

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal



**VARIABILIDAD ADAPTATIVA Y PATOGENICA EN  
“NEOSPORA CANINUM”**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE  
DOCTOR POR**

Francisco José Pérez Zaballos

Bajo la dirección de los Doctores:

Luis Miguel Ortega Mora  
Eduardo Costas Costas

**Madrid, 2004**

**ISBN: 84-669-2686-0**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA  
Dpto. Sanidad Animal



VARIABILIDAD ADAPTATIVA Y PATOGENICA EN  
*Neospora caninum*

D. Francisco José Pérez Zaballos

Madrid, 2004



Memoria presentada por D. Francisco José Pérez Zaballos para optar al grado de Doctor en Veterinaria por la Universidad Complutense de Madrid.



**Luis Miguel Ortega Mora**, Profesor Titular del Departamento de Sanidad Animal, y **Eduardo Costas Costas**, Profesor Titular del Departamento de Producción Animal, de la Facultad de Veterinaria, de la Universidad Complutense de Madrid,

**CERTIFICAN:**

Que la tesis doctoral titulada "Variabilidad adaptativa y patogénica en *Neospora caninum*" que presenta el Licenciado en Veterinaria Francisco José Pérez Zaballos, para optar al grado de Doctor en Veterinaria ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y cumple los requisitos exigibles para la obtención de dicho grado y autorizan su presentación.

Y para que conste, a todos los efectos, firmamos la presente en Madrid, a 15 de Marzo de 2004,

Fdo: Prof. Dr. Luis Miguel Ortega Mora

Fdo: Prof. Dr. Eduardo Costas Costas



**A MERCEDES**

**A ALFONSO Y CARMEN**

"Ahora siento que llegó el día  
en que tengo ganas de vivir  
de atravesar muros y ruinas  
que aunque pase el tiempo están ahí  
y florecer como un hombre nuevo  
sin miedo a las tragedias por venir.  
Regalarle a la vida todo el fuego  
de tus ojos y tus ansias de vivir"

JESÚS DE LA ROSA

**A MI AMIGO PACO:**

"...Y creo que he bebido más de 40 cervezas hoy"



## AGRADECIMIENTOS

Cierro los ojos y os veo a todos. Durante cuatro años os he tenido conmigo, siendo mi apoyo físico, intelectual e incluso espiritual. Sin vuestra ayuda no se podría haber concluido esta obra. Es para mí un placer escribir vuestros nombres en estas hojas. Con ello, espero expresaros todo mi respeto y mi más sincero reconocimiento.

Debo comenzar dando las gracias a mis directores de tesis, Edu y Luis, por confiar en mí y por haberme transmitido toda la sabiduría, moral y ánimo suficiente para poder terminar este, para mí faraónico, trabajo.

A Gema, Esther y Vanesa. A Gema, por el apoyo y amistad con los que me ha obsequiado durante los momentos alegres y menos alegres que ha habido en esta tesis. A Esther, porque, tras estos años, me he dado cuenta que es una persona sensible con una capacidad de entrega al compañero que es difícil de encontrar. A Vanesa por "el año que vivimos peligrosamente" juntos, y que no olvidaré nunca.

Al resto de la "manada" actualmente presente y ausente: Aurora, Inma, Verónica, Adriana, Javier, Ignacio, Cinta, Raquel, Enrique, Rinaldo, Andrea, Isabel, Ana, Anita, Esther, Cristina, Dévora, Natalia y Bea, por toda la ayuda recibida en la difícil tarea de transformar a un "veterinario rural" en todo un proyecto de investigador. No me he olvidado de Conchita, la que en "mis momentos difíciles" siempre me dio ánimo para continuar adelante.

A Chema, Mercedes e Isabel por sus buenos "chascarrillos" y las buenas "jornadas gastronómicas" que hemos pasado juntos. También a Juana, que siempre ha valorado el esfuerzo realizado.

Al laboratorio de "arriba": Gracias Victoria por la comprensión que he obtenido siempre de ti; A Libertad, a la que después de todos los "marrones" que me ha solucionado, tiene una sonrisa para recibirme.

A Antonio Rodríguez Bertos y a Marcos Rico, por su inestimable colaboración especializada.

A mis amigos de siempre. A Andrés, por esas digitalizaciones murinas tan "chulas" y el resto de ayuda "de todo tipo" recibida. A Alfonso y Elvira, porque, aunque no os vea, sé que estáis ahí. A Miguel "el rana" y M<sup>a</sup> Angeles, por ofrecerme el placer de ver crecer a vuestras hijas junto a mis hijos. También a Paco, M<sup>a</sup> José , Alberto, Fátima, Julio, Juan y Toñi, por nuestros breves momentos.

A mis amigos del barrio, especialmente a Antonio Luque por la ayuda prestada en momentos muy importantes de esta tesis. A Miguel Velasco, por todas sus maravillosas "ñapas" informáticas. A Chispi, por estar cerca hasta cuando se iba lejos.

A mis amigos alcarreños, por su eterna amistad.

A mi primo Angel por ser mi PRIMO Angel.

A Francisco José Escorza , por su enorme humanidad y por toda la comprensión que tuvo en los momentos más difíciles de estos últimos años.

A mis compañeros de trabajo de Tarancón, "el otro" Luis Ortega y Andrés "el cubano", y de Yeles, Choni y Jose Carlos, por haber soportado mi pequeña "afición".

Simplemente le expreso mi cariño por lo recibido a mi compañero de "TODO" (Facultad, Mili, Ocio, Trabajo y casi Familia) al Doctor D. Juan Manuel Troncoso Ramón (Gracias Tronco).

A mis padres y a mis hermanos Carmen, Ana y Ricardo, porque sé que aunque estemos lejos "La Fuerza está con nosotros".

A mis suegros y cuñados, por la ayuda familiar prestada.

A Mercedes, por todo lo que significas en mi vida: gracias por todo, por lo bueno y lo mejor. Siempre recordaré nuestro Via Crucis de Semana Santa. A los mejores hijos del mundo, Alfonso y Carmen, simplemente porque son maravillosos.

Termino estos agradecimientos recordando a una serie de personas, que no por mencionarlas al final tienen menos importancia. Todo lo contrario. Quiero agradecer su aportación a esta tesis: a mi compañero de prácticas O. Moro, al novio de Inma (y por supuesto a la novia de Luis), a mi mejor colega de las Vistillas, a mi amigo Luis que vino a la Parrilla a por cerveza y se llevó Anectine, a mi amigo que me invitó a una Bier en Edimburgo, al doctor L'oteka, a un "clochard" de París, a un mejicano en Murcia, y sobre todo a mi amigo el Profesor Doctor D. Luis Miguel Ortega Mora.



La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la financiación del Ministerio de Ciencia y Tecnología a través del proyecto de investigación AGL2001-1362.



Listado de Figuras.....	v
Listado de Tablas.....	ix
Abreviaturas y siglas.....	xi
<b>1. ANTECEDENTES.....</b>	<b>1</b>
1.1. <u>Neospora caninum</u> Y NEOSPOROSIS.....	3
1.1.1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1.2. <i>Neospora caninum</i> .....	4
1.1.2.1. TAXONOMÍA.....	4
1.1.2.2. MORFOLOGÍA.....	6
1.1.2.3. CULTIVO <i>IN VITRO</i> .....	7
1.1.2.4. BIOLOGÍA.....	8
1.1.2.4.1. ESPECTRO DE HOSPEDADORES.....	8
1.1.2.4.2. CICLO BIOLÓGICO.....	9
1.1.2.5. DIVERSIDAD INTRAESPECÍFICA.....	10
1.1.3. TRANSMISIÓN.....	13
1.1.3.1. TRANSMISIÓN VERTICAL.....	14
1.1.3.2. TRANSMISIÓN HORIZONTAL.....	15
1.1.4. PATOLOGÍA DE LA NEOSPOROSIS.....	18
1.1.4.1. PATOGENIA.....	18
1.1.4.2. SINTOMATOLOGÍA.....	21
1.1.4.3. LESIONES.....	24
1.1.5. LA NEOSPOROSIS EN EL MODELO EXPERIMENTAL MURINO.....	26
1.1.5.1. MODELO MURINO.....	27
1.1.5.1.1. MODELO MURINO NO GESTANTE.....	29
1.1.5.1.2. MODELO MURINO GESTANTE.....	32
1.1.5.2. FACTORES QUE INFLUYEN EN EL MODELO MURINO.....	33
1.1.5.2.1. ESTIRPE MURINA Y TRATAMIENTO INMUNODEPRESOR.....	33
1.1.5.2.2. AISLADOS <i>DE N. caninum</i> .....	34
1.1.5.2.3. DOSIS.....	34
1.1.5.2.4. VÍA DE INOCULACIÓN Y ESTADIO PARASITARIO.....	35
1.1.5.3. RESPUESTA INMUNE.....	35
1.1.5.3.1. RESPUESTA INMUNE CELULAR.....	35
1.1.5.3.2. RESPUESTA INMUNE HUMORAL.....	36
1.1.5.5. SINTOMATOLOGÍA.....	35
1.1.5.6. LESIONES Y LOCALIZACIÓN DEL PARÁSITO.....	37

<b>1.2. ASPECTOS EVOLUTIVOS EN PROTOZOOS PARÁSITOS.....</b>	<b>38</b>
1.2.1. ASPECTOS EVOLUTIVOS BÁSICOS: DIVERSIDAD GENÉTICA, ADAPTACIÓN, SELECCIÓN NATURAL Y EFICACIA BIOLÓGICA.....	38
1.2.2. EL TRINQUETE DE MULLER Y SU INFLUENCIA EN LA TRANSMISIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS.....	41
1.2.3. EL MODELO TEÓRICO DE LENSKI Y TRAVISANO.....	44
1.2.4. MACRO Y MICROEVOLUCIÓN EN PARÁSITOS.....	45
1.2.5. LA TEORÍA CLONAL DE LOS PROTOZOOS PARÁSITOS.....	46
1.2.5.1. EL EJEMPLO DE <i>T. gondii</i> .....	49
1.2.6. VARIACIÓN FENOTÍPICA CLONAL EN PROTOZOOS PARÁSITOS.....	50
<b>2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.....</b>	<b>53</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>59</b>
<b>3.1. CULTIVOS CELULARES.....</b>	<b>61</b>
3.1.1. LÍNEAS CELULARES EMPLEADAS.....	61
3.1.2. MANTENIMIENTO DE LAS LÍNEAS CELULARES.....	61
3.1.3. CONSERVACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES.....	62
<b>3.2. CULTIVO DE TAQUIZOÍTOS DE <i>N. caninum</i>.....</b>	<b>63</b>
3.2.1. AISLADOS DE <i>N. caninum</i> .....	63
3.2.2. OBTENCIÓN DEL AISLADO NC-Mez.....	63
3.2.3. OBTENCIÓN DE TAQUIZOÍTOS <i>N. caninum</i> EN CULTIVO CELULAR.....	63
3.2.4. CONSERVACIÓN DE LOS AISLADOS.....	64
<b>3.3. DETERMINACIÓN DE LA EFICACIA BIOLÓGICA     (FITNESS) DE LOS AISLADOS.....</b>	<b>65</b>
3.3.1. RECUENTO DE TAQUIZOÍTOS: MEDIAS PROGRESIVAS.....	61
3.3.2. ESTIMACIÓN DEL COMPONENTE MALTUSIANO DEL FITNESS.....	65
<b>3.4. ANIMALES EXPERIMENTALES.....</b>	<b>66</b>
3.4.1. CARACTERÍSTICAS.....	66
3.4.2. INFECCIÓN EXPERIMENTAL.....	67
<b>3.5. ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS OBSERVACIONALES.....</b>	<b>67</b>
<b>3.6. NECROPSIA Y RECOGIDA DE MUESTRAS.....</b>	<b>68</b>
<b>3.7. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS.....</b>	<b>69</b>
3.7.1. FIJACIÓN E INCLUSIÓN.....	70
3.7.2. MICROTOMÍA Y TINCIÓN.....	70
3.7.3. GRADUACIÓN DE LAS LESIONES.....	70

3.8. <u>TÉCNICAS DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ADN</u> .....	71
3.8.1. EXTRACCIÓN DEL ADN.....	71
3.8.2. ANÁLISIS DEL "ADN TOTAL" EXTRAÍDO.....	72
3.8.2.1. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.....	72
3.8.2.2. CUANTIFICACIÓN DEL ADN TOTAL EXTRAÍDO.....	72
3.8.3. CUANTIFICACIÓN DE <i>N. caninum</i> POR PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL.....	73
3.8.3.1. DESARROLLO DE LA PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL.....	73
3.8.3.2. CURVAS PATRÓN.....	74
3.8.3.3. ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN DE LA PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL.....	75
3.8.4. MEDIDAS PARA EVITAR CONTAMINACIONES.....	76
3.9. <u>DETERMINACIÓN DE IgG SÉRICA ANTI-<i>N. caninum</i></u> .....	76
3.9.1. OBTENCIÓN DE ANTÍGENO PARA LA PRUEBA DE IFI.....	77
3.9.2. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.....	77
3.10. <u>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</u> .....	78
3.10.1. HOMOGENEIDAD DE DOS MUESTRAS INDEPENDIENTES.....	78
3.10.1.1. COMPARACIÓN DE DOS MEDIAS.....	78
3.10.1.2. COMPARACIÓN DE DOS VARIANZAS.....	79
3.10.2. HOMOGENEIDAD DE <i>K</i> MUESTRAS INDEPENDIENTES ( <i>K</i> > 2).....	79
3.10.3. REGRESIÓN LINEAL.....	79
3.10.4. MODELO LINEAL GENERAL.....	80
3.10.5. MODELO DE REGRESIÓN "BOOTSTRAP".....	81
3.10.6. PROGRAMAS INFORMÁTICOS.....	82
<b>4. DIVERSIDAD GENÉTICA Y VARIABILIDAD</b>	
<b>ADAPTATIVA <i>IN VITRO</i> DE <i>Neospora caninum</i></b> .....	83
4.1. <u>INTRODUCCIÓN</u> .....	85
4.2. <u>DISEÑO EXPERIMENTAL</u> .....	87
4.3. <u>RESULTADOS</u> .....	90
4.3.1. <i>FITNESS</i> DE LOS AISLADOS.....	90
4.3.2. VARIACIONES EN EL TIEMPO DEL <i>FITNESS</i> : ESTUDIO EVOLUTIVO.....	93
4.3.3. VARIACIONES INTRAESPECÍFICAS DEL <i>FITNESS</i> : ESTUDIO DE VARIABILIDAD <i>IN VITRO</i> .....	93
4.3.4. COMPETENCIA ENTRE AISLADOS.....	94
4.4. <u>DISCUSIÓN</u> .....	94

