ovinas y bovinas procedentes de cuatro países de dos continentes distintos. Los resultados sugirieron la existencia de una segregación parcial por origen geográfico, aunque no consiguieron establecer ninguna asociación con la virulencia (Regidor-Cerrillo et al., 2013). Sin embargo, estas secuencias generalmente se encuentran en zonas no codificantes del genoma.

La comparación del genoma completo del aislado Nc-Liv con el genoma de *T. gondii* ha mostrado un alto grado de homología y sintenia entre ambos, proponiéndose a *T. gondii* como un buen modelo para el estudio de *N. caninum* (Reid et al., 2012). En *T. gondii* se ha demostrado un elevado polimorfismo de genes (Grigg et al., 2001; Grigg & Suzuki, 2003), cuyas combinaciones, en algunos casos, gobiernan las diferencias en la biología y la virulencia entre los tipos clonales de *T. gondii* (Jensen et al., 2015) y entre los aislados dentro del mismo linaje (Yang et al., 2013). Por otra parte, se ha comprobado que las diferencias fenotípicas entre aislados de *T. gondii* también pueden estar impulsadas por la variación en el número de copias de genes (Adomako-Ankomah et al., 2014; Lorenzi et al., 2016). Algunos genes polimórficos reconocidos en *T. gondii* son TgROP16, TgGRA15 o TgROP18, descritos todos ellos como factores de virulencia (Saeij et al., 2006; Rosowski et al., 2011; Du et al., 2014). Sin embargo, el estudio de los genes de *N. caninum* ortólogos a los factores de virulencia polimórficos de *T. gondii* en aislados procedentes de distintos hospedadores y áreas geográficas ha demostrado una secuencia conservada y un limitado polimorfismo en *N. caninum* (Beck et al., 2009). Además, se han observado otras discrepancias entre los genomas de ambos parásitos, como la ausencia de GRA24 en *N. caninum* o los ortólogos de TgROP18 y TgROP5 que son pseudogenes en *N. caninum*, lo que podría ayudar a explicar las diferencias en el espectro de hospedadores entre ambos parásitos y la disminución de la virulencia de *N. caninum* en ratones (Reid et al., 2012). En este sentido, se ha visto que la expresión del alelo TgROP18 del tipo clonal I en *N. caninum* aumentó la virulencia en ratones (Lei et al., 2014). Además, en *N. caninum* se ha demostrado una alta tasa de mutación en algunas familias de genes, como los genes relacionados con los antígenos de superficie (SRS), pudiendo estar implicados en mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria (Reid et al., 2012).

La comparación del genoma de dos aislados de *N. caninum* con distinta virulencia ha permitido identificar polimorfismos de nucleótido único (SNPs) e inserciones y deleciones (indels), tanto en regiones codificantes como no codificantes, pero no se ha demostrado el polimorfismo de genes responsables de su virulencia (Calarco et al., 2018; Calarco & Ellis, 2020a,b). Recientemente, un estudio en el que, a diferencia de estudios anteriores, se incluyó un amplio panel de 50 aislados provenientes de todo el mundo y de distintos hospedadores y se utilizaron herramientas genéticas de población apropiadas y de alta resolución, indicó una alta similitud entre los genomas de los distintos aislados analizados, apoyando la hipótesis de que el origen de la población de *N. caninum* es debido a una expansión global de un único linaje, favorecido por la transmisión vertical del parásito mediante reproducción asexual (Khan et al., 2019a). Teniendo en cuenta la escasa variabilidad que parece presentar el

genoma de los diferentes aislados de *N. caninum*, es razonable pensar que las variaciones transcripcionales o post-transcripcionales, así como la epigenética, puedan tener un papel importante en la variabilidad fenotípica observada entre los aislados.

2.2.2. Estudios transcriptómicos

Los análisis transcriptómicos permiten estudiar el conjunto del ARN transcrito en una célula en unas condiciones determinadas. Así, debido a los distintos procesos que componen el ciclo lítico del parásito, la diferenciación de estadios parasitarios (taquizoíto, bradizoíto) o la interacción del parásito con las células hospedadoras, se espera observar cambios en el transcriptoma del parásito o de la célula hospedadora a lo largo de los distintos escenarios. Los primeros datos transcriptómicos se obtuvieron mediante técnicas de microarrays, colecciones de marcadores de secuencias expresadas (EST), análisis en serie de la expresión génica (SAGE) o secuenciación masiva en paralelo (MPS), que suponían elevados costes y resultados menos precisos. La aparición de las técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS), como el *RNA-Sequencing* (RNA-Seq), ha permitido la producción de datos a gran escala, reduciendo costes y obteniendo una imagen global del transcriptoma (Wastling et al., 2009).

Hasta la fecha, se han realizado pocos estudios transcriptómicos en *N. caninum*. En los últimos años, el grupo SALUVET ha llevado a cabo varios análisis comparando el transcriptoma de taquizoítos de dos aislados de distinta virulencia (el aislado de alta virulencia Nc-Spain7 y el aislado de baja virulencia Nc-Spain1H), usando tanto taquizoítos purificados como en su interacción con la célula hospedadora, para tratar de identificar factores implicados en su virulencia (Tabla 1.2). En los resultados obtenidos se observaron diferencias en el perfil de expresión de genes entre ambos aislados, mostrando mayores niveles de expresión de genes relacionados con el estadio de bradizoíto (*NcBAG1*, *NcSAG4*, *NcBSR4*) el aislado de baja virulencia Nc-Spain1H (Horcajo et al., 2018). Además, este aislado también mostró mayor expresión de genes relacionados con antígenos de superficie y genes implicados en mecanismos de adhesión e invasión de la célula hospedadora (genes de la familia *SAG* y *MIC*). Sin embargo, el aislado de alta virulencia Nc-Spain7 mostró mayores niveles de expresión de genes relacionados con la motilidad, como genes del glideosoma, y de genes relacionados con procesos metabólicos (Horcajo et al., 2017, 2018; García-Sánchez et al., 2019a). También se observaron diferencias de expresión entre aislados de genes pertenecientes a las familias *ROP* y *GRA* o genes relacionados con el ciclo celular y respuesta al estrés. Estos estudios han permitido identificar un conjunto de genes que podrían estar implicados en las diferencias observadas en el comportamiento entre aislados (Tabla 1.2). Además, se encontraron diferencias en el transcriptoma del parásito según la célula hospedadora, lo que sugiere la necesidad de ciertos factores para adaptarse a determinadas circunstancias y la importancia de caracterizar los factores de virulencia en células diana hospedadoras. Es interesante señalar que tampoco hubo una coincidencia entre los resultados del transcriptoma y del proteoma del taquizoíto en las mismas condiciones (Horcajo et al., 2018), lo

que podría deberse a múltiples factores como variaciones de la técnica, la asincronía entre el transcriptoma y el proteoma, o a regulaciones post-transcripcionales en estos parásitos. Tanto en *N. caninum* como en *T. gondii* se han observado regiones UTR particularmente largas, así como regiones de ARN intergénicas largas no codificantes, las cuales podrían tener funciones clave en la regulación transcripcional (Ramaprasad et al., 2015).

La respuesta de la célula tras la interacción con el parásito podría verse afectada debido a la manipulación de distintas rutas de transcripción por efectores del parásito, igual que sucede en *T. gondii* (Saeij et al., 2006; Rosowski et al., 2011; Jensen et al., 2013; Bougdour et al., 2014). En diversos estudios se ha abordado la investigación del transcriptoma de distintas células hospedadoras (células bovinas del trofoblasto F3 y boMØ) y de tejidos diana del hospedador (muestras de la carúncula y del cotiledón de la placenta bovina) infectados con aislados de *N. caninum* de distinta virulencia (Nc-Spain7 y Nc-Spain1H) (Tabla 1.2). La respuesta de las células F3 a la infección con los distintos aislados fue muy similar, observando una marcada influencia sobre la biosíntesis del colesterol y la organización de la matriz extracelular (Horcajo et al., 2017). En los macrófagos bovinos infectados con *N. caninum* se observó una inhibición de los genes relacionados con la apoptosis y la degradación por lisosomas, lo que favoreció la supervivencia del parásito y una activación de la vía pro-inflamatoria NF- κ B, con una mayor modulación de la respuesta inmunitaria por parte del aislado de baja virulencia Nc-Spain1H (García-Sánchez et al., 2020). Como se ha indicado anteriormente (secciones 1.3.1 y 2.1.2), un estudio realizado con muestras de placentomas bovinos (carúncula y cotiledón) mostró diferencias en la interacción con la placenta entre aislados de distinta virulencia (Nc-Spain7 y Nc-Spain1H), siendo más notables en la carúncula, donde el aislado de alta virulencia desencadenó una respuesta proinflamatoria mediante la señalización IL-6/JAK/STAT3 y la señalización TNF- α a través de la vía NF- κ B. Por su parte, el aislado de baja virulencia indujo el aumento de la expresión de genes E2F, relacionados con la contención de la respuesta inflamatoria. Las modificaciones transcripcionales inducidas por ambos aislados en el cotiledón fueron similares, desencadenando una respuesta proinflamatoria que fue más intensa y temprana en los animales infectados con el aislado de alta virulencia (Horcajo et al., 2022).

2.2.3. Estudios proteómicos

Los análisis proteómicos consisten en el estudio de la expresión de proteínas en un momento determinado y bajo una circunstancia concreta. Su aplicación al estudio de los parásitos apicomplejos es de gran utilidad para ayudar a comprender los distintos procesos biológicos y los mecanismos de interacción del parásito con la célula hospedadora. Como ya hemos comentado, las discrepancias observadas entre los resultados transcriptómicos y proteómicos ponen de manifiesto la importancia de utilizar distintas técnicas para obtener una visión más amplia de la biología del parásito (Horcajo et al., 2018; Xia et al., 2008; Wastling et al., 2009). Además, la integración de los datos genómicos y proteómicos permite la identificación de proteínas y ayuda a la correcta anotación de genes (Ashton et al., 2001;

Tabla 1.2: Estudios comparativos transcripómicos y proteómicos realizados por el grupo SALUYET utilizando aislados de *Neospora caninum* de distinta virulencia y técnicas de alta resolución.

Referencia	Aislados utilizados	Muestras	Metodología empleada	Finalidad	Principales resultados
Horcajo et al., 2017	Nc-Spain7 Nc-Spain1H	Cultivos de células F3 infectadas con taquizoítos. Recogidos a 8 h pi.	RNA-Seq (Illumina)	Estudiar la modulación del transcriptoma de las células del trofoblasto bovino por <i>N. caninum</i> y discernir si los aislados de distinta virulencia difieren en su capacidad de regulación.	Los datos transcripómicos de las células F3 sugirieron una regulación muy similar por ambos aislados, influyendo en la reorganización de la matriz extracelular y la biosíntesis del colesterol. Nc-Spain1H: Mayor expresión genes adhesión/invasión (SAG, MIC). Nc-Spain7: Mayor expresión de genes relacionados con el glideosoma. Diferencias en la expresión de genes de las roptrias, de procesos metabólicos, ciclo celular y respuesta al estrés.
García-Sánchez et al., 2019	Nc-Spain7 Nc-Spain1H	Cultivos de boMØ infectados con taquizoítos. Recogidos a 8 h pi.	RNA-Seq (Illumina)	Identificar posibles efectores de <i>N. caninum</i> implicados en la capacidad diferencial de aislados de distinta virulencia para modular procesos relacionados con la respuesta inmunitaria.	Nc-Spain1H: Mayor expresión de genes implicados en el reconocimiento del patógeno, la quimiotaxis y la liberación de citoquinas proinflamatorias y reguladoras. También una mayor expresión de genes relacionados con antígenos de superficie y con el estado de bradizoito. Nc-Spain7: Mayor expresión de genes implicados en el crecimiento y la supervivencia del parásito en los MØ activados.
García-Sánchez et al., 2020	Nc-Spain7 Nc-Spain1H	Cultivos de boMØ infectados con taquizoítos. Recogidos a 8 h pi.	RNA-Seq (Illumina)	Estudiar el perfil transcripómico de los boMØ infectados con aislados de <i>N. caninum</i> de distinta virulencia y los efectos de la manipulación del parásito en el entorno de la célula hospedadora.	La ruta NF- κ B parece ser la principal vía de señalización implicada en la respuesta proinflamatoria de los boMØs frente a <i>N. caninum</i> . Por otra parte, la apoptosis y la maduración del fagolisosoma son procesos reprimidos por la infección por este patógeno para garantizar su supervivencia intracelular. Nc-Spain7: capaz de eludir parcialmente la respuesta proinflamatoria. Nc-Spain1H: induce una respuesta protectora frente a la infección.
Horcajo et al., 2018	Nc-Spain7 Nc-Spain1H	Taquizoítos purificados. Recogidos a 12, 36 y 56 h pi.	RNA-Seq (Illumina) LC-MS/MS	Estudiar los cambios entre aislados de <i>N. caninum</i> de distinta virulencia a lo largo del ciclo lítico del taquizoito mediante las diferencias proteómicas. Investigar las diferencias transcripómicas a las 56 h pi.	Se observaron diferencias en el proteoma de ambos aislados a lo largo del ciclo lítico. Los transcriptomas también mostraron marcadas variaciones, pero fueron inconsistentes con los resultados del proteoma. Nc-Spain1H: Mayor expresión de genes del estadio prebradizo y proteínas del micronema. Abundancias diferenciales entre aislados en: proteínas de las roptrias y de los gránulos densos, proteínas relacionadas con el metabolismo y con la respuesta al estrés.
Regidor-Cerrillo et al., 2020	Nc-Spain7 Nc-Spain1H	Cultivos de células F3 infectadas con taquizoítos. Recogidos a 12, 36 y 56 h pi.	LC-MS/MS	Estudiar la interacción de dos aislados de <i>N. caninum</i> de distinta virulencia con las células del trofoblasto bovino a lo largo del ciclo lítico y tratar de identificar posibles factores de virulencia.	No se observó una respuesta inmunitaria específica contra la infección. Los procesos principalmente regulados a lo largo del ciclo lítico fueron los procesos mitocondriales y metabólicos. La infección con Nc-Spain1H mostró una mayor influencia en el proteoma de la célula que la infección con Nc-Spain7.

Krishna et al., 2015).

El uso de geles de electroforesis bidimensional (2-DE) permitió definir por primera vez el mapa proteico y de antígenos inmunodominantes de taquizoítos de *N. caninum* (Lee et al., 2003, 2004), sin embargo, esta técnica no permite cuantificar la abundancia de las proteínas. El mismo enfoque se utilizó para comparar el proteoma de taquizoítos de distintos aislados entre sí (Nc-KBA2 y Nc-JAP1) y con el de *T. gondii*, encontrándose una escasa variabilidad entre aislados, con un limitado número de proteínas específicas para cada aislado y un alto número de diferencias al comparar con el proteoma de *T. gondii* (Lee et al., 2005). El perfil antigénico también se estudió, mostrando una homología significativa entre los aislados de *N. caninum*, la cual también se observó al comparar otros aislados de distinta procedencia geográfica (Schock et al., 2001; Lee et al., 2005; Shin et al., 2005).

El empleo de técnicas proteómicas cuantitativas permite distinguir, además de las diferencias de composición de proteínas, diferencias en la abundancia de las mismas, aportando mayor información. Así, se han establecido diferencias entre el proteoma de taquizoítos y bradizoítos de *N. caninum* y se ha encontrado un perfil proteico del bradizoíto relacionado con rutas glicolíticas anaeróbicas y mayor expresión de proteínas de respuesta al estrés (Marugán-Hernández et al., 2010). Utilizando la metodología 2D-DIGE, el grupo SALUVET realizó un estudio comparativo del proteoma de taquizoítos de aislados de distinta virulencia, dos de alta virulencia (Nc-Liv y Nc-Spain7) y uno de baja virulencia (Nc-Spain1H), identificando una amplia variación en la abundancia de proteínas entre aislados. Los aislados de alta virulencia mostraron una mayor abundancia y número de proteínas implicadas en procesos de respuesta al estrés oxidativo (como la proteína G6PDH) y en procesos relacionados con la invasión y formación de la vacuola parasitófora durante el ciclo lítico (como las proteínas ROP40, MIC1, ROP9, ACT1), permitiendo identificar un conjunto de proteínas con posible implicación en la virulencia (Regidor-Cerrillo et al., 2012).

En los últimos años, se han realizado nuevos estudios comparativos del proteoma de aislados de *N. caninum* de distinta virulencia (Nc-Spain7 y Nc-Spain1H) a lo largo del ciclo lítico y en su interacción con células del trofoblasto bovino mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) (Horcajo et al., 2018; Regidor-Cerrillo et al., 2020) (Tabla 1.2). Estas técnicas permiten una mayor resolución que los métodos clásicos, siendo herramientas excepcionales para el estudio global del proteoma de los parásitos. Las mayores diferencias entre aislados se observaron durante la invasión y la egresión, siendo similares los niveles de abundancia de proteínas durante la replicación (Horcajo et al., 2018; Regidor-Cerrillo et al., 2020). La comparación del proteoma de taquizoítos purificados mostró diferencias en la abundancia de proteínas ROP, GRA, SRS y proteínas relacionadas con el metabolismo y el estrés oxidativo. Además, el aislado Nc-Spain1H mostró un estatus de pre-bradizoíto y una mayor abundancia de proteínas MIC (Horcajo et al., 2018). Estos resultados fueron similares a los observados previamente mediante 2D-DIGE (Regidor-Cerrillo et al., 2012), lo que sugiere que determinadas proteínas relacionadas con el ciclo lítico, el metabolismo o la respuesta al estrés podrían estar implicadas en la variabilidad

biológica en *N. caninum*. La caracterización proteómica de la interacción de los taquizoítos con las células del trofoblasto F3 permitió estudiar el proteoma del parásito y del hospedador simultáneamente (Regidor-Cerrillo et al., 2020). En este estudio se detectó un menor número de proteínas diferencialmente abundantes entre aislados, probablemente debido al uso de parásitos no purificados, destacando algunas proteínas ROP, como un miembro de la familia ROP20 ya detectado previamente por LC-MS/MS en el aislado de alta virulencia Nc-Spain7. El resto de las proteínas diferencialmente abundantes fueron principalmente ribosomales y relacionadas con el metabolismo. El proteoma de la célula hospedadora no mostró la inducción de una respuesta inmunitaria específica para cada aislado, aunque se observó una mayor modificación en el proteoma de las células infectadas con el aislado de baja virulencia Nc-Spain1H, lo que sugiere una mayor respuesta del hospedador frente al aislado de baja virulencia o una mayor modulación por parte de este aislado. Los principales procesos afectados fueron los procesos mitocondriales y metabólicos (Regidor-Cerrillo et al., 2020). En un estudio previo de comparación del inmunoma de los aislados Nc-Spain7, Nc-Spain1H y Nc-Liv se sugirió la existencia de diferentes respuestas inmunitarias frente a los distintos aislados (Regidor-Cerrillo et al., 2015), aunque en el estudio en las células F3 no pudo ser comprobado.

2.3. Factores de virulencia en *Neospora caninum*

Un factor de virulencia es una molécula producida por el parásito que influye en la gravedad de la enfermedad, pero no es esencial para la transmisión del parásito o su supervivencia (Dubremetz & Lebrun, 2012). Como ya hemos comentado, las proteínas ROP, GRA o MIC están estrechamente relacionadas con los distintos procesos del ciclo lítico y tienen un papel importante en la interacción y modulación de distintas vías implicadas en la respuesta inmunitaria del hospedador (Dubremetz & Lebrun, 2012; Gubbels & Duraisingh, 2012; Kemp et al., 2013; Dubois & Soldati-Favre, 2019). Todo esto las convierte en posibles factores de virulencia. Sin embargo, la mayoría del conocimiento que se tiene sobre estas proteínas es procedente de *T. gondii*, mientras que en *N. caninum* se ha realizado un limitado número de estudios.

Las **herramientas de edición génica** permiten la modificación del genoma, facilitando el estudio de la función de determinados genes mediante su delección. Los primeros métodos de edición se basaron en sistemas de transfección clásica y consistían en la inserción de ARN/ADN exógeno en la célula eucariótica, en el genoma o extra cromosomal, según si se trataba de transfección estable o transitoria respectivamente, mediante lisosomas o pulsos eléctricos controlados (Howe et al., 1997; Howe & Sibley, 1997; Soete et al., 1999; Suarez et al., 2017). Sin embargo, la eficiencia de estas técnicas era muy variable y el fragmento de ADN exógeno podía ser insertado aleatoriamente en distintas partes del genoma. Estas técnicas sentaron las bases de los nuevos métodos de edición genética mediante nucleasas programables. Según la endonucleasa empleada podemos distinguir entre distintos sistemas: (i) meganucleasas, enzimas de restricción con secuencias largas de reconocimiento

de ADN (Khan, 2019); (ii) nucleasas con dedos de zinc (ZNF) (Khan, 2019); (iii) nucleasa de actividad similar a activador de transcripción (TALEN, *Transcription activator-like effector nuclease*) (Ma & Liu, 2015; Li et al., 2020); y (iv) proteína 9 asociada a sistemas de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR, *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*), CRISPR/Cas9 (Mojica et al., 2005; Doudna & Charpentier, 2014). Las tres primeras tienen la desventaja de ser más laboriosas y difíciles de diseñar, además de ser menos sensibles y específicas, mientras que la tecnología CRISPR/Cas9 es más adaptable, de menor coste, más eficiente y fácil de diseñar.

El sistema **CRISPR/Cas9** se trata de un sistema de defensa adaptativo propio de las bacterias y arqueobacterias, que protege al organismo de ADN extraño al inducir roturas de doble cadena en el material genético reconocido como extraño. Este sistema incorpora los fragmentos de ADN de fagos y plásmidos invasores en los espaciadores de los loci CRISPR y los utiliza para guiar la degradación de secuencias homólogas por parte de la nucleasa asociada al locus CRISPR (Cas, *Crispr associated protein*) (Terns & Terns, 2011). La adaptación de este sistema mediante la expresión heteróloga de componentes clave ha permitido la edición del genoma en múltiples modelos de organismos (Cong et al., 2013), utilizando un único y sintético ARN guía (ARNg) capaz de dirigir la Cas9 a una secuencia específica (Jinek et al., 2013).

La aplicación de la tecnología CRISPR/Cas9 a *N. caninum* se realizó con éxito por primera vez en 2018, utilizando las mismas construcciones desarrolladas previamente para *T. gondii* (Arranz-Solís et al., 2018). Desde su descubrimiento, se ha desarrollado un mayor número de parásitos mutantes deficientes en determinados genes (*knockout*, KO). Los nuevos enfoques basados en herramientas de edición genética, unidos a la caracterización en modelos *in vivo* e *in vitro* bien definidos utilizando el hospedador natural siempre que sea posible, son clave para descifrar los mecanismos subyacentes de la patogenia de la neosporosis bovina.

Con objeto de entender mejor la función de distintas proteínas y confirmar su implicación en la virulencia, se han generado **parásitos KO** en las siguientes proteínas: proteínas de los gránulos densos (GRA2, GRA6, GRA7, GRA11, GRA14, GRA17 y GRA23) (Nishikawa et al., 2018; Wang et al., 2021a; Abdou et al., 2022; Zhao et al., 2020; Dong et al., 2021; Yang et al., 2018, 2021), de las roptrias (ROP16, ROP5) (Ma et al., 2017a,b) y de los micro-nemas (MIC6) (Wang et al., 2021b). Estos mutantes se han generado tanto por métodos de recombinación homóloga por transfección estable (Δ ROP5, Δ ROP16, Δ MIC6, Δ GRA23) como utilizando la tecnología CRISPR/Cas9, usando promotores y plásmidos previamente utilizados para *T. gondii* o específicos de *N. caninum* (Δ GRA2, Δ GRA6, Δ GRA7, Δ GRA11, Δ GRA14, Δ GRA17). En la mayoría de estos trabajos se ha utilizado el aislado Nc-1 como cepa parental para generar los mutantes. La caracterización de dichos KO en modelos murinos y en modelos *in vitro* ha permitido obtener información sobre la implicación de las distintas proteínas en la virulencia de *N. caninum*. El estudio de los parásitos deficientes Δ GRA2 y Δ GRA17 en modelos *in vitro* demostró que las cepas KO presentaron defectos en la formación de la vacuola parasitófora en comparación con la cepa parental, conformando de manera

anómala la red de la estructura intravacuolar o presentando una morfología atípica de la vacuola respectivamente, lo que dio lugar a una menor proliferación *in vitro* y posiblemente fuera la causa de la reducción de la virulencia *in vivo* (Yang et al., 2018; Dong et al., 2021). Los parásitos KO Δ GRA6 también mostraron una proliferación *in vitro* más lenta que la cepa parental, pudiendo ser la causa de la menor virulencia observada en ratón, obteniendo menores cargas parasitarias en encéfalo y mayores ratios de supervivencia (Zhao et al., 2020). Por su parte, los parásitos deficientes en *GRA7* fueron los únicos analizados en un modelo murino gestante además de no gestante, demostrando el efecto de la proteína *GRA7* en la virulencia en ratones y en la transmisión vertical. Asimismo, se ha visto que esta proteína es uno de los principales activadores de la respuesta inmunitaria en ratones, ya que regula la producción de citoquinas, quimioquinas y factores inmunitarios en los macrófagos murinos (Nishikawa et al., 2018; Wang et al., 2021a). El efecto observado en ratones podría estar mediado por la inhibición que produce la proteína *GRA7* en la agregación del factor *IRGa6* a la membrana de la VP, lo que ayudaría al parásito a escapar de la respuesta inmunitaria del hospedador y poder multiplicarse (Nishikawa et al., 2018; Wang et al., 2021a; Abdou et al., 2022). Previamente, en *T. gondii* se había confirmado que la combinación de dicha proteína (*TgGRA7*) con *TgROP18* regula la inactivación específica de *IRGa6* por *TgROP18* (Alaganan et al., 2014; Hermanns et al., 2016). Sin embargo, debido a la ausencia de este mecanismo de defensa, basado en las proteínas *IRGs*, en la especie bovina es difícil poder extrapolar entre especies. Por otra parte, también se ha confirmado el efecto de las proteínas de las roptrias *ROP5* y *ROP16* en la virulencia de *N. caninum* en ratones no gestantes, obteniendo mayores ratios de supervivencia y menores cargas parasitarias cerebrales aquellos ratones infectados con parásitos KO en comparación con los infectados con la cepa parental. Además, se ha observado que la delección de *ROP5* produjo una disminución de los niveles de transcripción y expresión de *GRA7*, reconocido factor de virulencia, mientras que *ROP16* fosforila la vía de señalización celular *STAT3* induciendo la apoptosis (Ma et al., 2017a,b). Sin embargo, la delección de *GRA7* no produjo ningún efecto sobre *ROP5* (Nishikawa et al., 2018). Por último, la delección de la proteína *MIC6*, implicada en los procesos de invasión y egresión de las células *in vitro*, también tuvo efectos en la reducción de la virulencia en ratón, pudiendo funcionar de forma sinérgica con otras *MICs* para regular la virulencia del patógeno (Wang et al., 2021b). Estos estudios han permitido confirmar el efecto de las proteínas de los gránulos densos *GRA2*, *GRA6*, *GRA7* y *GRA17* (Nishikawa et al., 2018; Wang et al., 2021a; Abdou et al., 2022; Zhao et al., 2020; Dong et al., 2021; Yang et al., 2018), de las proteínas de las roptrias *ROP5* y *ROP16* (Ma et al., 2017a,b) y de la proteína de los micronemas *MIC6* (Wang et al., 2021b) en la virulencia de *N. caninum* en ratones, mientras que la delección de las proteínas *GRA11*, *GRA14* y *GRA23* no mostró ningún efecto de reducción de la virulencia *in vivo* (Nishikawa et al., 2018; Yang et al., 2021). Las principales características de los distintos KO en *N. caninum* aparecen resumidas en la Tabla 1.3.

Tabla 1.3: Parásitos *knockout* (KO) generados en *Neospora caninum*.

Gen defectivo	Cepa parental	Método	Principales resultados observados	Referencias
NcGRA2	Nc-1	CRISPR/Cas9	NcGRA2 se localiza junto NcGRA6 en el extremo posterior de los taquizoitos y en la red intravacuolar de las VP. Los parásitos KO mostraron un crecimiento <i>in vitro</i> más lento, con similar capacidad de invasión y egresión. Los ratones infectados con parásitos KO mostraron mayor tiempo medio de supervivencia, menor carga parasitaria y cambios histopatológicos leves.	Dong et al., 2021
NcGRA6	Nc-1	CRISPR/Cas9	Los parásitos KO tuvieron menor crecimiento y similar capacidad de invasión y egresión <i>in vitro</i> . Los ratones infectados con parásitos KO mostraron menor virulencia, menor tiempo medio de supervivencia y menor carga parasitaria.	Zhao et al., 2020
NcGRA7	Nc-Spain7 Nc-1	CRISPR/Cas9 CRISPR/Cas9	Las construcciones desarrolladas para la modificación de <i>T. gondii</i> son válidas en <i>N. caninum</i> . No se observaron efectos <i>in vitro</i> . Los parásitos KO mostraron una reducida virulencia en ratones, con menor carga parasitaria y lesiones más leves en cerebro. NcGRA7 modula la inmunidad del hospedador, regulando principalmente la producción de citoquinas y quimiocinas. Se observó reducción de la transmisión vertical en un modelo gestante.	Arranz-Solis et al., 2018 Nishikawa et al., 2018; Abdou et al., 2022
NcGRA11	Nc-1	CRISPR/Cas9	Los parásitos KO mostraron menor crecimiento <i>in vitro</i> y menor virulencia en ratón. Además, fueron más fácilmente eliminados por los macrófagos murinos, probablemente debido a la mayor agregación de IRGa6 a la membrana de sus VP.	Wang et al., 2021a
NcGRA14	Nc-1	CRISPR/Cas9	No mostró efectos en la virulencia.	Yang et al., 2021
NcGRA17	Nc-1	CRISPR/Cas9	No mostró efectos en la virulencia.	Nishikawa et al., 2018
NcGRA23	Nc-1	Transfección estable / recombinación homóloga	Los parásitos KO tuvieron un crecimiento <i>in vitro</i> más lento y una menor virulencia en ratón. NcGRA17 afecta a la morfología de la VP, formando una morfología aberrante.	Yang et al., 2018
NcROP5	Nc-1	Transfección estable / recombinación homóloga	No mostró efectos en la virulencia.	Yang et al., 2021
NcROP16	Nc-1	Transfección estable / recombinación homóloga	Los parásitos KO tuvieron una menor invasión y un menor crecimiento <i>in vitro</i> . Se observaron menores cargas parasitarias en ratón. Se observó una menor transcripción de NcGRA7 en los parásitos KO.	Ma et al., 2017
NcMIC6	Nc-1	Transfección estable / recombinación homóloga	Los parásitos KO mostraron menor crecimiento <i>in vitro</i> y menor virulencia en ratón, con menores cargas parasitarias. NcROP16 promueve la apoptosis de la célula hospedadora mediante la fosforilación de la vía de señalización STAT3.	Ma et al., 2016
	Nc-1	Transfección estable / recombinación homóloga	Los parásitos KO mostraron una menor virulencia en ratón, con menores cargas parasitarias en cerebro. Se observó una menor capacidad de invasión, egresión y un menor crecimiento <i>in vitro</i> . Los niveles de expresión de otras MIC (MIC1, MIC4, AMA1) disminuyeron, pudiendo tener una función sinérgica con MIC6.	Wang et al., 2021b

Justificación y objetivos

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La neosporosis bovina está considerada una de las principales causas de fallo reproductivo en el ganado bovino a nivel mundial (Dubey et al., 2017), ocasionando importantes pérdidas económicas (Reichel et al., 2013). La patogenia de la enfermedad en las hembras gestantes es compleja y depende de múltiples factores que, en la actualidad, se conocen de modo parcial. Las consecuencias de la infección durante la gestación (el aborto o el nacimiento de terneros clínicamente sanos, pero congénitamente infectados) están influenciadas por una serie de factores dependientes del parásito y del hospedador. Entre los primeros, la virulencia del aislado de *N. caninum* con el que se produce la infección puede ser determinante en la presentación y gravedad de la enfermedad. Intentando profundizar en este aspecto, el grupo de investigación SALUVET ha abordado en los últimos años la caracterización fenotípica y patogénica de un elevado número de aislados del parásito, observándose una gran variabilidad en su comportamiento. Dichos estudios han demostrado diferencias en la distribución orgánica, cargas parasitarias y gravedad de las lesiones en un modelo murino de infección cerebral (Pereira García-Melo et al., 2010) y en las tasas de transmisión transplacentaria y mortalidad neonatal en un modelo murino gestante de transmisión congénita (Rojo-Montejo et al., 2009b; Regidor-Cerrillo et al., 2010; Dellarupe et al., 2014a). En los estudios *in vitro* se han observado importantes variaciones en la capacidad de invasión y en la tasa de proliferación entre los diferentes aislados en células MARC-145 (Regidor-Cerrillo et al., 2011; Dellarupe et al., 2014b). Asimismo, se han caracterizado dos aislados con marcada diferencia en su virulencia (Nc-Spain7, de alta virulencia; y Nc-Spain1H, de baja virulencia) en células bovinas diana (células de la placenta y macrófagos) (Jiménez-Pelayo et al., 2017; García-Sánchez et al., 2019b), demostrándose también diferencias tanto en su capacidad de crecimiento como en la modulación de la respuesta inmunitaria de la célula hospedadora. La capacidad de los aislados para causar la muerte fetal también se ha investigado en infecciones experimentales en vacas gestantes durante el primer y segundo tercio de la

gestación, observándose, así mismo, importantes diferencias (Rojo-Montejo et al., 2009a; Caspe et al., 2012; Regidor-Cerrillo et al., 2014; Almería et al., 2016; Jiménez-Pelayo et al., 2019b; Vázquez et al., 2019). Concretamente, el aislado Nc-Spain7 es capaz de producir el aborto cuando se inocula al principio y mitad de gestación, mientras que el aislado Nc-Spain1H no causó mortalidad fetal en ninguno de los dos periodos de estudio (Rojo-Montejo et al., 2009a; Regidor-Cerrillo et al., 2014; Jiménez-Pelayo et al., 2019b). Además, se ha podido establecer una correlación entre ciertos rasgos fenotípicos *in vitro* (mayor invasión y mayor proliferación) con comportamientos más virulentos en modelos murinos (mayores tasas de mortalidad y morbilidad neonatal) (Regidor-Cerrillo et al., 2011). Los resultados obtenidos en los distintos estudios han permitido clasificar los aislados en alta (Nc-Spain4H, Nc-Spain5H, Nc-Spain7, Nc-Bahia, Nc-Liverpool, Nc-1), moderada (Nc-Spain10, Nc-Ger3) y moderada/baja y baja (Nc-Spain1H, Nc-Spain2H, Nc-Spain3H, Nc-Spain6, Nc-Spain8, Nc-Spain9, Nc-Ger2, Nc-Ger6, Nc-Arg6) virulencia.

A pesar de que la variabilidad biológica intraespecífica de *N. caninum* ha sido ampliamente demostrada, apenas se conocen los mecanismos que rigen esta diversidad y son pocos los estudios en los que se haya abarcado la identificación de genes y proteínas como posibles factores de virulencia del parásito. A diferencia de *T. gondii*, se ha demostrado una escasa variabilidad genética y un limitado polimorfismo a nivel genómico en *N. caninum* (Khan et al., 2019a; Calarco et al., 2018; Beck et al., 2009), por lo que las diferencias en la expresión génica o en la abundancia de proteínas entre aislados podrían tener un papel clave en la explicación de dicha variabilidad. En este sentido, la comparación del proteoma y del transcriptoma del taquizoíto entre aislados de distinta virulencia ha mostrado diferencias en la abundancia de proteínas y expresión de genes del apicoplasto y del metabolismo, así como de algunas proteínas presentes en organelas del complejo apical como las MIC (proteínas de micronemas), ROP y RON (proteínas de roptrias), GRA (proteínas de gránulos densos) o antígenos de superficie SRS (Regidor-Cerrillo et al., 2012; Horcajo et al., 2017, 2018; García-Sánchez et al., 2019a; Regidor-Cerrillo et al., 2020), que podrían estar asociados a la virulencia. En estos trabajos previos, comparando dos (Horcajo et al., 2017, 2018; García-Sánchez et al., 2019a; Regidor-Cerrillo et al., 2020) o tres aislados (Regidor-Cerrillo et al., 2012) de virulencia conocida, se ha podido determinar que las proteínas NcGRA7 y NcROP40 se encuentran más expresadas en los aislados con mayor virulencia, por lo que es razonable plantear la hipótesis de que puedan ser elementos clave para la virulencia del parásito. NcROP40 fue identificado en fracciones subcelulares de taquizoítos enriquecidas en roptrias por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), mostró una mayor abundancia en los taquizoítos de los aislados más virulentos en un estudio proteómico mediante DIGE acoplado a la técnica MALDI-TOF MS (Regidor-Cerrillo et al., 2012) y también obtuvo resultados prometedores al ser empleada como una vacuna recombinante junto con NcROP2 en un modelo murino gestante de infección por *N. caninum* (Pastor-Fernández et al., 2015a). Por su parte, la proteína de los gránulos densos NcGRA7 es una de las más estudiadas en *N. caninum*. Se trata de un antígeno inmunodominante (Álvarez-García et al., 2007) y

está implicada en la regulación de la respuesta inmunitaria del hospedador (Nishikawa et al., 2018). Su uso como candidato vacunal se ha descrito en diversos estudios, obteniendo resultados variables en cuanto a la protección conferida (Lally et al., 1997; Jenkins et al., 2004; Vemulapalli et al., 2007; Nishikawa et al., 2009; Aguado-Martínez et al., 2009). Además, la falta del gen que codifica para esta proteína disminuye la virulencia del parásito en modelos experimentales murinos (Nishikawa et al., 2018; Wang et al., 2021a; Abdou et al., 2022). Ambas proteínas parecen estar implicadas en distintas fases del ciclo lítico de *N. caninum* (Aguado-Martínez et al., 2010; Pastor-Fernández et al., 2015b); sin embargo, la caracterización funcional de dichas proteínas no se ha completado.

Por otra parte, el uso de herramientas de edición génica en *N. caninum* puede facilitar la investigación sobre las funciones desempeñadas por genes específicos en las interacciones parásito-hospedador y en la patogenia de la enfermedad. Recientemente, el éxito en la aplicación de la tecnología CRISPR/Cas9 para desarrollar mutantes defectivos en *N. caninum* (Arranz-Solís et al., 2018) ha permitido un gran avance en la realización de estudios de funcionalidad de genes. No obstante, hasta el momento son escasos los estudios dirigidos a la caracterización de potenciales factores de virulencia en *N. caninum*.

En este contexto, el objetivo general de la presente Tesis Doctoral fue la **identificación y caracterización de posibles factores de virulencia de *N. caninum***. El logro de dicho objetivo permitirá una mejor comprensión de la virulencia y patogenia de la neosporosis lo que, en el futuro, podría ser clave para la identificación de nuevas dianas vacunales eficaces. Para la consecución de este objetivo principal se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

▪ **Objetivo 1: Identificación de posibles factores de virulencia en *Neospora caninum*.**

Para ello, se analizó el proteoma de seis aislados de distinto origen y comportamiento *in vivo* e *in vitro*. Hasta la fecha, los estudios realizados han incluido un número muy bajo de aislados, comparando solo dos o tres aislados de distinta virulencia (Nc-Spain1H, Nc-Spain7 y Nc-Liv). Por lo tanto, en este estudio se incluyeron tres aislados de alta virulencia, Nc-Spain7, Nc-Spain4H y Nc-Bahia, y tres aislados de baja virulencia, Nc-Spain1H, Nc-Spain2H y Nc-Ger6. La abundancia diferencial de proteínas entre aislados podría ayudar a explicar las diferencias observadas en el comportamiento biológico de los mismos. Por otra parte, las proteínas con mayor abundancia en los aislados de alta virulencia podrían estar implicadas en su comportamiento más agresivo. Los resultados de este objetivo permitieron obtener una lista de proteínas con mayor abundancia en los aislados más virulentos y, por lo tanto, de posibles factores de virulencia y validar algunos candidatos previamente determinados por el grupo SALUVET en proyectos anteriores (NcGRA7).

▪ **Objetivo 2: Evaluación y caracterización de los posibles factores de virulencia de *Neospora caninum* NcGRA7 y NcROP40**

- Subobjetivo 2.1: Generación de mutantes de *N. caninum* defectivos en factores de virulencia. Se obtuvieron mutantes *knockout* (KO) de los dos posibles factores de virulencia seleccionados, NcGRA7 y NcROP40, mediante la utilización de la tecnología CRISPR/Cas9. Para ello, se empleó el aislado de alta virulencia Nc-Spain7 como cepa parental. También se realizó la complementación de las cepas KO con el gen delecionado, con objeto de comprobar que el efecto observado en la virulencia fuese debido a la deleción de dicho gen y descartar posibles efectos *offtarget*.
- Subobjetivo 2.2: Caracterización de los mutantes defectivos en NcGRA7 o NcROP40 en un modelo murino BALB/c gestante y no gestante. Se realizaron infecciones experimentales en los ratones con las distintas cepas KO, las cepas complementadas y la cepa parental (Nc-Spain7) y se evaluó la morbilidad, la mortalidad, la transmisión vertical, la carga parasitaria y la respuesta inmunitaria frente a la infección, comparando los efectos observados en los grupos infectados con las cepas mutantes con los observados en el grupo infectado con la cepa parental.
- Subobjetivo 2.3: Caracterización de los mutantes defectivos en NcGRA7 o NcROP40 en células bovinas diana de la infección por *N. caninum*. Se analizó el efecto de la deleción de los dos factores de virulencia a lo largo del ciclo lítico del parásito en dos células diana bovinas: trofoblastos (línea celular F3) y macrófagos primarios (boMØ), comparándolo con la cepa parental (Nc-Spain7). Asimismo, en los boMØ se analizaron los niveles de expresión de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) y de citoquinas y se investigó el crecimiento de las distintas cepas cuando se sometieron a la presión inmunitaria mediada por IFN- γ .

En resumen, consideramos que la consecución de estos objetivos permitirá obtener novedosa y valiosa información sobre los mecanismos implicados en la variabilidad intraespecífica de la virulencia en *N. caninum*.

Plan de trabajo y metodología

PLAN DE TRABAJO Y METODOLOGÍA

Para la consecución de los objetivos marcados en esta Tesis Doctoral se utilizaron metodologías de diferentes campos del ámbito de las Ciencias de la Salud (ciencias ómicas, biología molecular, biología celular) y varios modelos *in vivo* (modelo murino gestante y cerebral de neosporosis) e *in vitro* (cultivo del parásito en diferentes tipos celulares). Todos los procedimientos en los que intervinieron animales fueron aprobados por el Comité de Bienestar Animal y Experimentación de la Universidad Complutense de Madrid y el Área de Protección Animal de la Comunidad de Madrid, España (PROEX 274/16 y 66.7/20), y se realizaron y diseñaron de acuerdo con la legislación española y de la Unión Europea (Ley 6/2013; Real Decreto 118/2021; Directiva 2010/63/UE). Las investigaciones realizadas con animales de experimentación siguieron el criterio de las 3Rs. El uso de organismos modificados genéticamente y las instalaciones en las que se manejaron fueron aprobadas por la Comisión Nacional de Bioseguridad (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). Su manipulación se ajustó a lo descrito en la legislación vigente (Ley 9/2003; Real Decreto 178/2004; Directiva 2009/41/UE).

Para facilitar la comprensión y lectura de los distintos objetivos, los materiales y métodos se describen de manera más detallada en cada uno de los capítulos siguientes. No obstante, en esta sección se destacan los aspectos generales de estos objetivos y se explica, de una manera esquemática, la metodología empleada en cada estudio:

▪ **Objetivo 1: Identificación de posibles factores de virulencia en *Neospora caninum*.**

La comparación del transcriptoma y del proteoma de aislados de *N. caninum* con distinta virulencia ha mostrado diferencias en la expresión de genes o abundancia de proteínas que podrían estar involucradas en el comportamiento biológico y en la virulencia de los aislados (Regidor-Cerrillo et al., 2012; Horcajo et al., 2018; García-Sánchez

et al., 2019a). Sin embargo, el número de aislados del parásito que se han comparado en estudios previos es limitado. Por ello, el propósito de este objetivo fue realizar el análisis comparativo del proteoma de seis aislados de *N. caninum* seleccionados por su origen (bovino y canino) y diferente virulencia (alta y baja). Estos aislados habían sido caracterizados previamente por el grupo SALUVET en diferentes estudios *in vitro* e *in vivo* (Regidor-Cerrillo et al., 2010, 2011; Dellarupe et al., 2014a,b). En el estudio se incluyeron los aislados Nc-Bahia, Nc-Spain4H y Nc-Spain7, como representantes de los aislados de alta virulencia, y Nc-Ger6, Nc-Spain2H y Nc-Spain1H, representando a los aislados de virulencia baja. Su proteoma se estudió mediante LC-MS/MS (cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem) sin marcado. Los extractos de proteína se obtuvieron a partir de taquizoítos producidos en la línea celular MARC-145. El parásito se purificó utilizando columnas de cromatografía PD10 en el momento de la egresión (56-68 horas post-infección, pi, dependiendo del aislado) (Regidor-Cerrillo et al., 2011; Dellarupe et al., 2014b), y se obtuvieron pellets de $1,5 \times 10^8$ taquizoítos. Para la extracción de proteínas se utilizó un tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA). De cada aislado se analizaron seis réplicas biológicas. Las muestras fueron analizadas usando el sistema para separación de péptidos Easy-nanoLC II, acoplado al espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap-Velos-Pro. Posteriormente, la identificación peptídica se realizó mediante el motor de búsqueda MASCOT 2.3.0 frente a la base de datos ToxoDB versión 26. Por último, para la cuantificación relativa diferencial de las proteínas entre los aislados de *N. caninum* se utilizó el software Proteome Discoverer 2.2 (Figura 3.1). Todos los análisis proteómicos se realizaron en colaboración con el Servicio de Proteómica de la UCM. Aquellas proteínas con mayor abundancia en los aislados más virulentos se seleccionaron como posibles factores de virulencia en *N. caninum*.

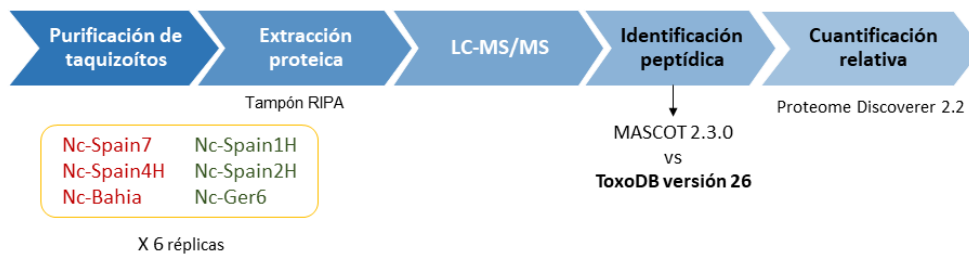


Figura 3.1: Esquema de trabajo del Objetivo 1.