<b>5. DIVERSIDAD PATOGENICA DE <i>Neospora caninum</i> EN EL</b>	
<b>MODELO MURINO.....</b>	<b>101</b>
<b>5.1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>103</b>
<b>5.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>105</b>
<b>5.3. RESULTADOS.....</b>	<b>108</b>
5.3.1. MORTALIDAD Y MORBILIDAD.....	108
5.3.2. LESIONES.....	109
5.3.2.1. SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	110
5.3.2.2. CORAZÓN.....	113
5.3.2.3. PULMÓN.....	115
5.3.2.4. HÍGADO.....	117
5.3.2.5. RIÑÓN.....	119
5.3.2.6. BAZO.....	121
5.3.3. CARGA PARASITARIA.....	123
5.3.3.1. SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	123
5.3.3.2. CORAZÓN.....	124
5.3.3.3. PULMÓN.....	125
5.3.3.4. HÍGADO.....	127
5.3.4. CORRELACIÓN ENTRE LA INTENSIDAD	
DE LESIÓN Y LA CARGA PARASITARIA.....	128
5.3.5. DETERMINACIÓN DE LA IgG SÉRICA ANTI- <i>N. caninum</i> .....	129
5.3.6. COMPETENCIA ENTRE AISLADOS.....	130
<b>5.4. DISCUSIÓN.....</b>	<b>137</b>
<b>ANEXO I .....</b>	<b>151</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>155</b>
<b>7. RESUMEN.....</b>	<b>159</b>
<b>8. SUMMARY.....</b>	<b>165</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>171</b>

## LISTADO DE FIGURAS

- Figura 1.-** Consecuencias clínicas de la neosporosis bovina.
- Figura 2.-** La figura muestra la distribución inicial (superior) de una población asexual de individuos con 0, 1, 2, 3,.....k mutaciones deletéreas. Las dos figuras inferiores muestran la misma población después de que el trinquete haya chascado una, o dos, muescas.
- Figura 3.-** Posibilidades de variación en el tiempo de la media y la desviación estandar de un parámetro en estudio.
- Figura 4.-** Esquema del diseño experimental. En el inicio del experimento los aislados de *N. caninum* fueron transferidos desde la línea celular Vero a la línea Marc-145. En ese momento se creó el aislado NC-Mez. Se obtuvieron diez réplicas de cada aislado que se mantuvieron mediante pases seriados en la línea celular Marc-145 durante 19 semanas (aproximadamente 250 generaciones). El *fitness* de cada réplica se calculó al inicio y al final del experimento. Asimismo se representan los estudios realizados en el experimento.
- Figura 5.-** Medias y desviaciones estándar de los valores de *fitness* de las réplicas de los diferentes aislados de *N. caninum* estudiados en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$ .
- Figura 6.-** Representación gráfica del diseño experimental. El esquema de trabajo fue el mismo en los dos momentos ( $t = 0$  y  $t = 250$ ). En el grupo testigo se siguieron los mismos procedimientos que en los demás grupos.
- Figura 7.-** Lesiones en el SNC de un ratón inoculado con el aislado NC-Liverpool (Día 42;  $t = 250$ ): a) Meningitis no supurativa. HE. 10x; b) Manguito perivascular de células redondas. HE 40x.
- Figura 8.-** Lesiones en el SNC de un ratón inoculado con el aislado NC-Liverpool (Día 42;  $t = 250$ ): a) Granuloma. Reacción glial. HE 10x; Lesiones en el SNC del ratón inoculado con el aislado NC-Liverpool (Día 7;  $t = 0$ ): b) Reacción encefálica a la presencia de vacuolas parasitóforas de *N. caninum*. HE. 10x; c) Foco inflamatorio en la sustancia blanca con marcada gliosis asociada a la presencia de estadios de desarrollo del parásito. HE. 40x; d) Foco hemorrágico perivascular. HE. 40x.
- Figura 9.-** Evolución de la media aritmética de la intensidad de las lesiones en el SNC de los ratones inoculados con los distintos aislados de *N. caninum* en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$  de su pase por el cultivo celular.
- Figura 10.-** Lesiones en corazón de un ratón inoculado con el aislado NC-Liverpool (Día 7-  $t = 250$ ) a) Miocarditis linfocítica moderada. HE. 20x; b) Pericarditis linfocítica. HE. 20x.
- Figura 11.-** Evolución de la media aritmética de la intensidad de las lesiones en el corazón de los ratones inoculados con los distintos aislados de *N. caninum* en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$  de su pase por el cultivo celular.

- Figura 12.-** Lesiones en el pulmón de un ratón inoculado con el aislado NC-Liverpool (Día 6;  $t = 0$ ): a) Neumonía intersticial crónica. HE. 10x; b) Moderada infiltración linfocítica en los septos alveolares. HE. 20x. Lesiones en el pulmón de un ratón inoculado con el aislado NC-Liverpool (Día 7;  $t = 0$ ): c) Pulmón de "shock". HE. 10x; d) Pulmón de "shock". Marcado edema y hemorragia en luz alveolar. HE. 20x.
- Figura 13.-** Evolución de la media aritmética de la intensidad de las lesiones en el pulmón de los ratones inoculados con los distintos aislados de *N. caninum* en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$  de su pase por el cultivo celular.
- Figura 14.-** Lesiones en hígado de un ratón inoculado con el aislado NC-Liverpool (Día 7;  $t = 0$ ): Hepatitis crónica reactiva: a) HE. 20x b) HE. 40x. Lesiones en hígado de ratón inoculado con el aislado NC-Liverpool (Día 7;  $t = 250$ ): c) Microgranuloma. HE. 40x; d) Hematopoyesis extramedular. HE. 40x; Lesiones en hígado de un ratón inoculado con el aislado NC-Liverpool (Día 42;  $t = 250$ ): Actividad portal caracterizada por un discreto infiltrado de células redondas en el tejido conjuntivo periportal: e) HE. 20x; f) HE. 10x.
- Figura 15.-** Evolución de la media aritmética de la intensidad de las lesiones en el hígado de los ratones inoculados con los distintos aislados de *N. caninum* en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$  de su pase por el cultivo celular.
- Figura 16.-** Lesiones en riñón de un ratón inoculado con el aislado NC-Liverpool (Día 7;  $t = 0$ ): a) Glomerulonefritis membranoproliferativa. HE. 40x; b) Discreta nefritis intersticial. HE. 40x.
- Figura 17.-** Evolución de la media aritmética de la intensidad de las lesiones en el riñón de los ratones inoculados con los distintos aislados de *N. caninum* en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$  de su pase por el cultivo celular.
- Figura 18.-** Lesiones en bazo de un ratón inoculado con el aislado NC-SweB1 (Día 14;  $t = 0$ ): a) Hiperplasia folicular esplénica: HE. 10x; b) Marcada activación de la pulpa blanca, principalmente en la zona T. HE. 20x.
- Figura 19.-** Evolución de la media aritmética de la intensidad de las lesiones en el bazo de los ratones inoculados con los distintos aislados de *N. caninum* en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$  de su pase por el cultivo celular.
- Figura 20.-** Cinética del número de parásitos en el SNC de los ratones infectados con los distintos aislados de *N. caninum* en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$ . Los resultados están expresados como la media del logaritmo en base 10 del número de parásitos por  $\mu\text{g}$  de ADN del hospedador.
- Figura 21.-** Distribuciones obtenidas por "bootstrap" en el estudio de la cinética de carga parasitaria en SNC. En el eje de las abscisas están representados los valores del logaritmo de la carga parasitaria, y en el de las ordenadas el número de observaciones simuladas por el remuestreo.

- Figura 22.-** Cinética del número de parásitos en el corazón de los ratones infectados con los distintos aislados de *N. caninum* en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$ . Los resultados están expresados como la media del logaritmo en base 10 del número de parásitos por  $\mu\text{g}$  de ADN del hospedador.
- Figura 23.-** Cinética del número de parásitos en el pulmón de los ratones infectados con los distintos aislados de *N. caninum* en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$ . Los resultados están expresados como la media del logaritmo en base 10 del número de parásitos por  $\mu\text{g}$  de ADN del hospedador
- Figura 24.-** Distribuciones obtenidas por "bootstrap" en el estudio de la cinética de carga parasitaria en pulmón. En el eje de las abscisas están representados los valores del logaritmo de la carga parasitaria, y en el de las ordenadas el número de observaciones simuladas por el remuestreo.
- Figura 25.-** Cinética del número de parásitos en el hígado de los ratones infectados con los distintos aislados de *N. caninum* en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$ . Los resultados están expresados como la media del logaritmo en base 10 del número de parásitos por  $\mu\text{g}$  de ADN del hospedador.
- Figura 26.-** Recta de regresión entre la carga parasitaria y la intensidad de lesión en el SNC.
- Figura 27.-** Títulos de inmunoglobulinas séricas anti-*N. caninum* medidos por IFI en los ratones infectados con los diferentes aislados de *N. caninum* en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$ .
- Figura 28.-** Evolución de la media aritmética de la intensidad de las lesiones del SNC y corazón de los ratones infectados con el aislado NC-Mez en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$  del experimento.
- Figura 29.-** Evolución de la media aritmética de la intensidad de las lesiones del pulmón, hígado y riñón de los ratones infectados con el aislado NC-Mez en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$  del experimento.
- Figura 30.-** Evolución de la media aritmética de la intensidad de las lesiones del bazo de los ratones infectados con el aislado NC-Mez en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$  del experimento.
- Figura 31.-** Evolución de la media aritmética de la carga parasitaria en el SNC de los ratones infectados con el aislado NC-Mez en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$  del experimento.
- Figura 32.-** Evolución de la media aritmética de la carga parasitaria en el corazón, pulmón e hígado de los ratones infectados con el aislado NC-Mez en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$  del experimento.
- Figura 33.-** Títulos de inmunoglobulinas séricas anti-*N. caninum* medidos por IFI en los ratones infectados con el aislado NC-Mez en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$ . (\* $P < 0,05$ )



## LISTADO DE TABLAS

- Tabla 1.-** Aislados de *N. caninum*.
- Tabla 2.-** Resumen de factores estudiados en la infección por *N. caninum* en el modelo murino.
- Tabla 3.-** Programa de PCR utilizado para la cuantificación de *N. caninum* y del gen 28S ARNr del hospedador utilizando SYBR Green™.
- Tabla 4.-** Media del número de taquizoítos de *N. caninum* obtenidos en cada réplica de los diferentes aislados en el experimento  $t = 0$ .
- Tabla 5.-** Media del número de taquizoítos de *N. caninum* obtenidos en cada réplica de los diferentes aislados en el experimento  $t = 250$ .
- Tabla 6.-** Valor del *fitness* representado como la media y la desviación estándar de las diez réplicas los diferentes aislados de *N. caninum* estudiados en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$ .
- Tabla 7.-** Valores de la U de Mann-Whitney y de la F de Snedecor resultantes de comparar las medias y las desviaciones estándar del *fitness* de las poblaciones de cada aislado en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$ .
- Tabla 8.-** Valor de la H de Kruskal-Wallis resultante de comparar los *fitness* de las réplicas de cada aislado de *N. caninum* en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$ .
- Tabla 9.-** Mortalidad en los ratones inoculados con el aislado NC-Liverpool en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$ .
- Tabla 10.-** Mortalidad y sintomatología en los ratones inoculados con el aislado NC-Liverpool en  $t = 0$  y  $t = 250$ .
- Tabla 11.-** Comparación de la mortalidad y la sintomatología entre los ratones inoculados con el aislado NC-Mez en  $t = 0$  y  $t = 250$ . Se han graduado los síntomas en ++ (graves), + (moderados) y - (ausentes)



## ABREVIATURAS Y SIGLAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CPV	Variación fenotípica clonal
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
FBS	Suero fetal bovino
GLM	Modelo lineal general
HE	Hematoxilina & eosina
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IFN <sub>γ</sub>	Gamma interferón
Ig G	Inmunoglobulina G
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleuquina
i.p.	Intraperitoneal
KDa	Kilodalton
M <sub>0</sub>	Gran media
MEM	Medio mínimo esencial
μl	Microlitro
μm	Micrometro
ng	Nanogramo
nss-ARN-r	Subunidad menor del ARN ribosomal
OD	Densidad óptica
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
p.i.	Post infección
RAPD-PCR	Polimorfismos de amplificaciones aleatorias
S <sub>D</sub>	Desviación estándar
s.c.	Subcutáneo
SHI	Suero equino inactivado
SNC	Sistema nervioso central
TBE	Tampón tris borato
TGF <sub>β</sub>	Factor de crecimiento tumoral β
TNF <sub>α</sub>	Factor de necrosis tumoral α
v.o.	Vía oral



## **1. ANTECEDENTES**



## 1.1. Neospora caninum Y NEOSPOROSIS

### 1.1.1. INTRODUCCIÓN

Se denomina neosporosis a la enfermedad producida por protozoos del género *Neospora*. Esta parasitosis se diagnosticó por primera vez en Noruega, en 1984, por Bjerkas *et al.* (1984), los cuales describieron una encefalopatía mortal en perros, caracterizada por encefalomielitis y miositis asociadas a un parásito semejante a *Toxoplasma gondii*. En la actualidad, el proceso más relevante por sus repercusiones económicas es la neosporosis bovina, que cursa con aborto, mortalidad neonatal y nacimiento de terneros con sintomatología neuromuscular o clínicamente sanos, pero crónicamente infectados.

El género *Neospora* se describió por primera vez en 1988, incluyéndose una única especie en ese momento: *Neospora caninum* (Dubey *et al.*, 1988b). Ese mismo año se obtuvo el primer aislado del parásito a partir de muestras de origen canino (Dubey *et al.*, 1988a). Desde ese momento, comienzan a desarrollarse diversas pruebas diagnósticas como la inmunofluorescencia indirecta (IFI) en 1988, para la detección de anticuerpos en el suero frente a *N. caninum*, y la inmunohistoquímica (Lindsay & Dubey, 1989b) con objeto de detectar al parásito en los tejidos infectados. También comienzan a desarrollarse los primeros modelos experimentales de la enfermedad por Lindsay & Dubey (1989d, 1990c), que realizaron las primeras inoculaciones del parásito en ratones y ratas.

En relación con la importancia de la enfermedad en el ganado bovino, Thilsted & Dubey (1989) describieron, originalmente, a *N. caninum* como agente etiológico del aborto en esta especie doméstica. Posteriormente, Anderson *et al.* (1991) y Barr *et al.* (1991a), consideran a la neosporosis como la primera causa de aborto en el ganado lechero en California (EE.UU.). En 1992, se confirma experimentalmente, la transmisión vertical del parásito en la especie bovina (Dubey *et al.*, 1992). En este sentido, tuvo gran

relevancia para las investigaciones experimentales el hecho de que a pesar de intentarse desde 1988, no fue hasta 1993 cuando se consiguió el primer aislado de *N. caninum* a partir de tejidos infectados bovinos (Conrad *et al.*, 1993; Barr *et al.*, 1994a).