▪ **Objetivo 2: Evaluación y caracterización de los posibles factores de virulencia de *Neospora caninum* NcGRA7 y NcROP40.**

Las proteínas NcGRA7 y NcROP40 se seleccionaron como posibles factores de virulencia por su mayor abundancia en los aislados de alta virulencia de acuerdo a los resultados obtenidos en el objetivo anterior y en estudios previos (Aguado-Martínez et al., 2010; Regidor-Cerrillo et al., 2012; Pastor-Fernández et al., 2015b, 2016), donde también se observó una mayor abundancia de estas proteínas en aislados de alta virulencia y unos mayores niveles de expresión de ARNm de estos genes durante la invasión y egresión de los taquizoítos, pudiendo, por tanto, estar implicados en dichos procesos. Para estudiar su efecto en la virulencia de *N. caninum* se generaron mutantes defectivos (*knockout*, KO) en dichos factores mediante la tecnología CRISPR/Cas9. Los parásitos KO se caracterizaron utilizando diferentes modelos *in vivo* e *in vitro* de acuerdo con los siguientes subobjetivos:

- **Subobjetivo 2.1: Generación de mutantes de *N. caninum* defectivos en NcGRA7 y NcROP40.** Para evaluar el efecto de los factores seleccionados sobre la virulencia de *N. caninum* se obtuvieron mutantes KO en dichos genes mediante la tecnología CRISPR/Cas9 (Figura 3.2). Como cepa parental para la manipulación genética se empleó el aislado Nc-Spain7, que tiene una alta tasa de proliferación *in vitro* (Regidor-Cerrillo et al., 2011) y una alta virulencia *in vivo* en un modelo experimental murino (Regidor-Cerrillo et al., 2010) y bovino (Regidor-Cerrillo et al., 2014; Jiménez-Pelayo et al., 2019b). Las cepas defectivas en NcGRA7 (NcΔGRA7) y NcROP40 (NcΔROP40) se generaron aplicando la tecnología CRISPR/Cas9 desarrollada para *T. gondii*, pero adaptando los protocolos de electroporación y selección a *N. caninum* (Arranz-Solís et al., 2018). En primer lugar, se diseñaron los ARN guía (ARNg) utilizados para la delección y se insertaron en el plásmido PSS013, que cuenta con la secuencia de la proteína Cas9 y los promotores necesarios para su expresión. Posteriormente, se electroporaron los taquizoítos de Nc-Spain7 (pulso exponencial, 1200V) junto con el plásmido que incluía los ARNg y la secuencia del gen que confiere resistencia a la pirimetamina (gen dihidrofolato reductasa-timidilato sintasa, *DHFR-TS*). La selección de los mutantes se realizó en células MARC-145 mediante la utilización de pirimetamina (10 μM). Tras la selección inicial, se procedió a la clonación de los parásitos mediante diluciones seriadas. Por último, los clones seleccionados se secuenciaron y analizaron por PCR, inmunofluorescencia (IFI) y Western Blot, para comprobar la correcta interrupción del gen de interés. Para comprobar que los ARNg no tuvieran efectos *offtarget*, se generaron las cepas complementadas de los mutantes KO mediante la inserción de una copia del gen delecionado interrumpiendo el gen *UPRT* que permite la selección con 5-Fluorodeoxyuridina (FUdR; 15 μM), siguiendo el protocolo previamente descrito para la generación del mutante KO.

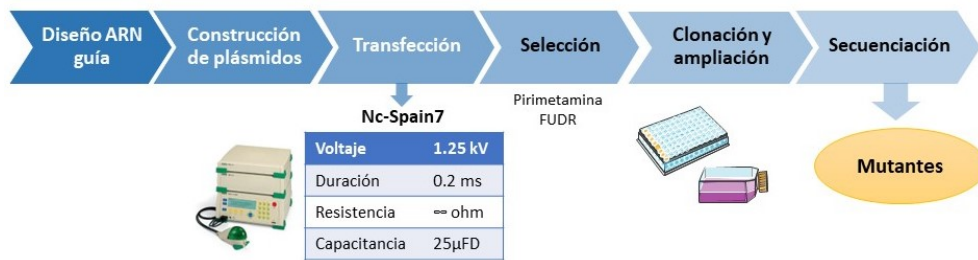


Figura 3.2: Esquema de trabajo para la generación de mutantes de *Neospora caninum* mediante CRISPR/Cas9.

- Subobjetivo 2.2: Caracterización de los mutantes defectivos en NcGRA7 y NcROP40 en un modelo murino BALB/c gestante y no gestante. El impacto de la delección de NcGRA7 y NcROP40 sobre la patogenicidad de la infección por *N. caninum* se evaluó en un modelo murino BALB/c gestante y no gestante normalizado previamente (López-Pérez et al., 2008; Arranz-Solís et al., 2015). El diseño experimental se resume en la figura 3.3. En primer lugar, se sincronizaron las hembras mediante el efecto *Whitten* (Whitten, 1956) y se realizaron las cubriciones, alojando un macho con dos hembras. Posteriormente, se inocularon los ratones a los 7-10 días después de la cubrición (mitad de gestación) por vía subcutánea con una dosis de 10^5 taquizoítos/ratón del aislado Nc-Spain7, de los parásitos KO (NcΔGRA7 o NcΔROP40) o de las cepas complementadas. Un grupo de ratones se inoculó con tampón PBS (testigo negativo). La gestación se confirmó mediante determinación del peso a los 15-18 días post-cubrición. Las hembras se clasificaron como gestantes (modelo murino gestante) o no gestantes (modelo murino no gestante) y se sacrificaron a los 30 días postparto o 30 días pi, respectivamente. Los animales se inspeccionaron diariamente, anotando la presencia de signos clínicos compatibles con la infección por *N. caninum* en el ratón (morbilidad) y, en su caso, la mortalidad. La gravedad de los signos clínicos se evaluó siguiendo el modelo desarrollado por Pastor-Fernández et al. (2015a). También se recogieron los datos de: tasa de fertilidad (porcentaje de hembras gestantes por grupo), tamaño de la camada (número de crías paridas por madre), y mortalidad de las crías, distinguiendo entre mortalidad temprana (en los dos primeros días postparto) o neonatal (del día 2 al día 30 postparto). En el momento del sacrificio se recogieron muestras de encéfalo y suero de los animales para determinar, por un lado, la carga parasitaria cerebral de los ratones por PCR cuantitativa (qPCR) y, por el otro, la respuesta inmunitaria humoral (IgG1 e IgG2a) mediante ELISA. Los machos utilizados para las cubriciones se infectaron con las mismas cepas y dosis descritas previamente y se sacrificaron durante la fase aguda de la infección (día 5 pi) para analizar la respuesta inmunitaria celular mediante la evaluación de los niveles de citoquinas (IFN- γ , IL-4, IL-10, TNF- α) por RT-qPCR presentes en

las muestras recogidas del bazo.

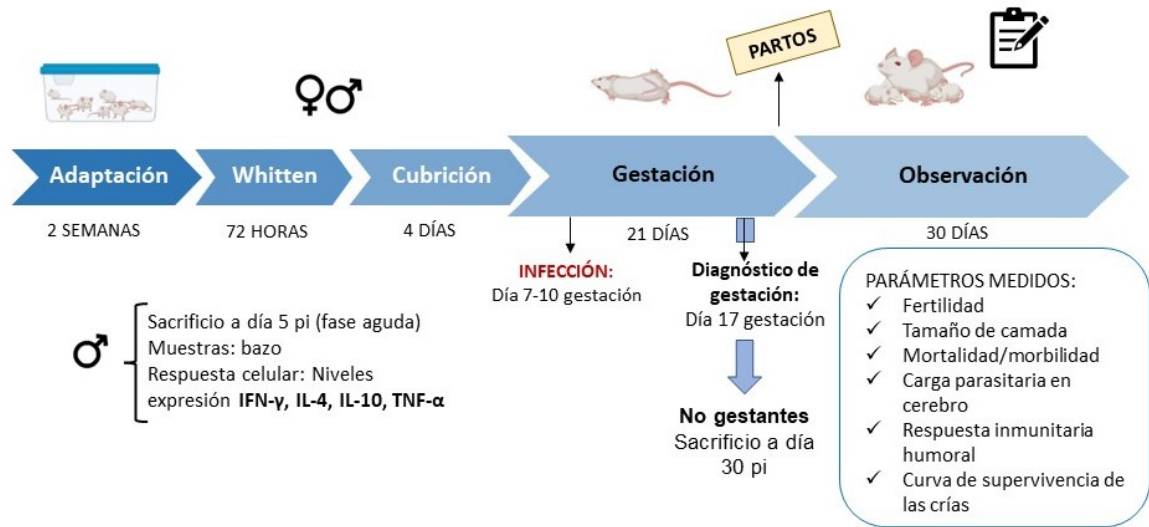


Figura 3.3: Diseño experimental del modelo murino.

- Subobjetivo 2.3: Caracterización de los mutantes defectivos en *NcGRA7* o *NcROP40* en células bovinas diana de la infección por *N. caninum*. En este subobjetivo se investigó el efecto de la delección de estos genes sobre el crecimiento del parásito en células del trofoblasto bovino (línea celular F3) y en macrófagos bovinos derivados de monocitos (boMØ). En las células F3 se evaluó la cinética de proliferación de los parásitos KO (*NcΔGRA7* y *NcΔROP40*) y del aislado *Nc-Spain7*, cuantificando el número de taquizoítos a determinados tiempos pi (8, 24, 36, 48, 60 y 72 horas) mediante qPCR (Jiménez-Pelayo et al., 2017; Hambruch et al., 2010). Posteriormente, se realizó un ensayo de competición del crecimiento de cada uno de los mutantes KO con la cepa parental (Saeij et al., 2008), manteniendo los parásitos en co-cultivo en placas de seis pocillos durante 6 pases. En los pases 0, 1, 3 y 6 se infectaron placas de 12 pocillos con la mezcla de parásitos (mutante en estudio y cepa parental) y se añadió medio de mantenimiento con pirimetamina y sin pirimetamina. A las 60 horas pi las placas se fijaron y los parásitos se tiñeron por inmunofluorescencia para, posteriormente, realizar el recuento de los eventos de infección en cada pocillo y calcular la proporción de parásitos KO en la mezcla de parásitos. En cuanto a la caracterización en los boMØ; en primer lugar se generaron estas células *in vitro* (García-Sánchez et al., 2019b) a partir de monocitos bovinos. Las células mononucleares periféricas se purificaron de la sangre utilizando Histopaque®-1077 y se obtuvieron los monocitos por separación magnética de las células CD14+. Posteriormente, se cultivaron durante 5 días en presencia de GM-CSF bovina recombinante para su diferenciación a macrófagos. En estas células se evaluó la cinética de proliferación de las distintas

cepas, siguiendo el mismo procedimiento que en células F3, y realizando tinciones mediante doble inmunofluorescencia para su visualización microscópica (García-Sánchez et al., 2019b). A las 48 horas pi se analizó el crecimiento de las cepas complementadas, comprobando si recuperaban la capacidad de crecimiento del aislado Nc-Spain7. En estas células también se evaluó el efecto de distintas dosis de IFN- γ (0,1, 1, 10 y 100 ng/ml) en la inhibición del crecimiento de los parásitos KO en comparación con la cepa parental, cuantificando el número de taquizoítos por qPCR a las 48 horas pi. Por último, se cuantificaron los niveles de expresión de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) y de diversas citoquinas a las 8 horas pi mediante RT-qPCR.

La figura 3.4 muestra el esquema del plan de trabajo seguido para la realización de la presente Tesis Doctoral.

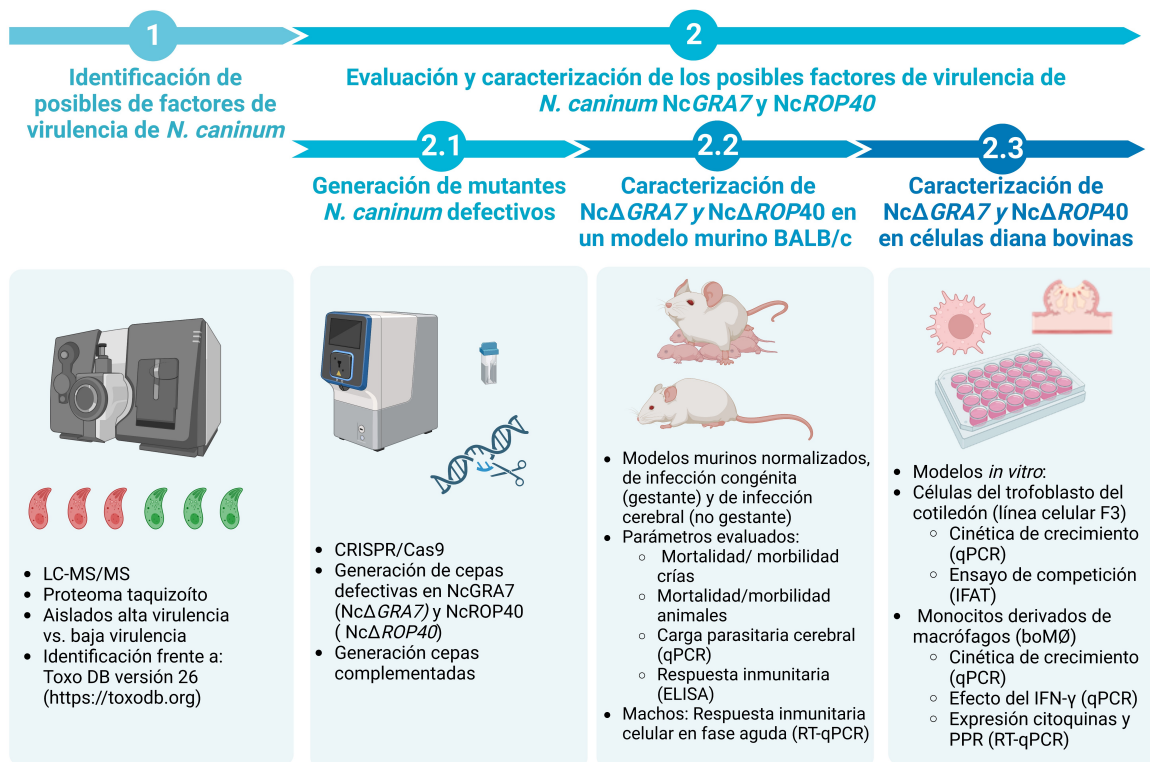


Figura 3.4: Plan de trabajo.

Resultados y discusión

Results and discussion

OBJECTIVO 1. IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES FACTORES DE VIRULENCIA EN *Neospora caninum*

La variabilidad biológica entre los aislados de *Neospora caninum* ha sido ampliamente demostrada, sin embargo, las bases moleculares que gobiernan esta diversidad siguen siendo altamente desconocidas. El empleo de herramientas ómicas para realizar estudios comparativos entre aislados de distinta virulencia nos permite identificar factores que podrían tener un papel importante en el comportamiento biológico de los distintos aislados parasitarios. Sin embargo, los últimos estudios se han centrado en un número limitado de aislados. Por tanto, el objetivo del presente estudio fue comparar el proteoma de taquizoíto de una población más amplia de aislados de *N. caninum*, utilizando la tecnología LC-MS/MS sin marcado de las muestras. Nc-Bahia, Nc-Spain4H y Nc-Spain7 representaron los aislados de alta virulencia, y Nc-Ger6, Nc-Spain2H y Nc-Spain1H representaron los aislados de baja virulencia.

Se realizaron dos tipos de análisis: comparaciones por pares entre todos los aislados, centrándonos en las comparaciones entre un aislado de alta y uno de baja virulencia, y comparaciones entre grupos de aislados de alta y baja virulencia. Los resultados obtenidos permitieron identificar un conjunto de proteínas con distinta abundancia entre los aislados de alta y baja virulencia, las cuales fueron clasificadas de acuerdo a su funcionalidad. Aquellas proteínas con mayor abundancia en los aislados de alta virulencia podrían estar implicadas en el comportamiento más virulento de los mismos, siendo, por tanto, posibles factores de virulencia. Desafortunadamente un alto porcentaje de las proteínas fueron clasificadas como hipotéticas, lo que pone de manifiesto la importancia de disponer de un genoma bien anotado para realizar verdaderos progresos en este campo.

Los resultados obtenidos mostraron una mayor abundancia de proteínas relacionadas con el metabolismo energético y con el procesamiento del ADN/ARN en los aislados de alta virulencia. Estas proteínas podrían estar implicadas en las mayores tasas de crecimiento y proliferación observadas en los aislados de alta virulencia. Cabe destacar la ADN polimerasa, la cual fue la única proteína con mayor abundancia en los aislados de alta virulencia en todas las comparaciones. Las proteínas relacionadas con los mecanismos redox y la respuesta al estrés tuvieron una abundancia diferencial entre aislados. Estos mecanismos están relacionados con la supervivencia del parásito en la célula hospedadora y podrían estar implicados en la diferente respuesta inmunitaria desarrollada. Por otro lado, también

se observó una mayor abundancia de algunas proteínas de las roptrias y de los gránulos densos en los aislados de alta virulencia, principales factores de virulencia descritos para *Toxoplasma gondii*. Entre las proteínas de las roptrias destacan un miembro de la familia de las roptrias quinasas ROP20, la cual ya tuvo una mayor abundancia en el aislado de alta virulencia Nc-Spain7 en previos estudios, y la pseudoquinasa de bradizoíto 1 (BPK1). Entre las proteínas de gránulos densos destacan algunas como GRA32, GRA6 o GRA7. La relevancia de estas proteínas en la infección por *N. caninum* merece una mayor investigación. Los resultados revelan información interesante sobre posibles mecanismos implicados en rasgos fenotípicos específicos de los aislados y en la virulencia de *N. caninum*.

En el capítulo 4 se desarrollan los materiales y métodos, resultados y discusión del Objetivo 1 (Identificación de posibles factores de virulencia en *N. caninum*). Como la presente tesis opta a Mención Internacional, los resultados aquí presentados han sido redactados en inglés. Los resultados obtenidos de este trabajo fueron publicados en la revista *International Journal for Parasitology* (DOI: 10.1016/j.ijpara.2020.02.003).

COMPARATIVE TACHYZOITE PROTEOME ANALYSES AMONG SIX *Neospora caninum* ISOLATES WITH DIFFERENT VIRULENCE (OBJECTIVE 1)

The biological variability among *Neospora caninum* isolates has been widely shown, however, the molecular basis that determines this diversity has not been thoroughly elucidated to date. The latest studies have focused on a limited number of isolates. Therefore, the goal of the present study was to compare the proteome of a larger number of *N. caninum* isolates with different origins and virulence. Label-free LC-MS/MS was used to investigate the tachyzoite proteomic differences among Nc-Bahia, Nc-Spain4H and Nc-Spain7, representing high virulence isolates and Nc-Ger6, Nc-Spain2H and Nc-Spain1H, representing low virulence isolates. Pairwise comparisons between all isolates and between high virulence and low virulence groups identified a subset of proteins with higher abundance in high virulence isolates. These proteins were involved in energy and redox metabolism, and DNA/RNA processing, which might determine the faster growth rates and parasite survival of the high virulence isolates. Highlighted proteins included a predicted member of the rhoptry kinase family ROP20 specific for *N. caninum*, Bradyzoite pseudokinase 1 and several dense granule proteins. DNA polymerase, which was more abundant in all high virulence isolates in all comparisons, might also be implicated in virulence. These results reveal insights into possible mechanisms involved in specific phenotypic traits and virulence in *N. caninum*, and the relevance of these candidate proteins for *N. caninum* virulence deserves further investigation.

1. Introduction

Bovine neosporosis is one of the main causes of abortion in cattle worldwide (Dubey et al., 2007; Dubey & Schares, 2011), involving significant economic losses to the beef and dairy industries (Reichel et al., 2013). This disease is caused by *Neospora caninum*, an obligate intracellular apicomplexan parasite phylogenetically related to *Toxoplasma gondii*.

Virulence characterization among *N. caninum* isolates has demonstrated intraspecific variability. *In vitro*, previous studies have shown significant variations in invasion and tachyzoite growth (Regidor-Cerrillo et al., 2011; Dellarupe et al., 2014b; Jiménez-Pelayo et al., 2017). *In vivo*, *N. caninum* isolates exhibit differences in causing mortality, vertical transmission and foetal death observed both in pregnant mice (Rojo-Montejo et al., 2009b; Regidor-Cerrillo et al., 2010; Dellarupe et al., 2014a) and in pregnant cattle models of neosporosis (Rojo-Montejo et al., 2009a; Chryssafidis et al., 2014; Regidor-Cerrillo et al., 2014; Jiménez-Pelayo et al., 2019b). Higher invasion rates and faster growth *in vitro* were identified in most isolates that were more virulent *in vivo*, indicating that certain *in vitro* phenotypes are predictive of *in vivo* virulence (Regidor-Cerrillo et al., 2011). This correlation between virulence in the bovine versus murine model is not always observed, for example, the Nc-Bahia isolate is highly virulent in the murine model but only moderately virulent in the bovine model (Chryssafidis et al., 2014; Dellarupe et al., 2014a). Nevertheless, for other isolates, such as Nc-Spain1H or Nc-Spain7, the correlation in virulence between both *in vivo* models was notably high (Rojo-Montejo et al., 2009b,a; Regidor-Cerrillo et al., 2010, 2014).

Moreover, recent studies have revealed that *N. caninum* modulates the cattle innate immune response in selected target cells (macrophages, trophoblasts) in an isolate-dependent manner (García-Sánchez et al., 2019b; Jiménez-Pelayo et al., 2019b). Nonetheless, knowledge of the molecular basis and mechanisms that underlie such biological diversity in *N. caninum* is limited.

In *T. gondii*, virulence differences have been associated with genetically polymorphic virulence factors such as the rhoptry proteins ROP5, ROP18, ROP16 and GRA6 (Saeij et al., 2006; El Hajj et al., 2007; Reese et al., 2011; Behnke et al., 2011; Ma et al., 2014) and their interaction with host proteins modulating cellular functions. Additionally, the allelic combinations of virulence factors such as ROP18 and ROP5 can explain some differences in strain virulence (Behnke et al., 2012). However, in *N. caninum*, little diversity has been detected for most of the major potential target loci, including antigen genes (Beck et al., 2009), and polymorphisms in key genes responsible for virulence differences have not been described (Calarco et al., 2018). Recently, Khan et al. (2019a) genotyped a large panel of *N. caninum* isolates collected worldwide from a wide host range, coupled with whole genome sequencing and the results support a global selective sweep of a single lineage of *N. caninum* with limited polymorphism genomewide (Khan et al., 2019a). Therefore, the differential gene expression or protein abundance between isolates based on epigenetic and copy number

variation of these genes could have a key role in explaining such variability.

Comparative transcriptomic and proteomic analyses between isolates have been performed to help to elucidate the virulence factors in *N. caninum* (Regidor-Cerrillo et al., 2012; Horcajo et al., 2017, 2018). These comparisons have shown differences in gene expression and protein abundance between isolates with marked differences in virulence. These results could explain, at least partially, the biological differences observed between these isolates. However, previous studies have compared only two (Horcajo et al., 2017, 2018) or three isolates (Regidor-Cerrillo et al., 2012) with known virulence and, in addition, they found a weak correlation between gene expression and protein abundance which highlights the importance of post-transcriptional regulation in these parasites.

High-throughput proteomics techniques such as LC-MS/MS could offer a more detailed picture than the transcriptome of the molecular basis for virulence and phenotypic diversity in *N. caninum*. Therefore, the goal of this study was to compare the tachyzoite proteome of six well-characterised isolates with different origins (canine and bovine) and with important differences in virulence. Nc-Bahia, Nc-Spain7 and Nc-Spain4H were included as representatives of high virulence isolates and Nc-Ger6, Nc-Spain1H and Nc-Spain2H represented low virulence isolates. These results may help to elucidate the mechanisms involved in specific phenotypic traits and virulence in *N. caninum*.

2. Materials and methods

2.1. Panel of isolates

The isolates included in this study were representative of high virulence (Nc-Spain7, Nc-Spain4H and Nc-Bahia) and low virulence (Nc-Spain2H, Nc-Spain1H and Nc-Ger6) according to their behaviour *in vitro* (invasion, tachyzoite yield and growth) and *in vivo* in pregnant mice (mortality and vertical transmission) and pregnant cattle models (foetal death and vertical transmission) of neosporosis (Fig. 4.1) (Rojo-Montejo et al., 2009b,a; Regidor-Cerrillo et al., 2010, 2011, 2014; Chryssafidis et al., 2014; Dellarupe et al., 2014b,a; Jiménez-Pelayo et al., 2019b). Data obtained from *in vitro* studies (invasion rate at 4 h, growth rate and tachyzoite yield at 56 h pi) were normalised using reference Nc-Liverpool data. Growth rates (μ) for Nc-Bahia and Nc-Ger6 were estimated according to the formula $LN = LN_0 + \mu t$, where N is the maximum number of parasites at time “ t ” (Tachyzoite yield at 56 h pi), N_0 is the initial number of parasites (number of parasites invaded according to invasion rate at 4 h pi), t is generation time (48 h pi, considering a lag phase of 8 h pi) and μ is the growth rate.

2.2. Parasite culture

Parasites were routinely maintained in a monolayer culture of the MARC-145 cell line, as previously described (Regidor-Cerrillo et al., 2011). Briefly, cells were cultured for 24 h

CAPÍTULO 4. COMPARATIVE TACHYZOITE PROTEOME ANALYSES AMONG SIX *Neospora caninum* ISOLATES WITH DIFFERENT VIRULENCE (OBJECTIVE 1)

in DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% heat inactivated FCS, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml) (Gibco BRL, Paisley, UK) in 5% CO₂/ 37°C. Then, cell monolayers were inoculated with an adjusted multiplicity of infection (MOI) of 0.5-3, depending on the invasion and growth capacities of each isolate, for parasite passaging onto a new MARC-145 monolayer every 3-4 days. Most of the *N. caninum* isolates used in this study were subjected to a limited number of culture passages (from nine to 22). Nc-Bahia was previously maintained for an undetermined passage number in Vero cells, and the passage number was assigned after change to MARC-145 (passage 12).

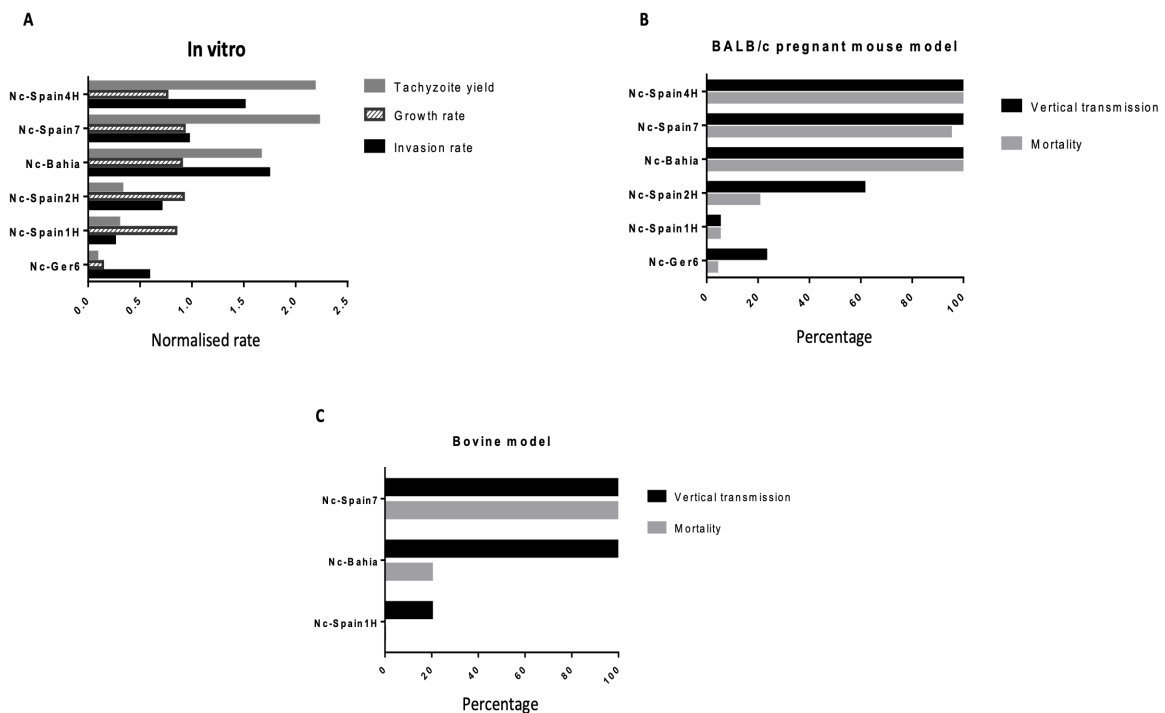


Figure 4.1: Phenotypic description of the *Neospora caninum* (Nc) isolates included in the study, *in vitro* (A), in a pregnant BALB/c mouse model (B) and in a 70-day pregnant cattle model (C). (A) Columns represent the invasion rate at 4 h, growth rate and tachyzoite yield at 56 h p.i. (Regidor-Cerrillo et al., 2011; Dellarupe et al., 2014b,a). (B) Columns represent pup mortality and vertical transmission in pregnant mice infected with 2×10^6 tachyzoites of Nc-Spain1H (Rojo-Montejo et al., 2009b), Nc-Spain7, Nc-Spain4H, Nc-Spain2H, (Regidor-Cerrillo et al., 2010), Nc-Bahia and Nc-Ger6 (Dellarupe et al., 2014a) in a pregnant mouse model. (C) Columns represent foetal loss (mortality) and vertical transmission in pregnant cattle inoculated with 10^7 tachyzoites of Nc-Spain1H (Rojo-Montejo et al., 2009a), Nc-Spain7 (Regidor-Cerrillo et al., 2014) and 5×10^8 of Nc-Bahia (Chryssafidis et al., 2014) at day 70 of pregnancy.

2.3. Tachyzoite production and protein extraction

All experiments were carried out with six biological replicates for each isolate. MARC-145 monolayers were infected with a selected MOI of one to six, depending on the isolate, to obtain the maximum number of infected cells by the different isolates. At 24 h pi, medium from cultures was replaced with DMEM supplemented with penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), without FCS. Tachyzoites were recovered at 56-68 h pi (depending on the isolate) when the majority of the parasites were still intracellular, with some beginning to egress. Cultures were collected by cell scraping in 5 ml of PBS supplemented with a protease and phosphatase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) passaged by 25 G needles for host cell disruption and purified using Disposable PD-10 Desalting Columns (Sephadex G-25 columns; G.E. Healthcare, Buckinghamshire, UK). Tachyzoite viability and number were checked by trypan blue exclusion followed by counting in a Neubauer chamber. Then, parasites were pelleted by centrifugation at 1350g for 10 min and stored at -80°C until tachyzoite proteomic analyses could be performed. The entire process was carried out at 4°C .

For the protein extraction, pellets of 1.5×10^8 tachyzoites were suspended in a radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) supplemented with a protease and phosphatase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), according to the manufacturer's instructions. The supernatant was collected and the protein concentration was measured by a Bradford assay (Quick Start™ Bradford 1× Dye Reagent, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

2.4. LC-MS/MS analyses

2.4.1. Digestion and desalting of peptides

Fifty micrograms of each protein extract were concentrated in a stacking gel for elimination of contaminants that could interfere with MS-MS analyses. The bands of proteins were cut from the acrylamide gel for gel trypsin digestion. Briefly, the protein bands were reduced in gel with DTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), alkylated with Iodacetamide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and digested with 4 μg of recombinant Trypsin (Trypsin sequencing grade; Roche, Mannheim, Germany) overnight at 37°C (Sechi & Chait, 1998).

The peptides from the digested proteins were desalted and concentrated with C18 reverse phase chromatography (OMIX C18, Agilent Technologies, Santa clara, CA, USA), and the peptides were eluted with 80% acetonitrile/0.1% trifluoroacetic acid (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). Finally, the samples were freeze-dried in Speed-vac (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) and resuspended in 2% Acetonitrile, 0.1% formic acid (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) before the Nano LC-MS/MS analysis. The supernatants were stored at -20°C until analysis was performed.

2.4.2. LC-MS/MS

The desalted peptides were analysed by a reversed phase liquid chromatography electrospray ionisation tandem mass spectrometry (RP-LC-ESI-MS/MS) in an EASY-nLC 1000 System coupled to the Q-Exactive HF mass spectrometer (an ultra high-field mass orbital analyzer) through the Nano-Easy spray source (all from Thermo Scientific, Bremen, Germany).

Peptides were loaded first onto an Acclaim PepMap 100 Trapping column (Thermo Scientific, 20 mm × 75 µm inner diameter (ID), 3 µm of C18 resin with 100 Å pore size, Thermo Scientific, Germering, Germany) using buffer A (mobile phase A: 2% acetonitrile, 0.1% formic acid) and then separated and eluted on a C18 resin analytical column NTCC (150 mm × 75 µm ID, 3 µm C18 resin with 100 Å pore size, Nikkyo Technos Co., Ltd., Tokyo, Japan) with an integrated spray tip. A 145 min gradient of 5-35% Buffer B (100% acetonitrile, 0.1% formic acid), from 35% to 50% in 10 min and finally 10 min more until 95% in Buffer A at a constant flow rate of 250 nL/min.

Data acquisition was performed with a Q-Exactive HF. All data were acquired using data-dependent acquisition (DDA) and in positive mode with Xcalibur 4.0 software (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). For the MS2 scan, the top 15 most abundant precursors with charges of 2-4+ selected in MS 1 scans were selected for higher energy collisional dissociation (HCD) fragmentation with a dynamic exclusion of 20 s. The MS1 scans were acquired at a m/z range of 350-2,000 Da with a mass resolution of 60,000 and an automatic gain control (AGC) target of 3E6 at a maximum Ion Time (ITmax) of 60 ms. The threshold to trigger MS2 scans was 2E3; the normalised collision energy (NCE) was 27%; the resolved fragments were scanned at a mass resolution of 30,000 and an AGC target value of 1E5 in an ITmax of 100 ms.

2.4.3. Protein identification

Peptide identifications from raw data were carried out using the Mascot v. 2.6.1 (Matrix-Science, London, UK) search engine through the Protein Discoverer 2.2 Software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A database search was performed against Toxo DB release 26 (<https://toxodb.org>). A database search was also previously filtered against the Mascot 2.3 contaminant database, with the most common contaminating proteins in proteomics experiments such as keratins, BSA, and trypsin. The following parameters were used for the searches: tryptic cleavage, up to two missed cleavage sites allowed, and tolerances of 10 p.p.m. for precursor ions and 0.02 Da for MS/MS fragment ions, and the searches were performed allowing optional methionine oxidation and methionine loss plus acetyl protein N-terminal and fixed carbamidomethylation of cysteine. A search against the decoy database (integrated decoy approach) was used to calculate the false discovery rate (FDR). The Mascot Scores were adjusted by a percolator algorithm. The acceptance criteria for protein identification were an FDR < 1% and at least one unique peptide identified with

high confidence (percolator q -value < 0.01).

2.4.4. Protein quantification

To determine the abundance of the identified peptides and proteins in different isolates, a label-free experiment based on precursor signal intensity was performed. The processing workflow was initiated with the recalibration of masses through a rapid search in Sequest HT (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) against the database and based on the positive identifications, an alignment of the chromatograms of all the samples with a tolerance of up to 10 min. Subsequently, the alignment of the retention times between the different samples analysed for the quantification of the precursor ions was performed, taking into account the unique peptides and the razor peptides (peptides that can be assigned to more than one protein in a protein group) present in at least 30% of the replicates. Finally, the results were normalised to the total amount of the peptides, equalling the total abundance among the different samples.

2.4.5. Data analysis

Two types of analyses were conducted. In the first analysis, pairwise comparisons with all possible combinations between isolates were performed. A second data analysis was carried out to detect those proteins that could be common among isolates with relevance to virulence. To identify those proteins with higher or lower abundance depending on the isolate's virulence, the isolates were grouped into high virulence isolates (Nc-Spain7, Nc-Spain4H and Nc-Bahia) and low virulence isolates (Nc-Spain1H, Nc-Spain2H and Nc-Ger6), and differential expression analysis between these two groups was performed.

A nested design with a pairwise ratio approach calculation was used in these experiments, where the protein ratios were calculated as the median of all possible pairwise ratios calculated between the six biological replicates of all connected peptides. For the second analysis, each biological replicate was formed by a replicate from the three isolates from each group (e.g., replicate 1 from Nc-Bahia, Nc-Sp4H, Nc-Sp7 versus replicate 1 from Nc-Sp1H, Nc-Sp2H, Nc-Ger6). After the analyses were completed, a final report presented the list of peptide groups and proteins with normalised abundances and selected ratios. The Proteome Discoverer application includes a statistical feature (Anova Background) for assessing the significance of differential expression by providing P values and adjusted P values (q -values) for those ratios. Only proteins identified with high confidence (FDR < 1%) with at least one unique peptide, abundance ratio variability < 30%, q -value < 0.05 and fold change > 1.5 were considered to be differentially expressed between groups.

The mass spectrometry proteomics data have been deposited in the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE (Vizcaíno et al., 2016) partner repository with the dataset identifier *PXD016173*.

Identified proteins in each isolate were showcased in an upset plot, to visualise intersections of the data (Lex et al., 2014).

The proteins with differential abundance were classified according to their functionality by the Gene Ontology (GO) terms (annotated and predicted) on the ToxoDB website (Gajria et al., 2008) and UniprotKB website for the *N. caninum* isolate Nc-Liverpool and *T. gondii* syntenic orthologues. Proteins differentially abundant between high and low virulence groups that remained as hypothetical were also analysed using The Phyre2 web portal (Kelley et al., 2015) for protein modelling, prediction and analysis. Three out of 11 submitted proteins had a high confidence model, these included NCLIV_002350, NCLIV_021570 and NCLIV_048390, and this result was used for their classification.

2.4.6. Principal components analysis (PCA)

Proteome Discoverer includes principal component analysis (PCA) to identify the major components in a protein data set using abundance normalised values. The input data used for PCA were the master proteins identified with high confidence in the *N. caninum* database, without taking contaminating proteins into account.

3. Results and discussion

In this study, proteomic differences between high and low virulence isolates were investigated by LC-MS/MS. All isolates used in this study have been well characterised *in vitro* (Regidor-Cerrillo et al., 2011; Dellarupe et al., 2014b) and *in vivo* in a standardised pregnant mouse model (Rojo-Montejo et al., 2009b; Regidor-Cerrillo et al., 2010; Dellarupe et al., 2014a) of neosporosis, which has served for their classification as high or low virulence isolates. At present, only Nc-Spain7, Nc-Spain1H and Nc-Bahia isolates have been studied in a pregnant bovine model (Rojo-Montejo et al., 2009a; Chryssafidis et al., 2014; Regidor-Cerrillo et al., 2014; Jiménez-Pelayo et al., 2019b). The results obtained in cattle with Nc-Spain7 and Nc-Spain1H isolates corroborated those obtained in the murine model, defining Nc-Spain7 and Nc-Spain1H as high and low virulence isolates, respectively. The Nc-Bahia isolate was considered a high virulence isolate based on the results obtained both *in vitro* and *in vivo* in the murine model. However, in the cattle model, although high vertical transmission was recorded, the number of observed foetal deaths was moderate. This discrepancy could be due to several factors such as the number of parasite passages in tissue culture, inoculum preparation and doses, which can influence the final outcome of the infection (Benavides et al., 2014), and further studies should be performed to confirm this result. Although LC-MS/MS technology provides a suitable tool for global proteome discovery, we cannot ignore some limitations such as the possible lack of detection of membrane proteins. In addition, the poorly annotated *N. caninum* genome could also contribute to the loss of useful information. Functional studies and improvements in the current annotation

of this species are needed to enhance the knowledge of the molecular basis of virulence in this parasite.

3.1. LC-MS/MS analysis

In this study, a total of 1989 proteins were identified with high confidence (FDR <1% and q -value <0.01) (Supplementary Tables S1 and S2). The predicted number of *N. caninum* proteins is 7122, based on the number of proteins deposited in the UniProt database (ToxoDB, *Neospora caninum* strain Liverpool), and therefore the identified proteins covered 28% of the *N. caninum* proteome. A similar number of predicted proteins were identified in studies on the *T. gondii* proteome (Xia et al., 2008; Zhou et al., 2017). In previous LC-MS/MS studies on *N. caninum*, a smaller number of proteins were identified (1390) (Horcajo et al., 2018). However, in that study, at least two unique peptides were required for reporting protein identifications but only one unique peptide in the present work. Nevertheless, more than 90% of proteins identified in this previous work were also identified in the present work. The number of identified proteins for each isolate varied from 1862 to 1956, (Supplementary Table S3), although the majority of proteins were identified in all isolates (1773), and there were few unique proteins (from zero proteins in Nc-Spain7 up to eight in Nc-Spain4H) (Fig. 4.2, and Supplementary Table S4). The majority of unique proteins were hypothetical, but some proteins had annotations such as the orthologue of the protein of dense granules TgGRA32 (NCLIV_049090) in Nc-Bahia or a predicted rhoptry kinase, subfamily ROP30 (NCLIV_001950) in Nc-Spain2H and some SRS (SAG1-related sequences) domain-containing proteins in Nc-Spain4H or Nc-Bahia. These unique proteins could be important in the specific biological behaviour of each isolate.

3.2. Pairwise comparison analyses

The PCA showed a good grouping of all replicates of each isolate (Fig. 4.3). Strikingly, PCAs segregated isolate replicates, regardless of their virulence (i.e., Nc-Ger6 and Nc-Bahia, classified as differentially virulent, were separated from the remaining isolates by PC1 components) (Fig. 4.3). The number of proteins with differential abundance in each comparison is presented in Table 4.1 (and Supplementary Tables S5-S19). Differentially abundant (DA) proteins varied from 41 to 133 proteins with always less than 10% of quantified proteins. Similar to the PCAs, the isolates with the largest differences were notably close isolates by origin and virulence (Nc-Spain7 and Nc-Spain4H isolates). In contrast, the isolates with the fewest differences in protein abundance were isolates of different virulence (Nc-Spain1H and Nc-Spain7). These results are a reflection of the whole proteome of the isolates in which many proteins related to functions other than virulence are involved. Considering the low number of proteins that have been described as involved in virulence in these apicomplexan parasites, these results are not surprising.

CAPÍTULO 4. COMPARATIVE TACHYZOITE PROTEOME ANALYSES AMONG SIX *Neospora caninum* ISOLATES WITH DIFFERENT VIRULENCE (OBJECTIVE 1)

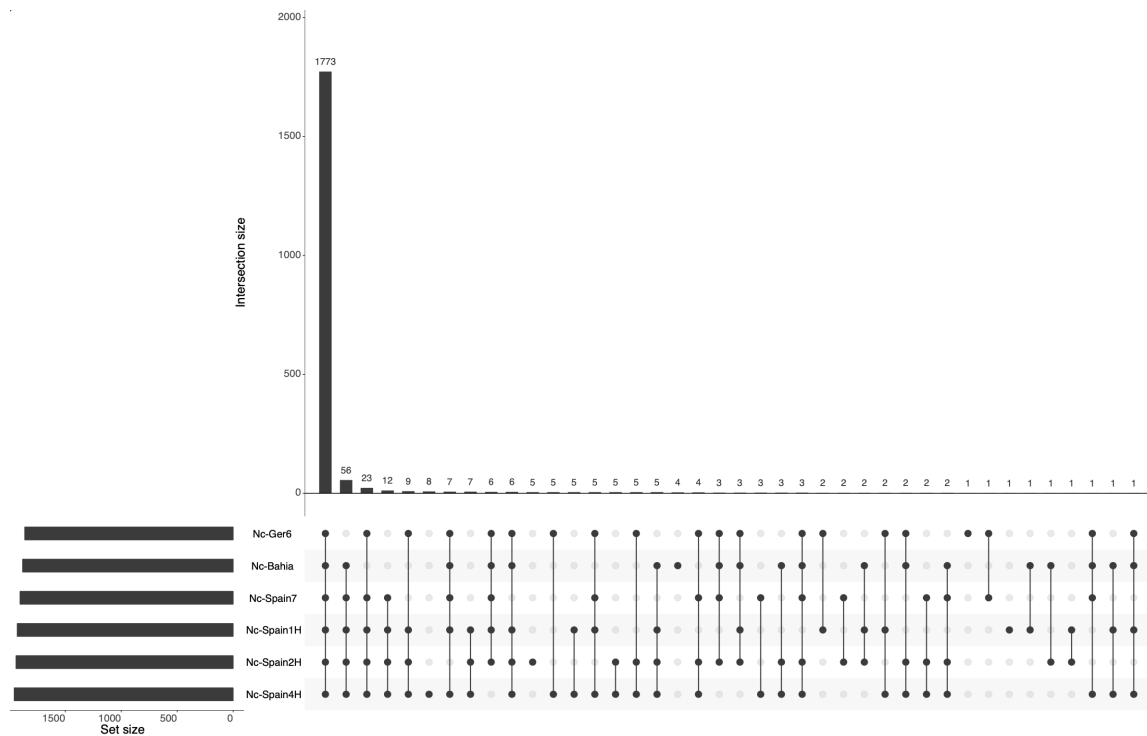


Figure 4.2: Upset plot of protein identifications for *Neospora caninum* (Nc) isolates (Nc-Ger6, Nc-Bahia, Nc-Spain7, Nc-Spain1H, Nc-Spain2H and Nc-Spain4H) by LC-MS/MS analysis.

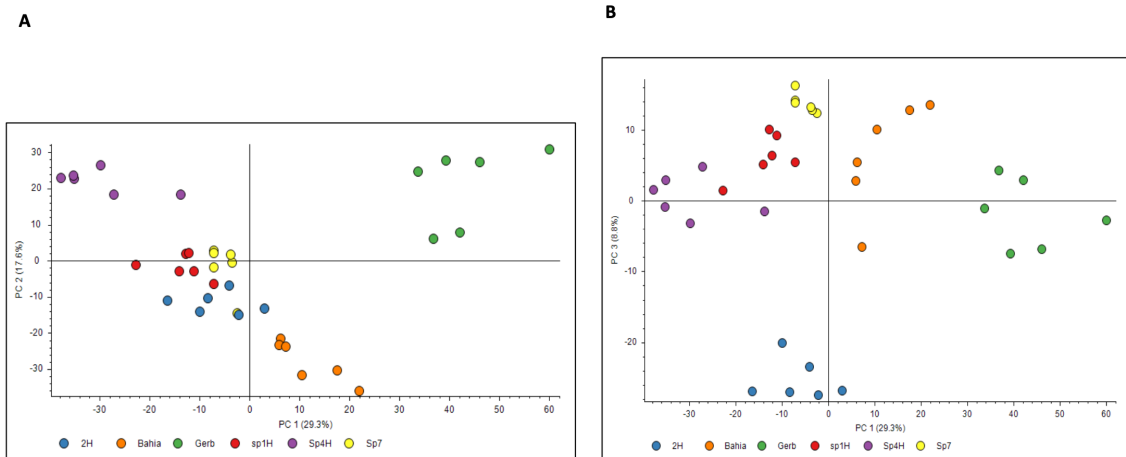


Figure 4.3: Principal component analyses of *Neospora caninum* (Nc) isolate replicates, Nc-Spain2H (2H), Nc-Bahia (Bahia), Nc-Ger6 (Gerb), Nc-Spain1H (sp1H) and Nc-Spain7 (Sp7), by LC-MS/MS analyses in isolate pairwise comparisons. Graph PC1&PC2 (A) and graph PC1&PC3 (B) each show grouping of isolate replicates and segregation among all isolates.

Table 4.1: The number of proteins with differential abundance between *Neospora caninum* (Nc) isolates in pairwise comparisons with high confidence (false discovery rate <1%), abundance ratio variability <30%, q-value <0.05 and fold change >1.5.

	Protein quantified	q-value <0.05	Abundance ratio positive	Abundance ratio negative
Nc-Spain7 / Nc-Spain1H	1483	41	15	26
Nc-Spain7 / Nc-Spain2H	1469	96	41	55
Nc-Spain7 / Nc-Ger6	1084	72	43	29
Nc-Spain4H / Nc-Spain1H	1448	54	36	18
Nc-Spain4H / Nc-Spain2H	1266	87	34	53
Nc-Spain4H / Nc-Ger6	1091	68	49	19
Nc-Bahia / Nc-Spain1H	1188	89	31	58
Nc-Bahia / Nc-Spain2H	1261	51	25	26
Nc-Bahia / Nc-Ger6	1162	97	72	25
Nc-Spain7 / Nc-Spain4H	1462	133	28	105
Nc-Spain7 / Nc-Bahia	1242	60	28	32
Nc-Spain4H / Nc-Bahia	1139	44	28	16
Nc-Spain1H / Nc-Spain2H	1458	52	27	25
Nc-Spain1H / Nc-Ger6	1416	97	78	19
Nc-Spain2H / Nc-Ger6	1333	98	84	14

According to the objective of this work, we focused on the comparisons between isolates of high and low virulence. Most of the DA proteins were specific for each comparison. We focussed on those proteins with a pattern of differential expression that might explain something about the different behaviour or virulence among isolates. These proteins were categorised according to their function and/or localization (Fig. 4.4). In all categories, there were proteins with higher abundance in high and low virulence isolates.