A partir de ese momento, los avances alcanzados en el conocimiento de la biología molecular del parásito y de sus mecanismos de patogenicidad, así como en el diagnóstico y epidemiología de la enfermedad, han sido especialmente significativos. Dichos avances han permitido un mejor conocimiento del ciclo biológico, incluyendo el hallazgo del perro como hospedador definitivo en el mismo (McAllister *et al.*, 1998). Este descubrimiento ha avivado, en los últimos años, la discusión acerca de la importancia relativa de las distintas vías de transmisión en la perpetuación de la enfermedad en el ganado bovino.

Un punto importante en la corta historia del género *Neospora*, fue la descripción de una segunda especie, la cual provocaba trastornos neurológicos en el caballo: *Neospora hughesi* (Marsh *et al.*, 1996 y 1998). Posteriormente, diversos autores pusieron en evidencia las diferencias ultraestructurales, antigénicas, genéticas y de patogenicidad existentes entre esta nueva especie y *N. caninum* (Marsh *et al.*, 1998).

Hoy en día, la neosporosis bovina está considerada una enfermedad parasitaria de distribución cosmopolita y una de las causas más frecuentes de fallo reproductivo en las principales zonas productoras del mundo (Dubey & Lindsay, 1996; Dubey, 1999 a y b, Dubey, 2003).

### 1.1.2. *Neospora caninum*

#### 1.1.2.1. Taxonomía

*N. caninum* se incluye dentro del phylum Apicomplexa, clase Sporozoea, subclase Coccidia, orden Eucoccidia, suborden Eimeriina y familia Sarcocystidae, junto con los géneros *Toxoplasma*, *Sarcocystis*, *Hammondia* y *Besnoitia* (Dubey & Lindsay, 1996). Los

integrantes de la familia Sarcocystidae se caracterizan por tener ciclos biológicos heteroxenos y formar quistes en el hospedador intermediario. Como tales actúan diferentes especies de herbívoros y omnívoros, y como hospedadores definitivos fundamentalmente, diferentes especies de carnívoros.

La situación taxonómica de *N. caninum* ha sido cuestionada desde su descripción, siendo objeto de importantes controversias. Estudios filogenéticos basados en el análisis de la secuencia de la subunidad menor del ARN ribosomal (nss-ARNr), mostraron un elevado grado de homología entre *N. caninum* y *T. gondii*, sugiriendo que los dos organismos podrían pertenecer al mismo género (Holmdahl *et al.*, 1994). Sin embargo, cuando se investigaron los genomas de *Neospora*, de *Toxoplasma* y de *Sarcocystis* mediante técnicas de RAPD-PCR se encontraron diferencias significativas (Guo & Jonson, 1995). Otros estudios genéticos han corroborado el hecho que *N. caninum* y *H. heydorni* son especies diferentes (Ellis *et al.*, 1999a; Mugridge *et al.*, 1999; Mugridge *et al.*, 2000). Desde el punto de vista biológico, son notables las diferencias en cuanto a la composición antigénica y al ciclo biológico. El empleo de pruebas diagnósticas serológicas específicas ha permitido diferenciar a *N. caninum* de otras especies gracias a su diferente composición antigénica. Por otra parte, el perro es el hospedador definitivo de *N. caninum* y *H. heydorni*, mientras que el gato es el hospedador definitivo de *T. gondii* y *H. hammondi*. También destacan las diferencias ultraestructurales existentes entre estas especies, tanto en los quistes tisulares como en los taquizoítos. Los quistes tisulares de *N. caninum* presentan una pared quística más gruesa que los de *T. gondii* y *H. heydorni* (Speer *et al.*, 1999). Así mismo, la presencia, localización y el número de determinadas organelas en el citoplasma de los taquizoítos difieren en los tres géneros mencionados (Speer & Dubey 1989; Dubey *et al.*, 2002b). Últimamente se ha cuestionado de nuevo la existencia del género *Neospora* (Mehlhorn & Heydorn 2000; Heydorn & Mehlhorn 2002 a y b), aunque también algunas publicaciones recientes demuestran la diferenciación biológica, inmunológica, morfológica y molecular de *N. caninum* y *H. heydorni* (Dubey *et al.*, 2002 a y b).

### 1.1.2.2. Morfología

En el ciclo biológico de *N. caninum* se han reconocido tres estadios diferentes: los taquizoítos, los quistes tisulares con bradizoítos en su interior y los ooquistes. Los taquizoítos tienen un tamaño que oscila entre 3-7  $\mu\text{m}$  de longitud y 1-5  $\mu\text{m}$  de anchura y una morfología ovoide, globular o lunar, dependiendo de la etapa de división en la que se encuentren (Dubey & Lindsay, 1996). Ultraestructuralmente, los taquizoítos derivados de cultivo celular son idénticos a los observados *in vivo* (Speer & Dubey, 1989). Ambos poseen una película integrada por un plasmalema y una membrana interna, un complejo apical formado por 22 microtúbulos subpeliculares, dos anillos apicales, un conoide y un anillo polar; organelas secretoras, micronemas, 8-24 roptrias y gránulos densos; mitocondria, núcleo, nucleolo, aparato de Golgi, ribosomas, polisomas, gránulos de amilopectina, cuerpos lipídicos, vesículas, retículo endoplásmico liso y rugoso, y un poro posterior (Speer & Dubey, 1989; Lindsay *et al.*, 1993; Speer *et al.*, 1999).

Los quistes tisulares miden aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  de diámetro, tienen forma redondeada u oval y pueden contener en su interior hasta 200 bradizoítos. La pared quística, con más de 4  $\mu\text{m}$  de espesor, está formada por dos membranas: la externa, una única membrana electrodensa, y la interna de mayor grosor, granular y con estructuras tubulares (Bjerkas & Dubey 1991; Dubey & Lindsay 1996). Los bradizoítos tienen aproximadamente 6-8  $\mu\text{m}$  de longitud por 1-1,8  $\mu\text{m}$  de anchura y contienen las mismas organelas que los taquizoítos, aunque en los bradizoítos el número de roptrias es menor y tienen más gránulos de amilopectina (Speer & Dubey, 1989; Jardine, 1996).

Los ooquistes de *N. caninum* son morfológicamente similares a los de *T. gondii* y *H. heydorni*; tienen forma esférica o subesférica y su tamaño medio es de 11,7  $\mu\text{m}$  de longitud y 11,3  $\mu\text{m}$  de anchura. La pared del ooquiste es lisa, de 0,6-0,8  $\mu\text{m}$  de espesor y no contiene micropilo. En su interior se encuentran dos esporoquistes elipsoidales (8,4  $\mu\text{m}$  de longitud por 6,1  $\mu\text{m}$  de anchura), cuya pared tiene un grosor de 0,6-0,8  $\mu\text{m}$ , no presentando cuerpo de Stieda. A su vez, en el interior de cada esporoquiste se

encuentran 4 esporozoítos (6,5  $\mu\text{m}$  de longitud por 2,0  $\mu\text{m}$  de anchura), de forma alargada, y el cuerpo residual esporoquístico (Lindsay *et al.*, 1999c).

### 1.1.2.3. Cultivo *in vitro*

En las primeras investigaciones, los taquizoítos de *N. caninum* se cultivaron en monocitos y células endoteliales de arteria cardiopulmonar de bovinos (Lindsay & Dubey, 1989c). Más tarde, comenzaron a utilizarse para el cultivo *in vitro* de *Neospora*, líneas celulares estables: Vero, Marc-145, células de riñón bovino y fibroblastos de piel humana. Los taquizoítos pueden mantenerse indefinidamente mediante su pase continuado en cultivo celular sin pérdida aparente de su infectividad para el ratón, y mantienen su infectividad para los cultivos celulares tras su conservación en nitrógeno líquido (Dubey *et al.*, 2002a). Sin embargo, Long *et al.* (1998) encontraron que cuando los taquizoítos se cultivaban durante mucho tiempo, perdían patogenicidad en el modelo murino.

En los cultivos celulares se aprecia que, tras las primeras 24 horas, aparecen de 1 a 4 taquizoítos por célula. La invasión celular finaliza transcurridos 45-60 minutos postinfección (p.i.), comenzando entonces la primera endodiogenia, la cual genera en 8-10 horas la primera generación de taquizoítos (Hemphill *et al.*, 1996; Sundermann & Estridge, 1999). A las 36 horas p.i. se observan células infectadas con más de 10 taquizoítos incluidos en el interior de una vacuola parasitófora bien desarrollada. Seguidamente, el número de taquizoítos se multiplica exponencialmente pudiendo observarse más de 100 en una misma célula a los 4 días p.i.. El efecto citopático se observa a los 3 días p.i., apreciándose la destrucción de las células infectadas de la monocapa, y observando la destrucción del tapiz celular a los 4-6 días p.i..

El cultivo *in vitro* de los taquizoítos ha permitido el estudio de las características ultraestructurales del parásito y de los mecanismos de adhesión e invasión celular (Hemphill *et al.*, 1996). A partir de ellos se ha realizado su manipulación genética (Howe

*et al.*, 1997; Howe & Sibley, 1997; Beckers *et al.*, 1997), y los ensayos de eficacia farmacológica (Lindsay & Dubey, 1989a; Lindsay *et al.*, 1994; Lindsay *et al.*, 1996c, 1997). El cultivo celular también se ha empleado como fuente de antígeno en el desarrollo de pruebas diagnósticas, en el estudio de la conversión taquizoíto-bradizoíto y en la producción *in vitro* de bradizoítos. En este sentido, Weiss *et al.* (1999), describieron la formación de quistes tisulares con bradizoítos *in vitro*, aunque con bajo rendimiento. Finalmente, el cultivo *in vitro* ha permitido la realización de estudios comparativos entre diferentes aislados, en los que se ha investigado su razón de crecimiento (Shock *et al.*, 2001) y la interacción competitiva con *T. gondii* (Sundermann & Estridge, 1999).

#### 1.1.2.4. Biología

##### 1.1.2.4.1. Espectro de hospedadores

*N. caninum* tiene un amplio espectro de hospedadores domésticos y silvestres. La infección se ha descrito, en el perro, en el ganado bovino, en la cabra (Barr *et al.*, 1992; Dubey *et al.*, 1996), la oveja (Dubey & Lindsay, 1990), el caballo (Lindsay *et al.*, 1996b), el búfalo de agua (Dubey *et al.*, 1998b; Huong *et al.*, 1998; Guarino *et al.*, 2000), el camello (Hilali *et al.*, 1998) la liebre parda europea (Ezio *et al.*, 2003) y los camélidos sudamericanos (Chaves-Velázquez *et al.*, 2004). En animales silvestres, la infección ha sido detectada en el ciervo (Woods *et al.*, 1994; Dubey *et al.*, 1996), el antílope (Peters *et al.*, 2001b), el mapache (Lindsay *et al.*, 2001b), el coyote (Lindsay *et al.*, 1996a), el zorro (Jakubek *et al.*, 2001; Schares *et al.*, 2001; Almería *et al.*, 2002), el dingo (Barber *et al.*, 1997), felinos salvajes (Cheadle *et al.*, 1999) y el rinoceronte (Williams *et al.*, 2002). Por su parte, la infección experimental se ha llevado a cabo en el ratón (Lindsay & Dubey, 1989d, 1990 a y b), la rata (Lindsay & Dubey, 1990c), el gerbo (Dubey & Lindsay, 2000), el gato (Dubey & Lindsay, 1989a,b), el perro (Dubey & Lindsay, 1989c), el coyote (Lindsay *et al.*, 1996a), el zorro (Scharres *et al.*, 2002b), la vaca (Barr *et al.*, 1994a; Adrianarivo *et al.*, 2000, 2001), la oveja (McAllister *et al.*, 1996b; Buxton, 1998; Buxton

*et al.*, 1998; Buxton *et al.*, 2001; O'Handley *et al.*, 2002), la cabra (Lindsay *et al.*, 1995a), el cerdo (Jensen *et al.*, 1998), el macaco (Barr *et al.*, 1994b) y en diversas especies de pájaros (Baker *et al.*, 1995). El papel de cada una de estas especies hospedadoras en el ciclo biológico del parásito y su importancia en relación con la transmisión de la infección no es del todo conocida.

#### 1.1.2.4.2. Ciclo biológico

En la actualidad, los únicos hospedadores definitivos conocidos de *N. caninum* son el perro (McAllister *et al.*, 1998) y el coyote (Gondim *et al.*, 2004), que además pueden actuar como hospedadores intermediarios. McAllister *et al.* (1998) identificaron ooquistes sin esporular en heces de perros a los que se había alimentado con cerebros de ratones infectados con el parásito. Los ooquistes esporulan en el medio ambiente a las 24 horas (Lindsay *et al.*, 1999a). Más tarde, Lindsay *et al.* (2001a) confirmaron estos datos, comprobando la eliminación de ooquistes en perros que habían sido alimentados con tejidos que contenían quistes tisulares procedentes de ratones. A pesar de estos avances, muchos aspectos del ciclo biológico en relación con el hospedador definitivo se desconocen: los estadios enteroepiteliales del parásito antes de la formación del ooquiste, la excreción de ooquistes después de la ingestión de ooquistes esporulados, etc.

Los hospedadores intermediarios pueden infectarse mediante transmisión vertical, ya sea por vía transplacentaria (Dubey, 2003) ó por ingestión de calostro o leche (Uggla *et al.*, 1998; Davison *et al.*, 2001 a), o por transmisión horizontal, mediante la ingestión de alimentos o agua contaminados con ooquistes (De Marez *et al.*, 1999; Trees *et al.*, 2002), e incluso de placentas que contengan taquizoítos (Dijkstra *et al.*, 2001b). En el hospedador intermediario podemos encontrar los dos estadios asexuales del parásito: taquizoítos y quistes tisulares con bradizoítos. Los taquizoítos son los responsables de la fase aguda, multiplicándose intracelularmente por endodiogenia en muchos tipos de células, incluyendo macrófagos, neutrófilos, células neuronales,

hepatocitos, fibroblastos, miocitos y células endoteliales de los vasos sanguíneos y renales (Dubey *et al.*, 1988b; Bjerkas & Presthus, 1989; Speer & Dubey, 1989; Hemphill, 1999).

La división del parásito dentro de la célula hospedadora provoca la aparición de una vacuola parasitófora integrada por taquizoítos. Subsiguientes divisiones se siguen produciendo dentro de la vacuola, pudiendo albergar ésta más de 100 taquizoítos. Tras la rotura celular, los taquizoítos salen al medio extracelular y en pocas horas se iniciarán los mecanismos de adhesión e invasión de nuevas células diana (Hemphill *et al.*, 1996).