3.2.1. Proteins involved in host cell attachment and invasion

Adhesion and invasion processes are *in vitro* phenotypes correlated with virulence (Regidor-Cerrillo et al., 2011). High virulence isolates show higher rates of invasion in *in vitro* studies compared with low virulence isolates (Fig. 4.1) (Regidor-Cerrillo et al., 2011; Dellarupe et al., 2014b). Effectors related to these processes are classically SRS-related proteins and microneme (MIC) proteins. In this study, pairwise comparisons showed significant variations in abundance of SRS proteins among isolates. NcSAG3 (NCLIV_034740) was less abundant in Nc-Ger6 versus the three high virulence isolates. TgSAG3 is found in both tachyzoites and bradyzoites, and participates in cellular invasion and attachment, mediating the binding of *T. gondii* to cell surface proteoglycans (Jacquet et al., 2001). By contrast, NcSAG3 was more abundant in Nc-Spain1H versus Nc-Spain7 in previous studies (Horcajo et al., 2017, 2018), although it was not detected in this study. Conversely, the orthologue of TgSRS16E (NCLIV_010050) protein had higher abundance in Nc-Ger6 compared with all high virulence isolates and in all low virulence isolates compared with Nc-Spain4H. SRS domain containing proteins are not only involved in adhesion and invasion processes but are also highly immunogenic proteins. Differences in these proteins may also be related to a different stimulation of the immune system observed between the different isolates (Lekutis et al., 2001; García-Sánchez et al., 2019b; Jiménez-Pelayo et al., 2019a). It has been suggested that the high virulence isolate Nc-Spain7 stimulates the host immune system less

than the low virulence isolate Nc-Spain1H (Jiménez-Pelayo et al., 2019a). These properties could be responsible for the higher growth rate of the high virulence isolate Nc-Spain7 than Nc-Spain1H in bovine monocyte-derived macrophages (García-Sánchez et al., 2019b). Differences in the abundance of SRS proteins could also be involved in isolate-dependent differences in host cell responses to the parasite.

On the other hand, the secretion of MIC proteins is necessary for the establishment of more stable adhesion between the tachyzoite and the host cell (Hemphill et al., 2006, 2013). NcMIC17B (NCLIV_038110) was more abundant in the Nc-Spain1H versus Nc-Spain7 isolate in a previous work (Horcajo et al., 2018), but in this study, it was more abundant in all high virulence isolates versus Nc-Spain1H, but also in Nc-Spain2H versus Nc-Spain4H isolate so, in this study the DA of any MIC protein could be related with the biological behaviour of the isolates.

Effectors related to glideosome have been proposed as powerful machinery related to invasion processes (Boucher & Bosch, 2015) and some previous studies have corroborated the higher expression of glideosome proteins in isolates with higher invasion rates (Horcajo et al., 2017; García-Sánchez et al., 2019a). However, our results are inconclusive in this regard.

3.2.2. Rhoptry and dense granule proteins

Secreted effectors such as dense granule and rhoptry proteins were differentially regulated between isolates. Rhoptry proteins are considered important virulence factors in *T. gondii* (Sibley et al., 2009; Behnke et al., 2015) and are responsible for host gene transcription modulation (Hakimi et al., 2017). In *N. caninum*, NcROP5 and NcROP16 have been described as key virulence factors (Ma et al., 2017a,b), but we did not find any differentially expressed genes in our study. In contrast, bradyzoite pseudokinase 1 (BPK1) (NCLIV_007770), a predicted member of the rhoptry kinase family ROP20 specific for *N. caninum* (NCLIV_068850) and a predicted rhoptry pseudokinase, subfamily ROP50 (NCLIV_065640), appeared more abundant in highly virulent isolates in different comparisons (Fig. 4.4). These proteins could be related to phenotypic traits of virulence since in previous transcriptomic and proteomic studies, BPK1 and the predicted rhoptry kinase family ROP20 specific for *N. caninum* were already found to be more abundant in the high virulence isolate Nc-Spain7 (Horcajo et al., 2017, 2018; García-Sánchez et al., 2019a). BPK1 plays a crucial role in the *in vivo* development of *Toxoplasma* cysts (Buchholz et al., 2013); however, there are no studies in *Neospora* on any of these ROP proteins. The orthologue of TgRON8 (NCLIV_070010) was more abundant in all low virulence isolates versus Nc-Spain4H. This protein facilitates host cell attachment and invasion in *T. gondii* (Straub et al., 2011), and the abundance of this protein in the isolates with the lowest rates of *in vitro* invasion could be an alternative mechanism of invasion of these isolates.

Dense granule proteins are secreted either during the process of invasion into the parasitophorous vacuole (PV) or afterwards, and play a role in forming and modifying PVs

(Mercier et al., 2005). As ROP proteins, some of them are recognised virulence factors in *T. gondii*, e.g., GRA6, GRA7, GRA15, GRA16 and GRA24 (Rosowski et al., 2011; Bougdour et al., 2013; Braun et al., 2013; Ma et al., 2014; Alaganan et al., 2014). In *N. caninum*, characterization of GRA proteins is more limited and notably few virulence factors have been described, including NcGRA17, which plays a regulatory role in the morphology of the PV (Yang et al., 2018) and NcGRA7, and it has been reported that a knockout of this protein in *N. caninum* reduces the virulence of the parasite in mice (Nishikawa et al., 2018). In our study only NcGRA7 (NCLIV_021640) was more abundant in the high virulence isolate Nc-Spain7 compared with the low virulence isolate Nc-Spain2H. The proteins NcGRA6 (NCLIV_052880), the orthologue of TgGRA8 (NCLIV_008990) and the orthologue of TgGRA32 (NCLIV_049090) were also more abundant in highly virulent isolates in more than one comparison. Interestingly, the orthologue of TgGRA32 was only identified in the Nc-Bahia isolate. This isolate had different behaviours in bovine and murine *in vivo* models (Chryssafidis et al., 2014; Dellarupe et al., 2014a) and further investigations on the peculiarities of this isolate could help us define species specific virulence factors.

3.2.3. Metabolism and redox mechanisms

Metabolic regulation can also be involved in the differences between isolates (Song et al., 2013). In a previous transcriptomic analysis of Nc-Spain7 and Nc-Spain1H isolates in trophoblast cells and bovine macrophages, a great number of genes related to *N. caninum* metabolism had higher expression in the high virulence isolate (Horcajo et al., 2017; García-Sánchez et al., 2019a). In this study, a greater number of proteins related to metabolism of carbohydrates and energy, and lipid or glycerophospholipid metabolism, also showed higher abundance in some comparisons in high virulence isolates. It is worth highlighting two proteins related to lipid metabolism (the lysophospholipase related protein, NCLIV_044560; and fatty-acyl-CoA binding molecular function, NCLIV_066640) that had the same profile: more abundance in the three high virulence isolates versus Nc-Spain2 and Nc-Ger6 isolates and in Nc-Bahia compared with the Nc-Spain1H isolate. Glycolysis is one of the main sources of obtaining energy in the form of ATP but proteins related with glycolysis were more abundant in high virulence isolates as Putative Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH, NCLIV_000940) and phosphoenolpyruvate synthase (NCLIV_042830) were found in a reduced number of comparisons. In *T. gondii* it has been reported that strain-specific growth rates and virulence are driven by altered metabolic capacities (Song et al., 2013). A higher abundance of proteins involved in carbohydrate, lipid and energy metabolism could explain a more efficient mechanism to obtain energy and the faster growth rates of the high virulence isolates.

Some proteins from antioxidant and stress response systems had different abundances between isolates. In *T. gondii*, redox is a mechanism to survive in the host cell macrophage and increase virulence, diminishing oxygen radical production in the host cell (Shrestha et al., 2006). Recently, it has been observed that the high virulence isolate Nc-Spain7 showed

CAPÍTULO 4. COMPARATIVE TACHYZOITE PROTEOME ANALYSES AMONG SIX *Neospora caninum* ISOLATES WITH DIFFERENT VIRULENCE (OBJECTIVE 1)

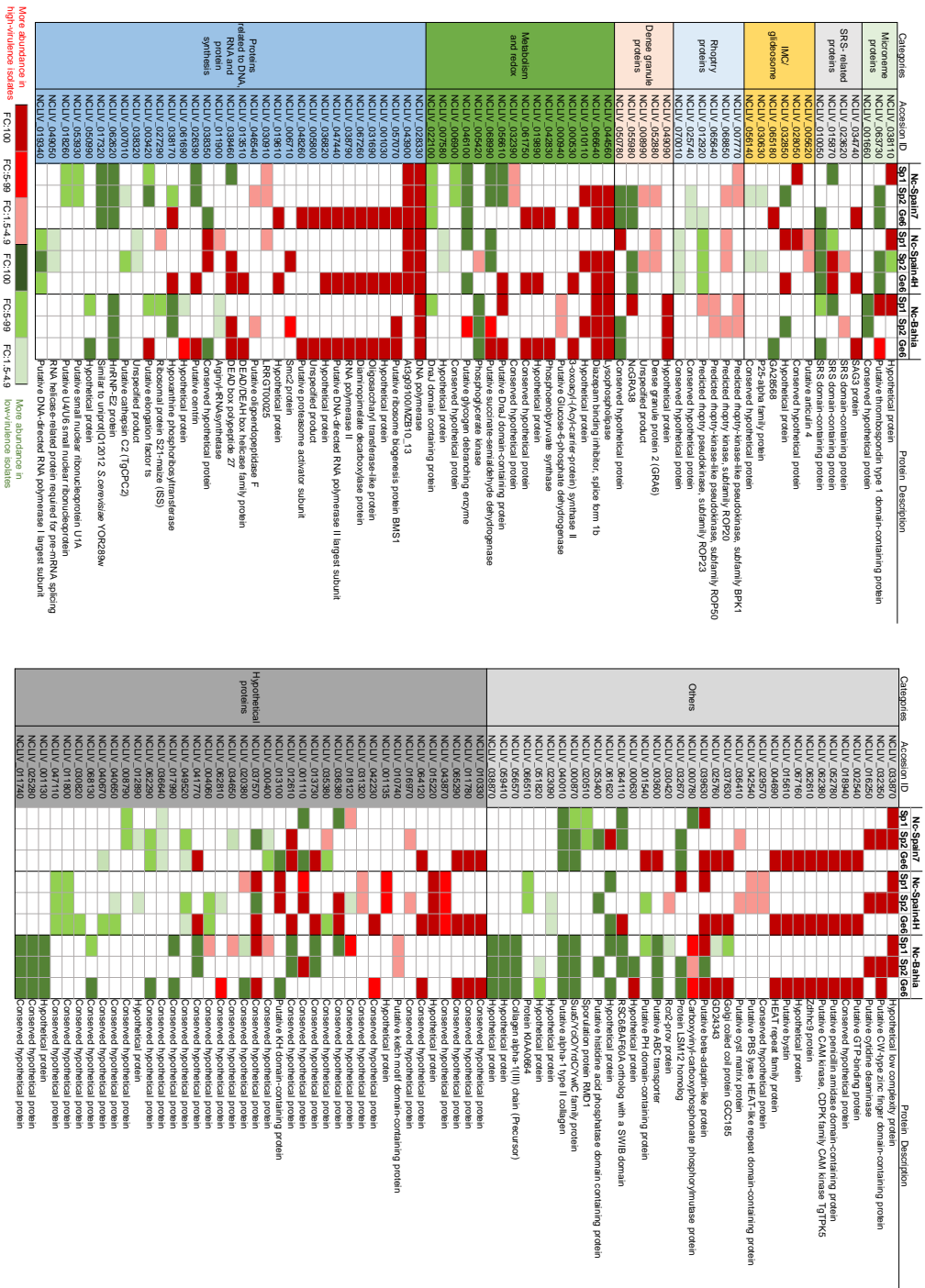


Figure 4.4: Selected differentially abundant proteins in more than two comparisons between high (Nc-Spain7, Nc-Spain4H and Nc-Bahia) and low (Nc-Spain1H (Sp1), Nc-Spain2H (Sp2) and Nc-Ger6 (Ge6)) virulence *Neospora caninum* (Nc) isolates quantified by LC-MS/MS analysis. Cells in red highlight proteins that are more abundant (>1.5 fold change q -value < 0.05) in highly virulent isolates, and cells in green highlight proteins that are more abundant in low virulence isolates. Cells in white indicate no variation in abundance. Different colour intensities represent different fold changes. The highest intensity of colour represents the highest fold change (FC=100), medium intensity of colour represents fold changes from 5 to 99 and the lowest intensity of colour represents fold changes from 1.5 to 4.99.

lower reactive oxygen species (ROS) and IFN- γ production, and a higher survival rate, than the low virulence isolate Nc-Spain1H in bovine macrophages (García-Sánchez et al., 2019b,a). The orthologues of prostaglandin-E synthase (NCLIV_019890) and of proteasome interacting thioredoxin domain-containing protein (NCLIV_061750) were more abundant in the three high virulence isolates compared with the Nc-Ger6 isolate, which had the lowest growth ratio.

3.2.4. DNA, RNA and protein metabolism

Marked evidence was also found in DNA, RNA and protein metabolism among isolates, mechanisms that are strongly related to the high growth capacities of the tachyzoite stage. A DNA polymerase (NCLIV_028330) was the only protein that had higher abundance in all high virulence isolates versus all low virulence isolates (Fig.4.4). High virulence isolates had the highest growth rates *in vitro*, so they need a more efficient DNA replication that could be given by higher abundance of the DNA polymerase. Moreover, in *Leishmania donovani*, over-expression of the DNA polymerase β has been related to an increase in its survival in the presence of oxidative stress (Khan et al., 2019b), a characteristic also demonstrated for the high virulence isolate Nc-Spain7 compared with the low virulence isolate Nc-Spain1H (García-Sánchez et al., 2019b). In addition, mRNA capping protein (NCLIV_043900) was more abundant in Nc-Spain7 and Nc-Spain4H isolates than in all low virulence isolates, which reflects an increased RNA expression in these isolates that had the highest proliferation in *in vitro* studies (Fig. 4.1). This enzyme is essential in the earliest modification in the biogenesis of mRNA, protects the mRNA from degradation and recruits factors that promote RNA splicing, export, and translation initiation (Furuichi & Shatkin, 2000). Interestingly, eight proteins related to RNA expression (RNA polymerase II, putative DNA-directed RNA polymerase II largest subunit and the orthologue of *T. gondii* NLI interacting factor family phosphatase), protein synthesis (putative ribosome biogenesis protein BMS1), protein modification (Oligosaccharyl transferase-like protein, related and the orthologue of *T. gondii* E3 ubiquitin-protein ligase) and protein turnover (putative proteasome activator subunit and Diaminopimelate decarboxylase protein) were more abundant in high virulence isolates only compared with the low virulence isolate Nc-Ger6. The Nc-Ger6 isolate showed the lowest tachyzoite yield, associated with the lowest growth rate and showing a longer lytic cycle *in vitro*, likely due to a lower metabolic rate and limited protein synthesis. The lower metabolic rate and limited protein synthesis can be suggested because the DA proteins were less abundant in Nc-Ger6 in the different comparisons. In addition, it is noteworthy that 11 proteins which were hypothetical or classified as others, due to the lack of sufficient information to be clearly classified, were also more abundant in all high virulence isolates only compared with the low virulence isolate Nc-Ger6. These proteins could be involved in the particular behaviour of this isolate.

3.3. Comparative proteome of high virulence versus low virulence isolates

A principal component analysis was performed to evaluate the effect of grouping the different isolates according to their virulence. When quantitative filters (abundance ratio $P < 0.05$) were applied to protein data set, the PCA plot was able to distinguish virulent isolates from non-virulent ones (Fig. 4.5).

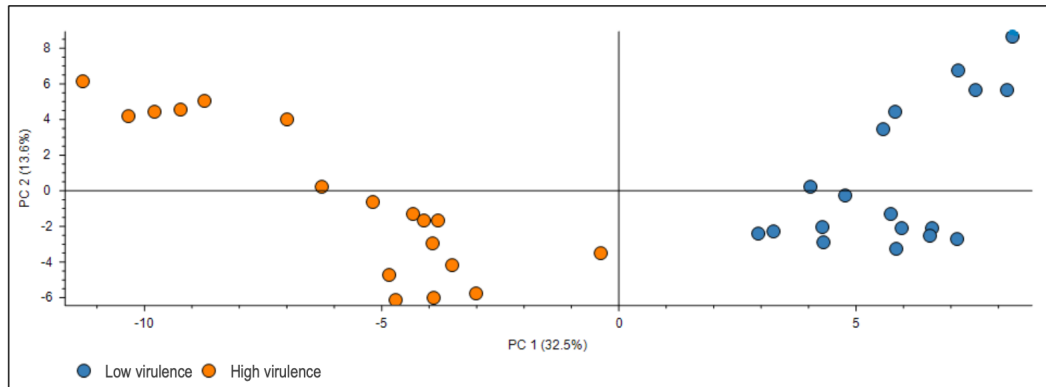


Figure 4.5: Principal component analyses of high and low virulence *Neospora caninum* (Nc) isolate groups comparison. The graph shows the segregation between high (Nc-Spain7, Nc-Spain4H, Nc-Bahia) and low (Nc-Spain1H, Nc-Spain2H, Nc-Ger6) virulence isolates.

Comparative analysis of the high and low virulence groups revealed 63 proteins with significant differences in relative abundance, and 33 and 30 proteins were more abundant in high and low virulence isolates, respectively (Supplementary Tables S20-S22). This finding highlights that among these proteins, 21 and 24 were only quantified in the high and low virulence groups, respectively. In this analysis, 28 new proteins were found to be DA between high and low virulence isolates, which were not previously quantified in pairwise comparisons and could be common virulence factors.

The functional classification of these proteins is presented in Fig. 4.6. Of the quantified proteins, approximately 12% were annotated as hypothetical, and some were also observed among the pairwise comparisons. The percentage of proteins classified as “others” was near to 30%. A similarly large proportion of proteins with ‘unknown function’ were detected in tachyzoites of *T. gondii* (Xia et al., 2008) and sporozoites of *Cryptosporidium* (Sanderson et al., 2008).

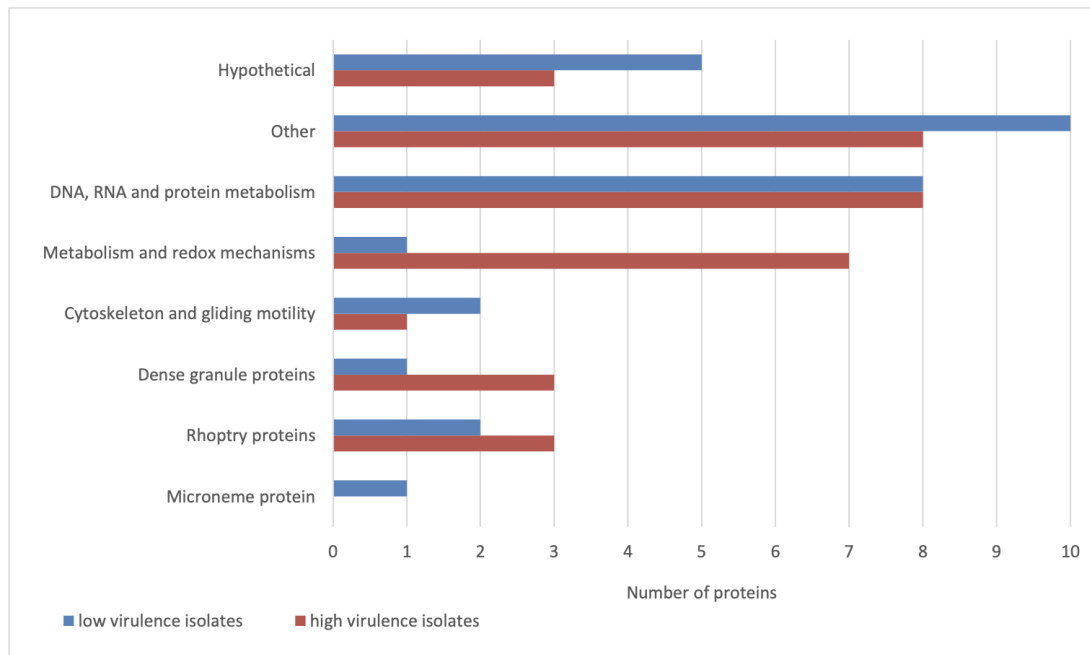


Figure 4.6: Functional classification of the differently abundant proteins (>1.5 and q -value <0.05) in the comparison between high (Nc-Spain7, Nc-Spain4H, Nc-Bahia) and low (Nc-Spain1H, Nc-Spain2H, NcGer6) virulence *Neospora caninum* (Nc) isolates.

3.3.1. Proteins involved in host cell attachment and invasion

Proteins related to adhesion/invasion had higher abundance in low virulence isolates (which display lower capacities of invasion), in a similar way to that described in previous studies (Horcajo et al., 2017, 2018). The microneme protein orthologue of TgMIC15 (NCLIV_063730) was more abundant in the group of low virulence isolates, mainly because it was not quantified in the group of high virulence isolates. In this design, two proteins related to the cytoskeleton and gliding motility were also more abundant in low virulence isolates: p25-alpha family protein (NCLIV_030630) and the orthologue of TgGAP70 (NCLIV_032850), which would not corroborate results of previous studies (Horcajo et al., 2017; García-Sánchez et al., 2019a), although the proteins DA in our study are different from those described previously. In the group of high virulence isolates, only the orthologue of TgIMC24 (NCLIV_028050) was more abundant, but none of the proteins directly involved in adhesion and invasion processes, such as SRS or MIC. Inner membrane complex (IMC) proteins have multiple functions and are involved in asexual division and gametogenesis (Dubey et al., 2017), support parasite motility (Keeley & Soldati, 2004) and contribute to the ability of the parasite to proliferate and cause disease (Chen et al., 2017), and could be related to the higher capacity of invasion and growth of the highly virulent isolates.

3.3.2. Rhoptry and dense granule proteins

Secreted effectors such as dense granule and rophtry proteins were differentially regulated between isolates, with a higher number being more abundant in high virulence isolates. This design showed new DA proteins such as the orthologue of the protease TgSUB2 (NCLIV_057550) and of the rophtry protein TgROP12 (NCLIV_021100), which had higher abundance in low virulence isolates and NcGRA25 (NCLIV_042680), the orthologue of TgGRA16 (NCLIV_003340) and a predicted rophtry pseudokinase, subfamily ROP37 (NCLIV_001460), which was more abundant in the high virulence isolates. The orthologue of TgGRA32, BPK1 and the predicted member of the rophtry kinase family ROP20 specific for *N. caninum* were also more abundant in the high virulence isolates in this analysis, and as main potential virulence factors for *N. caninum*. The orthologue of TgGRA42 (NCLIV_050780) was the only dense granule protein with more abundance in the group of low virulence isolates. The first analysis was also mainly more abundant in low virulence isolates, except for the comparison between Nc-Spain4H and Nc-Spain1H, which was more abundant in the high virulence isolate.

3.3.3. Metabolism and redox mechanisms

A greater number of proteins related to the metabolism of carbohydrates and energy, and lipid or glycerophospholipid metabolism was more abundant in the group of high virulence isolates. These proteins included new proteins involved in carbohydrate metabolism such as the orthologue of triose-phosphate isomerase, TPI-I (NCLIV_046900) and of a putative phosphoacetylglucosamine mutase (NCLIV_040500); proteins involved in isoprenoid biosynthesis such as the orthologue of a trans-polyprenyltransferase (NCLIV_036980); and a putative phospholipase (NCLIV_001135). In addition, the two proteins involved in lipid metabolism (the lysophospholipase-related protein and fatty-acyl-CoA binding molecular function), previously mentioned, and the putative G6PDH were more abundant in the group of high virulence isolates. G6PDH was also related to the maintenance of the cellular redox balance by producing NADPH (Ho et al., 2007), and previously, we showed that G6PDH was also more highly expressed in the high virulence isolate tachyzoite proteome (Regidor-Cerrillo et al., 2012). The level of G6PDH activity of the isolates may determine their sensitivity to oxidative stress and thus their ability to survive in the host cell. Further studies could be of interest to determine the role of *N. caninum* G6PDH. The only protein with more abundance in the group of low virulence isolates was an orthologous of *T. gondii* ubiquinol-cytochrome c chaperone (NCLIV_006900), which is involved in the mitochondrial electron transport chain and redox mechanism.

3.3.4. DNA, RNA and protein metabolism

Proteins related to DNA replication, RNA processing and protein synthesis, and fate were also DA between high and low virulence isolates. A large number of new proteins

were detected in this analysis, such as a hypothetical protein possibly involved in tRNA processing (NCLIV_035010), an orthologue of *T. gondii* AP2 domain transcription factor AP2IX-7 (NCLIV_042620) and a putative dihydrodipicolinate reductase (NCLIV_018380), and an enzyme involved in the lysine biosynthetic process, which were more abundant in the group of high virulence isolates. AP2 transcription factors play a central role in the regulation of apicomplexan gene expression, cell cycle progression, and parasite virulence and host invasion (Walker et al., 2013; Hong et al., 2017; Jeninga et al., 2019). In *T. gondii* the AP2IX-7 factor interacts with GCN5b, a lysine acetyltransferase essential for parasite viability, which has an indispensable role in regulating gene expression required during the lytic cycle (Wang et al., 2014; Harris et al., 2019). In the group of low virulence isolates, new proteins were also detected such as the orthologue of *T. gondii* of a protein related to the proteasome complex: proteasome 26S subunit, non-ATPase, 9, putative (NCLIV_047130), or a structural constituent of ribosome S28 (NCLIV_003680). In previous transcriptomic studies, the low virulence isolate Nc-Spain1H showed higher expression levels of ribosomal proteins (Horcajo et al., 2018). In *T. gondii* these expression levels have been associated with strains that readily switch from tachyzoite to bradyzoite (Croken et al., 2014). Bradyzoite formation is preceded by a parasite cell cycle shift towards slower growth (Jerome et al., 1998) and the low virulence isolates of *N. caninum* have slower *in vitro* growth rates. Prominent proteins involved in DNA replication and RNA processing were mainly more abundant in the group of high virulence isolates with higher growth capacities. It is noteworthy that DNA polymerase and mRNA capping enzyme were confirmed to be more abundant in high virulence isolates.

3.4. Concluding remarks

LC-MS/MS analysis has been demonstrated to be a suitable tool to establish protein variations among *N. caninum* isolates. In this study, the comparative tachyzoite proteome of a wide range of well-characterised isolates with differences in virulence confirmed variations in protein abundance. High virulence isolates showed more abundance in a subset of secreted proteins that may be involved in virulence, such as a predicted member of the rhoptry kinase family ROP20 specific for *N. caninum* or BPK1 and some GRA proteins. Furthermore, proteins other than classical virulence factors may be implicated in virulence. For example, a DNA polymerase that was also more abundant in all high virulence isolates in all comparisons. The role in parasite virulence of candidates highlighted in this work deserves further investigation. Studies based on reverse genetics would be necessary to elucidate the role of these proteins in *N. caninum* virulence *in vivo*.

Supplementary Materials

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.02.003>.

OBJETIVO 2. EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS POSIBLES FACTORES DE VIRULENCIA DE *Neospora caninum* NcGRA7 Y NcROP40

Las comparaciones transcriptómicas y proteómicas entre aislados de alta y baja virulencia han identificado una mayor expresión/abundancia de un conjunto de genes/proteínas específicos en aislados de alta virulencia, proponiendo determinadas proteínas como potenciales factores de virulencia. Entre ellas podemos encontrar la proteína de gránulos densos NcGRA7 y la proteína de las roptrias NcROP40, las cuales han sido previamente estudiadas a lo largo del ciclo lítico de *N. caninum* y como factores vacunales. El objetivo de este estudio fue evaluar el papel de estas dos proteínas en la virulencia de *N. caninum* mediante infecciones experimentales en un modelo de ratón BALB/c gestante, utilizando parásitos *knockout* CRISPR/Cas9 para cada uno de los genes. La delección de NcGRA7 y NcROP40 se asoció a una pérdida parcial de virulencia, ya que los ratones infectados con los parásitos *knockout* mostraron signos clínicos más leves, menor detección y cargas parasitarias en el cerebro, y menores tasas de mortalidad en comparación con los infectados con el parásito de tipo salvaje (Nc-Spain7). Además, se registró una mejora significativa de los tiempos medios de supervivencia en las crías de las madres infectadas con los parásitos *knockout*, aunque no se detectaron diferencias en las tasas de mortalidad neonatal. En general, los ratones infectados con los parásitos deficientes en NcGRA7 presentaron los mejores resultados de reducción de la virulencia, seguidos por los infectados con los parásitos deficientes en NcROP40. Estos resultados demuestran la relevancia de NcGRA7 y NcROP40 en la virulencia de *N. caninum* en ratones y establecen nuevas áreas de investigación en el campo de la neosporosis.

Posteriormente, se investigó el papel de estas proteínas en dos modelos *in vitro* que utilizan células bovinas diana de la infección por *N. caninum*: los trofoblastos (línea celular F3) y los macrófago derivados de monocitos de sangre periférica (boMØ). El objetivo fue profundizar en el papel de dichas proteínas en el hospedador diana natural. Para ello, se comparó experimentalmente la capacidad de proliferación de las cepas de parásitos mutantes defectivos con respecto a la cepa salvaje usando ambas poblaciones celulares. En cuanto al trofoblasto bovino, no se observó ningún cambio en el crecimiento de los parásitos *knockout* respecto a la cepa salvaje, ni en la cinética de proliferación ni en el ensayo de competición. Sin embargo, al infectar los macrófagos se observó una disminución significativa en la

capacidad de proliferación de los parásitos *knockout* a partir de las 48 horas post-infección. Al estudiar el efecto de la activación de los boMØ con IFN- γ no se observaron diferencias en el crecimiento de las distintas cepas, inhibiendo el crecimiento tanto de la cepa parental como de los parásitos mutantes defectivos. El estudio de los niveles de expresión de receptores de patrones de reconocimiento y de citoquinas mostró una mayor expresión del receptor TLR3 en los boMØ infectados con las cepas *knockout* respecto a los infectados con la cepa parental, pudiendo estar implicados en la alteración de la respuesta inmunitaria del hospedador. No obstante, las funciones específicas de estas proteínas siguen siendo desconocidas, lo que abre camino a futuras investigaciones.

En el capítulo 5 y 6 se describen, con mayor detalle, los materiales y métodos, resultados y discusión del Objetivo 2. El capítulo 5 recoge los resultados del subobjetivo 2.1 (Generación de mutantes de *N. caninum* defectivos en NcGRA7 y NcROP40) y 2.2 (Caracterización de los mutantes defectivos en NcGRA7 y NcROP40 en un modelo murino BALB/c gestante y no gestante). El capítulo 6 recoge los resultados del subobjetivo 2.3 (Caracterización de los mutantes defectivos en NcGRA7 y NcROP40 en células bovinas diana de la infección por *N. caninum*). Como la presente tesis opta a Mención Internacional, los resultados aquí presentados han sido redactados en inglés. Los resultados obtenidos de los subobjetivos 2.1 y 2.2 han sido publicados en la revista *Pathogens* (DOI: 10.3390/pathogens11090998). Los resultados del subobjetivo 2.3 se han enviado a la revista *Veterinary Parasitology* y se encuentran en fase de revisión

NCGRA7 AND NcROP40 PLAY A ROLE IN THE VIRULENCE OF *Neospora caninum* IN A PREGNANT MOUSE MODEL (OBJECTIVES 2.1 & 2.2)

The intraspecific variability among *Neospora caninum* isolates in their *in vitro* behaviour and *in vivo* virulence has been widely studied. In particular, transcriptomic and proteomic analyses have shown a higher expression/abundance of specific genes/proteins in high virulence isolates. Consequently, the dense granule protein NcGRA7 and the rhoptry protein NcROP40 were proposed as potential virulence factors. The objective of this study was to characterize the role of these proteins using CRISPR/Cas9 knockout (KO) parasites in a well-established pregnant BALB/c mouse model of *N. caninum* infection at midgestation. The deletion of NcGRA7 and NcROP40 was associated with a reduction of virulence, as infected dams displayed milder clinical signs, lower parasite burdens in the brain, and reduced mortality rates compared to those infected with the wild-type parasite (Nc-Spain7). Specifically, those infected with the NcGRA7 KO parasites displayed significantly milder clinical signs and a lower brain parasite burden. The median survival time of the pups from dams infected with the two KO parasites was significantly increased, but differences in neonatal mortality rates were not detected. Overall, the present study indicates that the disruption of NcGRA7 considerably impairs virulence in mice, while the impact of NcROP40 deletion was more modest. Further research is needed to understand the role of these virulence factors during *N. caninum* infection.

1. Introduction

Neospora caninum is an obligate intracellular apicomplexan parasite, phylogenetically related to *Toxoplasma gondii*, and the aetiological agent of bovine neosporosis. This disease is one of the major causes of reproductive failure in cattle worldwide (Dubey & Schares, 2011), resulting in significant economic losses (Reichel et al., 2013). Unfortunately, no tools are available for the treatment or prophylactic control of bovine neosporosis (Dubey & Schares, 2011).

The intraspecific biological variability of *N. caninum* has been widely demonstrated. *Neospora caninum* isolates have demonstrated differences in parasite growth in cell culture (Rojo-Montejo et al., 2009b; Regidor-Cerrillo et al., 2011; Dellarupe et al., 2014b) as well as differences in pathogenicity and vertical transmission in pregnant models in mice (Rojo-Montejo et al., 2009b; Regidor-Cerrillo et al., 2010; Dellarupe et al., 2014a) and cattle (Rojo-Montejo et al., 2009a; Chryssafidis et al., 2014; Regidor-Cerrillo et al., 2014; Jiménez-Pelayo et al., 2019b). A positive correlation exists between certain *in vitro* phenotypes and *in vivo* virulence (Regidor-Cerrillo et al., 2011). However, the molecular factors underlying this variability remain unknown.

Studies of *N. caninum* population genomics have shown gene copy number variation among different isolates, but with limited sequence polymorphisms, and a global selective sweep of a single lineage (Khan et al., 2019a). Moreover, mutational hotspots have been identified, but the current annotation of the *N. caninum* genome is incomplete, which prevents assigning functional significance to these hotspots (Calarco et al., 2018). In contrast to *T. gondii*, little diversity has been detected at potential antigenic loci (Beck et al., 2009; Adomako-Ankomah et al., 2014; Lorenzi et al., 2016). In recent years, comparisons between isolates with different virulence by omic technologies have highlighted differences in proteomic and transcriptomic profiles between isolates (Regidor-Cerrillo et al., 2012; Horcajo et al., 2017, 2018; García-Sánchez et al., 2019a; Rico-San Román et al., 2020; Regidor-Cerrillo et al., 2020). These differences provide a list of genes that can be used as a starting point for identifying factors that may have a key role in explaining such variability. Among these, dense granule NcGRA7 and rhoptry NcROP40 proteins were highlighted as putative virulence factors due to their higher expression and abundance in high virulence isolates in these comparisons.

Rhoptry and dense granules are specialized secretory organelles unique to the phylum Apicomplexa (Dubremetz et al., 1998) and are linked to parasite cell invasion, intracellular development, and host response control (Dubremetz & Lebrun, 2012; English et al., 2015; Hakimi & Bougdour, 2015; Fereig & Nishikawa, 2020). NcGRA7 is an immunodominant protein in *N. caninum* (Álvarez-García et al., 2007) that seems to be involved in cell invasion mechanisms (Aguado-Martínez et al., 2010; Dong et al., 2017). In addition, recent studies in murine models have shown a partial decrease in the virulence of a mutant deficient in this protein (Nishikawa et al., 2018; Wang et al., 2021a; Abdou et al., 2022). NcROP40 has been

less studied, but it may also be involved in the invasion of the host cell (Pastor-Fernández et al., 2015b). Furthermore, other rhoptry proteins, such as NcROP16 and NcROP5, have been described as virulence factors in mice (Ma et al., 2017a,b).

The use of genetic tools for DNA manipulation in *N. caninum* will help us to unravel the function of specific genes in host-parasite interactions and pathogenesis. The goal of this study was to characterize the role of NcGRA7 and NcROP40 proteins through experimental infections in a well-established BALB/c mouse model for congenital and cerebral neosporosis (López-Pérez et al., 2008; Arranz-Solís et al., 2015) using CRISPR/Cas9 knockout (KO) parasites for the two genes.

2. Materials and methods

2.1. Generation of knockout parasites and complemented strains

NcROP40 was disrupted using the CRISPR/Cas9 system as previously described (Arranz-Solís et al., 2018). Briefly, specific gRNA sequences targeting the 5' and 3' regions of the NcROP40 (ToxoDB ID NCLIV_012920) coding sequence (Table 5.1) were cloned into the *BsaI* sites of the pSS013-Cas9 vector (pU6 plasmid, Addgene plasmid #52694) (Sidik et al., 2014). The pLoxP-mCherry-DHFR plasmid (Addgene Plasmid #70147), which contains the *Toxoplasma* DHFR-TS pyrimethamine resistant allele marker, was used as a donor template (Fig. 5.1A).

Approximately $1 - 2 \times 10^7$ Nc-Spain7 tachyzoites were cotransfected with the two plasmids containing the gRNAs mentioned above, together with the *NotI*-linearized mCherry-DHFR-TS plasmid, at a final 5:1 molar ratio as previously described (Arranz-Solís et al., 2018). Twenty-four hours after transfection, parasite selection was carried out with $10 \mu\text{M}$ pyrimethamine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for three passages. Subsequently, individual clones were isolated by limiting dilution in 96-well plates and confirmed using PCR by means of the observation of correct DHFR-TS integration into the NcROP40 locus (Fig. 5.1A, Table 5.1). NcROP40-deficient clones (Nc Δ ROP40) were also confirmed by Western blot and immunofluorescence assays (see Sections 2.1.2 and 2.1.3). The NcGRA7-deficient strain (Nc Δ GRA7) was generated previously (Arranz-Solís et al., 2018). In both cases, the high virulence isolate Nc-Spain7 was used as the parental strain. This isolate has a controlled number of passages *in vitro* and has been widely characterized in both *in vitro* and *in vivo* models, which makes it an excellent reference isolate.

To generate complemented strains, exogenous copies of the respective genes were inserted into the uracil phosphoribosyl-transferase (UPRT) locus (NCLIV_056020) (Fig. 5.1B). Since the UTR regions are not annotated for these genes on ToxoDB, the repair templates were constructed by amplifying the coding sequences including 1000 bp upstream of the start codon and downstream of the stop codon (Table 5.1). These amplicons were subsequently inserted into the multiple cloning site of the universal pUC19 plasmid, generating the pUC19-NcROP40 and pUC19-NcGRA7 plasmids. Transfections were performed as above

Table 5.1: Guide RNAs (gRNAs) and primers used to generate the knockout parasites and complemented strains.

Purpose	Primer name	Sequence	Used for
NcROP40 disruption	ROP40 gRNA1	5' GATATTTGCACTCGAATGCT 3'	Disrupt <i>ROP40</i> gene in 5' and 3' terminal ends
	ROP40 gRNA2	5' GTCGCGGTTGCCGTTTCAGTGGTG 3'	
NcROP40 and NcGRA7 complementation	ROP40 Fw (P1)	5' TAAGAACCGCATGGCTGACTG 3'	Amplify and sequence the gRNA targeted region of the <i>ROP40</i> gene together with donor template
	ROP40 Rv (P2)	5' CGGTTCCGACAAAAACGTATAC 3'	
	DHFR Fw (P4)	5' GGCGTGAAGATCTGGGACAA 3'	Amplify and sequence the gRNA targeted region of the <i>ROP40</i> gene together with DHFR-TS donor template
	DHFR Rv (P3)	5' GCCCTGCTATCTTTATAGTCC 3'	
	UPRT gRNA	5' GCAGGAGGAAAGCATTTCTGC 3'	Disrupt UPRT gene in 5' terminal end
	KpnI_ROP40 Fw	5' AGTCGAGgtaccGAGTGCATGAGGGAGGATTCAAG 3'	Amplify the <i>ROP40</i> gene with its promoters for cloning it into the pUC19-plasmid. The restriction sequence is shown in lower case
	KpnI_ROP40 Rv	5' TCGACTgggtaccGCAGTTCAGAACCCACCGTTTTTCC 3'	
	iROP40 Fw (P5)	5' TAAGAACCGCATGGCTGACTG 3'	Amplify and sequence the <i>ROP40</i> complemented gene donor template
iROP40 Rv2 (P6)	5' CGGTTCCGACAAAAACGTATA 3'		
KpnI_GRA7 Fw	5' AGTCGAGgtaccAAAAACACAGGTTTCGTTCCCTGGCC 3'	Amplify the <i>GRA7</i> gene with its promoters for cloning it into the pUC19-plasmid. The restriction sequence is shown in lower case	
KpnI_GRA7 Rv	5' TCGACTgggtaccTCGAAGCAGAGAGAAAGCTTTC 3'		
iGRA7 5UTR Fw (P7)	5' TCGCTGTTCCTGTAGGCTTTT 3'	Amplify and sequence the <i>GRA7</i> complemented gene donor template	
iGRA7 3UTR Rv (P8)	5' CTGTCATCTGGACACGAAAA 3'		

with minor modifications. The pU6 plasmid containing the gRNA sequence targeting the 5' end of the UPRT coding sequence and the *SbfI*-linearized pUC19-NcROP40 plasmid or the *EcoRI*-HF-linearized pUC19-NcGRA7 plasmid were cotransfected at a 1:5 gRNA:insert molar ratio. Complemented parasites were selected with 15 μ M 5-fluorodeoxyuridine (FUDR, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for three passages, and single clones were obtained by limiting dilution as above. Finally, clones were analysed by PCR, Western blotting, and immunofluorescence to confirm the presence and expression of NcROP40 and NcGRA7. All the primers and gRNA sequences used are listed in Table 5.1.

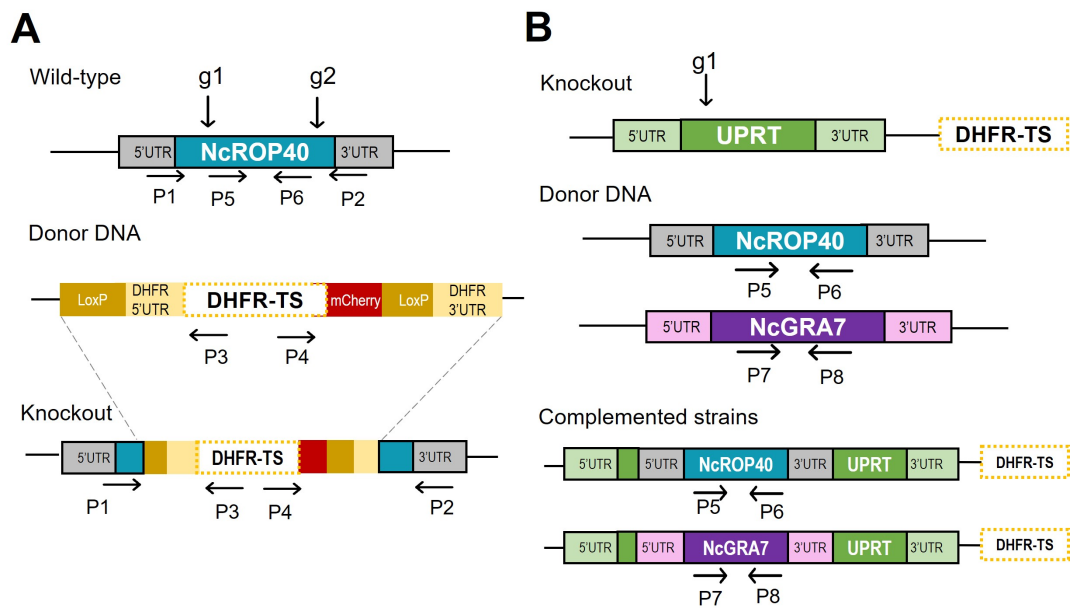


Figure 5.1: Construction and verification of the knockout and complemented strains by CRISPR/Cas9. (A) Schematic diagram of NcROP40 gene disruption and the repair template in Nc-Spain7 (wild-type). Disruption was achieved by employing two guide RNAs (g1 and g2). The positions of primers used for diagnostic PCR (P1-6) are indicated by arrows. (B) Schematic diagram of NcROP40 and NcGRA7 complementation of the knockout parasites by insertion at the *UPRT* locus. The *UPRT* gene was disrupted employing one guide RNA (g1). The positions of primers used for diagnostic PCR (P5-8) are indicated by arrows. UTR, untranslated region; DHFR-TS, dihydrofolate reductase-thymidylate synthase; LoxP: loxP sites.

2.1.1. PCR

All PCR reactions were performed using Taq DNA polymerase (Ecogen, Madrid, Spain) in a 25 μ L reaction mixture containing 5 μ L of DNA as a template, following the manufacturer's recommendations. For diagnostic PCRs, DNA from single clones was extracted using the Maxwell[®]16 Cell LEV DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). A schematic representation of the diagnostic PCRs and primers used can be found in Figure 5.1A,B and Table 5.1.

2.1.2. Western blot

To assess NcROP40 and NcGRA7 expression, wild-type (WT, Nc-Spain7 isolate) and genetically modified strains (KOs and complemented strains) were analysed by Western blot as previously described (Pastor-Fernández et al., 2015b). Purified tachyzoites were disrupted by bath sonication, electrophoresed in 15% acrylamide gels under reducing conditions, and transferred onto nitrocellulose membranes (GE Healthcare, Chicago, IL, USA; 1.5×10^6 tachyzoites per well). The antigen-coated membrane was cut into strips, and then the strips were blocked with TBS-Tween 20 buffer containing 5% (*w/v*) skimmed milk powder and incubated with polyclonal antibody (PAb) α -NcROP40 and α -NcGRA7 at a 1:1000 dilution. After three washes with TBS-Tween 20, goat anti-rabbit IgG monoclonal antibody conjugated to horseradish peroxidase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used as a secondary antibody at a 1:10,000 dilution. The strips were washed again, and reactions were developed using Immobilon Western chemiluminescent HRP (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) as substrate until signal visualization. Image capturing was performed using a ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

2.1.3. Immunostaining of NcROP40 and NcGRA7

Immunofluorescence imaging was performed following a previously described protocol (Pastor-Fernández et al., 2015b). The supernatants of the cell cultures were discarded at 48 h postinfection (pi), and wells were washed three times with PBS and subsequently fixed with paraformaldehyde 3%-glutaraldehyde 0.05% or ice-cold methanol for NcGRA7 or NcROP40 staining, respectively. Wells were washed with PBS and cells were blocked and permeabilized with 300 μ L/well of 3% BSA and 0.25% Triton-X 100 in PBS for 45 min at 37 °C, followed by additional washes with PBS. Then, the cultures were labelled with the monoclonal antibody (MAb) α -NcSAG1 (dilution 1:250) as a surface marker (Björkman & Hemphill, 1998) and affinity purified PAb α -NcROP40 (dilution of 1:6) (Pastor-Fernández et al., 2015b) and α -NcGRA7 (dilution of 1:6) (Pastor-Fernández et al., 2016) by incubation for 1 h at 37 °C. Affinity purified antibodies were prepared from PABs following standard procedures (Álvarez-García et al., 2007). After three additional washes with PBS, the cultures were incubated with Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-mouse IgG and Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) as secondary antibodies at a 1:1000 dilution for 1 h at room temperature in the dark and washed three times with PBS. In the final wash, DAPI stain was included to label the nuclei. Finally, the plates were washed with distilled water, and the protein location was visualized using an inverted fluorescence microscope (Nikon Eclipse TE200) at 100 \times magnification.

2.2. Parasite culture and inoculum preparation

The parasites used in this study were routinely maintained by continuous passage in a monolayer culture of the MARC-145 cell line and incubated at 37 °C in a 5% CO₂

humified incubator. Cells were cultured in DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum (FCS; Gibco BRL, Thermo Fisher Scientific, Paisley, UK) and a mixture of penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL), and amphotericin B (Lonza Group, Basel, Switzerland).

Tachyzoites were harvested from culture flasks 3 days pi, when the majority were still intracellular, using a cell scraper and followed by a single passage through a 25-gauge needle. Tachyzoite viability and concentration were determined by trypan blue vital exclusion staining followed by counting in a Neubauer chamber. For the *in vivo* virulence assays, tachyzoites were adjusted with PBS to the required dose of 10^5 tachyzoites in a final volume of 200 µL per mouse and were inoculated within 30 min of their collection (Arranz-Solís et al., 2015).

2.3. Mice and ethics statement

A total of 80 female and 48 male 7-week-old BALB/c mice were purchased from Janvier Labs (Laval, France). The animals were free from common viral, parasitic, and bacterial pathogens according to the results of routine screening analyses performed by the manufacturer. Mice were housed with ad libitum access to food and water in a controlled environment with 12-h light and 12-h dark cycles. Animals were used for experimentation after an acclimatization period of at least 15 days.

Animal procedures were approved by the Animal Welfare and Experimentation Committee of the Complutense University of Madrid and the Animal Protection Area of the Community of Madrid, Spain (PROEX 274/16 and 66.7/20) and were performed according to the corresponding guidelines and the Spanish and UE legislation (Law 6/2013; Royal Decree 118/2021; Directive 2010/63/UE). The use of genetically modified organisms was approved by the Genetically Modified Organisms Committee, and its manipulation was adjusted to that described in the current legislation (Law 9/2003; Royal Decree 178/2004; Directive 2009/41/UE). All animals used in this study were handled in strict accordance with practices made to minimize suffering. As a humane endpoint, severely clinically affected animals (evident loss of body condition or nervous signs) were euthanized to limit unnecessary suffering.

2.4. Assays of parasite virulence in mice

Two different experiments were carried out to compare the virulence of the NcΔ*GRA7* and NcΔ*ROP40* strains with the parental Nc-Spain7 isolate, as described below. In Experiment 1, well-established models for congenital and cerebral neosporosis were used as previously described (Arranz-Solís et al., 2015; Pastor-Fernández et al., 2015a). In Experiment 2, the cellular immune response at the acute stage of infection was determined.

■ Experiment 1

In this experiment, female mice were oestrus-synchronized by the Whitten effect and were mated for 96 h by housing one male with two females. Day 0 of pregnancy was defined as the first day that the females were housed with males. Female mice were then randomly distributed in groups of 20 mice each. At midgestation (Day 7 of gestation), mice were subcutaneously challenged with 10^5 tachyzoites/mouse of the KO parasites (Nc Δ GRA7 or Nc Δ ROP40), with 10^5 tachyzoites/mouse of the complemented parasites (iNc Δ GRA7 or iNc Δ ROP40), with 10^5 tachyzoites/mouse of the WT isolate or with 200 μ L of sterile PBS (negative control group). Pregnancy was confirmed by weighing on Days 15-18 of gestation, and pregnant mice were allocated individually for parturition. Female mice that did not become pregnant were housed in groups of up to 12 mice. Nonpregnant mice, dams, and their offspring were evaluated daily for clinical signs compatible with neosporosis and mortality. Clinical signs were scored according to the description from Pastor-Fernández et al. (2015a). Briefly, depending on the severity of the clinical signs, the following scores were given: no alterations (score = 0), ruffled coat/rough hair coats (score = 1), rounded back (score = 2), severe weight loss (score = 3), and nervous signs (score = 4). Dams and offspring were euthanized in a CO₂ chamber at 30 days postpartum (pp), while nonpregnant mice were euthanized at 30 days pi. Serum and brain samples from animals that were euthanized or reached the human end-point were collected and stored at -80 °C.

For the *N. caninum* congenital model, data on fertility rate, litter size, early pup mortality, and neonatal mortality were collected. The fertility rate was defined as the percentage of females that became pregnant. The litter size was defined as the number of pups delivered per dam. Stillbirth was evaluated as the number of full-term dead pups at birth, and early pup mortality was defined as the number of dead pups in the first two days pp. Neonatal mortality was defined as the number of dead pups from Day 2 to Day 30 pp. The model for cerebral neosporosis was performed with the dams and females that did not become pregnant at the chronic infection stage (Days 30 pp and 30 pi, respectively) by determining the presence and parasite burden of *N. caninum* DNA in the brain.

■ Experiment 2

In order to assess the cellular immune responses triggered at the acute stage of infection, male mice were randomly distributed into four groups of five mice each and were subcutaneously challenged with 10^5 tachyzoites/mouse of the WT isolate, with 10^5 tachyzoites/mouse of the Nc Δ GRA7 strain, with 10^5 tachyzoites/mouse of the Nc Δ ROP40 strain or with 200 μ L of sterile PBS (negative control group). All animals were monitored daily. Mice were sacrificed at 5 days pi, and spleen samples were collected and frozen at -80 °C to determine the expression levels of the pro-inflammatory cytokines interferon (IFN- γ) and tumour necrosis factor (TNF- α) and

the anti-inflammatory/regulatory cytokines interleukin 4 (IL-4) and interleukin 10 (IL-10) by quantitative real time PCR (RT-qPCR).

2.4.1. Parasite detection and quantification

DNA extraction was carried out from 40 to 100 mg of brain tissue samples using the Maxwell[®]16 Mouse Tail DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA) following the manufacturer's instructions. The concentrations of DNA were determined by spectrophotometry using a nanophotometer (NanoPhotometer[®], Implen GmbH, Munich, Germany) and adjusted to 20 ng/ μ L with molecular-grade water.

Parasite detection and quantification were performed from approximately 100 ng of extracted DNA by real-time PCR using the 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the commercial kit GoTaq[®]qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA). Primers targeted the Nc-5 region to quantify parasites and the 28S rRNA gene to quantify host DNA, as previously described (Collantes-Fernández et al., 2002). Parasite burden was calculated by the interpolation of cycle threshold (Ct) values on a standard curve. The standard curve was designed from the DNA equivalent to 10^{-1} – 10^5 tachyzoites. To normalize the quantification of the parasite in each sample, a 28S standard curve was also designed (from 320 ng to 10 ng DNA). The results were expressed as the relation between the amounts of parasite DNA (number of tachyzoites) and host DNA (100 ng DNA).

2.4.2. Real-Time PCR of cytokine expression

RNA was extracted from approximately 10 mg of each spleen using a commercial Maxwell[®]16 LEV simplyRNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA) following the manufacturer's recommendations. RNA integrity was analysed using 1% agarose gel electrophoresis, and RNA concentrations were determined using a NanoPhotometer[®] Spectrophotometer (Implen GmbH, Munich, Germany). Reverse transcription was performed with the master mix SuperScript[®] VILO[™] cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Paisley, UK) in 20 μ L reactions using up to 2.5 μ g of total RNA for the synthesis of cDNA. The obtained cDNA products were diluted 1:20 in molecular-grade water and then diluted 3 times in 4-fold serial dilutions (1:80; 1:320; 1:1280) and were used in qPCR assays. Real-time PCR was performed using the 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) with the commercial kit Power SYBR[®]Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) following the manufacturer's instructions. Briefly, PCR reactions were conducted using 12.5 μ L of Power SYBR[®]Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA), 10 pmol of each primer and 5 μ L of diluted cDNA samples. The primer sequences for cDNA amplification of IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-10 and β -actin have been previously published (Varona et al., 2005; López-Pérez et al., 2010) (Supplementary Table5.1). All Ct values were normalized to the expression of the housekeeping gene β -actin, which exhibited comparable Ct values for all the samples. For relative quantification of gene

expression, the comparative threshold cycle method was used. The relative n-fold change of each target cytokine expression, normalized to the endogenous reference and relative to the control group, is given by $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001). In addition, the ratio of IFN- γ /IL-10 was calculated as an indicator of Th1/Th2 response modulation.

2.4.3. Humoral immune responses

Serum levels of *N. caninum*-specific IgG1 and IgG2a isotypes were determined using ELISA in pregnant and nonpregnant mice (Experiment 1) as previously described (Arranz-Solís et al., 2015). The 96-well plates were coated with *N. caninum* soluble tachyzoite antigen (0.125 μ g in 100 μ L/well), and ELISA was performed using a 1:100 dilution of serum samples and an anti-mouse IgG1 or IgG2a peroxidase-conjugated secondary antibody (1:5000; Southern Biotechnology, Birmingham, AL, USA). The absorbance was measured at 405 nm, and the results were expressed as a relative index percentage (RIPC) using the following formula: RIPC = (OD sample – OD negative control)/(OD positive control – OD negative control) \times 100, where OD is the mean value of the optical density. The antibody isotype balance was evaluated using the IgG1/IgG2a ratio.

2.5. Statistical analysis

All statistical analyses were carried out using GraphPad Prism v.7.0 software (San Diego, CA, USA). Differences in data on fertility and mortality rates were evaluated using the chi-square test (χ^2) or Fisher's F test. Neonatal mortality was analysed using the Kaplan-Meier survival method to estimate the percentage of surviving animals at each time point. The log-rank (Mantel-Cox) test was applied to compare the survival curves between different groups and to calculate the median survival time. After testing the samples for normal distribution with D'Agostino-Pearson test, a one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test was used to compare litter size and anti-*N. caninum* antibody levels. However, differences in clinical sign scores, parasite burden and cytokine expression levels between groups were analysed using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple-comparison test. Finally, to evaluate whether parasite burden correlated with clinical sign scores, regression analysis was performed to determine the Pearson correlation coefficient, r , and the strength of the relationship was expressed as r^2 . Statistical significance for all analyses was established at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Successful construction of the NcROP40 knockout and NcROP40 and NcGRA7 complemented strains

We efficiently disrupted the NcROP40 gene in the Nc-Spain7 isolate by the insertion of a pyrimethamine resistance cassette (DHFR-TS), as was previously carried out for Nc Δ GRA7

(Arranz-Solis et al., 2018). PCR and sequencing confirmed the deletion of the *NcROP40* gene and the correct integration of DHFR-TS (Fig. 5.2A). In addition, the absence of expression of the NcGRA7 and NcROP40 proteins in their corresponding KO was verified by Western blot and immunofluorescence (Fig. 5.2B,C). Anti-NcGRA7 and anti-ROP40 rabbit sera did not recognize any band in the KO strains, while the expected bands for NcGRA7 (33 and 18 kDa) and NcROP40 (53 kDa) were detected in the WT strain (Fig. 5.2B). Similar results were observed by immunofluorescence analyses, and both proteins were only detected in the WT parasites, either secreted in the parasitophorous vacuole (NcGRA7) or located at the apical end of tachyzoites (NcROP40) (Fig. 5.2C).

To verify the role of NcGRA7 and NcROP40 in the virulence of the parasite in the murine model, complemented strains were constructed by reintroduction of the target genes (*NcGRA7* or *NcROP40*) in the corresponding KO parasites. The parasites were selected by FUDR treatment and checked by PCR to confirm efficient transfection of *NcGRA7* or *NcROP40* (Fig. 5.2A). Western blot and immunofluorescence analyses demonstrated the expression of the NcGRA7 and NcROP40 proteins in the complemented strains, with levels of expression comparable to those observed in the WT strain (Fig. 5.2B,C).

The above results demonstrate that the *N. caninum*-deficient strains (*NcΔGRA7* and *NcΔROP40*) and the complemented strains (*iNcΔGRA7* and *iNcΔROP40*) were successfully generated.

3.2. Evaluation of NcGRA7 and NcROP40 knockout parasite virulence in the BALB/c model for congenital and cerebral neosporosis

Data for pregnancy rates, litter size, mortality rates and parasite presence in dams are summarized in Table 5.2. No significant differences were found among the four groups in terms of pregnancy rate ($p > 0.05$, Fisher's F test) or litter size ($p > 0.05$, one-way ANOVA). Pups born to dams infected with either KO parasites significantly prolonged their median survival times compared to the WT group ($p < 0.05$, log-rank test; Fig. 5.3). The longest survival time was observed in the offspring from dams infected with the *NcΔGRA7* parasites (15 days), followed by the pups from dams infected with *NcΔROP40* parasites (12 days) and finally, pups from the WT group (10 days), although all infected groups reached mortality rates close to 100% (Table 5.2). The complementation of *NcΔGRA7* and *NcΔROP40* parasites resulted in a restoration of the parasite virulence, as offspring born to dams infected with the complemented parasites had the same median survival time as those from the WT group, with no significant difference ($p = 0.54$, log-rank test).

In dams, clinical signs were observed on the second week pi. Rough hair coats and apathy were the first signs observed, followed by anorexia, inactivity and nervous signs. In general, clinical signs of neosporosis were milder in the groups infected with the *NcΔGRA7* or *NcΔROP40* parasites, although significant differences were only found between the *NcΔGRA7* and WT groups ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis, Dunn's comparison post-test; Fig. 5.4). Moreover, dams challenged with KO parasites had lower mortality rates than those infected

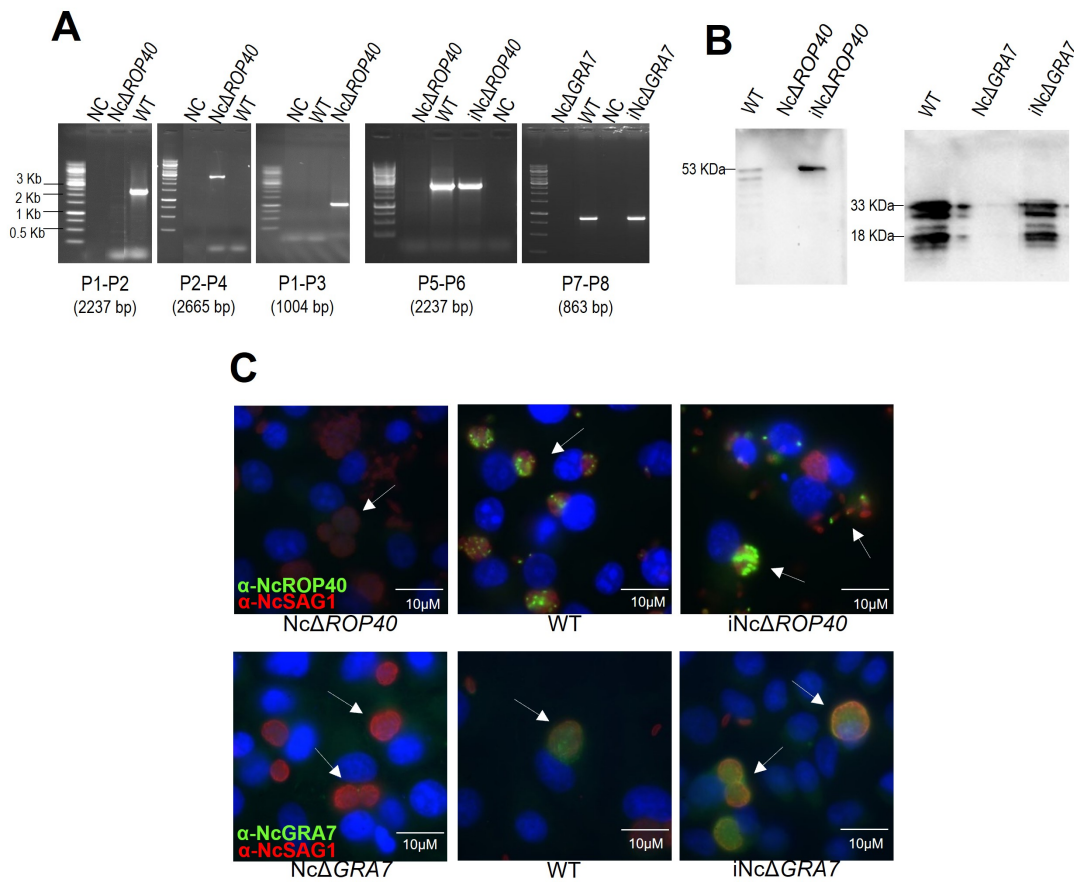


Figure 5.2: Verification of the knockout and complemented strains. (A) Diagnostic PCR demonstrating the loss of *NcROP40* (P1-P2, P5-P6) and the integration and orientation of the donor template (P2-P4, P1-P3) into the correct locus in the *NcROP40* knockout parasite. Diagnostic PCR demonstrating the integration of *NcROP40* (P5-P6) and *NcGRA7* (P7-P8) in the complemented strains. Primers used for PCR are described in Table 5.1 and indicated in Figure 5.1. (B) Western blotting assessment of *NcROP40* and *NcGRA7* gene disruption and complementation by measuring the protein expression levels. Anti-*NcROP40* rabbit serum detected a 53-kDa protein in the WT and complemented strain (iNcΔ*ROP40*) but not in the knockout (NcΔ*ROP40*) strain. A rabbit anti-*NcGRA7* antibody detected two major proteins of 33 and 18 kDa in the WT and in the complemented strain (iNcΔ*GRA7*), but not in the knockout parasite (NcΔ*GRA7*). (C) Immunofluorescence staining of Marc-145 cells infected with different strains of *Neospora caninum* (WT, knockouts, and complemented strains). The nuclei were stained with DAPI (blue), and the monoclonal antibody α-NcSAG1 was used as a control to mark the periphery of the parasites (red). The images above show methanol-fixed cultures labelled with affinity purified polyclonal antibody α-NcROP40 (green) and the images below show paraformaldehyde/glutaraldehyde-fixed cultures labelled with affinity purified polyclonal antibody α-NcGRA7 (green). White arrows indicate the expression or lack of expression of the proteins *NcROP40* or *NcGRA7* into the parasitophorous vacuole. Note that *NcROP40* and *NcGRA7* protein are detected in the WT and in the complemented strains but not in the knockout strains. WT, wild type (NcSpain7); NC, negative control; NcΔ*ROP40*, *NcROP40* knockout parasite; NcΔ*GRA7*, *NcGRA7* knockout parasite; iNcΔ*ROP40*, complemented strain of *NcROP40* knockout parasite; iNcΔ*GRA7*, complemented strain of *NcGRA7* knockout parasite.

Table 5.2: Effect of *Neospora caninum* infections in BALB/c pregnant dams and their pups. Mice were subcutaneously infected with 10^5 tachyzoites of the wild type strain Nc-Spain7 (WT) or with the knockout strains: NcGRA7 deficient line (Nc Δ GRA7) and NcROP40 deficient line (Nc Δ ROP40). One group was inoculated with PBS (Negative control).

Group	Fertility rate ^a	Litter size ^b	Mortality of dams ^c	Parasite presence in dams' brains ^d	Early pup mortality ^e	Neonatal mortality ^f	Median survival time of pups ^g
Negative control	8/20 (40%)	5.38 \pm 2.13	0/8 (0%)	0/8 (0%)	2/42 (4.8%)	0/40 (0%)	Undefined
WT	15/20 (75%)	4.64 \pm 2.10	7/15 (46.6%)	15/15 (100%)	14/65 (21.5%)	50/51 (98%)	10 days
Nc Δ GRA7	16/20 (80%)	4.69 \pm 1.74	4/16 (25%)	13/16 (81.25%)	11/75 (14.7%)	61/64 (95.3%)	15 days
Nc Δ ROP40	13/20 (65%)	3.54 \pm 1.61	3/13 (23.1%)	13/13 (100%)	8/46 (17.4%)	38/38 (100%)	12 days

^aNumber of pregnant mice / number of mice mated in the group (percentage).

^bAverage \pm SD.

^cNumber of dead or culled dams before 30 d pp. / number of dams in the group (percentage).

^dNumber of brain PCR-positive dams / number of dams in the group (percentage).

^eNumber of stillborn and dead pups from birth to day 2 / number of born pups in the group (percentage).

^fNumber of dead pups from day 2 until the end of the experiment / number of pups alive by day 2 pp. (percentage).

^gDay pp at which 50% of pups succumbed to infection.

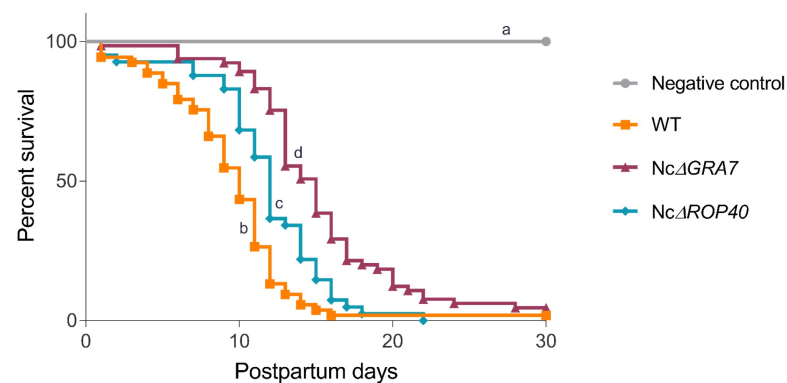


Figure 5.3: Effect of *Neospora caninum* infection in the offspring during a period of 30 days pp (postpartum). Kaplan-Meier survival curves of pups from dams infected on Days 7 of pregnancy with 10^5 tachyzoites from different *N. caninum* strains and the uninfected group (negative control, inoculated with PBS). The wild-type (WT) group was challenged with the Nc-Spain7 isolate, and the Nc Δ GRA7 and Nc Δ ROP40 groups were infected with knockout mutant parasites (deficient in GRA7 and ROP40 proteins, respectively). Each point represents the percentage of surviving animals on that day, and vertical steps downwards correspond to observed deaths. Letters a, b, c and d indicate significant differences ($p < 0.05$, log-rank test). Note that a delay in time to death was observed in groups infected with mutant parasites compared to the WT group.

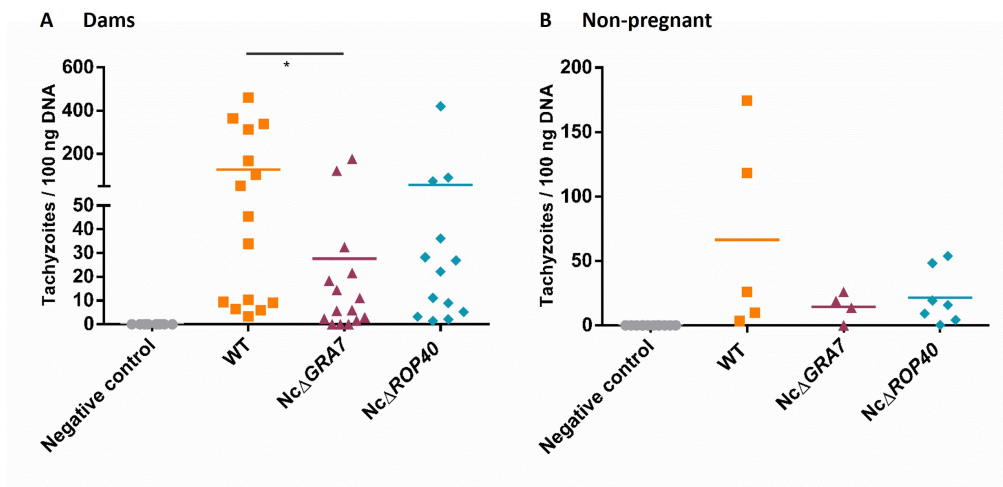


Figure 5.5: Cerebral parasite burden at 30 days postinfection in mice infected with 10^5 tachyzoites of different *Neospora caninum* strains and the uninfected group (negative control). The wild-type (WT) group was challenged with the Nc-Spain7 isolate, and the Nc Δ GRA7 and Nc Δ ROP40 groups were infected with knockout mutant parasites (deficient in GRA7 and ROP40 proteins, respectively). Each dot represents individual values, and medians are represented as horizontal lines. Parasite burden in the brain was calculated using real-time qPCR. (A) Parasite burden in the brains of dams infected on day 7 of gestation. (B) Parasite burden in the brains of nonpregnant mice. Significant differences between infected groups are denoted by horizontal lines and asterisks (* $p < 0.05$, Kruskal-Wallis Dunn's comparison post-test).

differences were found between challenged groups for any cytokine ($p > 0.05$, Kruskal-Wallis), but higher expression levels of IFN- γ and IL-10 were observed in males infected with KO parasites compared to WT-infected males. The levels of IFN- γ and IL-10 were similar in each infected group, with IFN- γ /IL-10 ratios close to 1.

3.4. Humoral immune response induced by NcGRA7 and NcROP40 knockout and wild-type parasites

Significantly higher levels of specific anti-*N. caninum* IgG1 and IgG2a antibodies were detected in all infected groups (dams and nonpregnant mice) compared to the negative control group ($p < 0.0001$, one-way ANOVA Tukey's comparison post-test), confirming *N. caninum* infection. Dams infected with the Nc Δ GRA7 and Nc Δ ROP40 parasites had significantly reduced IgG1 levels compared to WT ($p < 0.005$, one-way ANOVA Tukey's comparison post-test; Fig. 5.7A). In nonpregnant mice, only those infected with Nc Δ GRA7 parasites had lower levels of IgG1 compared to the WT group ($p < 0.001$, one-way ANOVA Tukey's comparison post-test; Fig. 5.7B). No significant differences in IgG2a levels were observed between infected groups, either in dams or nonpregnant mice ($p > 0.05$, one-way ANOVA).

Further analysis comparing IgG1/IgG2a ratios showed similar values between KO- and WT-infected groups.

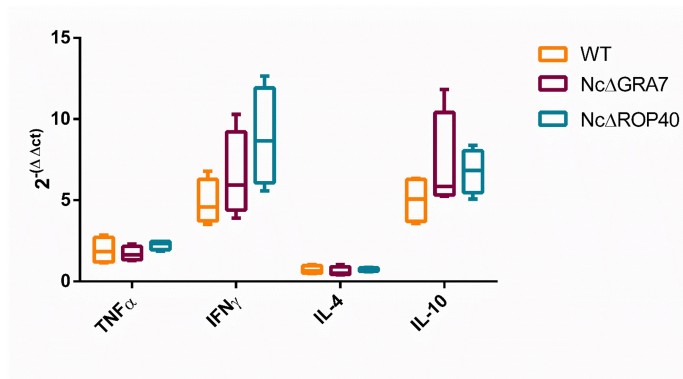


Figure 5.6: Cellular immune response in *Neospora caninum*-infected mice during the acute phase (5 days postinfection). The wild-type (WT) group was challenged with the Nc-Spain7 isolate, and the NcΔGRA7 and NcΔROP40 groups were infected with knockout mutant parasites (deficient in GRA7 and ROP40 proteins, respectively). Box-plot graphs represent the cytokine expression in the spleen, the mean (horizontal lines), the lower and upper quartiles (boxes) and minimum and maximum values (whiskers). Each sample was normalized to β -actin expression and relative to the negative control group. The results are given by $2^{-\Delta\Delta C_t}$, and the comparative threshold cycle method was used. According to the Kruskal-Wallis test, no significant differences were present between infected groups.

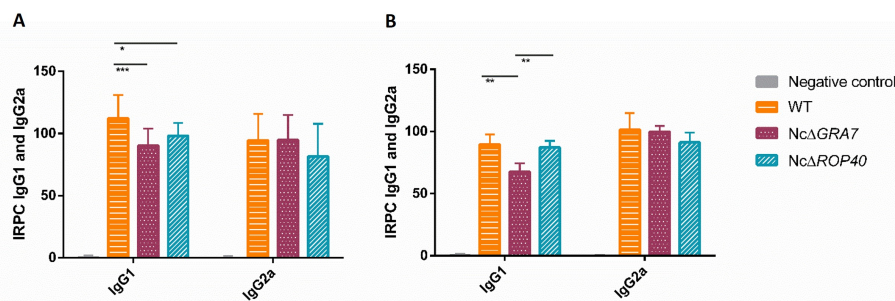


Figure 5.7: Humoral immune responses in challenged mice at 30 days postinfection. Anti-*N. caninum* immunoglobulins (IgG1 and IgG2a isotypes) generated in (A) dams and (B) nonpregnant mice inoculated with 10^5 tachyzoites from different *N. caninum* strains and the uninfected group (PBS). The wild-type (WT) group was challenged with the Nc-Spain7 isolate, and the NcΔGRA7 and NcΔROP40 groups were infected with knockout mutant parasites (deficient in GRA7 and ROP40 proteins, respectively). Bars represent the average RIPC (relative index percent), and error bars represent standard deviations for each group. Significant differences between infected groups are denoted by horizontal lines and asterisks with horizontal lines (***) $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$, one-way ANOVA Tukey's comparison post-test).

4. Discussion

The pathogenesis of apicomplexan parasites is largely dependent on host-parasite interactions (Dubremetz et al., 1998; Hemphill et al., 2013). These parasites use specialized organelles, such as rhoptries and dense granules, to deliver proteins in their surrounding environment that, in many cases, are able to modulate the host response, allowing parasite survival and proliferation (Hakimi & Bougdour, 2015; Bradley & Sibley, 2007). In *T. gondii*, many of these effector proteins have been described as virulence factors (Dubremetz & Lebrun, 2012; Boothroyd & Dubremetz, 2008; Zhang et al., 2019; Cesbron-Delauw et al., 1996). Although the understanding of the pathogenic molecular mechanisms in *N. caninum* is not as extensive as in the closely related *T. gondii*, some rhoptry (ROP16, ROP5) and dense granule (GRA7, GRA17, GRA6, GRA2) proteins have already been described as virulence factors in *N. caninum* (Nishikawa et al., 2018; Ma et al., 2017a,b; Yang et al., 2018; Zhao et al., 2020; Dong et al., 2021).

Based on transcriptomic and proteomic comparisons between the isolates of different virulence carried out by our group (Regidor-Cerrillo et al., 2012; Horcajo et al., 2017, 2018; García-Sánchez et al., 2019a; Rico-San Román et al., 2020), we hypothesize that NcGRA7 and NcROP40 proteins could contribute to parasite virulence. In addition, both proteins have been tested as putative vaccine candidates in mice, showing partial protection against infection (Pastor-Fernández et al., 2015a; Vemulapalli et al., 2007; Aguado-Martínez et al., 2009; Lv et al., 2015).

Gene editing and deletion techniques are useful tools for studying protein functions in parasites and for better understanding host-parasite interactions. The CRISPR/Cas9 technology was used in *N. caninum* for the first time in 2018 to generate *N. caninum* *Gra7* defective parasites, demonstrating that the same constructs developed for the closely related *T. gondii* can be employed in *N. caninum* (Arranz-Solís et al., 2018). In this study, the Nc Δ ROP40 strain was generated following the same approach that was used for the generation of the NcGRA7-deficient strain (Arranz-Solís et al., 2018). In contrast to other studies that failed or had very low efficiency disrupting genes in *N. caninum* using the tools developed for *T. gondii* (Yang et al., 2018; Zhao et al., 2020; Dong et al., 2021), we successfully generated the KO and complemented lines using this system. In addition, we used the highly virulent and well-characterised isolate Nc-Spain7 instead of Nc-1.

The importance of these proteins in parasite virulence was assayed in the well-established murine models of neosporosis. Although the role of the NcGRA7 protein in virulence has already been studied in mice, the models used have been poorly normalized. It has been widely shown that results in these models are dependent on the mouse breed, parasite isolate, infection dose, route of administration, and timing of infection during pregnancy. This is why previous studies have focused on standardizing and refining a pregnant BALB/c mouse model that could be used in different research groups with similar outcomes (López-Pérez et al., 2008; Arranz-Solís et al., 2015). This model is sensitive enough to detect differences

in virulence between *N. caninum* isolates and can be used to classify them as high, low, or moderate virulence (Regidor-Cerrillo et al., 2010; Dellarupe et al., 2014a). In infections at midgestation with 10^5 tachyzoites of Nc-Spain7, neonatal mortality and vertical transmission rates are expected to be close to 100%, with a high proportion of dams often developing severe clinical signs and mortality rates of approximately 40% (Arranz-Solís et al., 2015).

The deletion of both NcGRA7 and NcROP40 genes resulted in a reduced virulence in pups born from dams infected with the respective KO parasites, as their median survival times were significantly higher compared to that observed in the offspring from dams challenged with the WT parasite. These differences were not observed between the pups born to dams infected with the complemented strains and those from the WT group, supporting the role of NcGRA7 and NcROP40 in parasite virulence. The longest median survival time was recorded in the group infected with Nc Δ GRA7 parasites. However, offspring survival rates were similar in all infected groups, less than 5%, and almost all infected pups died. Vertical transmission was not analysed, but according to previous findings, the brains from pups that succumbed to infection were assumed to be *N. caninum* PCR-positive (Dellarupe et al., 2014b; Arranz-Solís et al., 2015; Pastor-Fernández et al., 2015a), suggesting vertical transmission close to 100%. The virulence reduction of these KO parasites was also observed in dams infected with these lines, with lower mortality rates and milder clinical signs. This largely reflects what was observed in the pups, with the group infected with the Nc Δ GRA7 having the mildest clinical signs and the lowest mortality rate.

Parasite load has proven to be a good indicator of parasite pathogenicity, with a positive correlation between the presence of clinical signs and severity of lesions and parasite burdens in the brain (Collantes-Fernández et al., 2004, 2006a; Long et al., 1998). In this study, we also observed such a correlation. Dams infected with Nc Δ GRA7 had a significantly lower parasite burden than those infected with the WT. Additionally, in nonpregnant mice, we observed a lower parasite burden in the groups infected with the deficient parasites, but without significant differences. This is probably linked to the fact that pregnant mice are more susceptible to infection, presumably due to the regulation of immunity during pregnancy (Aguado-Martínez et al., 2009; Kano et al., 2005; Quinn et al., 2004), and differences in virulence between isolates are easier to observe (Regidor-Cerrillo et al., 2010; Pastor-Fernández et al., 2015a; Aguado-Martínez et al., 2009; Pereira García-Melo et al., 2010; Marugán-Hernández et al., 2011a), corroborating that it is a more sensitive model than that of nonpregnant mice.

Previous studies have also reported lower mortality rates and lower parasite loads in the brains of mice infected with the NcGRA7-deficient strain than in those infected with the parental Nc-1 strain (Nishikawa et al., 2018; Wang et al., 2021a). In contrast, Abdou et al. (2022) reported higher mortality rates and similar parasite burdens in the brains of dams infected with the NcGRA7-deficient strain and its parental strain Nc-1 isolate. Nevertheless, they also observed decreased virulence in pups born to dams infected with NcGRA7-deficient parasites, with a lower vertical transmission of the KO parasite (70%) and a higher offspring

survival rate (50%). The differences observed in our work could be due to the time of infection (3.5 days vs. 7 days of pregnancy), the strain used for the KO generation (Nc-1 vs. Nc-Spain7) and the mouse breed (C57BL/6 vs. BALB/c); thus, comparisons between studies should be made with caution. Infection at midgestation (Day 7) leads to higher morbidity, mortality, and vertical transmission rates in pups than infection at early or late gestation, while infection at late gestation produced the lowest vertical transmission (López-Pérez et al., 2008). Differences among pregnancy periods could be a consequence of the degree of placenta development and embryo implantation. At early gestation, *N. caninum* may not reach the foetus because implantation has not yet occurred. At midgestation the embryo is already implanted (day 4.5) and the placenta is not completely developed and, at late gestation the placenta is completely developed acting as a barrier (López-Pérez et al., 2008). This could explain the higher mortality rates observed in our work. Moreover, unlike the high virulent isolate Nc-Spain7, Nc-1 is an isolate with an uncontrolled high number of passages in cell culture and prolonged cell culture maintenance can attenuate virulence of *N. caninum in vivo* (Bartley et al., 2006). Nc-1 isolate is classified as moderate-virulence, but the results across studies are inconsistent with survival rates of infected mice ranging from near 100% (Abdou et al., 2022; Collantes-Fernández et al., 2006a) to below 40% (Nishikawa et al., 2018; Wang et al., 2021a). All these differences demonstrate the importance of using a well-established model and a characterized isolate that provides reproducible results.

To date, no studies have been conducted on NcROP40-deficient parasites, but other rhoptries, such as NcROP5 and NcROP16, have been shown to play an important role in virulence in mice, and parasites deficient in these proteins also displayed lower parasite loads in the brain (Ma et al., 2017a,b). The lower virulence of groups infected with the deficient strains may be due to a defect in some critical step of the lytic cycle or to a different regulation of immunity. It has been reported that NcGRA7 and NcROP40 may play important roles during tachyzoite invasion (Aguado-Martínez et al., 2010; Pastor-Fernández et al., 2015b). NcROP40 mRNA levels are higher during the invasion phase (6 h pi) and during the egress-reinvasion phase (56 h pi) (Pastor-Fernández et al., 2015b) and both proteins are more abundant in isolates with higher invasion rates at 8 h pi (Regidor-Cerrillo et al., 2011; Dellarupe et al., 2014b; Regidor-Cerrillo et al., 2012; Horcajo et al., 2018; Rico-San Román et al., 2020). Moreover, studies using NcGRA7-deficient and -nondeficient parasite lines have shown an altered modulation of the immune response (Nishikawa et al., 2018; Wang et al., 2021a), which could contribute to parasite survival, such as the higher clearance of the NcGRA7-deficient parasites by macrophages compared to the parental strain (Wang et al., 2021a). In *T. gondii*, this protein forms a complex with ROP5/ROP18 and regulates the ROP18-specific inactivation of the immunity-related GTPase Irga6 (Hermanns et al., 2016; Alaganan et al., 2014). In *N. caninum*, Wang et al. (2021a) also reported that infection with NcΔGRA7 parasites resulted in a higher recruitment of Irga6 to the parasitophorous vacuole membrane. For ROP40, studies in *T. gondii* using a TgROP40-deficient strain showed no differences in growth *in vitro* and virulence in mice compared to the parental strain (Wang

et al., 2017) but exhibited a reduced cyst burden in the brain (Fox et al., 2016). TgROP40 is differentially expressed during the biological cycle, with higher expression during the tachyzoite and sporulated oocyst stage, and may play different roles during different life cycle stages (Wang et al., 2017). However, there are no similar studies on *N. caninum* and the molecular role of ROP40 remains unclear.

In terms of the humoral immune response, pregnant mice infected with KO parasites had significantly lower IgG1 levels than those challenged with WT parasites. The predominance of IgG1 is usually associated with a Th2 response (Liew, 2002), which likely contributes to a more efficient multiplication of the parasite in host tissues (Kano et al., 2005; Long & Baszler, 2000). This is in line with the results that we obtained, where dams infected with the Nc Δ GRA7 strain had the lowest IgG1 levels and the greatest reduction in virulence, while WT-infected dams had the highest IgG1 levels and parasite loads. However, the cytokine production did not appear to result in a strong modulation of the immune response, as no significant differences were observed between infected groups, although certain patterns were discernible. The Th1-type immune response, characterized by the production of proinflammatory cytokines such as IFN- γ and IL-12, is essential for limiting parasite multiplication (Long et al., 1998; Hemphill et al., 2006; Quinn et al., 2002b; Baszler et al., 1999). In our study, mice infected with KO parasites had higher IFN- γ levels, with the group infected with the Nc Δ ROP40 parasite having the highest production. The levels of IL-10 in the infected groups were similar to those of IFN- γ , with a balanced Th1/Th2 response. Abdou et al. (2022) also reported similar expression levels of cytokines in the spleens of animals infected with NcGRA7-deficient parasites and WT parasites, but other studies found lower IFN- γ levels in mice infected with parasites deficient in NcGRA7 than in mice infected with the parental strain Nc-1 (Nishikawa et al., 2018; Wang et al., 2021a). Further research in this field is needed to elucidate the role of these proteins in the immune response and in cytokine production.

In the present study, we demonstrated that NcGRA7 is a virulence factor in *N. caninum* using a well-established pregnant BALB/c mouse model. In addition, we described NcROP40 as a new virulence factor in *N. caninum*. The lack of these proteins may cause defects in the invasion and replication capacity of mutant parasites, in the ability to cross barriers such as the placenta and the blood-brain barrier, or in the immune response evasion/stimulation mechanisms. All these questions provide new avenues for research. Further studies are needed to clarify the function of these proteins during *N. caninum* infection.

Supplementary Materials

The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pathogens11090998/s1>, Table S1: Sequences of primers used for cytokine real-time PCR (qPCR).

Supplementary Table 5.1: Sequences of primers used for cytokine real-time PCR (qPCR).

Gene	Forward primer	Reverse primer	Reference
<i>β-actin</i>	5'-GGCACCACACCTTCTACAATG-3'	5'-TGGATGGCTACGTACATGGCTG-3'	Varona et al., 2005
<i>IFN-γ</i>	5'-TGAAAATCCTGCAGAGCCAGAT-3'	5'-AGCTCATTGAATGCTTGGCG-3'	Varona et al., 2005
<i>IL4</i>	5'-TGACGGCACAGAGCTATTGATG-3'	5'-TTCTTCGTTGCTGTGAGGACG-3'	Varona et al., 2005
<i>IL10</i>	5'-AGGCGCTGTCATCGATTCTC-3'	5'-TGGCCTGTAGACACCTTGGTC-3'	Varona et al., 2005
<i>TNFα</i>	5'-CTGTAGCCCACGTCGTAGC-3'	5'-TTGAGATCCATGCCGTTG-3'	López-Pérez et al., 2010

**CHARACTERIZATION OF *Neospora caninum*
VIRULENCE FACTORS NcGRA7 AND NcROP40 IN
BOVINE TARGET CELLS (OBJECTIVE 2.3)**

Bovine neosporosis is one of the major causes of reproductive failure in cattle worldwide, and differences in virulence between isolates have been widely shown. However, the molecular basis and mechanisms underlying virulence in *Neospora caninum* are mostly unknown. Recently, we demonstrated the involvement of NcGRA7 and NcROP40 in the virulence of *N. caninum* in a pregnant murine model using single knockout mutants in these genes generated by CRISPR/Cas9 technology. In this study, the role of these proteins was investigated in two *in vitro* models using bovine cells: trophoblast (F3 cell line) and monocyte-derived macrophages (BoMØ). The proliferation capacity of the single knockout mutant parasites was compared to the wild-type strain, the Nc-Spain7 isolate, using both cell populations. For the bovine trophoblast, no differences were observed in the growth of the defective parasites compared to the wild-type strain, neither in the proliferation kinetics nor in the competition assay. However, in naïve boMØ, a significant decrease in the proliferation capacity of the mutant parasites was observed from 48 h pi onwards. Stimulation of boMØ with IFN- γ showed a similar inhibition of tachyzoite growth in defective and wild-type strains in a dose-dependent manner. Finally, boMØ infected with knockout parasites showed higher expression levels of TLR3, which is involved in pathogen recognition. These results suggest that NcGRA7 and NcROP40 may be involved in the manipulation of innate immune defence mechanisms against neosporosis and confirm the usefulness of boMØ model for the evaluation of *N. caninum* virulence mechanisms. However, the specific functions of these proteins remain unknown, opening the way for future research.

1. Introduction

Bovine neosporosis is one of the main causes of abortion in cattle worldwide (Dubey & Schares, 2011; Lindsay & Dubey, 2020), involving significant economic losses to the beef and dairy industries (Reichel et al., 2013). This disease is caused by *Neospora caninum*, an apicomplexan cyst-forming protozoan closely related to *Toxoplasma gondii*, with dogs serving as the definitive host and cattle as the main intermediate host (Dubey et al., 2007). The transmission of *N. caninum* in cattle may occur by ingestion of sporulated oocysts (horizontal transmission) or transplacental transmission during pregnancy (vertical transmission) by dissemination of tachyzoites from the infected dam to the foetus (Williams et al., 2009; Dubey et al., 2007). The main outcomes of congenital infection are either abortion or birth of a healthy but persistently infected calf and are in part determined by *N. caninum* isolate virulence (Rojo-Montejo et al., 2009a; Regidor-Cerrillo et al., 2014; Jiménez-Pelayo et al., 2019b). However, the molecular mechanisms and factors underlying parasite virulence and disease outcome remain mostly unknown.

Comparative transcriptomics and proteomics studies among isolates of different virulence have revealed several parasite effectors that are potentially related to *N. caninum* virulence (Regidor-Cerrillo et al., 2012; Horcajo et al., 2017, 2018; García-Sánchez et al., 2019a; Rico-San Román et al., 2020; Regidor-Cerrillo et al., 2020). Recently, the dense granule protein NcGRA7 and the rhoptry protein NcROP40 were identified as virulence factors since their deletion (by CRISPR/Cas9 genome editing) was associated with a reduction in virulence in a pregnant mouse model (milder clinical signs, lower parasite burdens in the brain, reduced mortality rates, lower vertical transmission rates and longer median survival time of the pups) (Rico-San Román et al., 2022; Abdou et al., 2022). NcGRA7 and NcROP40 proteins play an important role during different phases of the lytic cycle of *N. caninum* (Aguado-Martínez et al., 2010; Pastor-Fernández et al., 2015b). In addition, studies using NcGRA7-deficient parasites have shown altered modulation of the immune response (Nishikawa et al., 2018; Wang et al., 2021a), which could contribute to the higher clearance of the NcGRA7-deficient parasites by murine macrophages compared to the parental strain (Wang et al., 2021a).

Murine infections are the most frequently used models to assess potential parasite virulence factors but may not be suitable for investigating the mechanisms underlying the interactions between *N. caninum* and its natural host (Gazzinelli et al., 2014; Novák, 2014). Recently, *in vitro* models using bovine target cells have been shown to be appropriate and informative for studying phenotypic traits that are predictive of *in vivo* virulence (García-Sánchez et al., 2019b, 2020; Jiménez-Pelayo et al., 2017, 2019b; Horcajo et al., 2017). Some of the cells used in these models were the bovine trophoblast (epithelial surface of foetal cotyledons) and bovine monocyte-derived macrophages (boMØ), in which *N. caninum* tachyzoites were able to invade, multiply, proliferate and regulate the host immune response in an isolate-dependent manner (Jiménez-Pelayo et al., 2017; García-Sánchez et al., 2019b). In fact, *in vitro* tachyzoite proliferative capacity in those cells was one of the main traits

associated with the *N. caninum* virulence phenotype observed in the murine model.

The aim of this study was to investigate the effect of deletion of *NcGRA7* or *NcROP40* on parasite growth and on immune response modulation in selected bovine target cells. The use of bovine trophoblast and boMØ as infection target cells was considered a good approach to investigate the phenotypes of *NcΔGRA7* or *NcΔROP40* strains and to explore whether these parasite genes could be *N. caninum* virulence factors in the bovine host.

2. Materials and methods

2.1. Ethics statement

Animal handling and sampling were carried out in accordance with Spanish and European Union legislation under good clinical practices (Law 6/2013; Royal Decree 118/2021; Directive 2010/63/UE). All procedures were approved by the Animal Welfare and Experimentation Committee of the Complutense University of Madrid and the Animal Protection Area of the Community of Madrid, Spain (PROEX 274/16 and 66.7/20). All efforts were made to minimise suffering.

The use of genetically modified organisms was approved by the Genetically Modified Organisms Committee, and its manipulation was adjusted to that described in the current legislation (Law 9/2003; Royal Decree 178/2004; Directive 2009/41/UE).

2.2. Parasites and cell cultures

The parasites used for this study were the high-virulence *N. caninum* isolate Nc-Spain7 (wild-type strain, WT) and the parasites defective in the *NcGRA7* and *NcROP40* genes (*NcΔGRA7* and *NcΔROP40* strains, respectively). Complemented strains for these genes were also used (*iNcΔGRA7* and *iNcΔROP40* strains) to verify the effect of the knockout (KO) strains. Both KO parasites were previously generated by deleting the target gene and introducing the DHFR-TS pyrimethamine resistance cassette in its place using CRISPR/Cas9 technology (Arranz-Solís et al., 2018; Rico-San Román et al., 2022). Complemented strains were also generated by CRISPR/Cas9 methodology (Rico-San Román et al., 2022).

Tachyzoites from the different *N. caninum* strains were routinely maintained in a monolayer of the MARC-145 cell line and cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum (FCS; Gibco BRL, Thermo Fisher Scientific, Paisley, UK), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml) and amphotericin B (0.25 µg/ml) (Lonza Group, Basel, Switzerland) in 5% CO₂ and 37°C, as previously described (Regidor-Cerrillo et al., 2011). Parasites were passaged onto new cell monolayers every 3 days.