En la fase crónica, los taquizoítos se diferencian en bradizoítos formando los quistes tisulares, que se localizan principalmente en el tejido nervioso de diversas especies tanto en la infección natural como experimental (Dubey *et al.*, 1988b; Barr *et al.*, 1992; Kobayashi *et al.*, 2001), aunque también se han encontrado quistes tisulares en tejido muscular esquelético de perro y vaca con infecciones naturales (Peters *et al.*, 2001a). Los mecanismos implicados en la conversión del taquizoíto en bradizoíto, y por tanto en el paso de una fase de infección aguda a una crónica, no han sido aclarados si bien están siendo objeto de estudio en la actualidad. Los bradizoítos en el interior del quiste tisular conservan su capacidad infectante durante períodos de tiempo prolongados, al menos 1 año, en el cerebro de ratones con infección experimental (Lindsay & Dubey, 1990b).

#### 1.1.2.5. Diversidad intraespecífica

Desde que en 1988 se consiguiera el primer aislado de *N. caninum* (Dubey *et al.*, 1988a), han sido relativamente numerosos los aislados obtenidos (tabla 1). En principio, las variables que definen a cada aislado son: la localización geográfica, la especie origen de la muestra (canina y bovina fundamentalmente), el grado de desarrollo del animal (básicamente en bovinos: fetos, terneros o animal adulto) y el tipo de muestra (cerebro o SNC en la mayoría de casos). Basándose en estos parámetros, han sido numerosos los

trabajos que han estudiado las diferencias intraespecíficas de *N. caninum*, encontrando diferencias biológicas, antigénicas y genéticas (Lindsay & Dubey, 1989d, 1990b, Lindsay *et al.*, 1995b, McGuire *et al.*, 1997, Buxton *et al.*, 1998, Atkinson *et al.*, 1999, Shock *et al.*, 2001, Quinn *et al.*, 2002, Miller *et al.*, 2002).

Tabla 1.- Aislados de *N. caninum*.

DENOMINACIÓN	PAÍS	ORIGEN	MUESTRA	REFERENCIA
NC-1	EE.UU.	Canino	SNC	Dubey <i>et al.</i> , 1988a,b
NC-2	EE.UU.	Canino	SNC	Hay <i>et al.</i> , 1990
NC-3	EE.UU.	Canino	SNC	Cuddon <i>et al.</i> , 1992
BPA-3	EE.UU.	Ternero	SNC	Barr, 1993
BPA-4	EE.UU.	Ternero	SNC	Barr, 1993
NC-Liverpool	Reino Unido	Canino	Cerebro	Barber <i>et al.</i> , 1993
BPA-1	EE.UU.	Feto	Cerebro	Conrad <i>et al.</i> , 1993a
BPA-2	EE.UU.	Feto	Cerebro	Conrad <i>et al.</i> , 1993a
JPA-1	Japón	Ternero	Cerebro	Yamane <i>et al.</i> , 1996
NC-SweB1	Suecia	Ternero	Cerebro	Stenlund <i>et al.</i> , 1997
NC-4	EE.UU.	Canino	SNC	Dubey <i>et al.</i> , 1998a
NC-5	EE.UU.	Canino	SNC	Dubey <i>et al.</i> , 1998a
JPA-2	Japón	Ternero	SNC	Yamane <i>et al.</i> , 1998
JPA-4	Japón	Ternero	SNC	Yamane <i>et al.</i> , 1998
JPA-5	Japón	Ternero	SNC	Yamane <i>et al.</i> , 1998
BT2	Japón	Ternero	SNC	Yamane <i>et al.</i> , 1998
CN-1	EE.UU.	Canino	SNC	Marsh <i>et al.</i> , 1998
NC-LivB1	Reino Unido	Ternero	Cerebro	Davison <i>et al.</i> , 1999b
NC-PV1	Italia	Ternero	Cerebro	Magnino <i>et al.</i> , 1999
NC-PG1	Italia	Ternero	Cerebro	Fioretti <i>et al.</i> , 2000
NC-LivB2	Reino Unido	Feto	Cerebro	Trees & Williams, 2000
NC-Beef	EE.UU.	Ternero	Cerebro	McAllister <i>et al.</i> , 2000
KBA-1	Corea	Ternero	Cerebro	Kim <i>et al.</i> , 2000
KBA-2	Corea	Feto	Cerebro	Kim <i>et al.</i> , 2000
NC-GER1	Alemania	Canino	SNC	Peters <i>et al.</i> , 2000
BT-3	Japón	Vaca	Cerebro	Sawada <i>et al.</i> , 2000
NC-Bahia	Brasil	Canino	Cerebro	Gondim <i>et al.</i> , 2001
NC-Porto1	Portugal	Feto	Cerebro	Canada <i>et al.</i> , 2002
NC6-Argentina	Argentina	Canino	Heces	Basso <i>et al.</i> , 2001
NC7-Japón	Japón	Oveja	Cerebro	Koyama <i>et al.</i> , 2001
NC-Nowra	Australia	Ternero	Cerebro	Miller <i>et al.</i> , 2002
Nc-Illinois	EE.UU.	Ternero	Cerebro	Gondim <i>et al.</i> , 2002
BNC-PR1	Brasil	Ternero	Cerebro	Locatelli-Dittrich <i>et al.</i> , 2003

La mayoría de trabajos de diversidad intraespecífica patogénica de *N. caninum* han usado el modelo murino no gestante. En 1990b, Lindsay & Dubey compararon en este modelo la patogenicidad de NC-1 y NC-2 en un modelo murino; más tarde Lindsay *et al.* (1995b) lo hicieron entre NC-1 y NC-3. Estos aislados se obtuvieron en EE.UU. y presentaban un origen canino. En ambos estudios NC-1 se reveló como el aislado más patógeno. McGuire *et al.* (1997), al intentar obtener un protocolo de producción de quistes tisulares en ratón, observaron que NC-2 provocaba mayor número de muertes en ratones que NC-Liverpool. En este caso aunque los dos aislados presentaban el mismo origen -canino-, habían sido obtenidos en continentes diferentes. Mas tarde, Atkinson *et al.* (1999) compararon las características biológicas de NC-Liverpool y NC-SweB1, aislados de origen canino y bovino respectivamente. Este trabajo reveló que la sintomatología y las lesiones eran más intensas en los ratones infectados con el aislado NC-Liverpool. Por último, Miller *et al.*, (2002) han realizado la caracterización del primer aislado australiano, comparando con NC-Liverpool sus características patogénicas en ratón. Los datos reflejan una mayor patogenicidad de NC-Liverpool.

El estudio realizado por Quinn *et al.* (2002), con los aislados NC-SweB1 y NC-Liverpool en un modelo murino gestante, determinó diferencias significativas a favor del primero cuando se estudió el número de fetos no viables/camada. Cuando se estudió la diversidad patogénica entre NC-1 y NC-Liverpool en el modelo ovino gestante, se observó que el primero provocó lesiones inflamatorias y necróticas más intensas en los fetos (Buxton *et al.*, 1998).

También se han detectado diferencias genéticas entre diversos aislados de *N. caninum*. Atkinson *et al.* (1999), encontraron diferencias en el genoma de NC-SweB1 y NC-Liverpool utilizando técnicas de PCR-RAPD. Cuando se utilizó un mayor número de marcadores genéticos y de aislados (NC-Liverpool, NC-1, BPA-1, NC-SweB1, JPA-2 y NC-LivB1) con esta misma técnica, también se obtuvieron resultados que revelaron un distanciamiento genético intraespecífico (Shock *et al.*, 2001).

Otro de los parámetros utilizados para comprobar la variabilidad ha sido la razón de crecimiento en cultivo celular. A este respecto, los resultados de los estudios han sido controvertidos. Innes *et al.* (1995), detectaron que NC-1 presentaba una mayor razón de crecimiento en cultivo celular que NC-Liverpool. Sin embargo, cuando se comparó este mismo parámetro en 6 aislados, NC-Liverpool superó a los otros cinco, entre los que se incluía NC-1 (Shock *et al.*, 2001).

El comportamiento divergente de los aislados de *N. caninum* también se ha observado cuando comparamos el perfil antigénico de los aislados. Se detectaron perfiles antigénicos semejantes, pero no iguales, cuando se compararon mediante western-blot, los sueros de ratones infectados con antígeno de taquizoíta de los aislados NC-Nowra y NC-Liverpool (Miller *et al.*, 2002).

Los resultados de todos estos trabajos muestran la existencia de diferencias significativas de diverso tipo entre los aislados sujetos a estudio. Lo que parece claro es que dentro de la especie *N. caninum* existen aislados con comportamiento diferente, que, en principio, puede tener relación con su distinto origen geográfico o de especie hospedadora.

### 1.1.3. TRANSMISIÓN

Como ya se ha señalado, *N. caninum* es un protozoo Apicomplexa, estrechamente relacionado con *T. gondii* y que presenta grandes similitudes en su ciclo biológico y sus modos de transmisión. Aunque, como hemos visto, *N. caninum* tiene un amplio espectro de hospedadores, la gran importancia que tiene la neosporosis bovina ha sido causa de que la mayor parte de los estudios estén referidos a esta especie. Sin embargo, es probable que muchas de las conclusiones obtenidas en el ganado bovino sean extrapolables al resto de hospedadores intermediarios.

### 1.1.3.1. Transmisión vertical

La importancia de este modo de transmisión en la epidemiología de la neosporosis es dependiente de la especie animal. En este sentido, es un hecho admitido que la transmisión vertical vía transplacentaria es el principal modo de infección en el ganado bovino. La ausencia de variaciones en las tasas de prevalencia entre los diferentes grupos de edad y la detección de anticuerpos precalostrales frente a *N. caninum* en el suero de terneros nacidos de vacas seropositivas (Davison *et al.*, 1999a; Hietala & Thurmond, 1999), sugieren la idea de que la transmisión vertical vía transplacentaria juega un papel muy importante en la propagación y mantenimiento de la neosporosis bovina (Björkman *et al.*, 1996; Paré *et al.*, 1996; Anderson *et al.*, 1997; Schares *et al.*, 1998). Una vez adquirida la infección (*in utero* o desde el medio) las hembras permanecen infectadas, probablemente de por vida, y pueden transmitir la infección a su descendencia en distintas gestaciones, consecutivas o no, con porcentajes que oscilan entre el 50% y el 95% (Wouda *et al.*, 1998a; Davison *et al.*, 1999a; Pereira-Bueno *et al.*, 2000). La transmisión vertical vía transplacentaria se produce tanto en animales en los que no se observa patología abortiva como en aquellos que han abortado (Dubey & Lindsay, 1996), y se ha demostrado experimentalmente en el ganado bovino, en la oveja (Dubey & Lindsay, 1990; McAllister *et al.*, 1996a; Buxton *et al.*, 1998), la cabra (Lindsay *et al.*, 1995a), el perro (Dubey & Lindsay, 1989c; Cole *et al.*, 1995), el gato (Dubey & Lindsay, 1989a), el mono (Barr *et al.*, 1994b), el cerdo (Jensen *et al.*, 1998) y el ratón (Cole *et al.*, 1995). La existencia de la infección sólo en determinadas líneas familiares y la ausencia aparente de transmisión horizontal observadas en las explotaciones, indican que el parásito puede transmitirse desde las madres infectadas a la descendencia durante varias generaciones y que la infección puede mantenerse en las granjas, donde la reposición con ganado propio sea la norma, en ausencia de un hospedador definitivo.

Experimentalmente, se ha demostrado que la transmisión vertical en el ganado bovino, vía calostro o leche, durante el periodo neonatal es posible (Ugglá *et al.*, 1998; Davison *et al.*, 2001). Sin embargo, este tipo de transmisión vertical no ha sido

demostrado en la naturaleza y no parece tener grandes repercusiones desde el punto de vista epidemiológico.

En lo que se refiere a la transmisión de la infección mediante la transferencia de embriones, Baillargeon *et al.* (2001), observaron que la infección por *N. caninum* no se detectó en ninguno de los 70 fetos o terneros nacidos de vacas seronegativas, las cuales habían recibido embriones de vacas seropositivas, mientras que 5 de 6 terneros procedentes de embriones donados por madres seronegativas e implantados en madres seropositivas, resultaron estar infectados por el parásito. Landman *et al.* (2002) confirmaron este hecho y expusieron que la transferencia de embriones previene la transmisión del parásito de vacas donantes seropositivas a receptoras seronegativas.

Barber & Trees (1998), estudiaron en el perro la importancia relativa de los distintos modos de transmisión. Para ello, investigaron la seropositividad mediante IFI de perras naturalmente infectadas por *N. caninum*. Aunque en estudios retrospectivos obtuvieron un 52% de cachorros seropositivos cuando éstos provenían de perras seropositivas, en los estudios prospectivos se obtuvo únicamente un 3% de cachorros seropositivos nacidos de perras seropositivas. Los resultados finales determinaron que el 80% de los cachorros nacidos de perras seropositivas no nacieron infectados. Este estudio demuestra que la frecuencia de la transmisión vertical en perros naturalmente infectados por *N. caninum* es variable, pero en cualquier caso es demasiado baja para mantener por sí sola la infección en la naturaleza. Por lo tanto, otras formas de transmisión, que impliquen infección postnatal, han de estar presentes en esta especie.

#### 1.1.3.2. Transmisión horizontal

El descubrimiento del perro como hospedador definitivo de *N. caninum*, puso de manifiesto la posibilidad de transmisión horizontal de la infección, ya que este cánido elimina ooquistes con sus heces (McAllister *et al.*, 1998; Lindsay *et al.*, 1999a). Posteriormente, se demostró que los ooquistes son infectantes cuando se administran

experimentalmente por vía oral a terneros (De Marez *et al.*, 1999) y a vacas gestantes (Trees *et al.*, 2002). Así pues, la infección postnatal en los hospedadores intermediarios puede tener lugar por ingestión de ooquistes eliminados en las heces del hospedador definitivo que contaminarían el alimento (pastos, forrajes y piensos almacenados) y el agua de bebida. Existen evidencias seroepidemiológicas que apoyan la teoría de la infección postnatal. La presencia de seroconversión en rebaños bovinos, junto con la falta de asociación entre los resultados serológicos de la madre y de su descendencia sugieren la existencia de infección postnatal, en la cual podría estar implicado el perro (Paré *et al.*, 1996; Davison *et al.*, 1999a; Dijkstra *et al.*, 2001 a y b). Por otra parte, diversos estudios han sugerido la existencia de una relación entre la presentación de aborto epidémico por neosporosis bovina en algunos rebaños y una exposición puntual a una fuente de infección externa, señalando la presencia del perro en el rebaño como un factor de riesgo implicado en la presentación de brotes de aborto asociados a la infección por *N. caninum* (Bartels *et al.*, 1999; Wouda *et al.*, 1999b; McAllister *et al.*, 2000).

La transmisión venérea del parásito vía semen también podría ocurrir, ya que recientemente se ha descrito la presencia esporádica de ADN de *N. caninum* en semen fresco y congelado procedente de sementales bovinos con infección natural crónica (Ortega-Mora *et al.*, 2003). Por el momento, las implicaciones epidemiológicas de esta posible vía de transmisión en la epidemiología de la neosporosis bovina se desconocen.