Tachyzoites used for all *in vitro* studies were harvested from 3-day growth cultures, when the majority of the parasites were still within parasitophorous vacuoles and purified using PD-10 Desalting Columns (G.E. Healthcare, Buckinghamshire, UK) as described

previously (Regidor-Cerrillo et al., 2011; Jiménez-Pelayo et al., 2017; García-Sánchez et al., 2019b). Trophoblast cells or boMØ were infected within 1 h of parasite harvest to minimise their loss of viability and preserve their invasion capacities. Parasite viability was checked by trypan blue exclusion, which was also exploited to quantify the tachyzoite concentration using a Neubauer chamber.

The bovine trophoblast cell line (F3) was kindly supplied by Dr. Pfarrer (University of Veterinary Medicine Hannover, Hannover, Germany) and maintained as previously described (Jiménez-Pelayo et al., 2017; Hambruch et al., 2010). In brief, cells were grown in flasks containing properly supplemented DMEM/Ham's F12, incubated at 37°C/5% CO₂ and transferred onto a new flask once a week.

BoMØs were generated from peripheral blood collected from a healthy Holstein dairy cow following the protocol described by García-Sánchez et al. (2019b). Briefly, monocytes were isolated from blood mononuclear cells (PBMCs) by positive selection using anti-human CD14 antibody-conjugated microbeads (Miltenyi Biotec Ltd., Bisley, UK) and seed into 6-well culture plates. Monocytes were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat inactivated FCS, penicillin (100 U/mL), streptomycin (10 mg/mL) (Lonza Group, Basel, Switzerland) and 50 µM β-mercaptoethanol (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) and incubated with 100 ng/ml recombinant bovine GM-CSF (Kingfisher Biotech Inc, St. Paul, MN, USA) at 37°C and 5% CO₂ for 5 days. Then, cells were harvested, counted and reseeded in appropriate culture plates for each assay and incubated for 24 h prior to parasite infection to reduce possible cellular stress due to handling.

2.3. *In vitro* assays in the F3 bovine trophoblast cell line

2.3.1. Proliferation kinetics assays

The proliferation kinetics of WT, NcΔGRA7 and NcΔROP40 in F3 cells were determined by quantifying the number of tachyzoites at specific times (8, 24, 36, 48, 60 and 72 h post-infection, pi) by real-time PCR (qPCR), as previously described (Jiménez-Pelayo et al., 2017). F3 cells were seeded into 24-well culture plates at a density of 2×10^4 cells/well and infected using a multiplicity of infection (MOI) of 2. Then, the cultures were maintained at 37°C in 5% CO₂. The samples were collected at the time points mentioned previously by adding 200 µl of PBS, 180 µl of lysis buffer and 20 µl of proteinase K (Qiagen, Hilden, Germany) to each well; transferred to a microcentrifuge tube; and frozen at -80 °C until DNA extraction. The number of tachyzoites was then quantified by qPCR (see section 2.5). For each measurement, eight replicates obtained from three independent experiments were used. The doubling time (Td), defined as the period required for a tachyzoite to duplicate during the exponential multiplication period (excluding the lag phase and egression period), was determined by applying nonlinear regression analysis and an exponential growth equation to each experiment (Regidor-Cerrillo et al., 2011). The Td for each isolate is presented as the average value obtained from all the determinations that revealed a $R^2 \geq 0.9$.

2.3.2. Growth competition assay

A growth competition assay (Saeij et al., 2008) was performed to determine if the *in vitro* growth capacity of the NcΔ*GRA7* or NcΔ*ROP40* strains was impaired in bovine trophoblast cells. F3 cells were seeded into 6-well and 12-well culture plates at a density of 8×10^4 cells/well and 4×10^4 cells/well, respectively. Equal amounts of tachyzoites from NcΔ*GRA7* or NcΔ*ROP40* strains and the WT strain (Nc-Spain7) were mixed and inoculated into 6-well plates, generating two different mixed parasite populations (NcΔ*GRA7* + WT; NcΔ*ROP40* + WT). Parasites were maintained in co-culture for 6 passages in 6-well plates at a dose of 10^5 tachyzoites/well. To determine the fitness of KO parasites against the WT, mixed parasite populations were monitored at passage 0, 1, 3 and 6 by immunofluorescence (IFAT) staining. At these passages, 12-well plates were infected with 100 tachyzoites/well of the co-cultures and maintained with medium containing 10 μM pyrimethamine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and without pyrimethamine. In wells with pyrimethamine, only KO parasites grew, while in wells without pyrimethamine, both KO and WT parasites grew. At 60 hours pi, the 12-well plates were fixed with 3% paraformaldehyde - 0.05% glutaraldehyde, and parasites were stained by a single IFAT as described in section 2.6. Total parasite events (parasitophorous vacuoles and lysis plaques) were counted in each well and the proportion of KO parasites in the population was calculated as follows: $\frac{\text{number of parasite events in wells with pyrimethamine}}{\text{number of parasite events in wells without pyrimethamine}} \times 100$. Experiments were repeated three independent times.

2.4. *In vitro* assays in bovine monocyte-derived macrophages

2.4.1. Determination of proliferation kinetics in naïve macrophages

The proliferation kinetics of WT, NcΔ*GRA7* and NcΔ*ROP40* parasites in naïve boMØ were determined by quantifying the number of tachyzoites at specific times (8, 24, 36, 48, 60 and 72 h pi) by qPCR, as previously described (García-Sánchez et al., 2019b). BoMØ were cultured in 24-well culture plates at a density of 10^6 cells/well and infected using a MOI of 2. Then, the cultures were maintained at 37 °C in 5% CO₂, and the samples were collected as explained previously for trophoblast cells (see section 2.3.1.) and kept at - 80 °C until DNA extraction. For each measurement, 12 replicates obtained from two independent experiments were used. The Td for each strain was also calculated as described previously (Regidor-Cerrillo et al., 2011). In parallel, infected boMØ at different times were cultured in coverslips and labelled using double-immunostaining (see section 2.6) to microscopically observe the proliferation kinetics of the three strains. The growth of the complemented strains (iNcΔ*GRA7* and iNcΔ*ROP40*) was analysed at 48 h pi.

2.4.2. Parasite susceptibility to IFN- γ -mediated growth inhibition in bovine monocyte-derived macrophages

BoMØs were seeded into 24-well culture plates at a density of 10^6 cells/ well, stimulated 6 h later with different doses of IFN- γ (0.1, 1, 10 and 100 ng/ mL; Kingfisher Biotech Inc, St. Paul, MN, USA) and incubated at 37 °C and 5% CO₂. After 24 h, cells were infected at an MOI of 2 with WT, Nc Δ GRA7 and Nc Δ ROP40 tachyzoites. At 48 h pi, samples were collected and stored at -80 °C until DNA extraction. Tachyzoite yield (TY) was then calculated by quantifying the number of tachyzoites by qPCR. For each dose, boMØs obtained from at least two independent experiments were used and more than 12 replicates per dose were analysed.

2.4.3. Analysis of pattern recognition receptors and cytokine expression in bovine monocyte-derived macrophages

The mRNA expression levels of pattern recognition receptors (PRRs; TLR-2, TLR-3, TLR-8, TLR-9 and NOD2), pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p40 and TNF- α) and the regulatory cytokine IL-10 were determined by quantitative reverse-transcription real-time PCR (RT-qPCR) in boMØ infected with the WT, Nc Δ GRA7 and Nc Δ ROP40 strains. BoMØ were seeded into 6-well culture plates at a density of 3×10^6 cells/ well and infected using an MOI of 2. Samples were collected at 8 h pi and resuspended in 300 μ L of RNAlater (Thermo Fisher Scientific, Paisley, UK) as previously described (García-Sánchez et al., 2020). Analysis was performed on 5 replicates obtained from two independent experiments. RNA was extracted using the commercial Maxwell[®]16 LEV simplyRNA Purification kit (Promega, Madison, WI, USA) following the manufacturer's recommendations. RNA integrity was checked by 1% agarose gel electrophoresis, and RNA concentrations were determined using a spectrophotometer (Nanophotometer[®]; Implen GmbH, Germany). Reverse transcription was performed with the master mix SuperScript[®]VILO[™]cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Paisley, UK) using up to 2.5 μ g of total RNA. Real-time PCR was performed using the 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) and Power SYBR[®]Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) following the manufacturer's instructions. The primers used were previously described (Jiménez-Pelayo et al., 2020) and can be found in supplementary table S16.1. β -Actin and *GAPDH* were used as housekeeping genes, obtaining comparable Ct values for all the samples. The relative quantification of gene expression levels (n-fold change), normalized to the endogenous reference and relative to the control group (WT), was carried out by the comparative threshold cycle method $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

2.5. DNA extraction and parasite quantification by real-time PCR

DNA extraction was carried out using a DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Concentrations of DNA were deter-

mined by spectrophotometry using a NanoPhotometer[®] (Implen GmbH, Munich, Germany) and adjusted to 20 ng/ μ L. Quantification of *N. caninum* tachyzoites was performed from 100 ng of extracted DNA by qPCR using a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA). Primers targeting the Nc-5 region were used as previously described (Collantes-Fernández et al., 2002). Finally, the number of tachyzoites was calculated by interpolating the Ct values on a standard curve that was designed from DNA equivalent to $10^{-1} - 10^4$ *N. caninum* tachyzoites.

2.6. Immunofluorescence staining

For infected trophoblast cells, single immunofluorescence staining was performed as previously described (Jiménez-Pelayo et al., 2017). Briefly, parasites were stained using a hyperimmune rabbit antiserum against *N. caninum* tachyzoites (1:1000 dilution; Álvarez-García et al., 2003) and Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:1000 dilution; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA); nuclei were labelled with a solution of 1:10000 DAPI in PBS.

For infected boMØs, double immunofluorescence staining was performed as described elsewhere (García-Sánchez et al., 2019b). After permeabilization with Triton X-100, parasites were stained using hyperimmune rabbit antiserum against *N. caninum* tachyzoites (1:1000 dilution; Álvarez-García et al., 2003) and Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:1000 dilution; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Then, Alexa Fluor-594 phalloidin (Thermo Fisher Scientific, Paisley, UK) was used to label the F-actin filaments of boMØ. Nuclei were stained with a solution of 1:10000 DAPI in PBS, and the coverslips were embedded in Prolong (Thermo Fisher Scientific, Paisley, UK).

For each condition, coverslips were photographed using an inverted fluorescence microscope (Nikon Eclipse TE 200, Chiyoda, TYO, Japan) at a magnification of 100 \times , the pco.panda 4.2 sCMOS camera (Excelitas PCO GmbH, Kelheim, Germany) and the NIS-Elements BR software (Nikon, Chiyoda, TYO, Japan).

2.7. Statistical analysis

All statistical analyses and graphical illustrations were generated using GraphPad Prism v.7.0 software (San Diego, CA, USA). Differences in the proportion of KOs over time in the competition assay in F3 cells were analysed with repeated measures one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. The results of the intracellular proliferation assays (in both F3 cells and naïve or IFN- γ -stimulated boMØs) and cytokine expression were analysed using one-way ANOVA test. When statistically significant differences were found, Dunnett's multiple-comparison test was applied to examine possible pairwise comparisons. Statistical significance for all analyses was established at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Deletion of NcGRA7 and NcROP40 has no impact on lytic cycle progression in bovine trophoblast cells

Neither of the KO parasites showed different proliferation kinetics than WT parasites. For all three strains, we observed exponential growth from 8 h pi to 72 h pi, with no significant differences at any specific time ($p > 0.5$, one-way ANOVA test) (Fig. 6.1A). There were also no significant differences in the Td values of the different strains tested ($p > 0.5$, one-way ANOVA test), although Nc Δ GRA7 (Td = 7.69 ± 0.33) and Nc Δ ROP40 (7.46 ± 1.67) parasites showed slight delays compared to WT (6.02 ± 0.39). To rule out possible minor impacts on parasite fitness in trophoblast F3 cells, competition assays were also carried out by growing the KO strains in competition with the WT strain. The competition assay was initiated with equal number of WT and KO parasites and kept in coculture for 6 passages (21 days), during which the proportion of KOs was determined every week at passages 0, 1, 3 and 6. This assay did not identify any significant differences in the proportion of KOs (Nc Δ GRA7 and Nc Δ ROP40) over the time ($p > 0.05$; Repeated measures one-way ANOVA test), remaining close to 50% and suggesting that deletion of NcGRA7 and NcROP40 does not induce any fitness impairment in parasites infecting F3 cells (Fig. 6.1B).

3.2. Nc Δ GRA7 and Nc Δ ROP40 strains show fitness defects in naïve bovine macrophages

The naïve boMØ model was used to study the growth of the different strains under the pressure of innate immunity. In naïve boMØ, both KO strains showed similar proliferation kinetics to WT, showing exponential growth from 24 h to 48 h pi (Fig. 6.2A). In addition, all strains had similar Td values (WT: 8.68 ± 1.53 ; Nc Δ GRA7: 8.67 ± 1.61 and Nc Δ ROP40: 8.99 ± 0.06 ; $p > 0.05$, one-way ANOVA test). However, from 48 h pi onwards, KO strains showed significantly lower tachyzoite numbers than WT parasites ($p < 0.05$; one-way ANOVA test, Dunnett's comparison post-test) (Fig. 6.2A). Microscopic examination of infected cell cultures subjected to immunostaining at different time points showed that cells were already infected with all the strains at 8 h pi (Fig. 6.2B). However, considering the phagocytic nature of boMØ and that parasite multiplication does not start until 24 h pi, it was not possible to distinguish between active parasite invasion and phagocytosis, which precludes the comparison between the invasion rates of the different strains tested. Multiplication began for all strains at 24 h pi, with the parasitophorous vacuoles reaching their largest sizes at 48 h pi. At this time-point, slight differences in the parasitophorous vacuole sizes between and within strains could be observed by microscopic examination, but the size of parasitophorous vacuoles was not measured. Between 60 and 72 h pi, the rupture of host cells and egress of tachyzoites were observed in all strains, with no differences in egress time. To validate the role of NcGRA7 and NcROP40 deletion on parasite fitness, we quantified

tachyzoite numbers by qPCR at 48 h pi in cells infected with WT and complemented strains, finding no significant differences ($p > 0.05$; one-way ANOVA test). This indicates that complementation with *NcGRA7* and *NcROP40* is sufficient to restore parasite fitness.

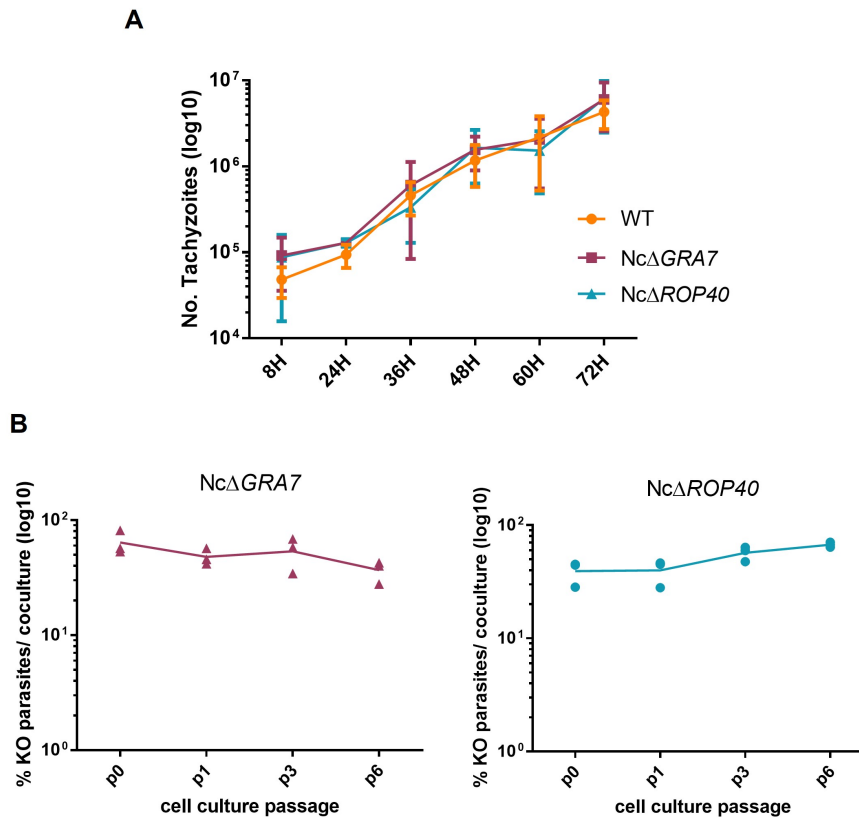


Figure 6.1: Analyses of parasite fitness in trophoblast cell line F3. A: Proliferation kinetics over time of the parental strain *Nc*-Spain7 (wild-type; WT) and the knockout strains (KO) *NcΔGRA7* and *NcΔROP40* in bovine trophoblast cell line F3. Graph represents the average number of tachyzoites for each time-point assayed and the error bars indicate the SD. All the strains fitted the exponential growth equation with an $R^2 > 0.9$. Significant differences between the KOs and the WT were not found ($p > 0.05$; one-way ANOVA test). B: Competition assay between the KO strains, *NcΔGRA7* or *NcΔROP40*, and the parental strain *Nc*-Spain7 in bovine trophoblast cell line F3. The graph represents the proportion of KO parasites for each cell culture passage. The experiment was performed in triplicate. No significant differences in the proportion of KOs over time were present ($p > 0.05$; Repeated measures one-way ANOVA test).

3.3. *NcΔGRA7*, *NcΔROP40* and WT parasites have similar susceptibility to IFN- γ -mediated growth inhibition in bovine macrophages

IFN- γ is a crucial cytokine involved in innate immunity and inflammation, playing a key role in macrophage activation for intracellular parasites clearance. We studied the susceptibility of the different strains to IFN- γ -mediated growth inhibition through para-

CAPÍTULO 6. CHARACTERIZATION OF *Neospora caninum* VIRULENCE FACTORS NCGRA7 AND NCROP40 IN BOVINE TARGET CELLS (OBJECTIVE 2.3)

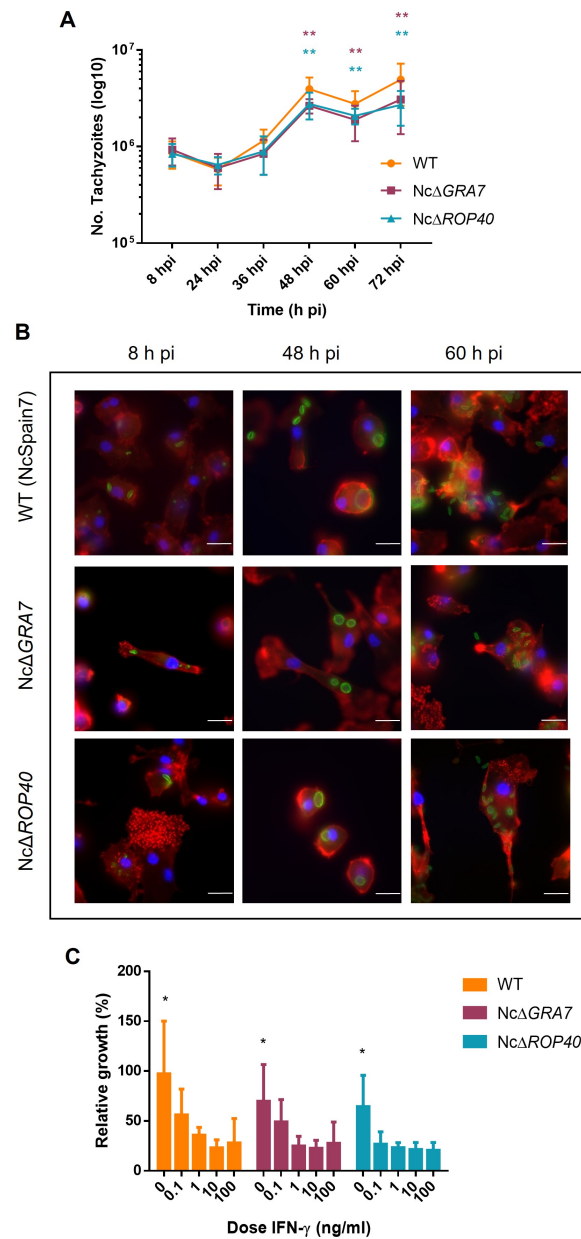


Figure 6.2: Analyses of parasite fitness in bovine monocyte derived macrophages (boMØ). A: Proliferation kinetics over time of the parental strain Nc-Spain7 (wild-type; WT) and the knockout (KO) strains NcΔGRA7 and NcΔROP40 in boMØ. Graph shows average number of tachyzoites quantified by qPCR for each time. The error bars indicate the SD. All the strains fitted the exponential growth from 24 to 48 h pi equation with an $R^2 > 0.9$. Significant differences between the KOs and the WT are denoted by asterisks (**: $p < 0.01$, one-way ANOVA test, Dunnett's comparison post-test). B: Immunofluorescence staining images showing the lytic cycle of the different strains over time. F-actin is stained red, nuclei blue and parasites green. Scale bar is 10 μm . C: Relative growth (%) at 48 h pi of the parental strain Nc-Spain7 (wild-type; WT) and the knockout strains (KO) NcΔGRA7 and NcΔROP40 in boMØ unstimulated or stimulated with different IFN- γ doses. The column graph represents the relative growth of parasites in boMØ, calculated as the percentage of the total growth of WT tachyzoites in naïve boMØ. Error bars indicate the SD. (*) denotes significant differences between naïve boMØ and stimulated boMØ (one-way ANOVA test, Tukey's comparison post-test).

site quantification at 48 h pi, after invasion and before complete tachyzoite egression. As expected, all strains displayed a reduced parasite burden in boMØ prestimulated with IFN- γ compared to infected naïve boMØ (Fig. 6.2C) ($p < 0.01$; one-way ANOVA test, Dunnett's comparison post-test). In addition, IFN- γ treatment decreased parasite loads in a dose-dependent manner. Interestingly, we observed lower parasite burdens in KO strains compared to the WT parasite, both in naïve boMØ and in boMØ activated with low IFN- γ concentrations (0.1 and 1 ng/ml) ($p < 0.0001$; one-way ANOVA test, Dunnett's multiple comparison post-test). However, these differences between KO and WT parasites disappeared at the highest doses of IFN- γ (10 and 100 ng/ml), where parasite growth was equally inhibited for all the strains.

3.4. The *Nc* Δ *GRA7* and *Nc* Δ *ROP40* knockout strains induce higher expression of TLR3 than the wild-type strain in bovine macrophages

BoMØ are able to recognize the parasite via PRRs, initiating intracellular signalling cascades and culminating in the synthesis of pro-inflammatory cytokines, a phenomenon that may have direct antiparasitic effects. We studied the effect of the deletion of *NcGRA7* and *NcROP40* on the expression of several key elements of the innate immune response in naïve boMØ at 8 h pi (Fig. 6.3). *Nc* Δ *GRA7* and *Nc* Δ *ROP40* parasites induced the upregulation of Toll-like receptor 3 (TLR3) compared to WT ($p < 0.01$ and $p < 0.06$, respectively, one-way ANOVA test, Dunnett's comparison post-test) (Fig. 6.3A). Regarding cytokine expression, there were no significant changes in the expression levels of any cytokine between boMØ infected with KO or WT strains (Fig. 6.3B). In addition, all infected boMØ had a similar IL-10/ IL-12 ratio close to 1, showing an equal Th1/ Th2 balance.

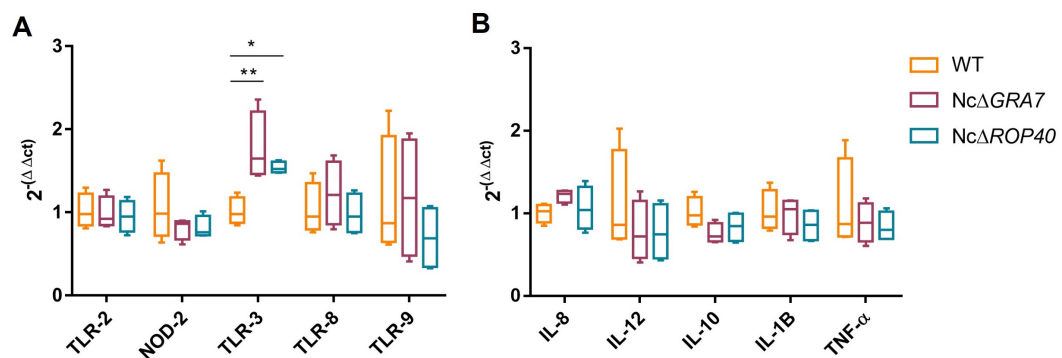


Figure 6.3: Relative mRNA expression levels of PRRs (A) and cytokines (B) in bovine monocyte derived macrophages (boMØ) infected with the parental strain *Nc*-Spain7 (wild-type; WT) or the knockout strains *Nc* Δ *GRA7* and *Nc* Δ *ROP40* at 8 h pi. The comparative threshold cycle method was used, and the results are given by $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Box-plot graphs represent the transcript relative expression, the lower and upper quartiles (boxes), the minimum and maximum values (whiskers) and the mean (horizontal lines). Significant differences between infected groups are denoted by horizontal lines and asterisks: * indicates $p < 0.05$ and ** indicates $p < 0.01$ (one-way ANOVA test, Dunnett's comparison post-test).

4. Discussion

The lytic cycle of *N. caninum* is a tightly regulated process that includes adhesion to the host cell, invasion, parasitophorous vacuole formation, multiplication and egress (Sinai & Joiner, 2001; Dubremetz & Lebrun, 2012; Nolan et al., 2015). This cycle involves a large number of effector proteins, such as those grouped at the rhoptries and dense granules, with potential key roles at each step (Horcajo et al., 2018; Pastor-Fernández et al., 2015b, 2016; Hemphill et al., 2006, 2013). In previous studies, *in vitro* tachyzoite growth was identified as a specific trait associated with the virulence phenotype of *N. caninum*, with a positive correlation between *in vitro* tachyzoite replication and pup mortality in the murine BALB/c pregnant model for neosporosis (Regidor-Cerrillo et al., 2010; Dellarupe et al., 2014a). This result supports the hypothesis that isolates with the highest inherent proliferation capacities reach higher parasite burdens in target host tissues, contributing to greater host tissue damage and more severe clinical signs. This also positions *in vitro* models as a valid alternative to animal models to perform the initial virulence screenings of newly obtained strains or isolates. In our case, NcGRA7 and NcROP40 proteins were previously described as virulence factors in a pregnant murine model, as mice infected with the respective KO strains showed lower brain parasite loads, and their offspring displayed longer median pup survival times (Rico-San Román et al., 2022). In this study, tachyzoite growth of the KO mutants Nc Δ GRA7 or Nc Δ ROP40 was assessed in bovine target cells as a first step to deepen the potential role of these proteins in the virulence of *N. caninum* in its natural host.

One of the bovine target cells used in this study was a bovine trophoblast cell line (F3), which is one of the cellular components that form the maternal-foetal interface of the placentome and plays a key role in the pathogenesis of the neosporosis and in initiating innate immune response at the placenta level (Jiménez-Pelayo et al., 2017, 2019a). F3 cells were isolated from a fifth-month pregnant heifer and retained the *in vivo* characteristics of bovine cotyledonary trophoblast cells (Hambruch et al., 2010). This line was previously used to assess the phenotypic traits of the high-virulence isolate Nc-Spain7 and the low-virulence isolate Nc-Spain1H, corroborating that the differences in virulence observed *in vitro* were comparable to those described during experimental infections of pregnant heifers (Jiménez-Pelayo et al., 2017, 2019a,b). This validated the usefulness of this model to carry out virulence assays. However, in this study, both KO and WT parasites showed similar growth kinetics, comparable to those previously observed for the Nc-Spain7 isolate (the parental strain used for KOs generation) in this cell line (Jiménez-Pelayo et al., 2017). In addition, parasites lacking the NcGRA7 and NcROP40 genes also showed fitness similar to that observed in the WT parasites in a competition assay. We previously described that the offspring of mice infected with both KO strains had longer survival times than offspring of WT-infected mice; despite this mortality delay in KO-infected groups, neonatal mortality rates reached values close to 100% in all infected groups, regardless of the strain used for challenge (Rico-San Román et al., 2022). Altogether, our results suggest that both KO and WT

parasites are able to multiply in trophoblast cells, be transmitted to the foetus, and induce foetal mortality. Another study conducted in VERO cells also found no significant differences in terms of infection rate or intracellular growth of NcGRA7-deficient parasites compared to the parental strain (Nc-1 isolate) (Nishikawa et al., 2018). In contrast, using HFF cells, NcGRA7-deficient parasites showed a lower proliferation capacity than the parental strain (Nc-1) (Wang et al., 2021a). Regarding NcROP40-deficient parasites, no similar studies have been performed in *N. caninum*. However in *T. gondii*, TgROP40-defective mutants assayed in HFF cells did not display any multiplication or growth defects either (Wang et al., 2017). Taken together, these findings suggest that the selection of appropriate cell lines is paramount to ensure a proper assessment of the potential effects of gene deletions on KO parasites.

The fitness of Nc Δ GRA7 or Nc Δ ROP40 strains was also studied in boM \emptyset , a bovine immune cell model potentially useful to investigate their behaviour under the pressure of innate immunity. Macrophages constitute the first line of immune defence, and they are key effectors in the development of the immune response against pathogens (Abe et al., 2014). We previously demonstrated that *N. caninum* can infect boM \emptyset s and survive and proliferate within these cells (García-Sánchez et al., 2019b). In addition, boM \emptyset s have been used as an infection model to identify strain-specific virulence abilities to subvert the activation of innate immune responses. Specifically, differences in virulence between *N. caninum* isolates have been reflected in terms of their proliferation capacity, modulation of the immune response and the host transcriptome in boM \emptyset (García-Sánchez et al., 2019b,a, 2020). In our study, KO parasites were "less prolific" than the WT isolate at 48, 60 and 72 h pi. Previous studies have shown that the expression of NcGRA7 and NcROP40 transcripts is increased at similar time points, coinciding with the multiplication and egress phases of the lytic cycle (Pastor-Fernández et al., 2015b, 2016). NcGRA7 is secreted into the host cell cytosol at 48 h pi (Nishikawa et al., 2018), targets the parasitophorous vacuole membrane and the intravacuolar tubular network (Hemphill et al., 1998; Aguado-Martínez et al., 2010; Dong et al., 2017), and may have effects on parasitophorous vacuole formation, as previously observed for other GRA proteins in *N. caninum* (Yang et al., 2018). In a previous study, parasitophorous vacuoles were smaller in NcGRA7-deficient parasites (Wang et al., 2021a). These findings could indicate that NcGRA7 is not essential for the formation of the parasitophorous vacuole, although its absence may be involved in the size attained. Regarding NcROP40, it is a pseudokinase of the ROP2 family localised in the rhoptry bulbs, but it is not secreted and does not interact with the parasitophorous vacuole membrane, as evidenced by confocal microscopy (Pastor-Fernández et al., 2015b). However, NcROP40 sequence has a signal peptide whose presence is a prerequisite for secretory pathways. Consequently, NcROP40 could be secreted into the cytosol and/or the nucleus of the host cell and have a potential role in host cell regulation that may affect the intracellular development and pathogenicity of the parasite (Pastor-Fernández et al., 2015b; Dong et al., 2017). In fact, similar findings have been reported previously for other rhoptry proteins such as ROP16

(Saeij et al., 2006, 2007; Ma et al., 2017a). In addition, although there are few studies on the ROP40 protein, it has been shown that overexpression of other ROP2 family members in *T. gondii*, such as ROP18, leads to an increase in the intravacuolar replication rate of the parasite *in vitro* (El Hajj et al., 2007). Accordingly, deletion of NcROP40 could affect the replication rate of the parasite.

Although there is a lack of knowledge in *N. caninum*, the closely related parasite *T. gondii* has evolved several mechanisms to counteract IFN- γ -induced host defenses, including the secretion of effector proteins from rhoptry and dense granules that manipulate host transcription and signalling pathways to control host cell responsiveness to inflammatory signals (Hunter & Sibley, 2012). IFN- γ is crucial in the defence against intracellular parasites and helps to control the infection by inhibiting tachyzoite growth and replication (Innes et al., 1995; Yamane et al., 2000; Yarovinsky, 2014). Interestingly, parasites deficient in the GRA TgIST protein are unable to counteract IFN- γ responses of their host cells *in vitro*, and are avirulent in mouse models (Olias et al., 2016; Gay et al., 2016). Within this context, our KO mutant parasites would be expected to be more susceptible to IFN- γ -mediated growth inhibition, as previously observed in *T. gondii* (Wang et al., 2020). We corroborated this hypothesis in our study, and all the parasite strains tested (KOs and WT) reduced their growth rate in IFN- γ activated boMØ in a dose-dependent manner. Remarkably, the use of high doses of IFN- γ greatly reduced parasite numbers, precluding the observation of obvious differences in the growth rate between KOs and WT observed in naïve boMØ and in boMØ activated with low IFN- γ doses. However, none of the IFN- γ activated boMØ were able to completely clear any of the parasites. Our results contrast with a recent study, where NcGRA7-deficient parasites were more easily cleared by murine macrophages (Raw246.7 cells) than the parental strain (Nc-1) (Wang et al., 2021a). This effect was attributed to the increased aggregation of the immune factor IRG6 (immunity-related GTPase) to the parasitophorous vacuole membrane of NcGRA7-deficient parasites, which contributed to their destruction in the presence of IFN- γ (Wang et al., 2021a; Saeij & Frickel, 2017). IRG-mediated destruction of the parasitophorous vacuole is one of the main mechanisms of *T. gondii* control in murine cells (Yamamoto et al., 2012; Saeij & Frickel, 2017). However, while IRGs play a dominant role in killing intracellular parasites in murine cells, humans and other animals, such as bovines, do not have IFN- γ -inducible IRGs (Hunn et al., 2011; Gazzinelli et al., 2014; Müller & Howard, 2016). Moreover, IRG-mediated destruction of the parasitophorous vacuole occurs upon activation of TLR11-12, and these receptors are not found in the bovine genome (Gazzinelli et al., 2014; Novák, 2014). Therefore, our results reflect what would be expected for an infection in a bovine target cell and are in line with what has been described by Gossner & Hassan (2020), who showed that IFN- γ stimulation abrogated most of the *T. gondii*-induced transcriptional changes in boMØ as a survival strategy, thus restricting their replication.

The different proliferation observed between strains in naïve boMØ could also be at-

tributed to the different abilities of the parasites to modulate host immunity, as this capacity has been widely associated with virulence (Feng et al., 2010; Ma et al., 2017a). KEGG pathway analysis of *N. caninum*-infected murine macrophages demonstrated that NcGRA7 robustly activates host signalling pathways, especially cytokine and chemokine production (Nishikawa et al., 2018). Although there are no studies on NcROP40, the ability of pseudokinases to modulate host cell signalling has been extensively demonstrated in *T. gondii* (Reese & Boyle, 2012). In this study, higher expression levels of TLR3 were found in boMØ infected with both defective strains than in those infected with the WT strain. It has been demonstrated that the TLR3-TRIF signalling pathway enhances resistance against *N. caninum* infection in mice, since it improves Th1 immune responses (Miranda et al., 2019). This could explain the better control of parasite multiplication in infections with KO parasites. However, we did not observe a clear activation of a Th1-type response in our study, as no differences in the expression of proinflammatory cytokines after infections by WT and KO strains were found. Nevertheless, considering that cytokine expression was analysed at an early stage of the infection (8 h pi), we cannot rule out whether this Th1 stimulation by downstream response to TLR3 activation occurs at later time points during the infection. We also cannot exclude whether Th1 activation could be mediated by other pro-inflammatory cytokines not included in our experimental design. For instance, activation of the TRIF-dependent pathway results in the production of IFN- β and IFN- α (Jiménez-Dalmaroni et al., 2016; Leichtle et al., 2009; Mineo et al., 2009). However, this hypothesis contrasts with the findings of a previous study, where the production of the proinflammatory cytokines IL-12p40 and IL-6 was lower in murine macrophage cultures infected with NcGRA7-deficient parasites than in those infected with a different parental strain, the Nc-1 isolate (Nishikawa et al., 2018). Previous works have shown that the Nc-Spain7 isolate may partially circumvent the proinflammatory response that could allow its multiplication during the first cycles of propagation (García-Sánchez et al., 2019a; Jiménez-Pelayo et al., 2019a, 2020). Our results suggest that this capacity could be reduced in our KO strains, although the mechanisms by which the NcGRA7 and NcROP40 proteins may evade TLR3 stimulation, and thus a harmful response against the parasite, remain to be elucidated.

In summary, the use of *in vitro* cultures can provide an initial approach to study certain mechanisms involved in parasite virulence, since they would attain reproducible results and the reduction of experimental animals. However, the selection of appropriate cell lines is paramount to ensure reliable results. The present study was pioneered the use of bovine cells for virulence factor evaluation in *N. caninum*. In trophoblast cells, no differences were observed in the growth of NcGRA7- or NcROP40-deficient strains. However, in boMØ, reduced growth capacity was observed in both KO strains. Future research on the putative activation pathways related to NcGRA7 and NcROP40 proteins will be necessary to help us better understand the functions of these proteins and their role in *N. caninum* virulence in bovines.

Supplementary Materials

Supplementary Table 6.1: Sequences of primers used for cytokine real-time PCR (qPCR).
 Source: Jiménez-Pelayo et al. 2020.

Gene	Forward primer	Reverse primer
TLR-2	5-ACGACGCCTTTGTGTCCTAC-3	5-CCGAAAGCACAAAGATGGTT-3
TLR-3	5-GAGGCAGGTGTCCTTGAAC -3	5-GCTGAATTTCTGGACCCAAG-3
TLR-8	5-GACGCTTCTGTCACGGACTG-3	5-TTGCTTTGGTTGATGCTCTG-3
TLR-9	5-AGTTCCCTCGTGTCCCTGT-3	5-CACCTCCGTGAGGTTGTTGT-3
NOD2	5-AGACCACCACGGATATGTACC-3	5-AGCACCAGGAAGCCAAGAG -3
IL-1b	5-ACCTGAACCCATCAACGAAATG-3	5-TAGGGTCATCAGCCTCAAATAACA -3
IL-6	5-CTGGGTTCAATCAGGCGATT-3	5-GGATCTGGATCAGTGTTCTGA -3
IL-8	5-CCACACCTTTCACCCCAA-3	5-CTTGCTTCTCAGCTCTCTTC-3
IL-12p40	5- AGTACACAGTGGAGTGTCAG-3	5-TTCTTGGGTGGGTCTGGTTT-3
TNF-α	5-CCAGAGGGAAGAGCAGTCC-3	5-GGAGAGTTGATGTCGGCTAC-3
β - actin	5-ACACCGCAACCAGTTCGCCAT-3	5-GTCAGGATGCCTCTCTTGCT-3
GAPDH	5-ATCTCGCTCCTGGAAGATG-3	5-TCGGAGTGAACGGATTTCG-3

Discusión general

DISCUSIÓN

Actualmente, las bases moleculares y los mecanismos responsables de la virulencia en *N. caninum* son, en gran medida, desconocidos. Se ha demostrado una amplia variabilidad intraespecífica, observándose notables diferencias en las tasas de invasión y en el crecimiento de taquizoítos en modelos *in vitro* (Rojo-Montejo et al., 2009b; Regidor-Cerrillo et al., 2011; Dellarupe et al., 2014b; Jiménez-Pelayo et al., 2017; García-Sánchez et al., 2019b), así como en las tasas de mortalidad, morbilidad, transmisión vertical y mortalidad neonatal en modelos animales murinos (Rojo-Montejo et al., 2009b; Regidor-Cerrillo et al., 2010; Dellarupe et al., 2014a). Además, los aislados más virulentos en el modelo murino gestante presentan mayores tasas de invasión y proliferación *in vitro*, lo que indica que ciertos rasgos fenotípicos *in vitro* son predictivos de la virulencia *in vivo* (Regidor-Cerrillo et al., 2011). Como consecuencia, se ha podido clasificar a los aislados en alta -Nc-Spain7, Nc-Spain4H y Nc-Bahia- o baja -Nc-Spain1H, Nc-Spain2H y Nc-Ger6- virulencia. Hasta la fecha, el número de aislados caracterizados en modelos bovinos gestantes es muy escaso (Rojo-Montejo et al., 2009a; Chryssafidis et al., 2014; Regidor-Cerrillo et al., 2014; Jiménez-Pelayo et al., 2019b), pero los resultados obtenidos con ciertos aislados, como Nc-Spain7 o Nc-Spain1H, confirman los resultados obtenidos en los modelos previamente descritos, observándose importantes diferencias en la capacidad del aislado para induir la muerte del feto. Sin embargo, los factores moleculares implicados en las diferencias fenotípicas observadas no se han esclarecido hasta el momento.

En *T. gondii*, las diferencias en la virulencia intraespecífica se han asociado con el polimorfismo genético de ciertos factores de virulencia y su interacción con el hospedador, como sucede con las proteínas de las roptrias y de los gránulos densos ROP5, ROP18, ROP16 y GRA6 (Saeij et al., 2006; El Hajj et al., 2007; Reese et al., 2011; Behnke et al., 2011; Ma et al., 2014). En cambio, los estudios realizados en *N. caninum* sugieren un limitado polimorfismo a nivel genómico (Khan et al., 2019a; Calarco et al., 2018; Beck et al., 2009),

por lo que las diferencias en la expresión génica o en la abundancia de proteínas podrían tener un papel más relevante en la explicación de la variabilidad fenotípica. De hecho, estudios comparativos entre dos o tres aislados de diferente virulencia mediante técnicas tradicionales (Regidor-Cerrillo et al., 2012) y mediante técnicas ómicas (Horcajo et al., 2017, 2018; García-Sánchez et al., 2019a) mostraron variaciones en los perfiles proteómicos y transcriptómicos entre aislados. Estos resultados podrían explicar, al menos parcialmente, las diferencias biológicas observadas entre aislados y ayudar a identificar posibles factores clave en la virulencia de *N. caninum*. Aquellas proteínas o genes con mayor abundancia o expresión en los aislados de alta virulencia se postularon como posibles factores de virulencia. Sin lugar a duda, el estudio de su función e implicación en la patogénesis de la enfermedad merece una mayor investigación.

El **objetivo general** de la presente Tesis Doctoral fue la **identificación y caracterización de posibles factores de virulencia de *N. caninum***. En primer lugar, se realizó la comparación del proteoma de un amplio número de aislados, con diferente origen y virulencia, mediante cromatografía líquida unida a espectrometría de masas sin marcado de la muestra (label free LC-MS/MS) (**Objetivo 1**). Los estudios realizados hasta la fecha habían comparado dos o tres aislados de diferente virulencia, mientras que en este estudio se comparó un mayor número de aislados. El panel de aislados incluyó los anteriormente mencionados: Nc-Spain7, Nc-Spain4H y Nc-Bahia, representando los aislados de alta virulencia, y Nc-Spain1H, Nc-Spain2H y Nc-Ger6, representando los aislados de baja virulencia. La tecnología proteómica de alto rendimiento LC-MS/MS proporcionó una herramienta excepcional para el estudio global del proteoma, ya que permite el análisis e identificación masiva de mezclas complejas de proteínas. Por otra parte, esta tecnología podría ofrecer una imagen más detallada que el transcriptoma de la base molecular de la virulencia y la diversidad fenotípica en *N. caninum*, ya que previamente se encontró una débil correlación entre la expresión de genes y la abundancia de proteínas, resaltando la importancia de la regulación post-transcripcional en estos parásitos (Horcajo et al., 2018). No obstante, este abordaje presenta algunas limitaciones, como la posible falta de detección de proteínas de membrana debido a su naturaleza hidrofóbica que, junto a los defectos en la anotación del genoma de *N. caninum*, podría contribuir a la pérdida de información relevante. Esta falta de anotación del genoma se puso en evidencia al clasificar como hipotéticas un gran número de las proteínas detectadas. En este estudio, se realizaron comparaciones por parejas de aislados y entre grupos de aislados de alta y baja virulencia. Esta estrategia permitió identificar un conjunto de proteínas con diferente abundancia entre los aislados de alta y baja virulencia en varias comparaciones, aunque la gran mayoría de proteínas diferencialmente abundantes fueron específicas para cada comparación. Las proteínas se clasificaron según su función o localización en: proteínas del metabolismo y mecanismos redox; proteínas relacionadas con el ADN, ARN y síntesis proteica; proteínas implicadas en la unión, adhesión e invasión de la célula hospedadora (como las proteínas de micronemas -MIC-, proteínas relacionadas con antígenos -SRS-, proteínas del glideosoma o proteínas del complejo de membrana interna

-IMC-); y proteínas implicadas en el desarrollo intracelular del parásito y la modulación de la respuesta inmunitaria del hospedador (proteínas de las roptrias -ROP- y proteínas de los gránulos densos -GRA-). En todas las categorías hubo proteínas con mayor abundancia en los aislados de alta o de baja virulencia.

En los aislados de alta virulencia encontramos un mayor número de proteínas más abundantes relacionadas con el metabolismo de carbohidratos y energía y con el metabolismo de lípidos o glicerofosfolípidos, tanto en las comparaciones por pares de aislados como en las comparaciones entre los grupos de alta y baja virulencia. Los estudios previos que han comparado el transcriptoma del taquizoíto de los aislados Nc-Spain7 y Nc-Spain1H también han reportado un gran número de genes relacionados con el metabolismo energético con una mayor expresión en el aislado de alta virulencia Nc-Spain7 (Horcajo et al., 2017; García-Sánchez et al., 2019a). En *T. gondii* se ha comprobado que la regulación metabólica de los aislados puede estar implicada en las diferentes tasas de crecimiento y virulencia (Song et al., 2013). Los resultados obtenidos sugieren un mecanismo más eficiente para la obtención de energía en los aislados más virulentos, lo que podría explicar sus tasas de crecimiento más rápidas. Entre las proteínas diferencialmente abundantes, cabe destacar dos proteínas relacionadas con el metabolismo de los lípidos: una proteína relacionada con la lisofosfolipasa, NCLIV_044560; y una proteína con función de unión a acil-CoA, NCLIV_066640; las cuales tuvieron mayor abundancia en el grupo de aislados de alta virulencia y en varias comparaciones por pares de aislados. Por otra parte, la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH, NCLIV_000940), implicada en la glucólisis, también mostró una mayor abundancia en los aislados de alta virulencia, tanto en las comparaciones por grupos como en algunas comparaciones por pares. Esta proteína ya se encontró anteriormente más expresada en el proteoma de taquizoítos del aislado de alta virulencia Nc-Spain7 comparado con el aislado de baja virulencia Nc-Spain1H (Regidor-Cerrillo et al., 2012). La función de la G6PDH también se ha relacionado con el mantenimiento del equilibrio celular redox mediante la producción de NADPH (Ho et al., 2007), por lo que el nivel de actividad G6PDH de los aislados podría determinar su sensibilidad al estrés oxidativo y, por tanto, su capacidad para sobrevivir en la célula hospedadora. En *T. gondii*, la proliferación de los taquizoítos en macrófagos se ha relacionado con el mecanismo redox y la disminución de la producción de radicales de oxígeno en la célula hospedadora (Shrestha et al., 2006). En macrófagos bovinos infectados con *N. caninum*, se observó que el aislado de alta virulencia, Nc-Spain7, mostró una mayor proliferación y una menor inducción de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que el aislado de baja virulencia, Nc-Spain1H (García-Sánchez et al., 2019a,b). Se deduce, por tanto, que podría ser interesante realizar más estudios para determinar el papel de la G6PDH en *N. caninum*.

Las proteínas implicadas en la replicación del ADN, el procesamiento del ARN y la síntesis proteica también fueron más abundantes en los aislados de alta virulencia, tanto en las comparaciones por pares de aislados como en las comparaciones por grupos de virulencia. Estas funciones están fuertemente relacionadas con las altas capacidades de crecimiento del

estadio del taquizoíto. La enzima ARNm capping (NCLIV_043900) tuvo mayor abundancia en el grupo de aislados de alta virulencia y en los aislados Nc-Spain7 y Nc-Spain4H frente al resto de aislados de baja virulencia. Ambos aislados tuvieron la mayor proliferación en estudios *in vitro* (Regidor-Cerrillo et al., 2011; Dellarupe et al., 2014b), por lo que pudieron necesitar una gran síntesis de ARNm para su replicación. Esta enzima es esencial en la biogénesis del ARNm, lo protege de la degradación y recluta factores que promueven el empalme del ARN, la exportación y el inicio de la traducción (Furuichi & Shatkin, 2000). Además, la ADN polimerasa (NCLIV_028330) fue la única proteína con mayor abundancia en todos los aislados de alta virulencia en todas las comparaciones, por lo que podría contribuir a las mayores tasas de crecimiento *in vitro* de los aislados más virulentos, proporcionándoles una replicación del ADN más eficiente.

En general, los aislados de alta virulencia tuvieron mayores tasas de invasión en estudios *in vitro* en comparación con los aislados de baja virulencia (Regidor-Cerrillo et al., 2011; Dellarupe et al., 2014b), por lo que cabría esperar que tuvieran una mayor abundancia de efectores relacionados con estos procesos (proteínas relacionadas con SRS y proteínas MIC), los cuales ayudan al establecimiento de una adhesión más estable entre el taquizoíto y la célula hospedadora (Hemphill et al., 2006, 2013). Sin embargo, estas proteínas presentaron una mayor abundancia en el grupo de aislados de baja virulencia, similar a lo descrito en estudios previos (Horcajo et al., 2017, 2018). En las comparaciones por pares de aislados los resultados no fueron concluyentes, encontrando algunas proteínas como Nc-SAG3 (NCLIV_034740), el ortólogo de la proteína TgSRS16E (NCLIV_010050) o NcMIC17B (NCLIV_038110) con mayor abundancia tanto en aislados de alta virulencia como en aislados de baja virulencia, dependiendo de la comparación, por lo que la abundancia diferencial de estas proteínas podría estar relacionada con los mecanismos específicos de invasión de cada aislado. Cabe señalar que las proteínas que contienen dominios SRS no sólo están implicadas en los procesos de adhesión e invasión, sino que también son altamente inmunogénicas, pudiendo estar relacionadas con la diferente estimulación inmunitaria de los aislados (Lekutis et al., 2001; García-Sánchez et al., 2019b; Jiménez-Pelayo et al., 2019a). Se ha sugerido que el aislado de alta virulencia Nc-Spain7 podría ser capaz de eludir parcialmente la respuesta proinflamatoria, mientras que Nc-Spain1H induce una respuesta protectora frente a la infección (Jiménez-Pelayo et al., 2019a; García-Sánchez et al., 2020), lo que podría explicar la mayor proliferación del aislado Nc-Spain7 en los macrófagos bovinos (García-Sánchez et al., 2019b) y su transmisión más eficiente *in vivo* (Jiménez-Pelayo et al., 2019b).

En cuanto a las proteínas relacionadas con el citosqueleto y la motilidad, encontramos mayor abundancia en el grupo de aislados de baja virulencia, similar a lo descrito en trabajos previos para otras proteínas relacionadas con la misma función (Horcajo et al., 2017, 2018), lo que podría intentar compensar la deficiencia en otros mecanismos desconocidos pero relevantes para la invasión. Se pone en evidencia la necesidad de realizar más investigaciones para tratar de conocer a fondo este proceso en *N. caninum*. En el grupo de aislados de alta virulencia, solo el ortólogo de TgIMC24 (NCLIV_028050) tuvo mayor abundancia.

Las proteínas IMC tienen múltiples funciones y están implicadas en la división asexual y gametogénesis (Dubey et al., 2017), favorecen la motilidad (Keeley & Soldati, 2004) y contribuyen a la capacidad del parásito para proliferar y causar enfermedad (Chen et al., 2017), por lo que esta proteína podría ser un factor importante en la mayor capacidad de invasión y crecimiento de los aislados altamente virulentos.

Por último, las proteínas secretadas por las roptrias (ROP, RON) y gránulos densos (GRA) estuvieron reguladas de forma diferencial entre los distintos aislados, siendo, en general, más abundantes en los aislados de alta virulencia. Las roptrias y los gránulos densos son orgánulos secretores exclusivos de los parásitos apicomplejos, cuya función está relacionada con el desarrollo intracelular, la proliferación y la modulación de la respuesta inmunitaria del hospedador (Mercier et al., 2005; Dubremetz & Lebrun, 2012; English et al., 2015; Hakimi & Bougdour, 2015; Fereig & Nishikawa, 2020). En *T. gondii*, muchas de estas proteínas se han descrito como factores de virulencia (Boothroyd & Dubremetz, 2008; Sibley et al., 2009; Behnke et al., 2015; Rosowski et al., 2011; Bougdour et al., 2013; Zhang et al., 2019). En *N. caninum*, aunque el conocimiento de los mecanismos moleculares patogénicos no es tan amplio, algunas proteínas de las roptrias (ROP16, ROP5) y de los gránulos densos (GRA7, GRA17, GRA6, GRA2) ya se han descrito como factores de virulencia (Ma et al., 2017a,b; Nishikawa et al., 2018; Yang et al., 2018; Zhao et al., 2020; Dong et al., 2021). Ninguna de las proteínas de las roptrias descritas anteriormente como factores de virulencia presentaron una abundancia diferencial en este estudio. Sin embargo, la pseudoquinasa de bradizoíto 1 (BPK1; NCLIV_007770) y un miembro de la familia de las roptrias quinasas ROP20 (NCLIV_068850), presentaron una mayor abundancia en los aislados de alta virulencia, tanto en el grupo de aislados de alta virulencia como en diferentes comparaciones por pares. Ambas proteínas ya mostraron mayor abundancia en estudios transcriptómicos y proteómicos previos (Horcajo et al., 2017, 2018; García-Sánchez et al., 2019a), por lo que podrían ser factores de virulencia importantes para *N. caninum*. En cuanto a las proteínas GRA previamente descritas como factores de virulencia en *N. caninum*, solo NcGRA7 (NCLIV_021640) fue más abundante en el aislado de alta virulencia Nc-Spain7 en las comparaciones por pares.

En resumen, los resultados obtenidos en este primer objetivo podrían ayudar a la identificación de posibles factores clave en la virulencia de *N. caninum* y a la explicación de mecanismos implicados en determinados rasgos fenotípicos observados en modelos *in vitro* e *in vivo*. Los aislados de alta virulencia mostraron mayor abundancia de algunas proteínas que podrían estar implicadas en la virulencia, como un miembro de la familia de la roptria quinasa ROP20, la proteína BPK1, la proteína ADN polimerasa y algunas proteínas GRA. Su papel en la virulencia del parásito merece una mayor investigación. Además, son necesarios estudios funcionales y mejoras en la anotación actual del genoma de *N. caninum* para mejorar el conocimiento de las bases moleculares de la virulencia de este parásito.

Como consecuencia de los resultados obtenidos en este trabajo y en estudios anteriores realizados por el grupo SALUVET, se seleccionaron las proteínas NcGRA7 y NcROP40 para

continuar su estudio, planteando la hipótesis de que podrían contribuir a la virulencia del parásito (**Objetivo 2**). Ambas proteínas presentaron una mayor abundancia en los aislados de alta virulencia en comparaciones proteómicas (Regidor-Cerrillo et al., 2012) y juegan un papel importante durante distintas fases del ciclo lítico de *N. caninum* (Aguado-Martínez et al., 2010; Pastor-Fernández et al., 2015b). Además, ambas proteínas se han usado como candidatos vacunales en ratones, exhibiendo una protección parcial frente a la infección (Pastor-Fernández et al., 2015a; Vemulapalli et al., 2007; Aguado-Martínez et al., 2009; Lv et al., 2015). Por otro lado, los estudios recientes utilizando parásitos mutantes deficientes en *NcGRA7* han demostrado la disminución de su virulencia en ratones (Nishikawa et al., 2018; Wang et al., 2021a; Abdou et al., 2022), aunque para ello se utilizaron modelos poco normalizados.

Con objeto de caracterizar estos posibles factores de virulencia y comprender mejor las interacciones parásito-hospedador, se realizaron mutantes knockout (KO) en dichas proteínas mediante la tecnología CRISPR/Cas9 (**Subobjetivo 2.1**), generando las cepas *NcΔGRA7* y *NcΔROP40*. Esta técnica se aplicó por primera vez a *N. caninum* en 2018, para generar mutantes defectivos en *NcGRA7*, demostrando que las construcciones desarrolladas para *T. gondii* se pueden emplear en *N. caninum* (Arranz-Solís et al., 2018). Desde entonces, el mismo procedimiento se ha utilizado para generar otros KO en *N. caninum* (Nishikawa et al., 2018), aunque algunos autores describieron fracasos o eficiencias muy bajas y tuvieron que modificar y emplear construcciones específicas para *N. caninum* (Yang et al., 2018; Zhao et al., 2020; Dong et al., 2021). En este estudio, la cepa *NcΔROP40* y las cepas complementadas con la copia del gen delecionado se generaron siguiendo el mismo procedimiento que Arranz-Solís et al. (2018), obteniendo buenos resultados. Además, tanto para la generación de *NcΔGRA7* (Arranz-Solís et al., 2018) como para la generación de *NcΔROP40*, se utilizó el aislado bien caracterizado y de alta virulencia *Nc-Spain7* como cepa parental (*wild-type*, WT) en lugar del aislado ampliamente utilizado para otros estudios *Nc-1*. *Nc-Spain7* representa un excelente aislado de referencia ya que, a diferencia de *Nc-1*, se ha mantenido mediante un número reducido de pases en cultivo celular para preservar sus rasgos fenotípicos (Bartley et al., 2006) y ha sido ampliamente caracterizado en modelos *in vivo* e *in vitro*, mostrando resultados comparables (Regidor-Cerrillo et al., 2010, 2011, 2014; Jiménez-Pelayo et al., 2017, 2019b; García-Sánchez et al., 2019b).

La influencia de estas proteínas en la virulencia del parásito se evaluó en un modelo murino gestante de infección congénita y cerebral por *N. caninum* perfectamente caracterizado en estudios previos (López-Pérez et al., 2008; Arranz-Solís et al., 2015) (**Subobjetivo 2.2**). Este modelo es lo suficientemente sensible como para detectar diferencias de virulencia entre aislados (Regidor-Cerrillo et al., 2010; Dellarupe et al., 2014a). El uso de modelos normalizados es de gran importancia para obtener resultados sólidos, reproducibles y comparables entre grupos, ya que se ha demostrado que los resultados dependen de la estirpe de ratón, el aislado y el número de pases en cultivo celular del parásito, la dosis de infección, la vía de administración y el momento de la infección durante la gestación.

La delección de los genes *NcGRA7* y *NcROP40* resultó en una reducción de la virulencia en este modelo, ya que los tiempos medios de supervivencia de las crías nacidas de madres infectadas con los parásitos KO fueron significativamente mayores que los de las crías de madres desafiadas con el parásito WT, siendo el grupo infectado con *NcΔGRA7* el que tuvo el mayor tiempo medio de supervivencia. Estas diferencias no se observaron al comparar el efecto de las cepas complementadas y el WT, apoyando el papel de *NcGRA7* y *NcROP40* en la virulencia del parásito. No obstante, la tasa de mortalidad de las crías fue superior al 95% en todos los grupos infectados, lo que sugiere una transmisión vertical cercana al 100% para todas las cepas. La reducción de la virulencia de los parásitos KO también se observó en las hembras gestantes infectadas con estas cepas, ya que mostraron signos clínicos más leves, menores cargas parasitarias en el cerebro y menores tasas de mortalidad en comparación con las infectadas con el WT, siendo, de nuevo, el grupo infectado con *NcΔGRA7* el que obtuvo los mejores resultados. Estudios previos también demostraron menores tasas de mortalidad y menores cargas parasitarias cerebrales en ratones infectados con una cepa deficiente en *NcGRA7* que en los infectados con la cepa parental Nc-1 (Nishikawa et al., 2018; Wang et al., 2021a). Por el contrario, otro estudio realizado en un modelo murino gestante observó mayores tasas de mortalidad y cargas parasitarias cerebrales similares en las hembras infectadas con la cepa deficiente en *NcGRA7* y su cepa parental, Nc-1 (Abdou et al., 2022). Sin embargo, en este estudio se observó un efecto en la supervivencia de las crías, presentando menores tasas de mortalidad (50%) las crías nacidas de madres infectadas con un parásito deficiente en *NcGRA7*. Las diferencias observadas en nuestro trabajo pueden ser debidas al momento de la infección (3,5 días frente a 7 días de gestación), a la cepa utilizada para la generación de los KO (Nc-1 frente a Nc-Spain7) y a la estirpe de ratón (C57BL/6 frente a BALB/c). La infección a mitad de gestación (día 7) produjo mayores tasas de mortalidad y transmisión vertical en las crías que la infección a principio o a final de gestación (López-Pérez et al., 2008). Esto es debido, probablemente, al grado de desarrollo de la placenta. A principio de la gestación es posible que *N. caninum* no llegue al feto porque aún no se ha producido la implantación (día 4,5), lo que explicaría las mayores tasas de mortalidad observadas en nuestro trabajo. Además, a diferencia del aislado Nc-Spain7, Nc-1 presenta un elevado número de pases en cultivo celular y se ha demostrado que el mantenimiento prolongado en cultivo celular puede atenuar la virulencia *in vivo* (Bartley et al., 2006). Los resultados obtenidos en infecciones murinas experimentales con esta cepa son inconsistentes, mostrando una gran variabilidad en las tasas de supervivencia (Nishikawa et al., 2018; Wang et al., 2021a; Collantes-Fernández et al., 2006a), todo esto corrobora la importancia de utilizar un modelo normalizado y un aislado bien caracterizado con un número de pases controlado. Por otra parte, aunque no existen estudios con parásitos deficientes en *ROP40* en *N. caninum*, los estudios realizados en *T. gondii* no mostraron diferencias en la virulencia en ratones en comparación con la cepa parental (Wang et al., 2017), pero exhibieron una carga reducida de quistes en el cerebro (Fox et al., 2016).

En cuanto a la respuesta inmunitaria humoral, las hembras gestantes infectadas con

parásitos KO presentaron niveles de IgG1 significativamente más bajos que las infectadas con parásitos WT. Cabe señalar que el predominio de IgG1 se asocia a una respuesta Th2 (Liew, 2002), la cual favorece una mayor multiplicación del parásito en los tejidos del hospedador (Kano et al., 2005; Long & Baszler, 2000). Las hembras gestantes infectadas con NcΔGRA7 tuvieron los niveles más bajos de IgG1 y la mayor reducción de la virulencia, mientras que las infectadas con WT tuvieron los mayores valores de IgG1 y de carga parasitaria. Por otra parte, la producción de citoquinas no pareció indicar que existiera una regulación diferencial de la respuesta inmunitaria inducida entre la cepa WT y las cepas KO.

Los resultados obtenidos demuestran que las proteínas NcGRA7 y NcROP40 son factores de virulencia de *N. caninum*, ya que su delección se asoció con una disminución de la virulencia en un modelo murino gestante normalizado, siendo más modesto el impacto producido por la delección de NcROP40. El efecto observado pudo ser debido a defectos en la capacidad de invasión/ proliferación de las cepas KO, a defectos en la capacidad de atravesar barreras (placenta o barrera hematoencefálica) o a mecanismos de modulación de la respuesta inmunitaria.

Las infecciones en ratón son los modelos más utilizados para evaluar factores de virulencia y diferencias de comportamiento entre aislados, sin embargo, pueden no ser adecuados para investigar los mecanismos subyacentes a las interacciones entre *N. caninum* y su hospedador natural, los bovinos. Por tanto, el siguiente objetivo fue investigar el papel de estas dos proteínas en el crecimiento de los taquizoítos y en la modulación de la respuesta inmunitaria en células diana bovinas (**Subobjetivo 2.3**) como primer paso para profundizar en el papel de estas proteínas en la virulencia de *N. caninum* en los bovinos. Para ello se utilizaron células del trofoblasto de la placenta bovina (línea celular F3), y macrófagos bovinos (boMØ), que demostraron ser muy útiles para estudiar rasgos fenotípicos diferenciales de los aislados Nc-Spain7 y Nc-Spain1H (Jiménez-Pelayo et al., 2017, 2019a,b; García-Sánchez et al., 2019b, 2020, 2021). La capacidad de proliferación de las cepas KO se comparó con la de la cepa WT en ambas poblaciones celulares.

Al analizar el crecimiento de los parásitos en las células F3, no se observaron diferencias entre las cepas KO y el parásito WT, ni en la cinética de proliferación ni en el ensayo de competición con la cepa WT. Las células F3 fueron aisladas de una novilla de quinto mes de gestación y conservan las características *in vivo* de las células trofoblásticas de los cotiledones de la placenta bovina (Hambruch et al., 2010). Los resultados obtenidos en la caracterización en ratón mostraron que, a pesar de los mayores tiempos medios de supervivencia de las crías de ratones infectados con las cepas KO, las tasas de mortalidad neonatal alcanzaron valores cercanos al 100% en todos los grupos. En conjunto, los resultados sugieren que los parásitos KO serían capaces de multiplicarse en las células del trofoblasto y transmitirse al feto. Un estudio similar realizado en células VERO tampoco encontró diferencias significativas en el crecimiento de parásitos deficientes en NcGRA7 en comparación con su cepa parental (el aislado Nc-1) (Nishikawa et al., 2018). Por el contrario, en células HFF, los parásitos defi-

cientes en NcGRA7 mostraron una menor capacidad de proliferación que Nc-1 (Wang et al., 2021a). No existen otros estudios con taquizoítos de *N. caninum* deficientes en NcROP40, sin embargo, estudios realizados en *T. gondii* no mostraron ninguna alteración significativa en el crecimiento de parásitos deficientes en dicho gen en HFF (Wang et al., 2017). Al igual que sucede con los modelos *in vivo*, la selección de líneas celulares adecuadas y aislados bien caracterizados es primordial para obtener resultados fiables y reproducibles.

Por otra parte, los macrófagos constituyen la primera línea de defensa y son efectores clave en el desarrollo de la respuesta inmunitaria bovina (Abe et al., 2014), por lo que se estudió el crecimiento de las cepas NcΔGRA7 y NcΔROP40 en dichas células para investigar su comportamiento cuando se ven sometidas a la presión inmunitaria. Los resultados muestran que las cepas KO tuvieron una capacidad de proliferación significativamente menor que la cepa WT a las 48, 60 y 72 h pi, momentos en los que previamente se observó una mayor expresión de los transcritos NcGRA7 y NcROP40 (Pastor-Fernández et al., 2015b, 2016), y que coinciden con las fases de multiplicación, egresión y reinvasión del ciclo lítico del parásito. NcGRA7 se secreta en el citosol de la célula hospedadora a las 48 h pi (Nishikawa et al., 2018) y se dirige a la membrana de la vacuola parasitófora y a la red tubular intravacuolar (Hemphill et al., 1998; Aguado-Martínez et al., 2010; Dong et al., 2017), pudiendo tener efectos sobre la formación de la vacuola parasitófora. Un estudio anterior observó que las vacuolas parasitóforas de las cepas deficientes en NcGRA7 fueron más pequeñas que las de Nc-1 (Wang et al., 2021a). Por su parte, NcROP40 no interactúa con la membrana de la vacuola parasitófora y no hay evidencias de su secreción por microscopía confocal (Pastor-Fernández et al., 2015b). Sin embargo, NcROP40 tiene un péptido señal en su secuencia, cuya presencia es un prerrequisito para entrar en las vías secretoras. En consecuencia, NcROP40 podría ser secretada al citosol y/o al núcleo de la célula hospedadora, pudiendo tener un papel en la regulación de la célula hospedadora (Pastor-Fernández et al., 2015b; Dong et al., 2017), tal y como se describió previamente para otras proteínas de las roptrias como NcROP16 (Ma et al., 2017a).

Aunque apenas se conocen los aspectos relacionados con la patogenia durante la infección por *N. caninum*, se ha demostrado que determinadas cepas de *T. gondii* han desarrollado varios mecanismos para contrarrestar las defensas del hospedador, incluyendo la secreción de proteínas efectoras de orgánulos especializados (ROP y GRA) las cuales intervienen en las vías de transcripción y señalización del hospedador, modulando la respuesta inmunitaria (Hunter & Sibley, 2012; Rastogi et al., 2020). De esta manera, los parásitos deficientes en la proteína de gránulos densos TgIST, fueron incapaces de contrarrestar la respuesta de IFN- γ de sus células hospedadoras *in vitro* y son avirulentos *in vivo* (Olias et al., 2016; Gay et al., 2016). El IFN- γ es una molécula crucial en la defensa frente a los parásitos intracelulares y ayuda a controlar la infección inhibiendo el crecimiento y la replicación de los taquizoítos (Innes et al., 1995; Yamane et al., 2000; Yarovinsky, 2014). En este contexto, cabe esperar que los parásitos KO sean más susceptibles a la inhibición del crecimiento mediada por IFN- γ , como se ha observado previamente en *T. gondii* (Wang et al., 2020).

Sin embargo, la estimulación de los boMØ con IFN- γ mostró una inhibición similar del crecimiento de taquizoítos en todas las cepas de forma dosis-dependiente. Las dosis altas de IFN- γ causaron la disminución del número de parásitos, eliminando las diferencias observadas entre grupos en boMØ no estimulados. Por el contrario, un estudio reciente demostró que los parásitos deficientes en NcGRA7 fueron eliminados más fácilmente por los macrófagos murinos estimulados con IFN- γ (células Raw246.7) que la cepa parental (Nc-1) (Wang et al., 2021a), probablemente debido a la mayor agregación del factor inmunitario IRGa6 (GTPasa relacionada con la inmunidad) a la membrana de la vacuola parasitófora de los parásitos deficientes en NcGRA7, contribuyendo a su destrucción en presencia de IFN- γ (Wang et al., 2021a; Saeij & Fricke, 2017). En *T. gondii*, GRA7 forma un complejo con ROP5/ROP18 y regula la inactivación específica de IRGa6 por ROP18 (Hermanns et al., 2016; Alaganaan et al., 2014). La destrucción de la vacuola parasitófora mediada por IRGs es uno de los principales mecanismos de control de *T. gondii* en células murinas (Yamamoto et al., 2012; Saeij & Fricke, 2017). Sin embargo, estas enzimas no se encuentran en muchas especies de mamíferos, como el bovino (Hunn et al., 2011; Gazzinelli et al., 2014; Müller & Howard, 2016), por lo que el efecto de la destrucción de la vacuola parasitófora mediada por IRGs no se observaría en nuestro estudio. Además, Gossner & Hassan (2020) demostraron que la estimulación con IFN- γ anulaba la mayoría de los cambios transcripcionales inducidos por *T. gondii* como estrategia de supervivencia en boMØ, restringiendo así su replicación.

Los estudios realizados en macrófagos murinos con parásitos deficientes en NcGRA7 demostraron que esta proteína activa las vías de señalización del hospedador, especialmente la producción de citoquinas y quimioquinas (Nishikawa et al., 2018). Aunque no hay estudios en NcROP40, la capacidad de las pseudoquinasas para modular las vías de señalización de las células hospedadoras se ha demostrado ampliamente en *T. gondii* (Reese & Boyle, 2012). Por lo tanto, la diferencia de proliferación observada entre cepas en boMØ sin estimular podría atribuirse a una alteración en la capacidad del parásito para modular la respuesta inmunitaria del hospedador, ya que esta capacidad se ha asociado ampliamente a la virulencia (Feng et al., 2010; Ma et al., 2017a; García-Sánchez et al., 2019a; Jiménez-Pelayo et al., 2019a, 2020). Los resultados obtenidos en este estudio demostraron mayores niveles de expresión de TLR3 en boMØ infectados con las cepas KO que en los infectados con la cepa WT. La vía de señalización TLR3-TRIF mejora la resistencia frente a la infección por *N. caninum* en ratones, ya que mejora la respuesta inmunitaria Th1 (Miranda et al., 2019), lo que podría explicar el mejor control de la multiplicación de los parásitos KO en nuestro trabajo. Sin embargo, no se observó una clara activación de la respuesta Th1, ya que no se encontraron diferencias en la expresión de citoquinas proinflamatorias entre los boMØ infectados con la cepa WT y los boMØ infectados con las cepas KO. No obstante, no podemos descartar que la estimulación Th1 como respuesta a la activación de TLR3 se produjera más tarde, ya que la expresión de citoquinas se analizó en una fase temprana de la infección (8 h pi). Además, la activación de la vía dependiente de TRIF da lugar a la producción de interferón de tipo I (IFN- β e IFN- α), que no se ha analizado en este estudio (Leichtle et al.,

2009; Mineo et al., 2009; Jiménez-Dalmaroni et al., 2016).

Esta investigación ha sido pionera en el uso de células bovinas para la evaluación de factores de virulencia de *N. caninum*. Los resultados obtenidos sugieren que NcGRA7 y NcROP40 podrían estar implicados en la manipulación de los mecanismos de defensa inmunitaria innata frente a *N. caninum*, observando diferencias entre el comportamiento de las cepas de parásitos KO y la cepa WT en boMØ, con una menor proliferación y una mayor estimulación del receptor TLR3. Se necesita proseguir la investigación sobre las vías de activación en las que participan estas proteínas para comprender mejor sus funciones y su papel en la virulencia de *N. caninum* durante la infección en los bovinos. En resumen, los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral permiten confirmar a las proteínas NcGRA7 y NcROP40 como factores de virulencia en un modelo murino gestante normalizado y han caracterizado el comportamiento de las cepas deficientes en dichas proteínas en células diana bovina. Adicionalmente, se ha descrito al boMØ como un modelo adecuado para evaluar factores de virulencia del parásito en el curso de la infección. Finalmente, los posibles factores de virulencia identificados en el Objetivo 1 merecen ser investigados en profundidad ya que podrían ser candidatos vacunales adecuados.

CONCLUSIONES

OBJETIVO 1. Identificación de posibles factores de virulencia en *Neospora caninum*.

Primera. La comparación del proteoma del taquizoíto de seis aislados de *N. caninum* con diferente virulencia ha demostrado la existencia de variaciones en la abundancia de proteínas entre los mismos.

Segunda. Los aislados de alta virulencia muestran una mayor abundancia de algunas proteínas específicas de parásitos apicomplejos que podrían estar implicadas en la invasión, el desarrollo intracelular de *N. caninum* o la modulación de la respuesta inmunitaria del hospedador. Entre ellas cabe destacar un miembro de la familia de las roptrias ROP20, la proteína pseudoquinasa 1 de bradizoíto (BPK1) y las proteínas de los gránulos densos GRA32, GRA6 y GRA7.

Tercera. Los aislados de alta virulencia también muestran una mayor abundancia de determinadas proteínas implicadas en el metabolismo de la energía y de los ácidos nucleicos, lo que podría explicar su mayor capacidad de replicación. Entre ellas, cabe destacar una proteína relacionada con la lisofosfolipasa, otra con función de unión a acil-CoA, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y la ADN polimerasa.

OBJETIVO 2. Evaluación y caracterización de los posibles factores de virulencia de *Neospora caninum* NcGRA7 y NcROP40.

Primera. Se ha aplicado con éxito la tecnología CRISPR/Cas9 para la obtención de una cepa deficiente en NcROP40 (Nc Δ ROP40), confirmando que los plásmidos desarrollados para *T. gondii* pueden utilizarse en *N. caninum*, sin necesidad de promotores específicos. El empleo del aislado de alta virulencia Nc-Spain7 como cepa parental presenta la ventaja de su caracterización en modelos *in vitro* e *in vivo* y haberse mantenido con un número de pases bajo y controlado en cultivo celular.

Segunda. La delección de NcGRA7 y NcROP40 se asocia con una reducción parcial de la virulencia en el modelo murino gestante, confirmándose NcGRA7 como factor de virulencia y postulándose NcROP40 como un nuevo factor de virulencia en *N. caninum*.

Tercera. La delección de NcGRA7 ocasiona una mayor atenuación de la virulencia que la delección de NcROP40. Los animales inoculados con los parásitos deficientes en NcGRA7

muestran signos clínicos más leves, menores cargas parasitarias en cerebro y mayor tiempo medio de supervivencia de las crías.

Cuarta. No se observan diferencias entre las cepas deficientes y la cepa parental en su crecimiento *in vitro* en las células del trofoblasto bovino. Este hecho, unido a la elevada mortalidad neonatal observada en el modelo murino, permite postular que la delección de estos genes no altera la capacidad del parásito de multiplicarse en las células del trofoblasto ni su transmisión al feto.

Quinta. El macrófago bovino es un modelo *in vitro* adecuado que permite la caracterización inicial de los posibles factores de virulencia mediante el estudio del crecimiento del parásito en las distintas fases del ciclo lítico y de la modulación de la respuesta inmunitaria innata en la especie diana.

Sexta. Las cepas delecionadas tienen una menor capacidad de crecimiento en el macrófago que la cepa parental, presentando un menor número de taquizoítos totales en distintas fases del ciclo lítico, lo que sugiere la existencia de alteraciones durante la replicación en esta célula.

Séptima. La función de las proteínas NcGRA7 y NcROP40 no parece estar afectada por la respuesta al IFN- γ en bovinos, ya que la estimulación de los macrófagos bovinos con IFN- γ muestra una inhibición similar del crecimiento de los taquizoítos, de forma dosis-dependiente, en las cepas deficientes y en la cepa parental.

Octava. Los mayores niveles de expresión del receptor TLR3 en los macrófagos infectados con los parásitos deficientes en las proteínas NcGRA7 y NcROP40 sugieren que estas proteínas podrían estar implicadas en la manipulación de los mecanismos de la defensa inmunitaria innata frente a *N. caninum*.

CONCLUSIONS

OBJECTIVE 1. Identification of potential virulence factors in *Neospora caninum*.

First. Comparative tachyzoite proteome analysis among six *N. caninum* isolates with different virulence has shown variations in protein abundance between isolates.

Second. High virulence isolates show an increased abundance of some apicomplexan parasite-specific proteins that may be involved in invasion, intracellular development of *N. caninum* or modulation of the host immune response. These include a member of the rhoptry kinase family ROP20, bradyzoite pseudokinase 1 (BPK1) and the dense granule proteins GRA32, GRA6 and GRA7.

Third. High virulence isolates also show a higher abundance of certain proteins involved in energy and nucleic acid metabolism, which could explain their higher replication capacity. These include a lysophospholipase-related protein, an acyl-CoA-binding protein, the glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and a DNA polymerase.

OBJECTIVE 2. Evaluation and characterisation of *Neospora caninum* virulence factors NcGRA7 y NcROP40.

First. CRISPR/Cas9 technology has been successfully applied to obtain a NcROP40-deficient strain (Nc Δ ROP40), confirming that plasmids developed for *T. gondii* can be used in *N. caninum*, without the need for specific promoters. The use of the highly virulent isolate Nc-Spain7 as the parental strain has the advantage of having been characterised in *in vitro* and *in vivo* models and of having been maintained with a low and controlled passage number in cell culture.

Second. NcGRA7 and NcROP40 deletion is associated with a partial reduction of virulence in the pregnant murine model, confirming NcGRA7 as a virulence factor and postulating NcROP40 as a novel virulence factor in *N. caninum*.

Third. NcGRA7 deletion results in a greater attenuation of virulence than NcROP40 deletion. Animals inoculated with NcGRA7-deficient parasites show milder clinical signs, lower parasite loads in the brain and longer median survival time of offspring.

Fourth. No differences are observed between the deficient strains and the parental strain in their *in vitro* growth in bovine trophoblast cells. This fact, together with the high

neonatal mortality observed in the murine model, allows us to postulate that deletion of these genes does not alter the parasite's ability to multiply in trophoblast cells or its transmission to the foetus.

Fifth. Bovine macrophage is a suitable *in vitro* model that allows initial characterisation of potential virulence factors by studying parasite growth at different stages of the lytic cycle and modulation of the innate immune response in the target specie.

Sixth. Defective strains have a lower growth capacity in the macrophage than the parental strain, showing a lower total number of tachyzoites at different stages of the lytic cycle. This suggests the existence of alterations during replication in this cell.

Seventh. The role of NcGRA7 and NcROP40 proteins does not appear to be affected by the response to IFN- γ in cattle, as stimulation of bovine macrophages with IFN- γ shows a similar inhibition of tachyzoite growth in a dose-dependent manner in the defective strains and in the parental strain.

Eighth. The increased expression levels of TLR3 receptor in macrophages infected with NcGRA7- and NcROP40-defective parasites suggest that these proteins may be involved in manipulating the mechanisms of innate immune defence against *N. caninum*.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdou, A. M., Ikeda, R., Watanabe, K., Furuoka, H., and Nishikawa, Y. (2022).
Role of dense granule antigen 7 in vertical transmission of *Neospora caninum* in C57BL/6 mice infected during early pregnancy.
Parasitology International, 89:102576.
- Abe, C., Tanaka, S., Ihara, F., and Nishikawa, Y. (2014).
Macrophage depletion prior to *Neospora caninum* infection results in severe neosporosis in mice.
Clinical and Vaccine Immunology, 21(8):1185–1188.
- Adomako-Ankomah, Y., Wier, G. M., Borges, A. L., Wand, H. E., and Boyle, J. P. (2014).
Differential locus expansion distinguishes Toxoplasmatinae species and closely related strains of *Toxoplasma gondii*.
mBio, 5(1):e01003–e01013.
- Aguado-Martínez, A., Álvarez-García, G., Arnaiz-Seco, I., Innes, E., and Ortega-Mora, L. M. (2005).
Use of avidity enzyme-linked immunosorbent assay and avidity Western blot to discriminate between acute and chronic *Neospora caninum* infection in cattle.
Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 17(5):442–450.
- Aguado-Martínez, A., Álvarez-García, G., Fernández-García, A., Risco-Castillo, V., Arnaiz-Seco, I., Rebordosa-Trigueros, X., Navarro-Lozano, V., and Ortega-Mora, L. M. (2008).
Usefulness of rNcGRA7- and rNcSAG4-based ELISA tests for distinguishing primo-infection, recrudescence, and chronic bovine neosporosis.
Veterinary Parasitology, 157(3-4):182–195.
- Aguado-Martínez, A., Álvarez-García, G., Fernández-García, A., Risco-Castillo, V., Marugán-Hernández, V., and Ortega-Mora, L. M. (2009).
Failure of a vaccine using immunogenic recombinant proteins rNcSAG4 and rNcGRA7 against neosporosis in mice.
Vaccine, 27(52):7331–7338.
- Aguado-Martínez, A., Álvarez-García, G., Schares, G., Risco-Castillo, V., Fernández-García, A., Marugán-Hernández, V., and Ortega-Mora, L. M. (2010).

- Characterisation of NcGRA7 and NcSAG4 proteins: Immunolocalisation and their role in the host cell invasion by *Neospora caninum* tachyzoites.
Acta Parasitologica, 55(4):304–312.
- Alaganan, A., Fentress, S. J., Tang, K., Wang, Q., and Sibley, L. D. (2014).
Toxoplasma GRA7 effector increases turnover of immunity-related GTPases and contributes to acute virulence in the mouse.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 111(3):1126–1131.
- Almería, S., Araujo, R. N., Darwich, L., Dubey, J. P., and Gasbarre, L. C. (2011).
Cytokine gene expression at the materno-foetal interface after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation.
Parasite Immunology, 33:517–523.
- Almería, S. and López-Gatius, F. (2013).
Bovine neosporosis: clinical and practical aspects.
Research in Veterinary Science, 95(2):303–309.
- Almería, S., Serrano-Pérez, B., and López-Gatius, F. (2017).
Immune response in bovine neosporosis: Protection or contribution to the pathogenesis of abortion.
Microbial pathogenesis, 109:177–182.
- Almería, S., Serrano-Perez, B., Darwich, L., Domingo, M., Mur-Novales, R., Regidor-Cerrillo, J., Cabezón, O., Pérez-Maillo, M., Lopez-Helguera, I., Fernández-Aguilar, X., Puig-Ribas, M., Ortega-Mora, L. M., García-Ispierto, I., Dubey, J. P., and López-Gatius, F. (2016).
Foetal death in naive heifers inoculated with *Neospora caninum* isolate Nc-Spain7 at 110 days of pregnancy.
Experimental Parasitology, 168:62–69.
- Álvarez-García, G., Collantes-Fernández, E., Costas, E., Rebordosa, X., and Ortega-Mora, L. M. (2003).
Influence of age and purpose for testing on the cut-off selection of serological methods in bovine neosporosis.
Veterinary Research, 34(3):341–352.
- Álvarez-García, G., García-Culebras, A., Gutiérrez-Expósito, D., Navarro-Lozano, V., Pastor-Fernández, I., and Ortega-Mora, L. M. (2013).
Serological diagnosis of bovine neosporosis: a comparative study of commercially available ELISA tests.
Veterinary Parasitology, 198(1-2):85–95.

- Álvarez-García, G., Pitarch, A., Zaballo, A., Fernández-García, A., Gil, C., Gómez-Bautista, M., Aguado-Martínez, A., and Ortega-Mora, L. M. (2007).
The NcGRA7 gene encodes the immunodominant 17 kDa antigen of *Neospora caninum*.
Parasitology, 134(1):41–50.
- Anderson, M., Andrianarivo, A., and Conrad, P. (2000).
Neosporosis in cattle.
Animal Reproduction Science, 60-61:417–431.
- Anderson, M. L., Blanchard, P. C., Barr, B. C., Dubey, J. P., Hoffman, R. L., and Conrad, P. A. (1991).
Neospora-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle.
Journal of the American Veterinary Medical Association, 198:241–244.
- Andrianarivo, A. G., Anderson, M. L., Rowe, J. D., Gardner, I. A., Reynolds, J. P., Choromanski, L., and Conrad, P. A. (2005).
Immune responses during pregnancy in heifers naturally infected with *Neospora caninum* with and without immunization.
Parasitology Research, 96(1):24–31.
- Arranz-Solís, D., Aguado-Martínez, A., Müller, J., Regidor-Cerrillo, J., Ortega-Mora, L. M., and Hemphill, A. (2015).
Dose-dependent effects of experimental infection with the virulent *Neospora caninum* Nc-Spain7 isolate in a pregnant mouse model.
Veterinary Parasitology, 211(3-4):133–140.
- Arranz-Solís, D., Regidor-Cerrillo, J., Lourido, S., Ortega-Mora, L. M., and Saeij, J. P. (2018).
Toxoplasma CRISPR/Cas9 constructs are functional for gene disruption in *Neospora caninum*.
International Journal for Parasitology, 48(8):597–600.
- Arrizabalaga, G. and Boothroyd, J. C. (2004).
Role of calcium during *Toxoplasma gondii* invasion and egress.
International Journal for Parasitology, 34(3):361–368.
- Ashton, P. D., Curwen, R. S., and Wilson, R. A. (2001).
Linking proteome and genome: how to identify parasite proteins.
Trends in Parasitology, 17(4):198–202.
- Atkinson, R., Harper, P. A., Ryce, C., Morrison, D. A., and Ellis, J. T. (1999).
Comparison of the biological characteristics of two isolates of *Neospora caninum*.
Parasitology, 118 (Pt 4):363–370.
- Baillargeon, P., Fecteau, G., Paré, J., Lamothe, P., and Sauvé, R. (2001).

- Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the International Embryo Transfer Society as a method of controlling vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle.
Journal of the American Veterinary Medical Association, 218(11):1803–1806.
- Bandini, L. A., Neto, A. F., Pena, H. F., Cavalcante, G. T., Schares, G., Nishi, S. M., and Gennari, S. M. (2011).
Experimental infection of dogs (*Canis familiaris*) with sporulated oocysts of *Neospora caninum*.
Veterinary Parasitology, 176(2-3):151–156.
- Barber, J. S., Holmdahl, O. J. M., Owen, M. R., Guy, F., Uggla, A., and Trees, A. J. (1995).
Characterization of the first European isolate of *Neospora caninum* (Dubey, Carpenter, Speer, Topper and Uggla).
Parasitology, 111(Pt 5):563–568.
- Barling, K. S., Lunt, D. K., Graham, S. L., and Choromanski, L. J. (2003).
Evaluation of an inactivated *Neospora caninum* vaccine in beef feedlot steers.
Journal of the American Veterinary Medical Association, 222(5):624–627.
- Barr, B. C., Anderson, M. L., Dubey, J. P., and Conrad, P. A. (1991a).
Neospora-like protozoal infections associated with bovine abortions.
Veterinary Pathology, 28(2):110–116.
- Barr, B. C., Conrad, P. A., Breitmeyer, R., Sverlow, K., Anderson, M. L., Reynolds, J., Chauvet, A. E., Dubey, J. P., and Ardans, A. A. (1993).
Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora*-infected fetuses: four cases (1990-1992).
Journal of the American Veterinary Medical Association, 202(1):113–117.
- Barr, B. C., Conrad, P. A., Dubey, J. P., and Anderson, M. L. (1991b).
Neospora-like encephalomyelitis in a calf: pathology, ultrastructure, and immunoreactivity.
Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 3(1):39–46.
- Barr, B. C., Rowe, J. D., Sverlow, K. W., BonDurant, R. H., Ardans, A. A., Oliver, M. N., and Conrad, P. A. (1994).
Experimental reproduction of bovine fetal *Neospora* infection and death with a bovine *Neospora* isolate.
Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 6(2):207–215.
- Barragan, A. and Sibley, L. D. (2002).
Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence.
The Journal of Experimental Medicine, 195(12):1625–1633.

- Bartels, C., Arnaiz-Seco, J., Ruiz-Santa-Quitera, A., Björkman, C., Frössling, J., von Blumröder, D., Conraths, F., Schares, G., van Maanen, C., Wouda, W., and Ortega-Mora, L. (2006).
Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, The Netherlands, Spain and Sweden.
Veterinary Parasitology, 137(1-2):17–27.
- Bartley, P. M., Katzer, F., Rocchi, M. S., Maley, S. W., Benavides, J., Nath, M., Pang, Y., Cantón, G., Thomson, J., Chianini, F., and Innes, E. A. (2013).
Development of maternal and foetal immune responses in cattle following experimental challenge with *Neospora caninum* at day 210 of gestation.
Veterinary Research, 44(1):91.
- Bartley, P. M., Wright, S., Sales, J., Chianini, F., Buxton, D., and Innes, E. A. (2006).
Long-term passage of tachyzoites in tissue culture can attenuate virulence of *Neospora caninum* in vivo.
Parasitology, 133(4):421–432.
- Basso, W., Schares, S., Bärwald, A., Herrmann, D. C., Conraths, F. J., Pantchev, N., Vrhovec, M. G., and Schares, G. (2009).
Molecular comparison of *Neospora caninum* oocyst isolates from naturally infected dogs with cell culture-derived tachyzoites of the same isolates using nested polymerase chain reaction to amplify microsatellite markers.
Veterinary Parasitology, 160(1-2):43–50.
- Basso, W., Schares, S., Minke, L., Bärwald, A., Maksimov, A., Peters, M., Schulze, C., Müller, M., Conraths, F. J., and Schares, G. (2010).
Microsatellite typing and avidity analysis suggest a common source of infection in herds with epidemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion.
Veterinary Parasitology, 173(1-2):24–31.
- Basso, W., Venturini, L., Venturini, M. C., Hill, D. E., Kwok, O. C., Shen, S. K., and Dubey, J. P. (2001).
First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog.
The Journal of Parasitology, 87(3):612–618.
- Baszler, T. V., Long, M. T., Mcelwain, T. F., and Mathison, B. A. (1999).
Interferon- γ and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice.
International Journal for Parasitology, 29(10):1635–1646.
- Beck, H. P., Blake, D., Dardé, M. L., Felger, I., Pedraza-Díaz, S., Regidor-Cerrillo, J., Gómez-Bautista, M., Ortega-Mora, L. M., Putignani, L., Shiels, B., Tait, A., and Weir, W. (2009).
Molecular approaches to diversity of populations of apicomplexan parasites.

- International Journal for Parasitology*, 39(2):175–189.
- Behnke, M. S., Fentress, S. J., Mashayekhi, M., Li, L. X., Taylor, G. A., and Sibley, L. D. (2012).
The polymorphic pseudokinase ROP5 controls virulence in *Toxoplasma gondii* by regulating the active kinase ROP18.
PLoS Pathogens, 8(11):e1002992.
- Behnke, M. S., Khan, A., Lauron, E. J., Jimah, J. R., Wang, Q., Tolia, N. H., and Sibley, L. D. (2015).
Rhoptry proteins ROP5 and ROP18 are major murine virulence factors in genetically divergent South American strains of *Toxoplasma gondii*.
PLoS Genetics, 11(8):e1005434.
- Behnke, M. S., Khan, A., Wootton, J. C., Dubey, J. P., Tang, K., and Sibley, L. D. (2011).
Virulence differences in *Toxoplasma* mediated by amplification of a family of polymorphic pseudokinases.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108(23):9631–9636.
- Beiting, D. P., Peixoto, L., Akopyants, N. S., Beverley, S. M., Wherry, E. J., Christian, D. A., Hunter, C. A., Brodsky, I. E., and Roos, D. S. (2014).
Differential induction of TLR3-dependent innate immune signaling by closely related parasite species.
PLoS ONE, 9(2):e88398.
- Benavides, J., Collantes-Fernández, E., Ferre, I., Pérez, V., Campero, C., Mota, R., Innes, E., and Ortega-Mora, L. M. (2014).
Experimental ruminant models for bovine neosporosis: What is known and what is needed.
Parasitology, 141(11):1471–1488.
- Benavides, J., González-Warleta, M., Arteché-Villasol, N., Pérez, V., Mezo, M., and Gutiérrez-Expósito, D. (2022).
Ovine neosporosis: The current global situation.
Animals, 12(16):2074.
- Benavides, J., Katzer, F., Maley, S. W., Bartley, P. M., Cantón, G., Palarea-Albaladejo, J., Purslow, C. A., Pang, Y., Rocchi, M. S., Chianini, F., Buxton, D., and Innes, E. A. (2012).
High rate of transplacental infection and transmission of *Neospora caninum* following experimental challenge of cattle at day 210 of gestation.
Veterinary Research, 43(1):83.
- Besteiro, S., Michelin, A., Poncet, J., Dubremetz, J.-F., and Lebrun, M. (2009).

- Export of a *Toxoplasma gondii* rhoptry neck protein complex at the host cell membrane to form the moving junction during invasion.
PLoS Pathogens, 5(2):e1000309.
- Beyer, T. V., Svezhova, N. V., Radchenko, A. I., and Sidorenko, N. V. (2002).
Parasitophorous vacuole: morphofunctional diversity in different coccidian genera (a short insight into the problem).
Cell Biology International, 26(10):861–871.
- Bisio, H. and Soldati-Favre, D. (2019).
Signaling cascades governing entry into and exit from host cells by *Toxoplasma gondii*.
Annual Review of Microbiology, 73:579–599.
- Bjerkas, I., Mohn, S. F., and Presthus, J. (1984).
Unidentified cyst-forming Sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs.
Zeitschrift für Parasitenkunde Parasitology Research, 70(2):271–274.
- Björkman, C., Alvarez-Garcia, G., Conraths, F. J., Mattsson, J. G., Ortega-Mora, L. M., Sager, H., and Schares, G. (2006).
Neospora caninum IgG avidity tests: an interlaboratory comparison.
Veterinary Parasitology, 140(3-4):273–280.
- Björkman, C. and Hemphill, A. (1998).
Characterization of *Neospora caninum* iscom antigens using monoclonal antibodies.
Parasite Immunology, 20(2):73–80.
- Björkman, C., Johansson, O., Stenlund, S., Holmdahl, O. J., and Uggla, A. (1996).
Neospora species infection in a herd of dairy cattle.
Journal of the American Veterinary Medical Association, 208(9):1441–1444.
- Black, M. W. and Boothroyd, J. C. (2000).
Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*.
Microbiology and Molecular Biology Reviews, 64(3):607–623.
- Boothroyd, J. C. and Dubremetz, J. F. (2008).
Kiss and spit: The dual roles of *Toxoplasma* rhoptries.
Nature Reviews Microbiology, 6(1):79–88.
- Boucher, E., Marin, M., Holani, R., Young-Speirs, M., Moore, D. M., and Cobo, E. R. (2018).
Characteristic pro-inflammatory cytokines and host defence cathelicidin peptide produced by human monocyte-derived macrophages infected with *Neospora caninum*.
Parasitology, 145(7):871–884.
- Boucher, L. E. and Bosch, J. (2015).
The apicomplexan glideosome and adhesins - Structures and function.
Journal of Structural Biology, 190(2):93–114.