Los quistes con bradizoítos presentes en el hospedador intermediario se encuentran principalmente en el tejido nervioso (cerebro y médula). En los quistes, los bradizoítos conservan su capacidad infectante durante períodos de tiempo prolongados (al menos 1 año en cerebro de ratones con infección experimental) y son resistentes a la acción del ácido clorhídrico y la pepsina lo que indica que el carnivorismo podría contribuir a la transmisión del parásito entre determinados hospedadores que participan en el ciclo biológico. Por otra parte, diversos autores han señalado la presencia de *N. caninum* en la placenta (Shivaprasad *et al.*, 1989; Barr *et al.*, 1994; Bergeron *et al.*,

2001a), aunque, únicamente, Dijkstra *et al.* (2002b), han demostrado, recientemente, que la ingestión de placenta infectada naturalmente por *N. caninum* podría ser un posible modo de transmisión entre la vaca y el perro. La infección postnatal en el perro, por lo tanto, tendría lugar por la ingestión de tejidos infectados (restos de animales muertos, placentas o fetos abortados). Sin embargo, los fetos bovinos infectados por *N. caninum* no parecen ser una vía de transmisión (Bergeron *et al.*, 2001b). Tampoco la leche o el calostro parecen ser fuentes de infección para el perro (Dijkstra *et al.*, 2001b, 2002b). Ello parece ser debido a la presencia de taquizoítos en lugar de quistes en estos productos. Además, dada la estrecha relación filogenética entre *N. caninum* y *T. gondii*, probablemente el perro desempeña en el ciclo biológico de *N. caninum* el mismo papel que el gato en el ciclo biológico de *T. gondii*. Por lo tanto, otra posible forma de transmisión para el perro sería la ingestión de ooquistes eliminados por el mismo o por otro perro.

Experimentalmente, se ha observado que la cantidad de ooquistes eliminada por los perros después de la ingestión de tejidos infectados es muy baja, y su presencia en perros naturalmente infectados, se ha descrito en pocas ocasiones (Basso *et al.*, 2001; Slapeta *et al.*, 2002; McGarry *et al.*, 2003). Sin embargo, la cantidad de ooquistes aumentó sensiblemente cuando los perros eran alimentados con tejidos de vacas experimentalmente infectadas (Gondim *et al.*, 2002). Por otra parte, apenas se conoce la frecuencia de eliminación de los ooquistes, aunque McGarry *et al.* (2003), señalaron que los perros podían eliminar ooquistes en más de una ocasión.

Recientemente, se ha descrito al coyote como hospedador definitivo (Gondim *et al.*, 2004). Sin embargo se desconoce la importancia de este hecho en la epidemiología de la neosporosis. También se ha investigado la eliminación de ooquistes en zorros, y sólo en uno de los estudios se ha logrado su identificación en heces (McGarry *et al.*, 2003). Por otro lado, se han detectado anticuerpos anti-*N. caninum* en el zorro (Schaes *et al.*, 2001; Almería *et al.*, 2002), el coyote (Lindsay *et al.*, 1996a) y el dingo (Barber *et al.*, 1997). En este sentido, hasta el 51% de 300 zorros alimentados con carne cruda de origen bovino, presentaban anticuerpos anti-*N. caninum* (Trees & Williams, 2000), sin

embargo son necesarios más estudios para determinar la importancia real de estas especies animales en la epidemiología de la neosporosis.

#### 1.1.4. PATOLOGÍA DE LA NEOSPOROSIS

##### 1.1.4.1. Patogenia

Las consecuencias más importantes de la infección por *N. caninum* en el ganado bovino son el aborto y el nacimiento de terneros congénitamente infectados. En general, cuando la infección se produce en los primeros momentos de la gestación se produce la muerte del feto y la reabsorción del mismo. Si se produce en la fase media de la gestación puede provocar aborto o el nacimiento de terneros congénitamente infectados que pueden tener sintomatología aparente. En los momentos finales de la gestación, la infección provocará el nacimiento de terneros infectados sin sintomatología aparente (Buxton *et al.*, 2002).

La patogenia en las hembras gestantes es compleja y depende de múltiples factores que en la actualidad no se conocen totalmente. Cualquiera que sea el origen de la infección en la madre (reactivación de una infección persistente o ingestión de ooquistes esporulados), es razonable asumir que tal infección originaría una parasitemia y una posterior invasión fetal. Sin embargo, las consecuencias de la infección fetal varían dependiendo de: el periodo de gestación en el que se produzca la infección, la magnitud y/o duración de la parasitemia, la eficacia de la respuesta inmune maternal y las características del aislado infectante. En la actualidad, la aportación individual de cada factor no ha sido todavía definida (Innes *et al.*, 2000; Innes *et al.*, 2002).

Los resultados obtenidos tanto en infecciones naturales (Barr *et al.*, 1991b) como en infecciones experimentales (Barr *et al.*, 1994a; Williams *et al.*, 2000, 2003) han demostrado que la transmisión del parásito al comienzo de la gestación es menos probable, y si se produce conduce a la muerte fetal seguida de una posterior

reabsorción. Ello es así porque la edad gestacional y por tanto el estado de inmunocompetencia del feto desempeñan un destacado papel en la patogenia de la neosporosis. Antes de los 100 días de gestación el feto es incapaz de reconocer ningún patógeno; entre los días 100 y 150 comienza a desarrollar una respuesta inmune; después del día 150 el feto es, progresivamente, más inmunocompetente (Osburn, 1988). Por tanto, debido a la inmadurez del sistema inmune, el feto es más vulnerable a la infección durante la fase tempranas de gestación, produciéndose la muerte fetal. En el segundo tercio de gestación el feto comienza a desarrollar su sistema inmunitario, sin embargo, la mayoría de los abortos diagnosticados por neosporosis ocurren entre los meses 5 y 7 de gestación. Ello es debido a que la respuesta inmune desarrollada es todavía rudimentaria e insuficiente para superar la infección (González *et al.*, 1999). La infección del feto durante este segundo tercio de gestación acabará con la muerte del feto, o con el nacimiento de animales congénitamente infectados. Según avanza la gestación, la posibilidad de transmisión aumenta. Consecuentemente, si la infección se produce en la última fase de la gestación ocurre el nacimiento de terneros congénitamente infectados (Buxton *et al.*, 2002; Dubey, 2003).

Por otra parte, los resultados obtenidos mediante la inoculación de taquizoítos de *N. caninum* de forma parenteral en el ganado bovino (Barr *et al.*, 1994a; Lundén *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 2000; Andrianarivo *et al.*, 2001; Innes *et al.*, 2001) han indicado que el feto se infecta aproximadamente en la cuarta semana después de la infección.

La presencia de *N. caninum* parece ser necesaria para que se produzca el aborto, aunque la infección por sí misma no sería suficiente, en todos los casos, para producirlo. Las causas que provocan la muerte del feto parecen ser multifactoriales y no se conocen con detalle. Dubey *et al.* (1990a), señalaron que la muerte del feto podría ser debida a una miocarditis, sin embargo otros autores postulan que las lesiones en el SNC serían las causantes (Barr *et al.*, 1990). Por el contrario, en muchas ocasiones no se han encontrado lesiones suficientemente importantes en los órganos vitales para provocarles la muerte, por lo que ésta parece depender también de otros factores. En este sentido, se ha

sugerido la importancia de la respuesta inmune celular desarrollada por las hembras gestantes, principalmente durante el periodo inicial de gestación. Durante la gestación se ponen en marcha una serie de mecanismos complejos que permiten que la madre gestante no rechace al feto. Sin embargo, este hecho puede favorecer la colonización de ciertos microorganismos como es el caso de *N. caninum*. En la placenta predomina la presencia de citoquinas "beneficiosas" como la interleuquina (IL) -10 y el factor de crecimiento tumoral (TGF) - $\beta$ , mientras que las citoquinas con un efecto potencialmente perjudicial, como la IL-2, IL-12, el IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$ , están restringidas. Cualquier respuesta inflamatoria que se origina como consecuencia de la invasión y multiplicación de los taquizoítos en las células de la placenta del feto y de la madre podría estimular el desarrollo de una respuesta inmune inapropiada y por tanto favorecer que se produzca el consiguiente aborto. En este sentido, Buxton *et al.* (2002) también han sugerido que el TNF- $\alpha$  podría jugar un papel determinante en el fracaso de la gestación.

Otros trabajos sugieren que la muerte fetal podría producirse directamente por la invasión parasitaria del placentoma y su consiguiente daño, interrumpiéndose el intercambio de oxígeno y nutrientes. En este sentido, se ha descrito la presencia de lesiones y del parásito en la placenta, tanto en vacas con infección natural (Shivaprasad *et al.*, 1989; Thilsted & Dubey 1989; Bergeron *et al.*, 2001a) como experimental (Barr *et al.*, 1994a; Innes *et al.*, 2001). En un estudio reciente, Maley *et al.* (2003) han señalado la importancia de la placenta en la patogenia de la infección y su papel al limitar o permitir la diseminación de la infección al feto.

Como ya se ha señalado, cuando la infección se produce en el último tercio de la gestación, por lo general, provoca el nacimiento de terneros infectados clínicamente sanos. La infección intrauterina induce, en fetos inmunocompetentes, la producción de títulos elevados de anticuerpos específicos precalostrales. Estos títulos pueden llegar a ser superiores a los títulos de anticuerpos de las madres. Hasta un 95% de éstos terneros infectados congénitamente pueden nacer clínicamente normales (Davison *et al.*, 1999a). En el caso de terneras seropositivas podrían también transmitir la infección a su

descendencia. A pesar de ser la infección subclínica la forma más frecuente de presentación de la neosporosis congénita, también se han descrito algunos casos de terneros infectados congénitamente que presentaron sintomatología nerviosa como consecuencia de la presencia de quistes tisulares en el SNC (Dubey & Lindsay, 1996).

La patogenia de la infección en los machos es un aspecto relevante y desconocido de la neosporosis, y que hasta el momento no ha sido abordado. Aparte de la eliminación del parásito vía semen (Ortega-Mora *et al.*, 2003), son pocos los factores conocidos. Estos estudios podrían aportar una valiosa información acerca de la importancia y las repercusiones clínicas de la infección en los machos y su posible participación en el ciclo biológico de *N. caninum*.

La gran importancia económica de la neosporosis bovina ha provocado que la mayoría de las investigaciones se hallan centrado en el ganado vacuno. También sucede así en el estudio de la patogenia, en donde las referencias a otras especies domésticas son prácticamente inexistentes.

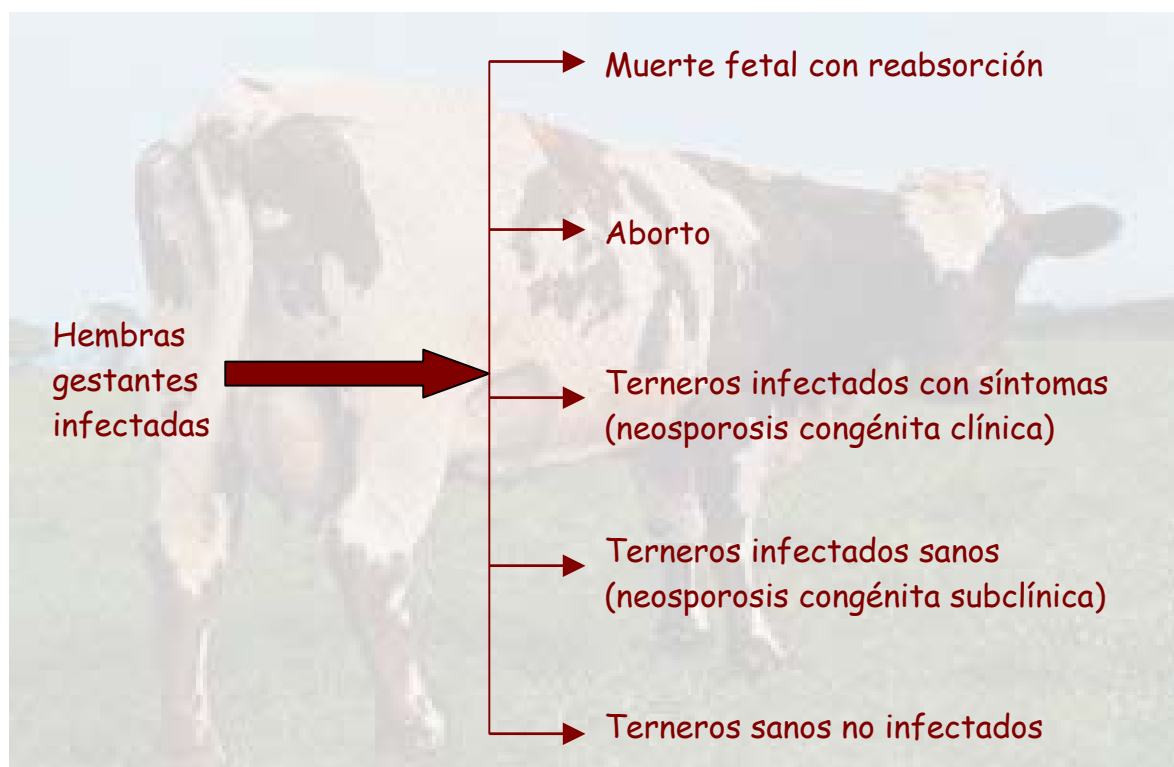
#### 1.1.4.2. Sintomatología

En el ganado bovino adulto, y en ausencia de sintomatología en el macho, el aborto es el único signo clínico observado en las hembras gestantes infectadas. En los rebaños seropositivos, los abortos pueden producirse en cualquier época del año y presentarse de forma esporádica, endémica o en forma de brotes epidémicos, pero sin síntomas previos de enfermedad. El aborto puede llegar a aparecer tanto en novillas como en vacas. La fertilidad después del aborto no está afectada y los animales salen en celo normalmente. Entre el 5 y el 6% de estos animales pueden abortar de nuevo, produciéndose la repetición del aborto durante la gestación siguiente o en otras posteriores (Anderson *et al.*, 1995; Wouda *et al.*, 1998b). Como se ha señalado previamente, el aborto repetido por neosporosis en el mismo animal se produce en muy pocas ocasiones (menos del 5%), sin

embargo, la transmisión repetida de la infección desde las madres infectadas a la descendencia es frecuente.

La infección fetal puede producirse en cualquier momento de la gestación, pero las consecuencias para el feto son más graves al comienzo de ésta (figura 1). En los primeros momentos de la gestación, la neosporosis puede ocasionar la muerte del embrión o del feto en el útero y su reabsorción. Generalmente, el aborto tiene lugar entre el 3<sup>er</sup> y el 9<sup>o</sup> mes de la gestación, siendo más frecuente en torno a los 4-7 meses (Anderson *et al.*, 1995; Moen *et al.*, 1998; Campero *et al.*, 1998; Sager *et al.*, 2001). La infección del feto no siempre provoca la muerte del mismo y, en ocasiones, se produce el nacimiento de terneros congénitamente infectados con sintomatología nerviosa, los cuales probablemente morirán dentro de las cuatro primeras semanas de vida (Dubey & Lindsay, 1996).