Bougdour, A., Durandau, E., Brenier-Pinchart, M. P., Ortet, P., Barakat, M., Kieffer, S., Curt-Varesano, A., Curt-Bertini, R. L., Bastien, O., Coute, Y., Pelloux, H., and Hakimi, M. A. (2013).

Host cell subversion by *Toxoplasma* GRA16, an exported dense granule protein that targets the host cell nucleus and alters gene expression.

Cell Host and Microbe, 13(4):489–500.

Bougdour, A., Tardieux, I., and Hakimi, M.-A. (2014).

Toxoplasma exports dense granule proteins beyond the vacuole to the host cell nucleus and rewires the host genome expression.

Cellular Microbiology, 16(3):334–343.

Boysen, P., Klevar, S., Olsen, I., and Storset, A. K. (2006).

The protozoan *Neospora caninum* directly triggers bovine NK cells to produce gamma interferon and to kill infected fibroblasts.

Infection and Immunity, 74(2):953–960.

Bradley, P. J. and Sibley, L. D. (2007).

Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors.

Current Opinion in Microbiology, 10(6):582–587.

Braun, L., Brenier-Pinchart, M. P., Yogavel, M., Curt-Varesano, A., Curt-Bertini, R. L., Hussain, T., Kieffer-Jaquinod, S., Coute, Y., Pelloux, H., Tardieux, I., Sharma, A., Belrhali, H., Bougdour, A., and Hakimi, M. A. (2013).

A *Toxoplasma* dense granule protein, GRA24, modulates the early immune response to infection by promoting a direct and sustained host p38 MAPK activation.

Journal of Experimental Medicine, 210(10):2071–2086.

Bridger, P. S., Menge, C., Leiser, R., Tinneberg, H.-R., and Pfarrer, C. D. (2007).

Bovine caruncular epithelial cell line (BCEC-1) isolated from the placenta forms a functional epithelial barrier in a polarised cell culture model.

Placenta, 28(11–12):1110–1117.

Bryan, L. A., Gajadhar, A. A., Dubey, J. P., and Haines, D. M. (1994).

Bovine neonatal encephalomyelitis associated with a *Neospora* sp. protozoan.

The Canadian Veterinary Journal, 35(2):111–113.

Buchholz, K. R., Bowyer, P. W., and Boothroyd, J. C. (2013).

Bradyzoite pseudokinase 1 is crucial for efficient oral infectivity of the *Toxoplasma gondii* tissue cyst.

Eukaryotic Cell, 12(3):399–410.

Buxton, D., McAllister, M. M., and Dubey, J. (2002).

The comparative pathogenesis of neosporosis.

- Trends in Parasitology*, 18(12):546–552.
- Calarco, L., Barratt, J., and Ellis, J. (2018).
Genome wide identification of mutational hotspots in the apicomplexan parasite *Neospora caninum* and the implications for virulence.
Genome Biology and Evolution, 10(9):2417–2431.
- Calarco, L. and Ellis, J. (2020a).
Contribution of introns to the species diversity associated with the apicomplexan parasite, *Neospora caninum*.
Parasitology Research, 119(2):431–445.
- Calarco, L. and Ellis, J. (2020b).
Species diversity and genome evolution of the pathogenic protozoan parasite, *Neospora caninum*.
Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases, 84:104444.
- Calero-Bernal, R., Horcajo, P., Hernández, M., Ortega-Mora, L. M., and Fuentes, I. (2019).
Absence of *Neospora caninum* DNA in human clinical samples, Spain.
Emerging Infectious Diseases, 25(6):1226–1227.
- Cantón, G. J., Katzer, F., Maley, S. W., Bartley, P. M., Benavides-Silvan, J., Palarea-Albaladejo, J., Pang, Y., Smith, S. H., Rocchi, M., Buxton, D., Innes, E. A., and Chianini, F. (2014a).
Cytokine expression in the placenta of pregnant cattle after inoculation with *Neospora caninum*.
Veterinary Immunology and Immunopathology, 161(1–2):77–89.
- Cantón, G. J., Katzer, F., Maley, S. W., Bartley, P. M., Benavides-Silvan, J., Palarea-Albaladejo, J., Pang, Y., Smith, S. H., Rocchi, M. S., Buxton, D., Innes, E. A., and Chianini, F. (2014b).
Inflammatory infiltration into placentas of *Neospora caninum* challenged cattle correlates with clinical outcome of pregnancy.
Veterinary Research, 45(1):11.
- Carruthers, V. and Boothroyd, J. C. (2007).
Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion.
Current Opinion in Microbiology, 10(1):83–89.
- Carruthers, V. B. (2002).
Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*.
Acta Tropica, 81(2):111–122.
- Carvalho, J. V., Alves, C. M. O. S., Cardoso, M. R. D., Mota, C. M., Barbosa, B. F., Ferro, E. A. V., Silva, N. M., Mineo, T. W. P., Mineo, J. R., and Silva, D. A. O. (2010).

- Differential susceptibility of human trophoblastic (BeWo) and uterine cervical (HeLa) cells to *Neospora caninum* infection.
International Journal for Parasitology, 40(14):1629–1637.
- Caspe, S. G., Moore, D. P., Leunda, M. R., Cano, D. B., Lischinsky, L., Regidor-Cerrillo, J., Álvarez-García, G., Echaide, I. G., Bacigalupe, D., Ortega Mora, L. M., Odeón, A. C., and Campero, C. M. (2012).
The *Neospora caninum*-Spain 7 isolate induces placental damage, fetal death and abortion in cattle when inoculated in early gestation.
Veterinary Parasitology, 189(2-4):171–181.
- Cesbron-Delauw, M.-F., Lecordier, L., and Mercier, C. (1996).
Role of secretory dense granule organelles in the pathogenesis of toxoplasmosis.
Current Topics in Microbiology and Immunology, 219:59–65.
- Chen, A. L., Moon, A. S., Bell, H. N., Huang, A. S., Vashisht, A. A., Toh, J. Y., Lin, A. H., Nadipuram, S. M., Kim, E. W., Choi, C. P., Wohlschlegel, J. A., and Bradley, P. J. (2017).
Novel insights into the composition and function of the *Toxoplasma* IMC sutures.
Cellular Microbiology, 19(4).
- Chryssafidis, A. L., Cantón, G., Chianini, F., Innes, E. A., Madureira, E. H., and Gennari, S. M. (2014).
Pathogenicity of Nc-Bahia and Nc-1 strains of *Neospora caninum* in experimentally infected cows and buffaloes in early pregnancy.
Parasitology Research, 113(4):1521–1528.
- Collantes-Fernández, E., Álvarez-García, G., Pérez-Pérez, V., Pereira-Bueno, J., and Ortega-Mora, L. M. (2004).
Characterization of pathology and parasite load in outbred and inbred mouse models of chronic *Neospora caninum* infection.
The Journal of Parasitology, 90(3):579–583.
- Collantes-Fernández, E., Arrighi, R. B., Álvarez-García, G., Weidner, J. M., Regidor-Cerrillo, J., Boothroyd, J. C., Ortega-Mora, L. M., and Barragan, A. (2012).
Infected dendritic cells facilitate systemic dissemination and transplacental passage of the obligate intracellular parasite *Neospora caninum* in mice.
PLoS One, 7(3):e32123.
- Collantes-Fernández, E., López-Pérez, I., Álvarez-García, G., and Ortega-Mora, L. M. (2006a).
Temporal distribution and parasite load kinetics in blood and tissues during *Neospora caninum* infection in mice.
Infection and Immunity, 74(4):2491–2494.

- Collantes-Fernández, E., Rodríguez-Bertos, A., Arnáiz-Seco, I., Moreno, B., Aduriz, G., and Ortega-Mora, L. M. (2006b).
Influence of the stage of pregnancy on *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions in aborted bovine fetuses.
Theriogenology, 65(3):629–641.
- Collantes-Fernández, E., Zaballos, Á., Álvarez-García, G., and Ortega-Mora, L. M. (2002).
Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR.
Journal of Clinical Microbiology, 40(4):1194–1198.
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., and Marraffini, L. A. (2013).
Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems.
Science, 339(6121):819–823.
- Coppens, I., Dunn, J. D., Romano, J. D., Pypaert, M., Zhang, H., Boothroyd, J. C., and Joiner, K. A. (2006).
Toxoplasma gondii sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space.
Cell, 125(2):261–274.
- Correia, A., Ferreira, P., Costa, A. A., Dias, J., Melo, J., Costa, R., Ribeiro, A., Faustino, A., Teixeira, L., Rocha, A., and Vilanova, M. (2013).
Mucosal and systemic T cell response in mice intragastrically infected with *Neospora caninum* tachyzoites.
Veterinary Research, 44(1):69.
- Croken, M. M. K., Ma, Y., Markillie, L. M., Taylor, R. C., Orr, G., Weiss, L. M., and Kim, K. (2014).
Distinct strains of *Toxoplasma gondii* feature divergent transcriptomes regardless of developmental stage.
PLoS One, 9(11):e111297.
- Cuteri, V., Nisoli, L., Preziuso, S., Attili, A., Guerra, C., Lulla, D., and Traldi, G. (2005).
Application of a New Therapeutic Protocol Against *Neospora caninum*-Induced Abortion in Cattle: A Field Study.
Journal of Animal and Veterinary Advances, 4(5):510–514.
- Davison, H. C., Guy, F., Trees, A. J., Ryce, C., Ellis, J. T., Otter, A., Jeffrey, M., Simpson, V. R., and Holt, J. J. (1999).
In vitro isolation of *Neospora caninum* from a stillborn calf in the UK.
Research in Veterinary Science, 67(1):103–105.
- Debache, K. and Hemphill, A. (2012).

- Effects of miltefosine treatment in fibroblast cell cultures and in mice experimentally infected with *Neospora caninum* tachyzoites.
Parasitology, 139(7):934–944.
- Delgado, I. L. S., Zúquete, S., Santos, D., Basto, A. P., Leitão, A., and Nolasco, S. (2022).
The apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*.
Encyclopedia, 2:189–211.
- Dellarupe, A., Regidor-Cerrillo, J., Jiménez-Ruiz, E., Schares, G., Unzaga, J. M., Venturini, M. C., and Ortega-Mora, L. M. (2014a).
Clinical outcome and vertical transmission variability among canine *Neospora caninum* isolates in a pregnant mouse model of infection.
Parasitology, 141(3):356–366.
- Dellarupe, A., Regidor-Cerrillo, J., Jiménez-Ruiz, E., Schares, G., Unzaga, J. M., Venturini, M. C., and Ortega-Mora, L. M. (2014b).
Comparison of host cell invasion and proliferation among *Neospora caninum* isolates obtained from oocysts and from clinical cases of naturally infected dogs.
Experimental Parasitology, 145(1):22–28.
- Dijkstra, T., Barkema, H., Eysker, M., Beiboer, M., and Wouda, W. (2003).
Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies.
Veterinary Parasitology, 110(3-4):161–169.
- Dijkstra, T., Lam, T., Bartels, C., Eysker, M., and Wouda, W. (2008).
Natural postnatal *Neospora caninum* infection in cattle can persist and lead to endogenous transplacental infection.
Veterinary Parasitology, 152(3-4):220–225.
- Dion, S., Germon, S., Guiton, R., Ducournau, C., and Dimier-Poisson, I. (2011).
Functional activation of T cells by dendritic cells and macrophages exposed to the intracellular parasite *Neospora caninum*.
International Journal for Parasitology, 41(6):685–695.
- Dobrowolski, J. M. and Sibley, L. D. (1996).
Toxoplasma invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite.
Cell, 84(6):933–939.
- Donahoe, S. L., Lindsay, S. A., Krockenberger, M., Phalen, D., and Šlapeta, J. (2015).
A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife.
International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife, 4(2):216–238.

- Dong, J., Li, J., Wang, J., Li, F., Yang, J., Gong, P., Li, H., and Zhang, X. (2017). Identification and characterization of GRA6/GRA7 of *Neospora caninum* in MDBK cells. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 49(4):361–366.
- Dong, J., Zhang, N., Zhao, P., Li, J., Cao, L., Wang, X., Li, X., Yang, J., Zhang, X., and Gong, P. (2021). Disruption of dense granular protein 2 (GRA2) decreases the virulence of *Neospora caninum*. *Frontiers in Veterinary Science*, 8:634612.
- Doudna, J. A. and Charpentier, E. (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science (New York, N.Y.)*, 346(6213):1258096.
- Du, J., An, R., Chen, L., Shen, Y., Chen, Y., Cheng, L., Jiang, Z., Zhang, A., Yu, L., Chu, D., Shen, Y., Luo, Q., Chen, H., Wan, L., Li, M., Xu, X., and Shen, J. (2014). *Toxoplasma gondii* virulence factor rop18 inhibits the host nf-kb pathway by promoting p65 degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 289(18):12578–12592.
- Dubey, A. Hemphill, R. Calero-Bernal, and Gereon Schares (2017). *Neosporosis in Animals*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Dubey, J. (2003). Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *The Korean Journal of Parasitology*, 41(1):1–16.
- Dubey, J., Barr, B., Barta, J., Bjerkås, I., Björkman, C., Blagburn, B., Bowman, D., Buxton, D., Ellis, J., Gottstein, B., Hemphill, A., Hill, D., Howe, D., Jenkins, M., Kobayashi, Y., Koudela, B., Marsh, A., Mattsson, J., McAllister, M., Modrý, D., Omata, Y., Sibley, L., Speer, C., Trees, A., Uggla, A., Upton, S., Williams, D., and Lindsay, D. (2002). Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *International Journal for Parasitology*, 32(8):929–946.
- Dubey, J. P., Buxton, D., and Wouda, W. (2006). Pathogenesis of bovine neosporosis. *Journal of Comparative Pathology*, 134(4):267–289.
- Dubey, J. P., Carpenter, J. L., Speer, C. A., Topper, M. J., and Uggla, A. (1988a). Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 192(9):1269–85.
- Dubey, J. P. and de Lahunta, A. (1993).

- Neosporosis associated congenital limb deformities in a calf.
Applied Parasitology, 34(4):229–233.
- Dubey, J. P., Hartley, W. J., and Lindsay, D. S. (1990a).
Congenital *Neospora caninum* infection in a calf with spinal cord anomaly.
Journal of the American Veterinary Medical Association, 197(8):1043–1044.
- Dubey, J. P., Hattel, A. L., Lindsay, D. S., and Topper, M. J. (1988b).
Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission.
Journal of the American Veterinary Medical Association, 193(10):1259–63.
- Dubey, J. P., Janovitz, E. B., and Skowronek, A. J. (1992).
Clinical neosporosis in a 4-week-old Hereford calf.
Veterinary Parasitology, 43(1-2):137–141.
- Dubey, J. P. and Lindsay, D. S. (1996).
A review of *Neospora caninum* and neosporosis.
Veterinary Parasitology, 67(1-2):1–59.
- Dubey, J. P., Miller, S., Lindsay, D. S., and Topper, M. J. (1990b).
Neospora caninum-associated myocarditis and encephalitis in an aborted calf.
Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2(1):66–69.
- Dubey, J. P. and Schares, G. (2006).
Diagnosis of bovine neosporosis.
Veterinary Parasitology, 140(1-2):1–34.
- Dubey, J. P. and Schares, G. (2011).
Neosporosis in animals-The last five years.
Veterinary Parasitology, 180(1-2):90–108.
- Dubey, J. P., Schares, G., and Ortega-Mora, L. M. (2007).
Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*.
Clinical Microbiology Reviews, 20(2):323–367.
- Dubey, R., Harrison, B., Dangoudoubiyam, S., Bandini, G., Cheng, K., Kosber, A., Agop-Nersesian, C., Howe, D. K., Samuelson, J., Ferguson, D. J. P., and Gubbels, M.-J. (2017).
Differential roles for inner membrane complex proteins across *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis neurona* development.
mSphere, 2(5):e00409–17.
- Dubois, D. J. and Soldati-Favre, D. (2019).
Biogenesis and secretion of micronemes in *Toxoplasma gondii*.
Cellular Microbiology, 21(5):e13018.

- Dubremetz, J., Garcia-Réguet, N., Conseil, V., and Fourmaux, M. N. (1998).
Invited review Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa.
International Journal for Parasitology, 28(7):1007–1013.
- Dubremetz, J. F. and Lebrun, M. (2012).
Virulence factors of *Toxoplasma gondii*.
Microbes and Infection, 14(15):1403–1410.
- El Hajj, H., Lebrun, M., Arold, S. T., Vial, H., Labesse, G., and Dubremetz, J. F. (2007).
ROP18 is a rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii*.
PLoS Pathogens, 3(2):0200–0211.
- Elmore, S. A., Jones, J. L., Conrad, P. A., Patton, S., Lindsay, D. S., and Dubey, J. (2010).
Toxoplasma gondii: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention.
Trends in Parasitology, 26(4):190–196.
- English, E. D., Adomako-Ankomah, Y., and Boyle, J. P. (2015).
Secreted effectors in *Toxoplasma gondii* and related species: Determinants of host range and pathogenesis?
Parasite Immunology, 37(3):127–140.
- Entrican, G. (2002).
Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion.
Journal of Comparative Pathology, 126(2–3):79–94.
- Eperon, S., Brönnimann, K., Hemphill, A., and Gottstein, B. (1999).
Susceptibility of B-cell deficient C57BL/6 (microMT) mice to *Neospora caninum* infection.
Parasite Immunology, 21(5):225–36.
- Feng, X., Zhang, N., and Tuo, W. (2010).
Neospora caninum tachyzoite- and antigen-stimulated cytokine production by bone marrow-derived dendritic cells and spleen cells of naïve BALB/c mice.
Journal of Parasitology, 96(4):717–723.
- Fereig, R. M., Abdelbaky, H. H., Kuroda, Y., and Nishikawa, Y. (2019).
Critical role of TLR2 in triggering protective immunity with cyclophilin entrapped in oligomannose-coated liposomes against *Neospora caninum* infection in mice.
Vaccine, 37(7):937–944.
- Fereig, R. M. and Nishikawa, Y. (2020).
From signaling pathways to distinct immune responses: Key factors for establishing or combating *Neospora caninum* infection in different susceptible hosts.
Pathogens, 9(5):384.

- Ferre, I., Serrano-Martínez, E., Martínez, A., Osoro, K., Mateos-Sanz, A., Del-Pozo, I., Aduriz, G., Tamargo, C., Hidalgo, C., and Ortega-Mora, L. (2008).
Effects of re-infection with *Neospora caninum* in bulls on parasite detection in semen and blood and immunological responses.
Theriogenology, 69(7):905–911.
- Flynn, R. J. and Marshall, E. S. (2011).
Parasite limiting macrophages promote IL-17 secretion in naive bovine CD4 + T-cells during *Neospora caninum* infection.
Veterinary Immunology and Immunopathology, 144(3-4):423–429.
- Fox, B. A., Rommereim, L. M., Guevara, R. B., Falla, A., Hortua Triana, M. A., Sun, Y., and Bzik, D. J. (2016).
The *Toxoplasma gondii* rhoptry kinome is essential for chronic infection.
mBio, 7(3):e00193–16.
- French, N., Clancy, D., Davison, H., and Trees, A. (1999).
Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle: transmission and options for control.
International Journal for Parasitology, 29(10):1691–1704.
- Frénel, K., Dubremetz, J.-F., Lebrun, M., and Soldati-Favre, D. (2017).
Gliding motility powers invasion and egress in Apicomplexa.
Nature Reviews Microbiology, 15:645–660.
- Furuichi, Y. and Shatkin, A. J. (2000).
Viral and cellular mRNA capping: Past and prospects.
Advances in Virus Research, 55:135–184.
- Gajria, B., Bahl, A., Brestelli, J., Dommer, J., Fischer, S., Gao, X., Heiges, M., Iodice, J., Kissinger, J. C., Mackey, A. J., Pinney, D. F., Roos, D. S., Stoeckert, C. J., Wang, H., and Brunk, B. P. (2008).
ToxoDB: An integrated *Toxoplasma gondii* database resource.
Nucleic Acids Research, 36(SUPPL. 1):D553–D556.
- García-Sánchez, M., Jiménez-Pelayo, L., Horcajo, P., Collantes-Fernández, E., Ortega-Mora, L. M., and Regidor-Cerrillo, J. (2020).
Neospora caninum infection induces an isolate virulence-dependent pro-inflammatory gene expression profile in bovine monocyte-derived macrophages.
Parasites and Vectors, 13(1):374.
- García-Sánchez, M., Jiménez-Pelayo, L., Horcajo, P., Regidor-Cerrillo, J., Collantes-Fernández, E., and Ortega-Mora, L. M. (2019a).

- Gene expression profiling of *Neospora caninum* in bovine macrophages reveals differences between isolates associated with key parasite functions.
Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 9:354.
- García-Sánchez, M., Jiménez-Pelayo, L., Horcajo, P., Regidor-Cerrillo, J., Ólafsson, E. B., Bhandage, A. K., Barragan, A., Werling, D., Ortega-Mora, L. M., and Collantes-Fernández, E. (2019b).
Differential responses of bovine monocyte-derived macrophages to infection by *Neospora caninum* isolates of high and low virulence.
Frontiers in Immunology, 10(APR):915.
- García-Sánchez, M., Jiménez-Pelayo, L., Vázquez, P., Horcajo, P., Regidor-Cerrillo, J., Jiménez-Meléndez, A., Osoro, K., Ortega-Mora, L. M., and Collantes-Fernández, E. (2021).
Maternal and foetal cellular immune responses in dams infected with high- and low-virulence isolates of *Neospora caninum* at mid-gestation.
Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 11:684670.
- Garrison, E., Treeck, M., Ehret, E., Butz, H., Garbuz, T., Oswald, B. P., Settles, M., Boothroyd, J., and Arrizabalaga, G. (2012).
A forward genetic screen reveals that calcium-dependent protein kinase 3 regulates egress in *Toxoplasma*.
PLoS Pathogens, 8(11):e1003049.
- Gay, G., Braun, L., Brenier-Pinchart, M. P., Voltaire, J., Josserand, V., Bertini, R. L., Varesano, A., Touquet, B., De Bock, P. J., Coute, Y., Tardieux, I., Bougdour, A., and Hakimi, M. A. (2016).
Toxoplasma gondii TgIST co-opts host chromatin repressors dampening STAT1-dependent gene regulation and IFN- γ -mediated host defenses.
Journal of Experimental Medicine, 213(9):1779–1798.
- Gazzinelli, R. T., Mendonça-Neto, R., Lilue, J., Howard, J., and Sher, A. (2014).
Innate resistance against *Toxoplasma gondii*: An evolutionary tale of mice, cats, and men.
Cell Host and Microbe, 15(2):132–138.
- Gibney, E. H., Kipar, A., Rosbottom, A., Guy, C. S., Smith, R. F., Hetzel, U., Trees, A. J., and Williams, D. J. (2008).
The extent of parasite-associated necrosis in the placenta and foetal tissues of cattle following *Neospora caninum* infection in early and late gestation correlates with foetal death.
International Journal for Parasitology, 38(5):579–588.
- Gondim, L. F. (2006).
Neospora caninum in wildlife.
Trends in Parasitology, 22(6):247–252.

- Gondim, L. F., Pinheiro, A. M., Santos, P. O., Jesus, E. E., Ribeiro, M. B., Fernandes, H. S., Almeida, M. A., Freire, S. M., Meyer, R., and McAllister, M. M. (2001).
Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils.
Veterinary Parasitology, 101(1):1–7.
- Gondim, L. F. P., Laski, P., Gao, L., and McAllister, M. M. (2004a).
Variation of the internal transcribed spacer 1 sequence within individual strains and among different strains of *Neospora caninum*.
The Journal of Parasitology, 90(1):119–122.
- Gondim, L. F. P., McAllister, M. M., Mateus-Pinilla, N. E., Pitt, W. C., Mech, L. D., and Nelson, M. E. (2004b).
Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals.
Journal of Parasitology, 90(6):1361–1365.
- Goodswen, S. J., Kennedy, P. J., and Ellis, J. T. (2013).
A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: From the past to the present.
Infection, genetics and evolution, 13(1):133–150.
- Gossner, A. and Hassan, M. A. (2020).
Transcriptional Analyses Identify Genes That Modulate Bovine Macrophage Response to *Toxoplasma* Infection and Immune Stimulation.
Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 10:437.
- Grigg, M. E., Bonnefoy, S., Hehl, A. B., Suzuki, Y., and Boothroyd, J. C. (2001).
Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries.
Science, 294(5540):161–165.
- Grigg, M. E. and Suzuki, Y. (2003).
Sexual recombination and clonal evolution of virulence in *Toxoplasma*.
Microbes and Infection, 5(7):685–690.
- Gubbels, M.-J. and Duraisingh, M. T. (2012).
Evolution of apicomplexan secretory organelles.
International Journal for Parasitology, 42(12):1071–1081.
- Guido, S., Katzer, F., Nanjiani, I., Milne, E., and Innes, E. A. (2016).
Serology-based diagnostics for the control of bovine neosporosis.
Trends in Parasitology, 32(2):131–143.
- Gunning, R. F., Gumbrell, R. C., and Jeffrey, M. (1994).

- Neospora* infection and congenital ataxia in calves.
The Veterinary Record, 134(21):558.
- Guy, C. S., Williams DJL, Kelly, D. F., McGarry, J. W., Guy, F., Björkman, C., Smith, R. F., and Trees, A. J. (2001).
Neospora caninum in persistently infected, pregnant cows: spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody.
The Veterinary Record, 149(15):443–449.
- Hakimi, M. A. and Bougdour, A. (2015).
Toxoplasma's ways of manipulating the host transcriptome via secreted effectors.
Current Opinion in Microbiology, 26:24–31.
- Hakimi, M. A., Olias, P., and Sibley, L. D. (2017).
Toxoplasma effectors targeting host signaling and transcription.
Clinical Microbiology Reviews, 30(3):615–644.
- Hambruch, N., Haeger, J. D., Dilly, M., and Pfarrer, C. (2010).
EGF stimulates proliferation in the bovine placental trophoblast cell line F3 via Ras and MAPK.
Placenta, 31(1):67–74.
- Harris, M. T., Jeffers, V., Martynowicz, J., True, J. D., Mosley, A. L., and Sullivan, W. J. (2019).
A novel GCN5b lysine acetyltransferase complex associates with distinct transcription factors in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*.
Molecular and Biochemical Parasitology, 232(1):111203.
- Häsler, B., Regula, G., Stärk, K. D. C., Sager, H., Gottstein, B., and Reist, M. (2006a).
Financial analysis of various strategies for the control of *Neospora caninum* in dairy cattle in Switzerland.
Preventive Veterinary Medicine, 77(3-4):230–253.
- Häsler, B., Stärk, K. D. C., Sager, H., Gottstein, B., and Reist, M. (2006b).
Simulating the impact of four control strategies on the population dynamics of *Neospora caninum* infection in Swiss dairy cattle.
Preventive Veterinary Medicine, 77(3-4):254–283.
- Heaslip, A. T., Nishi, M., Stein, B., and Hu, K. (2011).
The motility of a human parasite, *Toxoplasma gondii*, is regulated by a novel lysine methyltransferase.
PLoS Pathogens, 7(9):e1002201.
- Hemphill, A., Aguado-Martínez, A., and Müller, J. (2016).

- Approaches for the vaccination and treatment of *Neospora caninum* infections in mice and ruminant models.
Parasitology, 143(3):245–259.
- Hemphill, A., Debache, K., Monney, T., Schorer, M., Guionaud, C., Alaeddine, F., Müller, N., and Müller, J. (2013).
Proteins mediating the *Neospora caninum*-host cell interaction as targets for vaccination.
Frontiers in Bioscience, 5(1):23–36.
- Hemphill, A., Gajendran, N., Sonda, S., Fuchqa, . N., Gottstein, B., Hentrich, . B., and Jenkins, M. (1998).
Identification and characterisation of a dense granule-associated protein in *Neospora caninum* tachyzoites.
International Journal for Parasitology, 28(3):429–438.
- Hemphill, A., Gottstein, B., and Kaufmann, H. (1996).
Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by *Neospora caninum*.
Parasitology, 112 (Pt 2):183–197.
- Hemphill, A., Vonlaufen, N., and Naguleswaran, A. (2006).
Cellular and immunological basis of the host-parasite relationship during infection with *Neospora caninum*.
Parasitology, 133(3):261–278.
- Hemphill, A., Vonlaufen, N., Naguleswaran, A., Keller, N., Riesen, M., Guetg, N., Srinivasan, S., and Alaeddine, F. (2004).
Tissue culture and explant approaches to studying and visualizing *Neospora caninum* and its interactions with the host cell.
Microscopy and Microanalysis, 10(5):602–620.
- Hermanns, T., Müller, U. B., Könen-Waisman, S., Howard, J. C., and Steinfeldt, T. (2016).
The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP18 is an Irga6-specific kinase and regulated by the dense granule protein GRA7.
Cellular Microbiology, 18(2):244–259.
- Ho, H. Y., Cheng, M. L., and Chiu, D. T. Y. (2007).
Glucose-6-phosphate dehydrogenase - From oxidative stress to cellular functions and degenerative diseases.
Redox Report, 12(3):109–118.
- Holmdahl, J., Björkman, C., Stenlund, S., Uggla, A., and Dubey, J. P. (1997).
Bovine *Neospora* and *Neospora caninum*: One and the same.
Parasitology Today, 13(1):40–41.

- Hong, D.-P., Radke, J. B., and White, M. W. (2017).
Opposing transcriptional mechanisms regulate *Toxoplasma* development .
mSphere, 2(1):e00347–16.
- Horcajo, P., Jiménez-Pelayo, L., García-Sánchez, M., Regidor-Cerrillo, J., Collantes-Fernández, E., Rozas, D., Hambruch, N., Pfarrer, C., and Ortega-Mora, L. M. (2017).
Transcriptome modulation of bovine trophoblast cells in vitro by *Neospora caninum*.
International Journal for Parasitology, 47(12):791–799.
- Horcajo, P., Pitarch, A., García-Sánchez, M., Pastor-Fernández, I., Collantes-Fernández, E., Ortega-Mora, L. M., and Regidor-Cerrillo, J. (2022).
Dynamic remodeling of the bovine placenta proteome upon infection with high and low virulence *Neospora caninum* isolates.
In *Proceedings of the VI International Meeting on Apicomplexan Parasites in Farm Animals Bern, (Switzerland)*., page 72.
- Horcajo, P., Regidor-Cerrillo, J., Aguado-Martínez, A., Hemphill, A., and Ortega-Mora, L. M. (2016).
Vaccines for bovine neosporosis: current status and key aspects for development.
Parasite Immunology, 38(12):709–723.
- Horcajo, P., Xia, D., Randle, N., Collantes-Fernández, E., Wastling, J., Ortega-Mora, L. M., and Regidor-Cerrillo, J. (2018).
Integrative transcriptome and proteome analyses define marked differences between *Neospora caninum* isolates throughout the tachyzoite lytic cycle.
Journal of Proteomics, 180:108–119.
- Howe, D. K., Mercier, C., Messina, M., and Sibley, L. D. (1997).
Expression of *Toxoplasma gondii* genes in the closely-related apicomplexan parasite *Neospora caninum*.
Molecular and Biochemical Parasitology, 86(1):29–36.
- Howe, D. K. and Sibley, L. D. (1997).
Development of molecular genetics for *Neospora caninum*: A complementary system to *Toxoplasma gondii*.
Methods, 13(2):123–133.
- Hu, K., Johnson, J., Florens, L., Fraunholz, M., Suravajjala, S., DiLullo, C., Yates, J., Roos, D. S., and Murray, J. M. (2006).
Cytoskeletal components of an invasion machine—The apical complex of *Toxoplasma gondii*.
PLoS Pathogens, 2(2):e13.
- Hunn, J. P., Feng, C. G., Sher, A., and Howard, J. C. (2011).

- The immunity-related GTPases in mammals: A fast-evolving cell-autonomous resistance system against intracellular pathogens.
Mammalian Genome, 22(1–2):43–54.
- Hunter, C. A. and Sibley, L. D. (2012).
Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors.
Nature Reviews Microbiology, 10(11):766–778.
- Innes, E. A. (2007).
The host-parasite relationship in pregnant cattle infected with *Neospora caninum*.
Parasitology, 134(13):1903–1910.
- Innes, E. A., Andrianarivo, A. G., Björkman, C., Williams, D. J. L., and Conrad, P. A. (2002).
Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination.
Trends in Parasitology, 18(11):497–504.
- Innes, E. A., Buxton, D., Maley, S., Wright, S., Marks, J., Esteban, I., Rae, A., Schock, A., and Wastling, J. (2000).
Neosporosis. Aspects of epidemiology and host immune response.
Annals of the New York Academy of Sciences, 916:93–101.
- Innes, E. A., Panton, W. R. M., Marks, J., Trees, A. J., Holmdahl, J., and Buxton, D. (1995).
Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum*, as shown by incorporation of 3H uracil.
Journal of Comparative Pathology, 113(1):95–100.
- Innes, E. A., Wright, S., Bartley, P., Maley, S., Macalodowie, C., Esteban-Redondo, I., and Buxton, D. (2005).
The host-parasite relationship in bovine neosporosis.
Veterinary Immunology and Immunopathology, 108(1–2 Spec. Iss.):29–36.
- Innes, E. A., Wright, S. E., Maley, S., Rae, A., Schock, A., Kirvar, E., Bartley, P., Hamilton, C., Carey, I. M., and Buxton, D. (2001).
Protection against vertical transmission in bovine neosporosis.
International Journal for Parasitology, 31(13):1523–1534.
- Jacquet, A., Coulon, L., De Nè, J., Daminet, V., Le Haumont, M., Garcia, L., Bollen, A., Jurado, M., and Biemans, R. (2001).
The surface antigen SAG3 mediates the attachment of *Toxoplasma gondii* to cell-surface proteoglycans.
Molecular and Biochemical Parasitology, 116(1):35–44.
- Jeninga, M. D., Quinn, J. E., and Petter, M. (2019).
ApiAP2 transcription factors in apicomplexan parasites.
Pathogens, 8(2):47.

- Jenkins, M., Parker, C., Tuo, W., Vinyard, B., and Dubey, J. P. (2004).
Inclusion of CpG adjuvant with plasmid DNA coding for NcGRA7 improves protection against congenital neosporosis.
Infection and Immunity, 72(3):1817–1819.
- Jensen, K. D., Camejo, A., Melo, M. B., Cordeiro, C., Julien, L., Grotenbreg, G. M., Frickel, E. M., Ploegh, H. L., Young, L., and Saeij, J. P. (2015).
Toxoplasma gondii superinfection and virulence during secondary infection correlate with the exact ROP5/ROP18 allelic combination.
mBio, 6(2):e02280.
- Jensen, K. D. C., Hu, K., Whitmarsh, R. J., Hassan, M. A., Julien, L., Lu, D., Chen, L., Hunter, C. A., and Saeij, J. P. J. (2013).
Toxoplasma gondii rhoptry 16 kinase promotes host resistance to oral infection and intestinal inflammation only in the context of the dense granule protein GRA15.
Infection and Immunity, 81(6):2156–2167.
- Jerome, M. E., Radke, J. R., Bohne, W., Roos, D. S., and White, M. W. (1998).
Toxoplasma gondii bradyzoites form spontaneously during sporozoite-initiated development .
Infection and Immunity, 66(10):4838–4844.
- Jewett, T. J. and Sibley, L. D. (2003).
Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in apicomplexan parasites.
Molecular Cell, 11(4):885–894.
- Jiménez-Pelayo, L., García-Sánchez, M., Collantes-Fernández, E., Regidor-Cerrillo, J., Horcajo, P., Gutiérrez-Expósito, D., Espinosa, J., Benavides, J., Osoro, K., Pfarrer, C., and Ortega-Mora, L. M. (2020).
Crosstalk between *Neospora caninum* and the bovine host at the maternal-foetal interface determines the outcome of infection.
Veterinary Research, 51(1):83.
- Jiménez-Pelayo, L., García-Sánchez, M., Regidor-Cerrillo, J., Horcajo, P., Collantes-Fernández, E., Gómez-Bautista, M., Hambruch, N., Pfarrer, C., and Ortega-Mora, L. M. (2017).
Differential susceptibility of bovine caruncular and trophoblast cell lines to infection with high and low virulence isolates of *Neospora caninum*.
Parasites and Vectors, 10(1):463.
- Jiménez-Pelayo, L., García-Sánchez, M., Regidor-Cerrillo, J., Horcajo, P., Collantes-Fernández, E., Gómez-Bautista, M., Hambruch, N., Pfarrer, C., and Ortega-Mora, L. M. (2019a).

- Immune response profile of caruncular and trophoblast cell lines infected by high- (Nc-Spain7) and low-virulence (Nc-Spain1H) isolates of *Neospora caninum*.
Parasites and Vectors, 12(1):218.
- Jiménez-Pelayo, L., García-Sánchez, M., Vázquez, P., Regidor-Cerrillo, J., Horcajo, P., Collantes-Fernández, E., Blanco-Murcia, J., Gutiérrez-Expósito, D., Román-Trufero, A., Osoro, K., Benavides, J., and Ortega-Mora, L. M. (2019b).
Early *Neospora caninum* infection dynamics in cattle after inoculation at mid-gestation with high (Nc-Spain7)- or low (Nc-Spain1H)-virulence isolates.
Veterinary Research, 50(1):72.
- Jiménez-Dalmaroni, M. J., Gerswhin, M. E., and Adamopoulos, I. E. (2016).
The critical role of toll-like receptors — From microbial recognition to autoimmunity: A comprehensive review.
Autoimmunity Reviews, 15(1):1–8.
- Jin, X., Gong, P., Zhang, X., Li, G., Zhu, T., Zhang, M., and Li, J. (2017).
Activation of ERK signaling via TLR11 induces IL-12p40 production in peritoneal macrophages challenged by *Neospora caninum*.
Frontiers in Microbiology, 8(7):1393.
- Jinek, M., East, A., Cheng, A., Lin, S., Ma, E., and Doudna, J. (2013).
RNA-programmed genome editing in human cells.
eLife, 2:e00471.
- Journel, C., Chatagnon, G., Martin, D., Richard, A., and Tainturier, D. (2002).
Prevention of abortions and foetal infections due to *Neospora caninum* in heifers: trial of decoquinat treatments during pregnancy at the rate of 2mg / kg / d.
In *Proceedings of the XXII World Buiatrics Congress, Hannover (Germany)*.
- Kafsack, B. F. C., Pena, J. D. O., Coppens, I., Ravindran, S., Boothroyd, J. C., and Carruthers, V. B. (2009).
Rapid membrane disruption by a perforin-like protein facilitates parasite exit from host cells.
Science, 323(5913):530–533.
- Kano, R., Masukata, Y., Omata, Y., Kobayashi, Y., Maeda, R., and Saito, A. (2005).
Relationship between type 1/type 2 immune responses and occurrence of vertical transmission in BALB/c mice infected with *Neospora caninum*.
Veterinary Parasitology, 129(1–2):159–164.
- Keeley, A. and Soldati, D. (2004).
The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by apicomplexa.

- Trends in Cell Biology*, 14(10):528–532.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., and Sternberg, M. J. (2015).
The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis.
Nature Protocols, 10(6):845–858.
- Kemp, L. E., Yamamoto, M., and Soldati-Favre, D. (2013).
Subversion of host cellular functions by the apicomplexan parasites.
FEMS Microbiology Reviews, 37(4):607–631.
- Khan, A., Fujita, A. W., Randle, N., Regidor-Cerrillo, J., Shaik, J. S., Shen, K., Oler, A. J.,
Quinones, M., Latham, S. M., Akanmori, B. D., Cleaveland, S., Innes, E. A., Ryan, U.,
Slapeta, J., Schares, G., Ortega-Mora, L. M., Dubey, J. P., Wastling, J. M., and Grigg, M. E.
(2019a).
Global selective sweep of a highly inbred genome of the cattle parasite *Neospora caninum*.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,
116(45):22764–22773.
- Khan, I. A., Schwartzman, J. D., Fonseka, S., and Kasper, L. H. (1997).
Neospora caninum: role for immune cytokines in host immunity.
Experimental Parasitology, 85(1):24–34.
- Khan, M. I., Mishra, A., Jha, P. K., Abhishek, K., Chaba, R., Das, P., and Sinha, K. K. (2019b).
DNA polymerase β of *Leishmania donovani* is important for infectivity and it protects the
parasite against oxidative damage.
International Journal of Biological Macromolecules, 124:291–303.
- Khan, S. H. (2019).
Genome-editing technologies: Concept, pros, and cons of various genome-editing techniques
and bioethical concerns for clinical application.
Molecular Therapy. Nucleic acids, 16:326–334.
- Klevar, S., Kulberg, S., Boysen, P., Storset, A. K., Moldal, T., Björkman, C., and Olsen, I.
(2007).
Natural killer cells act as early responders in an experimental infection with *Neospora
caninum* in calves.
International Journal for Parasitology, 37(3-4):329–339.
- Koga, K. and Mor, G. (2008).
Expression and function of toll-like receptors at the maternal-fetal interface.
Reproductive Sciences, 15(3):231–242.
- Krishna, R., Xia, D., Sanderson, S., Shanmugasundram, A., Vermont, S., Bernal, A., Daniel-
Naguib, G., Ghali, F., Brunk, B. P., Roos, D. S., Wastling, J. M., and Jones, A. R. (2015).

- A large-scale proteogenomics study of apicomplexan pathogens-*Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*.
Proteomics, 15(15):2618–2628.
- Kritzner, S., Sager, H., Blum, J., Krebber, R., Greif, G., and Gottstein, B. (2002).
An explorative study to assess the efficacy of toltrazuril-sulfone (ponazuril) in calves experimentally infected with *Neospora caninum*.
Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 1(1):4.
- Kul, O., Atmaca, H., Antepioglu, T., Ocal, N., and Canpolat, S. (2015).
Neospora caninum: the first demonstration of the enteroepithelial stages in the intestines of a naturally infected dog.
Journal of Comparative Pathology, 153(1):9–13.
- Lally, N., Jenkins, M., Liddell, S., and Dubey, J. (1997).
A dense granule protein (NCDG1) gene from *Neospora caninum* 1Note: Nucleotide sequences data reported in this paper are available in the GenBank data base under the accession number U82229.1.
Molecular and Biochemical Parasitology, 87:239–243.
- Lambert, H., Dellacasa-Lindberg, I., and Barragan, A. (2011).
Migratory responses of leukocytes infected with *Toxoplasma gondii*.
Microbes and Infection, 13(1):96–102.
- Lambert, H., Vutova, P. P., Adams, W. C., Loré, K., and Barragan, A. (2009).
The *Toxoplasma gondii*-shuttling function of dendritic cells is linked to the parasite genotype.
Infection and Immunity, 77(4):1679–1688.
- Lavine, M. D. and Arrizabalaga, G. (2008).
Exit from host cells by the pathogenic parasite *Toxoplasma gondii* does not require motility.
Eukaryotic Cell, 7(1):131–140.
- Lee, E.-G., Kim, J.-H., Shin, Y.-S., Shin, G.-W., Kim, Y.-H., Kim, G.-S., Kim, D.-Y., Jung, T.-S., and Suh, M.-D. (2004).
Two-dimensional gel electrophoresis and immunoblot analysis of *Neospora caninum* tachyzoites.
Journal of Veterinary Science, 5:139–45.
- Lee, E. G., Kim, J. H., Shin, Y. S., Shin, G. W., Kim, Y. R., Palaksha, K. J., Kim, D. Y., Yamane, I., Kim, Y. H., Kim, G. S., Suh, M. D., and Jung, T. S. (2005).
Application of proteomics for comparison of proteome of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* tachyzoites.
Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 815(1-2):305–314.

- Lee, E. G., Kim, J. H., Shin, Y. S., Shin, G. W., Suh, M. D., Kim, D. Y., Kim, Y. H., Kim, G. S., and Jung, T. S. (2003).
Establishment of a two-dimensional electrophoresis map for *Neospora caninum* tachyzoites by proteomics.
Proteomics, 3(12):2339–2350.
- Lei, T., Wang, H., Liu, J., Nan, H., and Liu, Q. (2014).
ROP18 is a key factor responsible for virulence difference between *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*.
PLoS One, 9(6).
- Leichtle, A., Hernandez, M., Pak, K., Webster, N. J., and Ryan, A. F. (2009).
The Toll-Like receptor adaptor TRIF contributes to otitis media pathogenesis and recovery.
BMC Immunology, 10:45.
- Lekutis, C., Ferguson, D. J. P., Grigg, M. E., Camps, M., and Boothroyd, J. C. (2001).
Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme.
International Journal for Parasitology, 31:1285–1292.
- Lex, A., Gehlenborg, N., Strobel, H., Vuillemot, R., and Pfister, H. (2014).
UpSet: Visualization of intersecting sets.
IEEE Transactions on Visualization and Computer Graphics, 20:1983–1992.
- Li, H., Yang, Y., Hong, W., Huang, M., Wu, M., and Zhao, X. (2020).
Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects.
Signal Transduction and Targeted Therapy, 5(1):1.
- Li, S., Gong, P., Tai, L., Li, X., Wang, X., Zhao, C., Zhang, X., Yang, Z., Yang, J., Li, J., and Zhang, X. (2018).
Extracellular vesicles secreted by *Neospora caninum* are recognized by toll-like receptor 2 and modulate host cell innate immunity through the MAPK signaling pathway.
Frontiers in Immunology, 9(7):1633.
- Liew, F. Y. (2002).
TH1 and TH2 cells: a historical perspective.
Nature Reviews Immunology, 2(1):55–60.
- Lindsay, D. S., Dubey, J., and Duncan, R. B. (1999).
Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*.
Veterinary Parasitology, 82(4):327–333.
- Lindsay, D. S. and Dubey, J. P. (1989).
Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections.
American Journal of Veterinary Research, 50(11):1981–1983.

- Lindsay, D. S. and Dubey, J. P. (2020).
Neosporosis, toxoplasmosis, and sarcocystosis in ruminants: An update.
The Veterinary Clinics of North America, 36(1):205–222.
- Lindsay, D. S., Lenz, S. D., Cole, R. A., Dubey, J. P., and Blagburn, B. L. (1995).
Mouse model for central nervous system *Neospora caninum* infections.
The Journal of parasitology, 81(2):313–315.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001).
Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method.
Methods, 25(4):402–408.
- Long, M. T. and Baszler, T. V. (1996).
Fetal loss in BALB/C mice infected with *Neospora caninum*.
The Journal of Parasitology, 82(4):608–611.
- Long, M. T. and Baszler, T. V. (2000).
Neutralization of maternal IL-4 modulates congenital protozoal transmission: Comparison of innate versus acquired immune responses.
The Journal of Immunology, 164(9):4768–4774.
- Long, M. T., Baszler, T. V., and Mathison, B. A. (1998).
Comparison of intracerebral parasite load, lesion development, and systemic cytokines in mouse strains infected with *Neospora caninum*.
Journal of Parasitology, 84(2):316–320.
- López-Gatius, F., Almería, S., Donofrio, G., Nogareda, C., García-Ispierto, I., Bech-Sàbat, G., Santolaria, P., Yániz, J. L., Pabón, M., de Sousa, N. M., and Beckers, J. F. (2007).
Protection against abortion linked to gamma interferon production in pregnant dairy cows naturally infected with *Neospora caninum*.
Theriogenology, 68(7):1067–1073.
- López-Gatius, F., López-Béjar, M., Murugavel, K., Pabón, M., Ferrer, D., and Almería, S. (2004).
Neospora-associated abortion episode over a 1-year period in a dairy herd in north-east Spain.
Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health, 51(7):348–352.
- López-Gatius, F., Santolaria, P., Yániz, J. L., Garbayo, J. M., and Almería, S. (2005).
The use of beef bull semen reduced the risk of abortion in *Neospora*-seropositive dairy cows.
Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health, 52(2):88–92.