**Figura 1.** - Consecuencias clínicas de la neosporosis bovina.



En estos animales que nacen vivos, los primeros signos clínicos aparecen, frecuentemente, a los 4-5 días del parto o pueden retrasarse hasta 2 semanas. La casuística de la neosporosis congénita clínica es reducida. Estos animales suelen presentar problemas neuromusculares muy variables -desde incoordinación ligera hasta parálisis completa-, debilidad y dificultad para levantarse. Los miembros anteriores y/o posteriores están flexionados o hiperextendidos y el examen neurológico revela ataxia, disminución del reflejo patelar y pérdida de coordinación (Barr *et al.*, 1991b; Barr *et al.*, 1993). En ocasiones hay exoftalmia, posición asimétrica de los ojos y otras deformaciones asociadas con la lesión de las células nerviosas embrionarias (Bryan *et al.*, 1994). La infección congénita subclínica parece ser más frecuente, produciéndose el nacimiento de terneros clínicamente sanos aunque infectados *in utero* (Anderson *et al.*, 2000).

La mayor parte de los casos graves de neosporosis canina aparecen en animales jóvenes, principalmente cachorros congénitamente infectados. (Dubey, 1999b y 2003). Estos animales desarrollan paresia de los miembros posteriores, que evoluciona progresivamente hacia una parálisis. Los miembros anteriores están menos afectados que los posteriores que llegan a presentar hiperextensión rígida (Cuddon *et al.*, 1992; Barber & Trees, 1998). También pueden aparecer otros síntomas como la dificultad en la deglución, la parálisis mandibular (Hay *et al.*, 1990), la flaccidez muscular, la atrofia muscular e incluso el fallo cardíaco. Los perros con paresia posterior pueden llegar a vivir meses. La enfermedad puede ser localizada o generalizada, y cualquier tejido puede estar afectada, incluida la piel. La neosporosis puede afectar a perros de cualquier edad.

Las perras infectadas subclínicamente pueden transmitir el parásito a los fetos pudiendo nacer infectadas camadas sucesivas. Sin embargo, no se ha descrito la presencia de aborto en la infección natural del perro.

### 1.1.4.3. Lesiones

En el ganado bovino, las lesiones se localizan, principalmente, en el feto abortado y en la placenta. Los animales adultos, aunque infectados, no manifiestan alteraciones anatomopatológicas evidentes.

Como ya se ha señalado, el aborto es el signo clínico más característico de la neosporosis bovina. Los fetos pueden aparecer totalmente autolíticos o momificados, siendo esta última presentación relativamente común en los abortos causados por este parásito. En ocasiones, se observan, únicamente, restos del esqueleto óseo del feto ya que los otros tejidos pueden ser reabsorbidos en el útero. La placenta suele ser eliminada con el feto abortado, sin que exista retención. Alrededor de un 50% de los casos de neosporosis presentan alteraciones inespecíficas en la placenta, que se caracterizan por la presencia de un moderado edema y de pequeños focos blanquecinos de necrosis en los cotiledones.

Las lesiones más características se van a presentar en los fetos abortados. Las alteraciones macroscópicas son raras y suelen presentarse en la musculatura, tanto esquelética como cardíaca, en forma de pequeñas áreas blanquecinas que profundizan a la sección. Microscópicamente, las alteraciones que aparecen en el feto son altamente específicas de esta infección, siendo el estudio histopatológico de los fetos abortados uno de los principales métodos de diagnóstico. Estas lesiones, como ya se ha señalado, van a tener una naturaleza inflamatoria y degenerativa (focos de necrosis) y, virtualmente, pueden aparecer en cualquier órgano o tejido fetal, aunque por frecuencia de aparición destacan el SNC, el corazón, el músculo esquelético y el hígado. En otros órganos como el riñón, el pulmón, el páncreas o las glándulas adrenales también se han encontrado lesiones asociadas a esta parasitosis (Barr *et al.*, 1991b; Rogers *et al.*, 1993).

En el SNC, este parásito invade de forma activa neuronas y astrocitos, provocando trastornos neuromusculares graves por la destrucción de estas células

nerviosas. También están afectados los nervios craneales y espinales por lo que la transmisión del impulso nervioso está alterada (Mayhew *et al.*, 1991; Dubey & de Lahunta, 1993). La lesión más característica es una encefalomiелitis no purulenta de distribución multifocal. Ocasionalmente, se ha observado la formación de granulomas alrededor de los quistes tisulares y bradizoítos en degeneración (Dubey *et al.*, 1990; Mayhew *et al.*, 1991). Esporádicamente, pueden apreciarse mangitos perivasculares de células mononucleares alrededor de estas lesiones. En el corazón, la alteración típica es una miocarditis que puede variar desde focal a difusa (Wouda *et al.*, 1996). En el resto de órganos, y aunque en principio todos son susceptibles de presentar lesiones, éstas aparecen con menos frecuencia. El hígado presenta una hepatitis no purulenta (Barr *et al.*, 1990; Wouda *et al.*, 1996, 1997). Con menor frecuencia, pueden detectarse infiltrados inflamatorios semejantes a los descritos en otros órganos como el pulmón, el riñón, el páncreas o la glándula adrenal. En los ganglios linfáticos únicamente se observa una hiperplasia reactiva, con presencia de folículos linfoides prominentes.

*N. caninum* es detectado casi exclusivamente en las lesiones del SNC. Con mucha menos frecuencia aparece en el corazón. En el resto de los órganos afectados es más difícil encontrar al parásito. En muchas ocasiones, son necesarias secciones seriadas del tejido para poner de manifiesto al agente, aún en presencia de lesiones evidentes. Pueden aparecer taquizoítos asociados a las zonas de necrosis del SNC en número escaso y difícilmente identificables sin la ayuda de técnicas inmunohistoquímicas. Los quistes tisulares de *N. caninum* son menos frecuentes y aparecen en el tejido nervioso sin asociarse con la presencia de lesiones, aunque, excepcionalmente, pueden observarse en zonas de infiltrado inflamatorio. Recientemente, Peters *et al.* (2001a), han detectado quistes tisulares en tejido muscular de animales con infección natural. Las técnicas inmunohistoquímicas, utilizando anticuerpos específicos frente a *N. caninum*, son también de gran ayuda en la identificación de los quistes.

Las lesiones aparecidas en los terneros nacidos con neosporosis clínica congénita se van a localizar principalmente en el SNC. Macroscópicamente, pueden observarse

áreas de malacia, con o sin hemorragia, semejantes a las descritas en los fetos abortados. Estas lesiones se localizan sobre todo en la médula espinal, que también puede presentar malformaciones (Barr *et al.*, 1991b; Bryan *et al.*, 1994). Microscópicamente, se aprecia encefalomiелitis no purulenta, manguitos perivasculares, focos de gliosis, vacuolización del neuropilo y la degeneración walleriana de los axones con presencia de esferoides. Diferentes partes de la musculatura pueden presentar atrofia. En estos terneros no es extraño observar taquizoítos y quistes parasitarios en los tejidos, tanto en el encéfalo como en la médula espinal, asociados o no a zonas lesionadas.

Las lesiones encontradas en el perro durante la necropsia consisten en la aparición de decoloraciones rayadas grises amarillentas en los músculos atrofiados y dermatitis exudativa (Dubey, 1999). Histológicamente, en el SNC se aprecia encefalomiелitis granulomatosa multifocal parcialmente supurativa en asociación con necrosis focal, gliosis, proliferación vascular y manguitos perivasculares. Se han descrito quistes tisulares en cerebro, nervios craneales y médula espinal. Asimismo, se observan lesiones inflamatorias en la musculatura esquelética. También puede aparecer inflamación en el ojo (coroiditis del cuerpo ciliar), corazón, hígado, bazo, riñón y glándulas adrenales.

#### 1.1.5. LA NEOSPOROSIS EN EL MODELO EXPERIMENTAL MURINO

En la actualidad, el ratón es el modelo animal más usado para el estudio de la infección por *N. caninum* (tabla 2), aunque no se ha descrito la existencia de infecciones naturales en ratones u otros roedores. *N. caninum* es infectivo para el ratón, pudiendo observarse la presencia de mortalidad, sintomatología y lesiones directamente asociadas a la presencia del parásito. Diversos trabajos han demostrado que estos signos clínicos y lesiones son característicos de la enfermedad (Lindsay & Dubey 1989b, 1990; Lindsay *et al.*, 1995b; Atkinson *et al.*, 1999; Dreier *et al.*, 1999). En general, en la fase aguda de la

infección aparecen alteraciones, principalmente, en el pulmón y en el hígado (Baszler *et al.*, 1999b), mientras que en la fase crónica ocurren en el SNC (Lindsay *et al.*, 1995b).

Las manifestaciones de la neosporosis en el modelo murino son muy variables y dependen de gran variedad de factores (tabla 2). Estos factores que influyen en la infección no son independientes unos de otros, pero aún así podemos establecer una clasificación que los separe como dependientes del hospedador o del parásito. Dentro de los factores ligados al hospedador, destacan la estirpe de ratón, el tratamiento inmunodepresor o las inmunodeficiencias selectivas de origen genético. Entre los dependientes del parásito citaremos el aislado de *N. caninum*, la dosis infectante, la vía de inoculación y el estadio parasitario (Innes *et al.*, 2000).

#### 1.1.5.1. Modelo murino

El estudio de la patogenia de la neosporosis en modelos naturales presenta varios inconvenientes. El gran coste y tamaño de los animales y la ausencia de reactivos, han fomentado la búsqueda de otros modelos distintos del natural para los estudios patogénicos de la neosporosis. Por ello, el modelo murino ha surgido como una alternativa válida que soluciona estos inconvenientes.

Tabla 2. - Resumen de factores estudiados en la infección por *N. caninum* en el modelo murino.

Aislado	Dosis	Vía inoculación	Estirpe del ratón	Tratamiento	Tipo de estudio	Fase de estudio	Referencias
NC-1	10 <sup>5</sup>	s.c. <sup>1</sup>	Swiss W. <sup>2</sup>	2 mg MPA <sup>3</sup> 4 mg MPA <sup>3</sup>	Compara tratamiento	Aguda y Crónica	Lindsay & Dubey, 1989
NC-1 NC-2	2x10 <sup>5</sup>	s.c. <sup>1</sup> , i.p. <sup>4</sup> , oral	Swiss W. <sup>2</sup>	5 mg MPA <sup>3</sup>	Compara vías, y aislados	Aguda y Crónica	Lindsay & Dubey, 1990
NC-1 NC-3	2x10 <sup>5</sup>	s.c. <sup>1</sup>	BALB/c ICR	--	Compara estirpe y aislado	Aguda y Crónica	Lindsay <i>et al.</i> , 1995
NC-2 NC-Liverpool	4x10 <sup>5</sup> 8x10 <sup>5</sup>		ICR, BALB/c CBA/Ca	MPA <sup>3</sup>	Compara dosis, estirpe, trata- miento y aislado	Crónica (75-110d)	McGuire <i>et al.</i> , 1997
NC-1	2x10 <sup>5</sup> 2x10 <sup>6</sup> 2x10 <sup>7</sup>	i.p. <sup>4</sup>	BALB/c C57BL/6 B10.D2	--	Compara dosis, estirpe	Crónica (42)	Long <i>et al.</i> , 1998
NC-1 NC-1 <sub>ts</sub>	5x10 <sup>5</sup>	s.c. <sup>1</sup>	BALB/c ICR	--	Compara estirpe, aislado	Crónica (42-56d)	Lindsay <i>et al.</i> , 1999
NC-1 NC-1 <sub>ts4-8-12</sub>	2x10 <sup>5</sup>	s.c. <sup>1</sup>	ICR	2 mg MPA <sup>3</sup>	Compara trata- miento y aislado	Crónica (56d)	
NC-1	2x10 <sup>7</sup>	i.p. <sup>4</sup>	BALB/c	IFN-γ <sup>5</sup> IL-12 <sup>6</sup>	Compara tratamiento	3-6 semanas	Baszler <i>et al.</i> , 1999
JPA-1	2x10 <sup>5</sup>	i.p. <sup>4</sup>	BALB/c wt BALB/c nu	--	Compara la estirpe con nuevo aislado	Aguda y Crónica	Shibahara <i>et al.</i> , 1999
NC-1	10 <sup>5</sup>	i.p. <sup>4</sup>	C57BL/6 wt y deficiente células B	--	Compara estirpe	Aguda y Crónica (10-24-44 días)	Eperon <i>et al.</i> , 1999
NC-Liverpool NC-SweB1	10 <sup>5</sup> 10 <sup>6</sup> 10 <sup>7</sup>	s.c. <sup>1</sup>	BALB/c	--	Compara dosis y aislado	Aguda y Crónica	Atkinson <i>et al.</i> , 1999
NC-1 NC-1 <sub>ts8</sub> NC-1 <sub>ts8(C.C.)</sub> <sup>10</sup>	5x10 <sup>6</sup>	s.c. <sup>1</sup>	BALB/c SCID/Bg	--	Compara estirpe, aislado	Crónica (4, 6 y 8 semanas)	Dreier <i>et al.</i> , 1999
NC-1	2x10 <sup>5</sup>	s.c. <sup>1</sup>	BALB/c	NSO <sup>7</sup> NISV <sub>s</sub> <sup>8</sup> FCA <sup>9</sup>	Compara tratamiento	Crónica (6 semanas)	Baszler <i>et al.</i> , 2000
NC-1	10 <sup>5</sup> 5x10 <sup>5</sup> 10 <sup>6</sup> 5x10 <sup>6</sup> 10 <sup>7</sup>	i.p. <sup>4</sup>	C57BL/6	Toltrazuril Ponazuril	Compara dosis y tratamiento	Día 12	Gottstein <i>et al.</i> , 2001
NC-Norwa NC-Liverpool	10 <sup>6</sup>	s.c. <sup>1</sup>	BALB/c	--	Compara aislados	Aguda y Crónica	Miller <i>et al.</i> , 2002
NC-1	4x10 <sup>5</sup> 10 <sup>6</sup> 5x10 <sup>6</sup>	s.c. <sup>1</sup> , i.p. <sup>4</sup>	BALB/c ICR	MPA <sup>3</sup> , VLB <sup>11</sup> , Cy <sup>12</sup>	Compara dosis, estirpe y trata- miento	Crónica (8 semanas)	Collantes- Fernández <i>et al.</i> 2004

1: subcutánea; 2: Swiss White; 3: acetato de metil prednisolona; 4: intra-peritoneal; 5: gamma interferón; 6: interleuquina-12; 7: antígeno soluble de taquizoíta de *N. caninum*; 8: vesículas surfactantes no iónicas encapsuladas; 9: adyuvante completo de Freund; 10: variedad sensible a la temperatura y con "n" pases en cultivo celular; 11: vinblastina; 12: ciclofosfamida.

#### 1.1.5.1.1. Modelo murino no gestante

El modelo murino no gestante ha sido el primer y más usado modelo hasta la fecha. En él se han estudiado diversos parámetros con el fin de obtener una información reproducible de la enfermedad. Los objetivos de los estudios realizados con este modelo murino han sido múltiples: fijar los modelos nosológicos del parásito en el ratón; estudiar la eficacia terapéutica de fármacos y productos vacunales, etc. Entre los principales parámetros que se han estudiado cabe indicar los siguientes:

- ◆Mortalidad. Éste es uno de los parámetros más sencillos e importantes para medir patogenicidad. Con su estudio se han analizado diversos factores que influyen en la patogenia de la enfermedad: dosis y vía de inoculación del parásito, tratamientos en el ratón, etc.. (Lindsay & Dubey, 1989d y 1990b; Lindsay *et al.*, 1995b; McGuire *et al.*, 1997; Baszler *et al.*, 1999).
- ◆Sintomatología. Su estudio ha determinado dos grupos de signos clínicos en el modelo: los síntomas inespecíficos y los de origen nervioso. Se ha utilizado principalmente para estudiar la influencia de diversos factores: uso de diferentes aislados, diferentes estirpes murinas, etc.. (Lindsay & Dubey, 1989d y 1990b; Lindsay *et al.*, 1995b; Atkinson *et al.*, 1999; Gottstein *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 2002).
- ◆Lesiones. Como la sintomatología, la evaluación de la gravedad de las lesiones ha servido para estudiar la influencia de diversos factores: uso de diferentes vías y dosis de administración del parásito, la estirpe murina etc.. (Lindsay & Dubey, 1989d y 1990b; Lindsay *et al.*, 1995b; Mc Guire *et al.*, 1997; Long *et al.*, 1998; Baszler *et al.*, 2000; Gottstein *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 2002; Collantes-Fernández *et al.*, 2004).

♦ Respuesta inmune. Se ha investigado tanto la respuesta inmune celular como la humoral. Diversos estudios han analizado los niveles de citoquinas e IFN- $\gamma$  en ratones infectados (Baszler *et al.*, 1999; Eperon *et al.*, 1999). Otros han estudiado los perfiles de inmunoglobulinas mediante diferentes técnicas diagnósticas:

- IFI. La IFI detecta, fundamentalmente, anticuerpos que se unen a los antígenos localizados en la superficie celular del taquizoíto de *N. caninum*. Fue la primera técnica aplicada al diagnóstico serológico de la neosporosis y frecuentemente ha sido utilizada como prueba de referencia (Lindsay & Dubey, 1989d; Lindsay *et al.*, 1999b; Eperon *et al.*, 1999).

- ELISA. Las pruebas ELISA, presentan una sensibilidad y una especificidad elevadas, son sencillas, de rápida realización y de bajo coste económico, además carecen de la subjetividad de la IFI. Para mejorar la especificidad de las pruebas ELISA tradicionales, basadas en el uso de antígeno completo o extractos solubles de taquizoítos, se han utilizado taquizoítos enteros, antígenos englobados en complejos estimulantes de la inmunidad (iscoms), antígenos recombinantes y antígenos purificados por afinidad. Por otra parte, se han desarrollado varias pruebas ELISA de aidez que permiten distinguir entre las fases aguda y crónica de la neosporosis (Long *et al.*, 1998; Baszler *et al.*, 1999; Eperon *et al.*, 1999).

- Western Blot. La técnica de western blot se ha utilizado, fundamentalmente, para estudiar la composición antigénica de *N. caninum*, empleando sueros de diferentes especies infectadas. Entre los antígenos identificados destacan por su intensidad y frecuencia de reconocimiento varios antígenos inmunodominantes de 17, 29-30, 37 y 46 kDa. Su uso no ha estado tan extendido como las anteriores (Atkinson *et al.*, 1999; Baszler *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2002).

♦Distribución orgánica del parásito. Se han realizado estudios para detectar y cuantificar la presencia del parásito en distintos órganos diana. Para la detección del parásito se han utilizado las técnicas de inmunohistoquímica (IHC) (Shibahara *et al.*, 1999; Gottstein *et al.*, 1999) y la PCR (Eperon *et al.*, 1999; Gottstein *et al.*, 1999; Nishikawa *et al.*, 2001). Los estudios encaminados a conocer la carga parasitaria en órganos diana han utilizado las técnicas de inmunohistoquímica (Long *et al.*, 1998; Baszler *et al.*, 1999) y de PCR cuantitativa (Collantes-Fernández *et al.*, 2004).

- Inmunohistoquímica. Las técnicas inmunohistoquímicas permiten localizar e identificar al parásito en los cortes de tejido utilizando un suero policlonal o un anticuerpo monoclonal anti-*Neospora* (Lindsay & Dubey, 1989b). La IHC es una técnica poco sensible, debido al escaso número de parásitos en los tejidos afectados y a la distribución aleatoria de los mismos.

- PCR. Se han desarrollado varios métodos de PCR que amplifican el fragmento ITS1 (Payne & Ellis, 1996) o la secuencia del gen pNc5 (Kaufmann *et al.*, 1996) de *Neospora* con diferentes modificaciones, como las PCR anidadas o semianidadas, intentando con ello incrementar la sensibilidad y especificidad de la técnica. Las ventajas de esta técnica son su elevada especificidad y sensibilidad. Posteriormente se han descrito dos PCR cuantitativas específicas que mejoran el rendimiento de la anterior, pues determinan la cantidad de ADN parasitario por cantidad de tejido (Collantes-Fernández *et al.*, 2002a; Müller *et al.*, 2002).

#### 1.1.5.1.2. Modelo murino gestante

El modelo murino gestante se encuentra actualmente en desarrollo. No obstante, todos los resultados obtenidos hasta la fecha indican un alto grado de similitud con los obtenidos en el modelo bovino. La transmisión congénita de *N. caninum* en el ratón está en relación con el día de la gestación en el que la madre es infectada (Long *et al.*, 1996; Cole *et al.*, 1995; Liddell *et al.*, 1999). Cuando la infección se realiza con el aislado NC-1 en ratones BALB/c antes de la gestación o al principio de ésta (día 5), el parásito no se ha detectado ni en los tejidos del feto ni en la placenta en los días 13-19 de gestación (Long *et al.*, 1996). Por otro lado, en un modelo gestante con ratones no consanguíneos (estirpe Quackenbush) infectados con el aislado NC-Liverpool en el día 5 de gestación, la tasa de transmisión en el día 7 post-parto fue del 91% (Quinn *et al.*, 2002). De este modo, el período de tiempo transcurrido entre la infección y el sacrificio parece ser crucial para la multiplicación del parásito y el establecimiento de la infección. En ratonas BALB/c infectadas con NC-1 entre los días 8 y 12 de gestación y sacrificadas en días sucesivos, el parásito se ha detectado en placenta, músculo esquelético y cerebro del feto y, en algunos casos, con altas tasas de transmisión (Long *et al.*, 1996; Liddell *et al.*, 1999). Si la infección se realiza entre los días 13-15 de gestación, el parásito sólo se ha detectado por PCR en un número reducido de crías (Liddell *et al.*, 1999). La localización de *N. caninum* en las crías también varía en función de la edad; en los animales de 2-4 días de edad, el parásito se ha detectado en cerebro y pulmón, mientras que a los 7-23 días se detecta, únicamente, en cerebro (Liddell *et al.*, 1999)

La pérdida fetal en el modelo murino gestante es también dependiente del período de gestación en el que ocurra la infección. Así cuando se infectan ratonas BALB/c en el día 10 después de la cubrición, el número de ratones por camada fue significativamente menor que en los testigos. La infección en el día 5 de gestación con el aislado NC-1 originó una tasa de reabsorciones en el día 14 casi tres veces mayor que en las hembras no infectadas (33% *versus* 12%) (Long *et al.*, 1996). La infección de ratones Quackenbush el día 8 de gestación, provocó un 25% de fetos no viables por camada

cuando se usó NC-SweB1, y un 2,8% al utilizar NC-Liverpool. En el primer caso, el porcentaje fue significativamente mayor que en los testigos, no así en el segundo (Quinn *et al.*, 2002). Por otra parte, no se observaron pérdidas fetales en hembras infectadas al final de la gestación (Long *et al.*, 1996).

#### 1.1.5.2. Factores que influyen en el modelo murino

##### 1.1.5.2.1. Estirpe murina y tratamiento inmunosupresor

En el ratón se han descrito infecciones en estirpes consanguíneas o "inbred" (BALB/c, BALB/c *nu/nu*, CBA/CaA/J, B10D2 y C57BL/6) y estirpes no consanguíneas o "outbred" (Swiss Webster, ICR, CD-1), encontrándose grandes variaciones en la receptividad a la infección dependiendo de la estirpe utilizada.

En estudios de comparación de estirpes, las no consanguíneas siempre se han demostrado más resistentes que las consanguíneas (Lindsay *et al.*, 1995b y 1999b; McGuire *et al.*, 1997). Para provocar la enfermedad en las estirpes no consanguíneas se necesita una dosis superior o realizar algún tratamiento inmunodepresor en el ratón. Dependiendo de la dosis de corticoides administrada se puede reproducir la forma aguda o crónica de la enfermedad.

Las estirpes consanguíneas reproducen con mayor facilidad la enfermedad. Sin embargo, entre las estirpes consanguíneas o "inbred" también aparecen diferencias: las estirpes A/J y B10D2 han mostrado ser más resistentes (Khan *et al.*, 1997; Long *et al.*, 1998) que las estirpes BALB/c y CB57/BL que pueden desarrollar síntomas nerviosos cuando se les infecta con el aislado NC-1 (Lindsay *et al.*, 1995b; Long *et al.*, 1998).

Por otra parte, la respuesta inmune del hospedador es un factor importante en relación con la presentación de la enfermedad, tal y como se ha podido observar en los modelos murinos de estirpes con defectos inmunológicos. Los ratones BALB/c atímicos

(*nu/nu*) son muy receptivos a la infección por *N. caninum*, incluso con aislados poco patógenos. En la mayoría de las ocasiones, las infecciones cursan con síntomas y mortalidad. Las lesiones son mucho más graves y el parásito llega antes al cerebro cuando se comparan con su estirpe parental. Los ratones BALB/c-SCID-bg (deficientes en células T y B funcionales, y en un 50% de NK) fueron muy sensibles a la infección por *N. caninum*, muriendo en la fase aguda de la infección, mientras que sus parentales prácticamente no presentaron síntomas (Dreier *et al.*, 1999).

#### 1.1.5.2.2. Aislados de *N. caninum*

Los estudios realizados hasta el día de hoy han demostrado que, el uso de distintos aislados, provoca una diversidad de respuestas biológicas y patogénicas en la infección del ratón. Todos estos trabajos ya han sido revisados en el apartado 1.1.2.5. de los Antecedentes.

Por otra parte, Lindsay *et al.* (1999), compararon las diferencias de patogenicidad observadas entre el aislado NC-1 y diversas variedades sensibles a la temperatura del mismo aislado. Éstas resultaron ser menos patógenas que el aislado parental y comprobaron que la vacunación con ellas ejercía un efecto protector en el modelo murino. Cuando se comparó el efecto patógeno de las variedades sensibles a la temperatura con o sin pases continuados por cultivo celular no se obtuvo ninguna diferencia (Dreier *et al.*, 1999).

#### 1.1.5.2.3. Dosis

El desarrollo de la infección por *N. caninum* en el modelo murino ha mostrado tener un comportamiento dependiente de la dosis del parásito. En este sentido, Long *et al.* (1998) observaron una asociación evidente entre dosis elevadas de taquizoítos y un incremento en el número de lesiones, carga parasitaria en cerebro, presencia de

síntomas y mortalidad. Estos datos han sido corroborado en varios estudios (Gottstein *et al.*, 2001; Eperon *et al.*, 1999).

#### 1.1.5.2.4. Vía de inoculación y estadio parasitario

Las infecciones experimentales llevadas a cabo en el modelo murino se han realizado mediante la inoculación de taquizoítos por vía i.p., s.c. o v.o., aunque hasta el momento las vías más utilizadas han sido las dos primeras. Lindsay & Dubey (1990b), observaron que los ratones infectados con taquizoítos por vía i.p. morían antes que los inoculados s.c. o v.o.. Por otra parte, Atkinson *et al.* (1999) describieron que los ratones inoculados i.p. no desarrollaron signos clínicos de la enfermedad ni lesiones en el cerebro. En un estudio reciente con el modelo de ratona gestante de la infección por *N. caninum* también se describió que las lesiones en el cerebro fueron más graves en los ratones inoculados por vía s.c. (Quinn *et al.*, 2002).

La patogenia de la infección tras la inoculación con bradizoítos obtenidos de quistes tisulares e inoculados por vía s.c. o v.o. también ha sido estudiada, encontrándose resultados parecidos a las infecciones con taquizoítos (Lindsay & Dubey, 1990b).

Los ratones han demostrado ser muy poco sensibles a las infecciones con ooquistes de *N. caninum* por v.o. (Lindsay *et al.*, 1999), sin embargo los gerbos son altamente receptivos (Dubey & Lindsay, 2000).

#### 1.1.5.3. Respuesta inmune

##### 1.1.5.3.1. Respuesta inmune celular

En la actualidad el ratón es el modelo animal más utilizado para el estudio de la respuesta inmune producida en el curso de la infección por *N. caninum* en el hospedador. En este sentido, el desarrollo de modelos murinos con inmunodeficiencias selectivas de

origen genético ha sido de gran ayuda en el estudio de inmunidad celular frente a la infección.

Durante la infección, se activan diferentes componentes de la inmunidad celular innata como macrófagos, células NK y células dendríticas, las cuales responden liberando citoquinas del tipo IL-12 e IFN- $\gamma$  que, junto con los linfocitos CD4+ y CD8+, intervienen en la regulación de la respuesta celular Th1/Th2, que es crucial en la respuesta protectora desarrollada frente al parásito (Kasper & Khan, 1998; Nishikawa *et al.*, 2002).

Diversos estudios han señalado el papel del IFN- $\gamma$  e IL-12 en la resistencia frente al parásito durante la fase aguda de la infección (Khan *et al.*, 1997; Dubey *et al.*, 1998a; Baszler *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 2000; Ritter *et al.*, 2002). Las poblaciones de linfocitos T, CD4+ y CD8+ juegan un papel importante en la prevención de la infección por *N. caninum* en las fases más avanzadas (Nishikawa *et al.*, 2002).

#### 1.1.5.3.2. Respuesta inmune humoral

La respuesta humoral en el modelo murino parece ser importante en el desarrollo de protección frente a la infección por *N. caninum*. Así los ratones deficientes en células B y, por tanto, sin la capacidad de sintetizar anticuerpos, fueron más receptivos a la infección que sus parentales (Eperon *et al.*, 1999). En ratones BALB/c y C57BL/6 se han detectado mayores niveles de Ig G2a que de Ig G1 en las fases iniciales de la infección pero posteriormente se produjeron niveles parecidos de ambos isotipos (Long *et al.*, 1998).