- López-Pérez, I. C., Collantes-Fernández, E., Aguado-Martínez, A., Rodríguez-Bertos, A., and Ortega-Mora, L. M. (2008).
Influence of *Neospora caninum* infection in BALB/c mice during pregnancy in post-natal development.
Veterinary Parasitology, 155(3-4):175–183.
- López-Pérez, I. C., Collantes-Fernández, E., Rojo-Montejo, S., Navarro-Lozano, V., Risco-Castillo, V., Pérez-Pérez, V., Pereira-Bueno, J., and Ortega-Mora, L. M. (2010).
Effects of *Neospora caninum* infection at mid-gestation on placenta in a pregnant mouse model.
Journal of Parasitology, 96(5):1017–1020.
- López-Pérez, I. C., Risco-Castillo, V., Collantes-Fernández, E., and Ortega-Mora, L. M. (2006).
Comparative effect of *Neospora caninum* infection in BALB/c mice at three different gestation periods.
Journal of Parasitology, 92(6):1286–1291.
- Lorenzi, H., Khan, A., Behnke, M. S., Namasivayam, S., Swapna, L. S., Hadjithomas, M., Karamycheva, S., Pinney, D., Brunk, B. P., Ajioka, J. W., Ajzenberg, D., Boothroyd, J. C., Boyle, J. P., Dardé, M. L., Diaz-Miranda, M. A., Dubey, J. P., Fritz, H. M., Gennari, S. M., Gregory, B. D., Kim, K., Saeij, J. P., Su, C., White, M. W., Zhu, X. Q., Howe, D. K., Rosenthal, B. M., Grigg, M. E., Parkinson, J., Liu, L., Kissinger, J. C., Roos, D. S., and Sibley, L. D. (2016).
Local admixture of amplified and diversified secreted pathogenesis determinants shapes mosaic *Toxoplasma gondii* genomes.
Nature Communications, 7:10147.
- Lourido, S., Tang, K., and Sibley, L. D. (2012).
Distinct signalling pathways control *Toxoplasma* egress and host-cell invasion.
The EMBO Journal, 31(24):4524–4534.
- Lv, Q., Xing, S., Gong, P., Chang, L., Bian, Z., Wang, L., Zhang, X., and Li, J. (2015).
A 78 kDa host cell invasion protein of *Neospora caninum* as a potential vaccine candidate.
Experimental Parasitology, 148:56–65.
- Ma, D. and Liu, F. (2015).
Genome editing and its applications in model organisms.
Genomics, Proteomics & Bioinformatics, 13(6):336–344.
- Ma, J. S., Sasai, M., Ohshima, J., Lee, Y., Bando, H., Takeda, K., and Yamamoto, M. (2014).
Selective and strain-specific NFAT4 activation by the *Toxoplasma gondii* polymorphic dense granule protein GRA6.
Journal of Experimental Medicine, 211(10):2013–2032.

- Ma, L., Liu, G., Liu, J., Li, M., Zhang, H., Tang, D., and Liu, Q. (2017a).
Neospora caninum ROP16 play an important role in the pathogenicity by phosphorylating host cell STAT3.
Veterinary Parasitology, 243:135–147.
- Ma, L., Liu, J., Li, M., Fu, Y., Zhang, X., and Liu, Q. (2017b).
Rhoptry protein 5 (ROP5) is a key virulence factor in *Neospora caninum*.
Frontiers in Microbiology, 8(3):370.
- Maley, S. W., Buxton, D., Macalodowie, C. N., Anderson, I. E., Wright, S. E., Bartley, P. M., Esteban-Redondo, I., Hamilton, C. M., Storset, A. K., and Innes, E. A. (2006).
Characterization of the immune response in the placenta of cattle experimentally infected with *Neospora caninum* in early gestation.
Journal of Comparative Pathology, 135(2–3):130–141.
- Maley, S. W., Buxton, D., Rae, A. G., Wright, S. E., Schock, A., Bartley, P. M., Esteban-Redondo, I., Swales, C., Hamilton, C. M., Sales, J., and Innes, E. A. (2003).
The pathogenesis of neosporosis in pregnant cattle: inoculation at mid-gestation.
Journal of Comparative Pathology, 129(2–3):186–195.
- Marez, T. D., Liddell, S., Dubey, J., Jenkins, M., and Gasbarre, L. (1999).
Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses.
International Journal for Parasitology, 29(10):1647–1657.
- Marin, M. S., Hecker, Y. P., Quintana, S., Pérez, S. E., Leunda, M. R., Cantón, G. J., Cobo, E. R., Moore, D. P., and Odeón, A. C. (2017).
Immunization with inactivated antigens of *Neospora caninum* induces toll-like receptors 3, 7, 8 and 9 in maternal-fetal interface of infected pregnant heifers.
Veterinary Parasitology, 243:12–17.
- Marsh, A. E., Barr, B. C., Madigan, J., Lakritz, J., Nordhausen, R., and Conrad, P. A. (1996).
Neosporosis as a cause of equine protozoal myeloencephalitis.
Journal of the American Veterinary Medical Association, 209(11):1907–1913.
- Marsh, A. E., Barr, B. C., Packham, A. E., and Conrad, P. A. (1998).
Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae).
The Journal of Parasitology, 84(5):983–991.
- Marsh, A. E., Barr, B. C., Sverlow, K., Ho, M., Dubey, J. P., and Conrad, P. A. (1995).
Sequence analysis and comparison of ribosomal DNA from bovine *Neospora* to similar coccidial parasites.
The Journal of Parasitology, 81(4):530–535.

- Marugán-Hernández, V. (2017).
Neospora caninum and bovine neosporosis: Current vaccine research.
Journal of Comparative Pathology, 157(2–3):193–200.
- Marugán-Hernández, V., Álvarez-García, G., Risco-Castillo, V., Regidor-Cerrillo, J., and Ortega-Mora, L. M. (2010).
Identification of *Neospora caninum* proteins regulated during the differentiation process from tachyzoite to bradyzoite stage by DIGE.
Proteomics, 10(9):1740–1750.
- Marugán-Hernández, V., Ortega-Mora, L. M., Aguado-Martínez, A., and Álvarez-García, G. (2011a).
Genetic manipulation of *Neospora caninum* to express the bradyzoite-specific protein NcSAG4 in tachyzoites.
Parasitology, 138(4):472–480.
- Marugán-Hernández, V., Ortega-Mora, L. M., Aguado-Martínez, A., Jiménez-Ruiz, E., and Álvarez-García, G. (2011b).
Transgenic *Neospora caninum* strains constitutively expressing the bradyzoite NcSAG4 protein proved to be safe and conferred significant levels of protection against vertical transmission when used as live vaccines in mice.
Vaccine, 29(44):7867–7874.
- McAllister, M. M., Dubey, J. P., Lindsay, D. S., Jolley, W. R., Wills, R. A., and McGuire, A. M. (1998).
Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*.
International Journal for Parasitology, 28(9):1473–1478.
- McCann, C., McAllister, M., Gondim, L., Smith, R., Cripps, P., Kipar, A., Williams, D., and Trees, A. (2007).
Neospora caninum in cattle: Experimental infection with oocysts can result in exogenous transplacental infection, but not endogenous transplacental infection in the subsequent pregnancy.
International Journal for Parasitology, 37(14):1631–1639.
- McCann, C. M., Vyse, A. J., Salmon, R. L., Thomas, D., Williams, D. J., McGarry, J. W., Pebody, R., and Trees, A. J. (2008).
Lack of serologic evidence of *Neospora caninum* in humans, England.
Emerging Infectious Diseases, 14(6):978–980.
- Melo, E. J., Carvalho, T. M., and De Souza, W. (2001).
Behaviour of microtubules in cells infected with *Toxoplasma gondii*.
Biocell, 25(1):53–59.

Mendoza-Morales, L. F., Lagorio, V., Corigliano, M. G., Sánchez-López, E., Ramos-Duarte, V. A., Clemente, M., and Sander, V. A. (2022).

Neosporosis in sheep: A systematic review and meta-analysis of global seroprevalence and related risk factors.

Acta Tropica, 233:106569.

Mercier, C., Adjogble, K. D., Däubener, W., and Delauw, M. F. C. (2005).

Dense granules: Are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites?

International Journal for Parasitology, 35(8):829–849.

Mineo, T. W., Benevides, L., Silva, N. M., and Silva, J. S. (2009).

Myeloid differentiation factor 88 is required for resistance to *Neospora caninum* infection.

Veterinary Research, 40(4):32.

Mineo, T. W., Oliveira, C. J., Gutierrez, F. R., and Silva, J. S. (2010).

Recognition by toll-like receptor 2 induces antigen-presenting cell activation and Th1 programming during infection by *Neospora caninum*.

Immunology and Cell Biology, 88(8):825–833.

Miranda, V. D. S., França, F. B. F., Da Costa, M. S., Silva, V. R. S., Mota, C. M., Da Silva Cardoso Barros, P., Parreira, K. S., Santiago, F. M., Mineo, J. R., and Mineo, T. W. P. (2019). Toll-like receptor 3-TRIF pathway activation by *Neospora caninum* RNA enhances infection control in mice.

Infection and Immunity, 87(4):e0073918.

Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., and Soria, E. (2005).

Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements.

Journal of Molecular Evolution, 60(2):174–182.

Mols-Vorstermans, T., Hemphill, A., Monney, T., Schaap, D., and Boerhout, E. (2013).

Differential effects on survival, humoral immune responses and brain lesions in inbred BALB/C, CBA/CA, and C57BL/6 mice experimentally infected with *Neospora caninum* tachyzoites .

ISRN Parasitology, 2013(830980):1–11.

Mordue, D. G., Håkansson, S., Niesman, I., and Sibley, L. D. (1999).

Toxoplasma gondii resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways.

Experimental Parasitology, 92(2):87–99.

Müller, J. and Hemphill, A. (2013).

In vitro culture systems for the study of apicomplexan parasites in farm animals.

- International Journal for Parasitology*, 43(2):115–124.
- Müller, U. B. and Howard, J. C. (2016).
The impact of *Toxoplasma gondii* on the mammalian genome.
Current Opinion in Microbiology, 32:19–25.
- Mur-Navales, R., López-Gatius, F., Serrano-Pérez, B., García-Ispierto, I., Darwich, L., Cabezón, O., de Sousa, N., Beckers, J., and Almería, S. (2016a).
Experimental *Neospora caninum* infection in pregnant dairy heifers raises concentrations of pregnancy-associated glycoproteins 1 and 2 in foetal fluids.
Reproduction in Domestic Animals, 51(2):282–286.
- Mur-Navales, R., Serrano-Pérez, B., García-Ispierto, I., de Sousa, N., Beckers, J., Almería, S., and López-Gatius, F. (2016b).
Experimental *Neospora caninum* infection modifies trophoblast cell populations and plasma pregnancy-associated glycoprotein 1 and 2 dynamics in pregnant dairy heifers.
Veterinary Parasitology, 216:7–12.
- Naguleswaran, A., Cannas, A., Keller, N., Vonlaufen, N., Björkman, C., and Hemphill, A. (2002).
Vero cell surface proteoglycan interaction with the microneme protein NcMIC(3) mediates adhesion of *Neospora caninum* tachyzoites to host cells unlike that in *Toxoplasma gondii*.
International Journal for Parasitology, 32(6):695–704.
- Nishikawa, Y., Shimoda, N., Fereig, R. M., Moritaka, T., Umeda, K., Nishimura, M., Ihara, F., Kobayashi, K., Himori, Y., Suzuki, Y., and Furuoka, H. (2018).
Neospora caninum dense granule protein 7 regulates the pathogenesis of neosporosis by modulating host immune response.
Applied and Environmental Microbiology, 84(18):e01350–18.
- Nishikawa, Y., Zhang, H., Ikehara, Y., Kojima, N., Xuan, X., and Yokoyama, N. (2009).
Immunization with oligomannose-coated liposome-entrapped dense granule protein 7 protects dams and offspring from *Neospora caninum* infection in mice.
Clinical and Vaccine Immunology, 16(6):792–797.
- Nogareda, C., López-Gatius, F., Santolaria, P., García-Ispierto, I., Bech-Sàbat, G., Pabón, M., Mezo, M., Gonzalez-Warleta, M., Castro-Hermida, J. A., Yániz, J., and Almería, S. (2007).
Dynamics of anti-*Neospora caninum* antibodies during gestation in chronically infected dairy cows.
Veterinary Parasitology, 148(3-4):193–199.
- Nolan, S. J., Romano, J. D., Luechtefeld, T., and Coppens, I. (2015).
Neospora caninum recruits host cell structures to its parasitophorous vacuole and salvages lipids from organelles.

- Eukaryotic Cell*, 14(5):454–473.
- Novák, K. (2014).
Functional polymorphisms in Toll-like receptor genes for innate immunity in farm animals.
Veterinary Immunology and Immunopathology, 157(1-2):1–11.
- Olias, P., Etheridge, R. D., Zhang, Y., Holtzman, M. J., and Sibley, L. D. (2016).
Toxoplasma effector recruits the Mi-2/NuRD complex to repress STAT1 transcription and block IFN- γ -dependent gene expression.
Cell Host and Microbe, 20(1):72–82.
- Omata, Y., Nidaira, M., Kano, R., Kobayashi, Y., Koyama, T., Furuoka, H., Maeda, R., Matsui, T., and Saito, A. (2004).
Vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice in both acute and chronic infection.
Veterinary Parasitology, 121:323–328.
- Ortega-Mora, L., Calero-Bernal, R., and Regidor-Cerrillo, J. (2019).
Manual práctico de enfermedades infectocontagiosas en rumiantes.
chapter 32, pages 289–300. Elsevier, Barcelona, España.
- Ortega-Mora, L., Fernández-García, A., and Gómez-Bautista, M. (2006).
Diagnosis of bovine neosporosis: Recent advances and perspectives.
Acta Parasitologica, 51(1):1–14.
- Osburn, B. I., MacLachlan, N. J., and Terrell, T. G. (1982).
Ontogeny of the immune system.
Journal of the American Veterinary Medical Association, 181(10):1049–1052.
- Osoro, K., Ortega-Mora, L., Martínez, A., Serrano-Martínez, E., and Ferre, I. (2009).
Natural breeding with bulls experimentally infected with *Neospora caninum* failed to induce seroconversion in dams.
Theriogenology, 71(4):639–642.
- Ouologuem, D. T. and Roos, D. S. (2014).
Dynamics of the *Toxoplasma gondii* inner membrane complex.
Journal of Cell Science, 127(Pt 15):3320–3330.
- Pastor-Fernández (2016).
Identificación y caracterización de las proteínas NcROP40 y NcNTPasa, y evaluación de su utilidad vacunal frente a la neosporosis.
PhD thesis, Universidad Complutense de Madrid.
- Pastor-Fernández, I., Arranz-Solís, D., Regidor-Cerrillo, J., Álvarez-García, G., Hemphill, A., García-Culebras, A., Cuevas-Martín, C., and Ortega-Mora, L. M. (2015a).

- A vaccine formulation combining rhoptry proteins NcROP40 and NcROP2 improves pup survival in a pregnant mouse model of neosporosis.
Veterinary Parasitology, 207(3-4):203–215.
- Pastor-Fernández, I., Collantes-Fernández, E., Jiménez-Pelayo, L., Ortega-Mora, L. M., and Horcajo, P. (2021).
Modeling the ruminant placenta-pathogen interactions in apicomplexan parasites: Current and future perspectives.
Frontiers in Veterinary Science, 7:634458.
- Pastor-Fernández, I., Regidor-Cerrillo, J., Álvarez-García, G., Marugán-Hernández, V., García-Lunar, P., Hemphill, A., and Ortega-Mora, L. M. (2016).
The tandemly repeated NTPase (NTPDase) from *Neospora caninum* is a canonical dense granule protein whose RNA expression, protein secretion and phosphorylation coincides with the tachyzoite egress.
Parasites and Vectors, 9(1):352.
- Pastor-Fernández, I., Regidor-Cerrillo, J., Jiménez-Ruiz, E., Álvarez-García, G., Marugán-Hernández, V., Hemphill, A., and Ortega-Mora, L. M. (2015b).
Characterization of the *Neospora caninum* NcROP40 and NcROP2Fam-1 rhoptry proteins during the tachyzoite lytic cycle.
Parasitology, 143(1):97–113.
- Pedraza-Díaz, S., Marugán-Hernández, V., Collantes-Fernández, E., Regidor-Cerrillo, J., Rojo-Montejo, S., Gómez-Bautista, M., and Ortega-Mora, L. M. (2009).
Microsatellite markers for the molecular characterization of *Neospora caninum*: application to clinical samples.
Veterinary Parasitology, 166(1-2):38–46.
- Pereira García-Melo, D., Regidor-Cerrillo, J., Collantes-Fernández, E., Aguado-Martínez, A., Del Pozo, I., Minguijn, E., Gómez-Bautista, M., Aduriz, G., and Ortega-Mora, L. M. (2010).
Pathogenic characterization in mice of *Neospora caninum* isolates obtained from asymptomatic calves.
Parasitology, 137(7):1057–1068.
- Perez-Zaballos (2004).
Variabilidad adaptativa y patogénica en Neospora caninum.
PhD thesis, Universidad Complutense de Madrid.
- Pérez-Zaballos, F. J., Ortega-Mora, L. M., Álvarez-García, G., Collantes-Fernández, E., Navarro-Lozano, V., García-Villada, L., and Costas, E. (2005).
Adaptation of *Neospora caninum* isolates to cell-culture changes: An argument in favor of its clonal population structure.
Journal of Parasitology, 91(3):507–510.

- Peters, M., Lütkefels, E., Heckerroth, A., and Schares, G. (2001).
Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle.
International Journal for Parasitology, 31(10):1144–1148.
- Quinn, H. E., Ellis, J. T., and Smith, N. C. (2002a).
Neospora caninum: a cause of immune-mediated failure of pregnancy?
Trends in Parasitology, 18(9):391–394.
- Quinn, H. E., Miller, C. M., and Ellis, J. T. (2004).
The cell-mediated immune response to *Neospora caninum* during pregnancy in the mouse is associated with a bias towards production of interleukin-4.
International Journal for Parasitology, 34(6):723–732.
- Quinn, H. E., Miller, C. M. D., Ryce, C., Windsor, P. A., and Ellis, J. T. (2002b).
Characterization of an outbred pregnant mouse model of *Neospora caninum* infection.
Journal of Parasitology, 88(4):691–696.
- Quintanilla-Gozaló, A., Pereira-Bueno, J., Seijas-Carballedo A., Costas, E., and Ortega-Mora, L. (2000).
Observational studies in *Neospora caninum* infected dairy cattle: relationship infection-abortion and gestational antibody fluctuations.
International Journal for Parasitology, 30:900–906.
- Raghupathy, R. (1997a).
Maternal anti-placental cell-mediated reactivity and spontaneous abortions.
American Journal of Reproductive Immunology, 37(6):478–484.
- Raghupathy, R. (1997b).
Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy.
Immunology Today, 18(10):478–482.
- Ramamoorthy, S., Duncan, R., Lindsay, D., and Sriranganathan, N. (2007).
Optimization of the use of C57BL/6 mice as a laboratory animal model for *Neospora caninum* vaccine studies.
Veterinary Parasitology, 145(3–4):253–259.
- Ramaprasad, A., Mourier, T., Naeem, R., Malas, T. B., Moussa, E., Panigrahi, A., Vermont, S. J., Otto, T. D., Wastling, J., and Pain, A. (2015).
Comprehensive evaluation of *Toxoplasma gondii* VEG and *Neospora caninum* LIV genomes with tachyzoite stage transcriptome and proteome defines novel transcript features.
PLOS One, 10(4):e0124473.
- Rastogi, S., Xue, Y., Quake, S. R., and Boothroyd, J. C. (2020).

- Differential impacts on host transcription by ROP and GRA effectors from the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*.
mBio, 11(3):e00182–20.
- Rees, T., Vandepitte, L., Vanhoorne, B., and Decock, W. (2020).
All genera of the world: an overview and estimates based on the March 2020 release of the interim register of marine and nonmarine genera (IRMNG).
Megataxa, 1(2):123–140.
- Reese, M. L. and Boyle, J. P. (2012).
Virulence without catalysis: how can a pseudokinase affect host cell signaling?
Trends in Parasitology, 28(2):53–57.
- Reese, M. L., Zeiner, G. M., Saeij, J. P., Boothroyd, J. C., and Boyle, J. P. (2011).
Polymorphic family of injected pseudokinases is paramount in *Toxoplasma* virulence.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108(23):9625–9630.
- Regidor-Cerrillo, J., Álvarez-García, G., Pastor-Fernández, I., Marugán-Hernández, V., Gómez-Bautista, M., and Ortega-Mora, L. M. (2012).
Proteome expression changes among virulent and attenuated *Neospora caninum* isolates.
Journal of Proteomics, 75(8):2306–2318.
- Regidor-Cerrillo, J., Arranz-Solís, D., Benavides, J., Gómez-Bautista, M., Castro-Hermida, J. A., Mezo, M., Pérez, V., Ortega-Mora, L. M., and González-Warleta, M. (2014).
Neospora caninum infection during early pregnancy in cattle: How the isolate influences infection dynamics, clinical outcome and peripheral and local immune responses.
Veterinary Research, 45(1):10.
- Regidor-Cerrillo, J., Díez-Fuertes, F., García-Culebras, A., Moore, D. P., González-Warleta, M., Cuevas, C., Schares, G., Katzer, F., Pedraza-Díaz, S., Mezo, M., and Ortega-Mora, L. M. (2013).
Genetic diversity and geographic population structure of bovine *Neospora caninum* determined by microsatellite genotyping analysis.
PloS One, 8(8):e72678.
- Regidor-Cerrillo, J., Gámez-Bautista, M., Sodupe, I., Aduriz, G., Álvarez-García, G., Del Pozo, I., and Ortega-Mora, L. (2011).
In vitro invasion efficiency and intracellular proliferation rate comprise virulence-related phenotypic traits of *Neospora caninum*.
Veterinary Research, 42(1):41.
- Regidor-Cerrillo, J., García-Lunar, P., Pastor-Fernández, I., Álvarez-García, G., Collantes-Fernández, E., Gómez-Bautista, M., and Ortega-Mora, L. M. (2015).

- Neospora caninum* tachyzoite immunome study reveals differences among three biologically different isolates.
Veterinary Parasitology, 212(3-4):92–99.
- Regidor-Cerrillo, J., Gómez-Bautista, M., Del Pozo, I., Jiménez-Ruiz, E., Aduriz, G., and Ortega-Mora, L. M. (2010).
Influence of *Neospora caninum* intra-specific variability in the outcome of infection in a pregnant BALB/c mouse model.
Veterinary Research, 41(4):52.
- Regidor-Cerrillo, J., Gómez-Bautista, M., Pereira-Bueno, J., Aduriz, G., Navarro-Lozano, V., Risco-Castillo, V., Fernández-García, A., Pedraza-Díaz, S., and Ortega-Mora, L. M. (2008).
Isolation and genetic characterization of *Neospora caninum* from asymptomatic calves in Spain.
Parasitology, 135(14):1651–1659.
- Regidor-Cerrillo, J., Pedraza-Díaz, S., Gómez-Bautista, M., and Ortega-Mora, L. M. (2006).
Multilocus microsatellite analysis reveals extensive genetic diversity in *Neospora caninum*.
The Journal of Parasitology, 92(3):517–524.
- Regidor-Cerrillo, J., Xia, D., Jiménez-Pelayo, L., García-Sánchez, M., Collantes-Fernández, E., Randle, N., Wastling, J., Ortega-Mora, L. M., and Horcajo, P. (2020).
Proteomic characterization of host-pathogen interactions during bovine trophoblast cell line infection by *Neospora caninum*.
Pathogens, 9(9):1–10.
- Reichel, M. P., Alejandra Ayanegui-Alcérreca, M., Gondim, L. F., and Ellis, J. T. (2013).
What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - The billion dollar question.
International Journal for Parasitology, 43(2):133–142.
- Reichel, M. P. and Ellis, J. T. (2006).
If control of *Neospora caninum* infection is technically feasible does it make economic sense?
Veterinary Parasitology, 142(1-2):23–34.
- Reichel, M. P., McAllister, M. M., Pomroy, W. E., Campero, C., Ortega-Mora, L. M., and Ellis, J. T. (2014).
Control options for *Neospora caninum* – is there anything new or are we going backwards?
Parasitology, 141(11):1455–1470.
- Reichel, M. P., Moore, D. P., Hemphill, A., Ortega-Mora, L. M., Dubey, J. P., and Ellis, J. T. (2015).
A live vaccine against *Neospora caninum* abortions in cattle.

- Vaccine*, 33(11):1299–1301.
- Reid, A. J., Vermont, S. J., Cotton, J. A., Harris, D., Hill-Cawthorne, G. A., Könen-Waisman, S., Latham, S. M., Mourier, T., Norton, R., Quail, M. A., Sanders, M., Shanmugam, D., Sohal, A., Wasmuth, J. D., Brunk, B., Grigg, M. E., Howard, J. C., Parkinson, J., Roos, D. S., Trees, A. J., Berriman, M., Pain, A., and Wastling, J. M. (2012). Comparative genomics of the apicomplexan parasites *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*: Coccidia differing in host range and transmission strategy. *PLoS Pathogens*, 8(3):e1002567.
- Rettigner, C., Leclipteux, T., Meerschman, F. D., Focant, C., and Losson, B. (2004). Survival, immune responses and tissue cyst production in outbred (Swiss white) and inbred (CBA/Ca) strains of mice experimentally infected with *Neospora caninum* tachyzoites. *Veterinary Research*, 35(2):225–232.
- Rico-San Román, L., Amieva, R., Regidor-Cerrillo, J., García-Sánchez, M., Collantes-Fernández, E., Pastor-Fernández, I., Saeij, J. P. J., Ortega-Mora, L. M., and Horcajo, P. (2022). NcGRA7 and NcROP40 play a role in the virulence of *Neospora caninum* in a pregnant mouse model. *Pathogens*, 11(9):998.
- Rico-San Román, L., Horcajo, P., Regidor-Cerrillo, J., Fernández-Escobar, M., Collantes-Fernández, E., Gutiérrez-Blázquez, D., Hernández-Sánchez, M. L., Saeij, J. P., and Ortega-Mora, L. M. (2020). Comparative tachyzoite proteome analyses among six *Neospora caninum* isolates with different virulence. *International Journal for Parasitology*, 50(5):377–388.
- Risco-Castillo, V., Fernández-García, A., and Ortega-Mora, L. M. (2004). Comparative analysis of stress agents in a simplified in vitro system of *Neospora caninum* bradyzoite production. *The Journal of Parasitology*, 90(3):466–470.
- Roiko, M. S. and Carruthers, V. B. (2013). Functional dissection of *Toxoplasma gondii* perforin-like protein 1 reveals a dual domain mode of membrane binding for cytolysis and parasite egress. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(12):8712–8725.
- Rojo-Montejo, S., Collantes-Fernández, E., Blanco-Murcia, J., Rodríguez-Bertos, A., Risco-Castillo, V., and Ortega-Mora, L. M. (2009a). Experimental infection with a low virulence isolate of *Neospora caninum* at 70 days gestation in cattle did not result in foetopathy. *Veterinary Research*, 40(5):49.

- Rojo-Montejo, S., Collantes-Fernández, E., Pérez-Zaballos, F., Rodríguez-Marcos, S., Blanco-Murcia, J., Rodríguez-Bertos, A., Prenafeta, A., and Ortega-Mora, L. M. (2013).
Effect of vaccination of cattle with the low virulence Nc-Spain 1H isolate of *Neospora caninum* against a heterologous challenge in early and mid-gestation.
Veterinary Research, 44(1):106.
- Rojo-Montejo, S., Collantes-Fernández, E., Regidor-Cerrillo, J., Álvarez-García, G., Marugan-Hernández, V., Pedraza-Díaz, S., Blanco-Murcia, J., Prenafeta, A., and Ortega-Mora, L. M. (2009b).
Isolation and characterization of a bovine isolate of *Neospora caninum* with low virulence.
Veterinary Parasitology, 159(1):7–16.
- Romero, J. J., Pérez, E., and Frankena, K. (2004).
Effect of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite vaccine on the crude abortion rate of Costa Rican dairy cows under field conditions.
Veterinary Parasitology, 123(3-4):149–159.
- Rosbottom, A., Gibney, E. H., Guy, C. S., Kipar, A., Smith, R. F., Kaiser, P., Trees, A. J., and Williams, D. J. (2008).
Upregulation of cytokines is detected in the placentas of cattle infected with *Neospora caninum* and is more marked early in gestation when fetal death is observed.
Infection and Immunity, 76(6):2352–2361.
- Rosbottom, A., Guy, C. S., Gibney, E. H., Smith, R. F., Valarcher, J. F., Taylor, G., and Williams, D. J. L. (2007).
Peripheral immune responses in pregnant cattle following *Neospora caninum* infection.
Parasite Immunology, 29(4):219–228.
- Rosowski, E. E., Lu, D., Julien, L., Rodda, L., Gaiser, R. A., Jensen, K. D., and Saeij, J. P. (2011).
Strain-specific activation of the NF- κ B pathway by GRA15, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein.
Journal of Experimental Medicine, 208(1):195–212.
- Ruggiero, M. A., Gordon, D. P., Orrell, T. M., Bailly, N., Bourgoin, T., Brusca, R. C., Cavalier-Smith, T., Guiry, M. D., and Kirk, P. M. (2015).
A higher level classification of all living organisms.
PLoS One, 10(4):e0119248.
- Saeij, J. P., Arrizabalaga, G., and Boothroyd, J. C. (2008).
A cluster of four surface antigen genes specifically expressed in bradyzoites, SAG2CDXY, plays an important role in *Toxoplasma gondii* persistence.
Infection and Immunity, 76(6):2402–2410.

- Saeij, J. P., Boyle, J. P., Collier, S., Taylor, S., Sibley, L. D., Brooke-Powell, E. T., Ajioka, J. W., and Boothroyd, J. C. (2006).
Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis.
Science, 314(5806):1780–1783.
- Saeij, J. P. and Frickel, E. M. (2017).
Exposing *Toxoplasma gondii* hiding inside the vacuole: a role for GBPs, autophagy and host cell death.
Current Opinion in Microbiology, 40:72–80.
- Saeij, J. P. J., Collier, S., Boyle, J. P., Jerome, M. E., White, M. W., and Boothroyd, J. C. (2007).
Toxoplasma co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue.
Nature, 445(7125):324–327.
- Sánchez-Sánchez, R., Ferre, I., Re, M., Vázquez, P., Ferrer, L. M., Blanco-Murcia, J., Regidor-Cerrillo, J., Pizarro Díaz, M., González-Huecas, M., Tabanera, E., García-Lunar, P., Benavides, J., Castaño, P., Hemphill, A., Hulverson, M. A., Whitman, G. R., Rivas, K. L., Choi, R., Ojo, K. K., Barrett, L. K., Van Voorhis, W. C., and Ortega-Mora, L. M. (2018a).
Safety and efficacy of the bumped kinase inhibitor BKI-1553 in pregnant sheep experimentally infected with *Neospora caninum* tachyzoites.
International Journal for Parasitology, 8(1):112–124.
- Sánchez-Sánchez, R., Vázquez, P., Ferre, I., and Ortega-Mora, L. M. (2018b).
Treatment of toxoplasmosis and neosporosis in farm ruminants: State of knowledge and future trends.
Current Topics in Medicinal Chemistry, 18(15):1304–1323.
- Sanderson, S. J., Xia, D., Prieto, H., Yates, J., Heiges, M., Kissinger, J. C., Bromley, E., Lal, K., Sinden, R. E., Tomley, F., and Wastling, J. M. (2008).
Determining the protein repertoire of *Cryptosporidium parvum* sporozoites.
Proteomics, 8(7):1398–1414.
- Sawada, M., Kondo, H., Tomioka, Y., Park, C., Morita, T., Shimada, A., and Umemura, T. (2000).
Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected adult dairy cow.
Veterinary Parasitology, 90(3):247–52.
- Schares, G., Bärwald, A., Staubach, C., Söndgen, P., Rauser, M., Schröder, R., Peters, M., Wurm, R., Selhorst, T., and Conraths, F. J. (2002).
p38-avidity-ELISA: examination of herds experiencing epidemic or endemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion.
Veterinary Parasitology, 106(4):293–305.
- Schares, G., Pantchev, N., Barutzki, D., Heydorn, A. O., Bauer, C., and Conraths, F. J. (2005).

- Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany.
International Journal for Parasitology, 35(14):1525–1537.
- Schares, G., Peters, M., Wurm, R., Bärwald, A., and J. Conraths, F. (1998).
The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques.
Veterinary Parasitology, 80(2):87–98.
- Schock, A., Innes, E. A., Yamane, I., Latham, S. M., and Wastling, J. M. (2001).
Genetic and biological diversity among isolates of *Neospora caninum*.
Parasitology, 123 (Pt 1):13–23.
- Sechi, S. and Chait, B. T. (1998).
Modification of cysteine residues by alkylation. A tool in peptide mapping and protein identification.
Analytical Chemistry, 70(24):5150–5158.
- Shin, Y. S., Shin, G. W., Kim, Y. R., Lee, E. Y., Yang, H. H., Palaksha, K. J., Youn, H. J., Kim, J. H., Kim, D. Y., Marsh, A. E., Lakritz, J., and Jung, T. S. (2005).
Comparison of proteome and antigenic proteome between two *Neospora caninum* isolates.
Veterinary Parasitology, 134(1-2):41–52.
- Shrestha, S. P., Tomita, T., Weiss, L. M., and Orlofsky, A. (2006).
Proliferation of *Toxoplasma gondii* in inflammatory macrophages in vivo is associated with diminished oxygen radical production in the host cell.
International Journal for Parasitology, 36(4):433–441.
- Sibley, L. D., Qiu, W., Fentress, S., Taylor, S. J., Khan, A., and Hui, R. (2009).
Forward genetics in *Toxoplasma gondii* reveals a family of rhopty kinases that mediates pathogenesis.
Eukaryotic Cell, 8(8):1085–1093.
- Sibley, L. D., Weidner, E., and Krahenbuhl, J. L. (1985).
Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*.
Nature, 315(6018):416–419.
- Sidik, S. M., Hackett, C. G., Tran, F., Westwood, N. J., and Lourido, S. (2014).
Efficient genome engineering of *Toxoplasma gondii* using CRISPR/Cas9.
PLoS One, 9(6):e100450.
- Sinai, A. P. and Joiner, K. A. (2001).
The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane.
The Journal of Cell Biology, 154(1):95–108.

- Soete, M., Hettman, C., and Soldati, D. (1999).
The importance of reverse genetics in determining gene function in apicomplexan parasites.
Parasitology, 118 Suppl(1):S53–61.
- Soldati, D., Dubremetz, J. F., and Lebrun, M. (2001).
Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*.
International Journal for Parasitology, 31(12):1293–1302.
- Song, C., Chiasson, M. A., Nursimulu, N., Hung, S. S., Wasmuth, J., Grigg, M. E., and Parkinson, J. (2013).
Metabolic reconstruction identifies strain-specific regulation of virulence in *Toxoplasma gondii*.
Molecular Systems Biology, 9:708.
- Speer, C., Dubey, J., McAllister, M., and Blixt, J. (1999).
Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*.
International Journal for Parasitology, 29(10):1509–1519.
- Speer, C. A. and Dubey, J. P. (1989).
Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum*.
The Journal of Protozoology, 36(5):458–463.
- Stenlund, S., Björkman, C., Holmdahl, O. J., Kindahl, H., and Ugglå, A. (1997).
Characterization of a Swedish bovine isolate of *Neospora caninum*.
Parasitology Research, 83(3):214–219.
- Straub, K. W., Cheng, S. J., Sohn, C. S., and Bradley, P. J. (2009).
Novel components of the Apicomplexan moving junction reveal conserved and coccidia-restricted elements.
Cellular Microbiology, 11(4):590–603.
- Straub, K. W., Peng, E. D., Hajagos, B. E., Tyler, J. S., and Bradley, P. J. (2011).
The moving junction protein RON8 facilitates firm attachment and host cell invasion in *Toxoplasma gondii*.
PLoS Pathogens, 7(3):e1002007.
- Suarez, C. E., Bishop, R. P., Alzan, H. F., Poole, W. A., and Cooke, B. M. (2017).
Advances in the application of genetic manipulation methods to apicomplexan parasites.
International Journal for Parasitology, 47(12):701–710.
- Swapna, L. S. and Parkinson, J. (2017).

- Genomics of apicomplexan parasites.
Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 52(3):254–273.
- Taubert, A., Hermosilla, C., Behrendt, J., and Zahner, H. (2006a).
Reaction of bovine endothelial cells in vitro to coccidia (*Eimeria bovis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*) infections as the expression of a non-adaptive immune response.
Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift, 119(7–8):274–281.
- Taubert, A., Krüll, M., Zahner, H., and Hermosilla, C. (2006b).
Toxoplasma gondii and *Neospora caninum* infections of bovine endothelial cells induce endothelial adhesion molecule gene transcription and subsequent PMN adhesion.
Veterinary Immunology and Immunopathology, 112(3–4):272–283.
- Taylor, S., Barragan, A., Su, C., Fux, B., Fentress, S. J., Tang, K., Beatty, W. L., Hajj, H. E., Jerome, M., Behnke, M. S., White, M., Wootton, J. C., and Sibley, L. D. (2006).
A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*.
Science, 314(5806):1776–1780.
- Teixeira, L., Botelho, A. S., Batista, A. R., Meireles, C. S., Ribeiro, A., Domingues, H. S., Costa, J. M. C. D., Castro, A. G., Faustino, A. M. R., and Vilanova, M. (2007).
Analysis of the immune response to *Neospora caninum* in a model of intragastric infection in mice.
Parasite Immunology, 29(1):23–36.
- Tenter, A. M., Barta, J. R., Beveridge, I., Duszynski, D. W., Mehlhorn, H., Morrison, D. A., Thompson, R. C. A., and Conrad, P. A. (2002).
The conceptual basis for a new classification of the coccidia.
International Journal for Parasitology, 32(5):595–616.
- Terns, M. P. and Terns, R. M. (2011).
CRISPR-based adaptive immune systems.
Current Opinion in Microbiology, 14(3):321–327.
- Thilsted, J. P. and Dubey, J. P. (1989).
Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle.
Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 1(3):205–209.
- Trees, A. J. and Williams, D. J. (2005).
Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*.
Trends in Parasitology, 21(12):558–561.
- VanLeeuwen, J. A., Greenwood, S., Clark, F., Acorn, A., Markham, F., McCarron, J., and O’Handley, R. (2011).

- Monensin use against *Neospora caninum* challenge in dairy cattle.
Veterinary Parasitology, 175(3–4):372–376.
- Varona, R., Cadenas, V., Gomez, L., Martinez-A, C., and Marquez, G. (2005).
CCR6 regulates CD4+ T-cell-mediated acute graft-versus-host disease responses.
Blood, 106(1):18–26.
- Vázquez, P., Osoro, K., Fernández, M., Román-Trufero, A., Regidor-Cerrillo, J., Jiménez-Pelayo, L., García-Sánchez, M., Rojo-Montejo, S., Benavides, J., Horcajo, P., and Ortega-Mora, L. M. (2019).
Effects of challenge dose and inoculation route of the virulent *Neospora caninum* Nc-Spain7 isolate in pregnant cattle at mid-gestation.
Veterinary Research, 50(1):68.
- Vemulapalli, R., Sanakkayala, N., Gulani, J., Schurig, G. G., Boyle, S. M., Lindsay, D. S., and Sriranganathan, N. (2007).
Reduced cerebral infection of *Neospora caninum* in BALB/c mice vaccinated with recombinant *Brucella abortus* RB51 strains expressing *N. caninum* SRS2 and GRA7 proteins.
Veterinary Parasitology, 148(3–4):219–230.
- Vizcaíno, J. A., Csordas, A., Del-Toro, N., Dianes, J. A., Griss, J., Lavidas, I., Mayer, G., Perez-Riverol, Y., Reisinger, F., Ternent, T., Xu, Q.-W., Wang, R., and Hermjakob, H. (2016).
2016 update of the PRIDE database and its related tools.
Nucleic Acids Research, 44(D1):447–456.
- Walker, R., Gissot, M., Croken, M. M., Huot, L., Hot, D., Kim, K., and Tomavo, S. (2013).
The *Toxoplasma* nuclear factor TgAP2XI-4 controls bradyzoite gene expression and cyst formation.
Molecular Microbiology, 87(3):641–655.
- Walsh, C. P., Vemulapalli, R., Sriranganathan, N., Zajac, A. M., Jenkins, M. C., and Lindsay, D. S. (2001).
Molecular comparison of the dense granule proteins GRA6 and GRA7 of *Neospora hughesi* and *Neospora caninum*.
International Journal for Parasitology, 31(3):253–258.
- Wang, F., Wang, X., Song, X., Ma, L., Yang, J., Liu, Q., and Liu, J. (2021a).
Function of *Neospora caninum* dense granule protein 7 in innate immunity in mice.
Parasitology Research, 120(1):197–207.
- Wang, J., Dixon, S. E., Ting, L. M., Liu, T. K., Jeffers, V., Croken, M. M., Calloway, M., Cannella, D., Ali Hakimi, M., Kim, K., and Sullivan, W. J. (2014).
Lysine acetyltransferase GCN5b interacts with AP2 factors and is required for *Toxoplasma gondii* proliferation.

- PLoS Pathogens*, 10(1):e1003830.
- Wang, J. L., Li, T. T., Elsheikha, H. M., Chen, K., Zhu, W. N., Yue, D. M., Zhu, X. Q., and Huang, S. Y. (2017).
Functional characterization of rhoptry kinome in the virulent *Toxoplasma gondii* RH strain.
Frontiers in Microbiology, 8(1):84.
- Wang, X., Gong, P., Zhang, X., Li, S., Lu, X., Zhao, C., Yu, Q., Wei, Z., Yang, Y., Liu, Q., Yang, Z., Li, J., and Zhang, X. (2018).
NLRP3 inflammasome participates in host response to *Neospora caninum* infection.
Frontiers in Immunology, 9(1):1791.
- Wang, X., Tang, D., Wang, F., Jin, G., Wang, L., Liu, Q., and Liu, J. (2021b).
Microneme protein 6 is involved in invasion and egress by *Neospora caninum*.
Pathogens, 10(2):201.
- Wang, Y., Sangaré, L. O., Paredes-Santos, T. C., Hassan, M. A., Krishnamurthy, S., Furuta, A. M., Markus, B. M., Lourido, S., and Saeij, J. P. (2020).
Genome-wide screens identify *Toxoplasma gondii* determinants of parasite fitness in IFN γ -activated murine macrophages.
Nature Communications, 11(1):5258.
- Wastling, J. M., Xia, D., Sohal, A., Chaussepied, M., Pain, A., and Langsley, G. (2009).
Proteomes and transcriptomes of the Apicomplexa - Where's the message?
International Journal for Parasitology, 39(2):135–143.
- Wegmann, T. G., Lin, H., Guilbert, L., and Mosmann, T. R. (1993).
Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon?
Immunology Today, 14(7):353–356.
- Wei, Z., Wang, Y., Zhang, X., Wang, X., Gong, P., Li, J., Taubert, A., Hermosilla, C., Zhang, X., and Yang, Z. (2018).
Bovine macrophage-derived extracellular traps act as early effectors against the abortive parasite *Neospora caninum*.
Veterinary Parasitology, 258:1–7.
- Werling, D., Jann, O. C., Offord, V., Glass, E. J., and Coffey, T. J. (2009).
Variation matters: TLR structure and species-specific pathogen recognition.
Trends in Immunology, 30(3):124–130.
- Werling, D., Piercy, J., and Coffey, T. J. (2006).
Expression of TOLL-like receptors (TLR) by bovine antigen-presenting cells- Potential role in pathogen discrimination?

- Veterinary Immunology and Immunopathology*, 112(1–2):2–11.
- Weston, J. F., Heuer, C., and Williamson, N. B. (2012).
Efficacy of a *Neospora caninum* killed tachyzoite vaccine in preventing abortion and vertical transmission in dairy cattle.
Preventive Veterinary Medicine, 103(2–3):136–144.
- Whitten, W. K. (1956).
Modification of the oestrous cycle of the mouse by external stimuli associated with the male.
The Journal of Endocrinology, 13(4):399–404.
- Williams, D. J., Guy, C. S., McGarry, J. W., Guy, F., Tasker, L., Smith, R. F., MacEachern, K., Cripps, P. J., Kelly, D. F., and Trees, A. J. (2000).
Neospora caninum-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival.
Parasitology, 121(Pt 4):347–358.
- Williams, D. J., Hartley, C. S., Björkman, C., and Trees, A. J. (2009).
Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum*- How the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease.
Parasitology, 136(14):1895–1900.
- Williams, D. J. L., Guy, C. S., Smith, R. F., Ellis, J., Björkman, C., Reichel, M. P., and Trees, A. J. (2007).
Immunization of cattle with live tachyzoites of *Neospora caninum* confers protection against fetal death.
Infection and Immunity, 75(3):1343–1348.
- Wouda, W., Moen, A. R., Visser, I. J., and van Knapen, F. (1997).
Bovine fetal neosporosis: a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification of organisms in brain, heart, and liver.
Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 9(2):180–185.
- Xia, D., Sanderson, S. J., Jones, A. R., Prieto, J. H., Yates, J. R., Bromley, E., Tomley, F. M., Lal, K., Sinden, R. E., Brunk, B. P., Roos, D. S., and Wastling, J. M. (2008).
The proteome of *Toxoplasma gondii*: Integration with the genome provides novel insights into gene expression and annotation.
Genome Biology, 9(7):R116.
- Yamamoto, M., Okuyama, M., Ma, J. S., Kimura, T., Kamiyama, N., Saiga, H., Ohshima, J., Sasai, M., Kayama, H., Okamoto, T., Huang, D. C., Soldati-Favre, D., Horie, K., Takeda, J., and Takeda, K. (2012).

- A cluster of interferon- γ -inducible p65 gtpases plays a critical role in host defense against *Toxoplasma gondii*.
Immunity, 37(2):302–313.
- Yamane, I., Kitani, H., Kokuho, T., Shibahara, T., Haritani, M., Hamaoka, T., Shimizu, S., Koiwai, M., Shimura, K., and Yokomizo, Y. (2000).
The Inhibitory Effect of Interferon Gamma and Tumor Necrosis Factor Alpha on Intracellular Multiplication of *Neospora caninum* in Primary Bovine Brain Cells.
The Journal of Veterinary Medical Science, 62(3):347–351.
- Yang, C., Liu, J., Ma, L., Zhang, X., Zhang, X., Zhou, B., Zhu, X., and Liu, Q. (2018).
NcGRA17 is an important regulator of parasitophorous vacuole morphology and pathogenicity of *Neospora caninum*.
Veterinary Parasitology, 264:26–34.
- Yang, C., Wang, C., Liu, J., and Liu, Q. (2021).
Biotinylation of the *Neospora caninum* parasitophorous vacuole reveals novel dense granule proteins.
Parasites and Vectors, 14(1):1–12.
- Yang, N., Farrell, A., Niedelman, W., Melo, M., Lu, D., Julien, L., Marth, G. T., Gubbels, M.-J., and Saeij, J. P. J. (2013).
Genetic basis for phenotypic differences between different *Toxoplasma gondii* type I strains.
BMC Genomics, 14(1):467.
- Yarovinsky, F. (2014).
Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection.
Nature Reviews Immunology, 14(2):109–121.
- Zhang, Y., Lai, B. S., Juhas, M., and Zhang, Y. (2019).
Toxoplasma gondii secretory proteins and their role in invasion and pathogenesis.
Microbiological Research, 227(1):126293.
- Zhao, P., Zhang, N., Dong, J., Li, J., Wang, X., Li, X., Li, X., Yang, J., Gong, P., and Zhang, X. (2020).
Effects of dense granular protein 6 (GRA6) disruption on *Neospora caninum* virulence.
Frontiers in Veterinary Science, 7:562730.
- Zhou, D.-H., Wang, Z.-X., Zhou, C.-X., He, S., Elsheikha, H. M., and Zhu, X.-Q. (2017).
Comparative proteomic analysis of virulent and avirulent strains of *Toxoplasma gondii* reveals strain-specific patterns.
Oncotarget, 8(46):80481–80491.