#### 1.1.5.5. Sintomatología

La aparición de signos clínicos en los ratones infectados con *N. caninum* está influenciada por una gran cantidad factores que hemos enunciado anteriormente. Sin

embargo, cuando la enfermedad se desarrolla, lo hace con un perfil común más o menos definido. La enfermedad presenta dos etapas bien diferenciadas.

En los primeros días tras la infección, los ratones permanecen inmóviles, con el raquis encorvado, muestran dificultad respiratoria y erizamiento del pelo, debido posiblemente a un estado febril. Cuando la infección es muy grave, mueren en esta fase. En la fase crónica (a partir de la segunda semana p.i.) los ratones añaden a la sintomatología ya expuesta, los signos nerviosos, con debilidad y dificultad para el movimiento que va desde la debilidad en el tercio posterior hasta su parálisis. También presentan torneo, ataxia y temblor de cabeza. Acompañando a todos estos síntomas se observa pérdida de peso y apatía (Lindsay & Dubey, 1989d, 1990b; Lindsay *et al.*, 1995b; McGuire *et al.*, 1997; Atkinson *et al.*, 1999; Eperon *et al.*, 1999; Gottstein *et al.*, 2001).

#### 1.1.5.6. Lesiones y localización del parásito

Las lesiones observadas en las infecciones experimentales en el ratón son muy similares a las mostradas en infecciones naturales en las especies hospedadoras clásicas. En la fase aguda de la infección las lesiones se observan, principalmente, en pulmón e hígado (Baszler *et al.*, 1999), mientras que en la fase crónica acontecen en el SNC (Lindsay *et al.*, 1995b). En el cerebro es típica una meningoencefalitis no supurativa multifocal de distribución variable con focos de necrosis y presencia de macrófagos, células de Gitter y linfocitos, gliosis y manguitos perivasculares. En el sistema nervioso periférico se ha citado la presencia de ganglioradiculoneuritis incluyendo degeneración axonal de los nervios espinales, necrosis focal de las neuronas y células Schwann y desmineralización. En el pulmón es característica la presencia de una neumonía intersticial con pequeños nódulos de células linfoides a veces asociados a los vasos sanguíneos. En el hígado se ha descrito una hepatitis no supurativa con necrosis multifocal de los hepatocitos e infiltración de linfocitos. En el páncreas, las lesiones que se han citado son una necrosis difusa de las células acinares e infiltración de células inflamatorias en el tejido conectivo pancreático. También se han observado, aunque con

menos frecuencia, lesiones en las glándulas adrenales, músculo esquelético y útero (Lindsay & Dubey, 1989d, 1990b; Lindsay *et al.*, 1995b; Atkinson *et al.*, 1999; Dreier *et al.*, 1999; Shibahara *et al.*, 1999).

La presencia del parásito en los diferentes órganos se ha detectado mediante inmunohistoquímica y PCR. En las etapas iniciales de la infección, el parásito se ha localizado en varios órganos, principalmente en pulmón, y en la fase crónica en cerebro. En ratones BALB/c inoculados con  $10^6$  taquizoítos del aislado NC-1, se detectó ADN del parásito en corazón, hígado, pulmón, riñón, bazo y cerebro desde el día 4 al 8 p.i.. El pulmón y el cerebro también fueron positivos hasta el último día del estudio (día 10 p.i.) (Nishikawa *et al.*, 2001). Mediante inmunohistoquímica, los taquizoítos también se han visualizado, ocasionalmente, en otros órganos como en estómago, oviducto, músculo esquelético, páncreas, diafragma, etc. (Lindsay & Dubey, 1989d, 1990b; Shibahara *et al.*, 1999). En cerebro, la presencia de *N. caninum* se ha podido detectar hasta el día 463 p.i. (Dubey & Lindsay, 1996). La observación de quistes tisulares en el cerebro de ratones infectados experimentalmente es poco frecuente, describiéndose su presencia a partir de la tercera semana p.i. (Lindsay & Dubey, 1989d). A pesar de ello el modelo murino se ha utilizado para la producción de quistes tisulares (McGuire *et al.*, 1997).

## 1.2. ASPECTOS EVOLUTIVOS EN PROTOZOOS PARÁSITOS

### 1.2.1. ASPECTOS EVOLUTIVOS BÁSICOS: DIVERSIDAD GENÉTICA, ADAPTACIÓN, SELECCIÓN NATURAL Y EFICACIA BIOLÓGICA

Entre todas las teorías de la evolución, la hipótesis neodarwinista se asienta sobre tres conceptos fundamentales: la variabilidad genética, la adaptación y la selección. Para que una población de un organismo determinado pueda evolucionar es indispensable, en primer lugar, que existan diferencias entre los individuos que la componen, bien sea por rasgos morfológicos, fisiológicos o de comportamiento. Además, los genes deben de ser, al menos en parte, responsables de estas diferencias, con el

objeto de garantizar la transmisión de una generación a la siguiente. En segundo lugar, algunas de esas variantes deben estar mejor adaptadas que otras, en el sentido de resolver más eficientemente el problema planteado por una situación ambiental concreta. Por último, debe ocurrir que aquellas variantes que estén mejor adaptadas contribuyan con más descendientes a las futuras generaciones. Esta teoría propone, como mecanismo único de evolución, la selección natural (Mayr, 1963; López-Fanjul & Toro, 1987).

Así cuando las frecuencias alélicas cambian en una población como resultado de un progreso en la eficiencia reproductiva para la población, decimos que ha ocurrido selección natural (Crow & Kimura, 1970; Spies, 1989). Los factores que afectan a las frecuencias alélicas en las poblaciones son: la mutación, la migración, la selección natural, la deriva genética y el apareamiento no aleatorio.

Si se acepta que la evolución ha ocurrido por acción de la selección natural, de ello se deduce, lógicamente, que tanto las estructuras morfológicas como las pautas de comportamiento puedan interpretarse con referencia a su contribución a la supervivencia y a la reproducción. El estudio empírico de la ADAPTACIÓN debe hacerse atendiendo a criterios de optimización y, para ello, se considera aisladamente una determinada faceta de un organismo como un problema que se pretende que tenga una solución óptima. Una vez obtenida dicha solución se investiga si ésta es la adaptada por la especie objeto de estudio y, en caso positivo, se acepta su naturaleza adaptadora (Dobzhansky, 1955; López-Fanjul & Toro, 1987; Klug & Cummings, 1999)

Un aspecto importante para cualquier proceso evolutivo es la presencia de VARIABILIDAD GENÉTICA. Así, las distintas variantes de un mismo gen pueden conferir diferentes grados de adaptación a sus portadores y ello puede traducirse en diferencias en eficacia. Ello equivaldría a postular la existencia de una asociación positiva entre eficacia y adaptación, de manera que una variante que llevara consigo una mayor adaptación implicaría, globalmente, una mayor eficacia y, en consecuencia, estaría

favorecida por la selección natural. Por otra parte, es imprescindible que tanto eficacia como adaptación presenten un cierto componente hereditario en su variación, para que la acción selectiva adaptadora pueda prolongarse a las generaciones futuras. Por consiguiente, la condición necesaria y suficiente para que la selección natural actúe de forma continuada, se reduce a la existencia de variabilidad genética y, para que esta tenga consecuencias adaptadoras, esa condición se convierte en la exigencia de correlación genética, generalmente positiva, entre eficacia y adaptación. Ello implica, desde luego, el que ambos rasgos manifiesten cierta variación fenotípica en las poblaciones y, al mismo tiempo, el que una fracción de ésta pueda atribuirse a causas genéticas (Fisher, 1930; López-Fanjul & Toro, 1987; Mettler *et al.*, 1988)

En lenguaje estadístico, la SELECCIÓN podría definirse como la supervivencia o reproducción diferencial de entidades replicadoras, lo cual equivale a decir que éstas últimas difieren en eficacia biológica. Esta noción de eficacia biológica (*FITNESS*), se define como la contribución de descendencia a la generación siguiente (Gould, 1982; López-Fanjul & Toro, 1987). La noción neodarwiniana de esta eficacia atribuye las diferencias en las mismas a los distintos genotipos y, por reducción, a los que genes que los componen, redefiniendo la selección natural como la reproducción natural de unos y otros. Así, definimos el *fitness* darwiniano como la ganancia neta de la descendencia sobre la muerte, que se expresa en las poblaciones como una proporción reproductiva neta, siempre que se alcance una distribución estable por edades en la población, o dicho de otra manera, es la contribución relativa del genotipo al incremento de la población. Por el contrario, es más simple el concepto maltusiano del *fitness*, definiéndose éste como la razón final de incremento en el tamaño de la población. El *fitness*, por tanto, es una medida directa de adaptación (Crow, 1986; Spies, 1989).

En resumen, si la selección natural ocurre como consecuencia de la mayor aportación sucesoria de los más eficaces (con mayor *fitness*), y éstos a su vez se definen como los que contribuyen descendientes en mayor número, la circularidad de la proposición es patente.

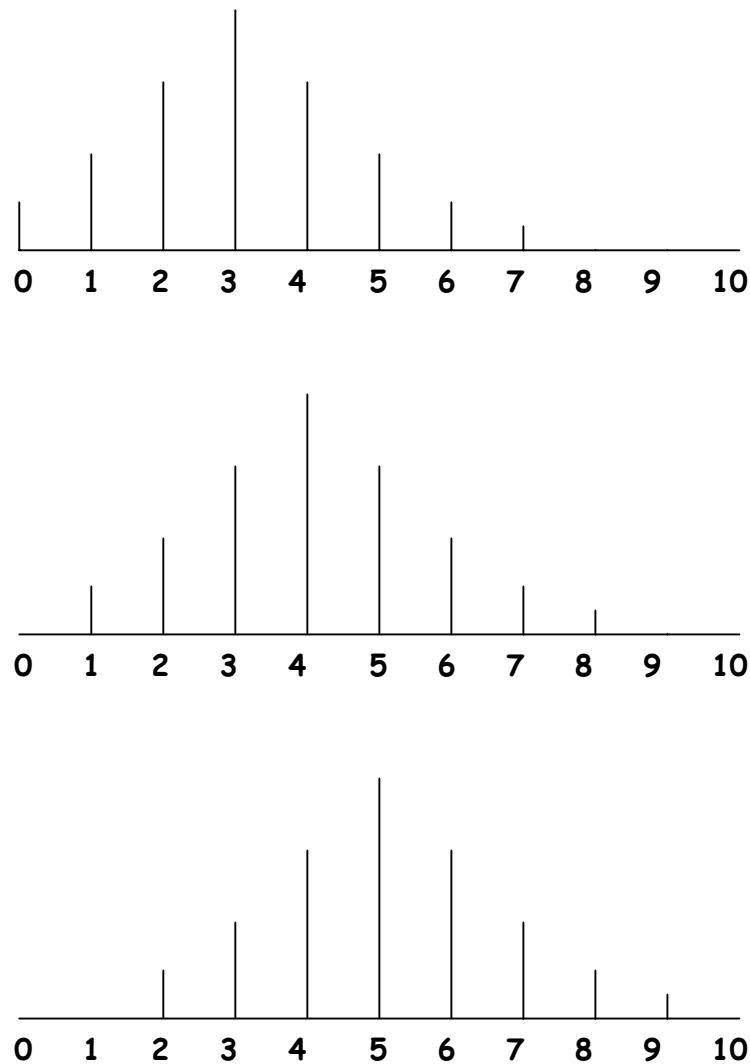
## 1.2.2. EL TRINQUETE DE MULLER Y SU INFLUENCIA EN LA TRANSMISIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS

Desde que en 1964, Muller expusiera su teoría del "Trinquete" sobre la acumulación de las mutaciones deletéreas en organismos con reproducción asexual, han sido muchos los autores (Haigh, 1978; Pamilo *et al.*, 1987; Bell, 1988; Gabriel *et al.*, 1993; Lynch *et al.*, 1993; Stephan *et al.*, 1993; Butcher, 1995; Gessler, 1995; Higgs & Woodcock, 1995; Charlesworth & Charlesworth, 1997) que han investigado cómo el tamaño de la población, la razón de mutación y el coeficiente de selección, influyen la velocidad del trinquete.

Muller (1964), señaló que, en poblaciones sin recombinación, hay una ligera tendencia a acumular mutaciones deletéreas. El fundamento de esta teoría se muestra en la figura 2.

Cualquier población se puede agrupar en clases continuas con 0,1,2, ...k mutaciones deletéreas. El número de individuos en la clase óptima, sin mutaciones deletéreas, será  $n_0$ . Si  $n_0$  es pequeño (como ocurre durante la transmisión de muchos protozoos parásitos), en muchas generaciones, los fenómenos de azar harán que, a pesar de su mayor *fitness*, toda la  $n_0$  muera sin dejar descendencia. Cuando esto ocurre, la clase óptima se pierde y únicamente, podría ser reconstituida en organismos clonales mediante mutaciones reversas, cuya probabilidad de aparición es ínfima. En poblaciones con reproducción sexual la población original podría reconstituirse por un proceso de recombinación. En una frase del propio Muller: "el trinquete ha chascado una muesca". La nueva clase óptima transportará, según el ejemplo de la figura 2, una mutación deletérea. Con el tiempo, esta clase también se perderá, dando un giro más al trinquete, quedando como clase óptima la que presenta 2 mutaciones deletéreas.

**Figura 2.-** La figura muestra la distribución inicial (superior) de una población asexual de individuos con 0, 1, 2, 3,.....k mutaciones deletéreas. Las dos figuras inferiores muestran la misma población después de que el trinquete haya chascado una, o dos, muescas.



El proceso es relevante únicamente si  $n_0$  es pequeña. Se puede demostrar (High, 1978), que si los *fitness* presentan efecto multiplicativo, el valor de equilibrio para  $n_0$  es:

$$n_0 = Ne^{-U/S}$$

Donde N es el tamaño de la población, U es el número esperado de mutaciones deletéreas por genoma y por generación y S es la desventaja selectiva por mutación.

Si S es pequeña, entonces  $n_0$  puede ser pequeña incluso si N es grande. Por ejemplo, si  $N = 100.000$ ,  $U = 0,1$ , y  $S = 0,01$ , entonces  $n_0 \approx 4,5$ . Este hecho significa que las mutaciones deletéreas se acumularían rápidamente. Una población sexual con esta

razón de mutación no estaría en dificultades: la media del *fitness* ( $w$ ), relativa a un *fitness* de 1 para la clase óptima, es  $w = e^{-0.1} = 0,905$ .

Los argumentos del trinquete de Muller no solo se aplican a organismos asexuales, sino que pueden aplicarse a regiones del ADN que nunca recombinan como, por ejemplo, el cromosoma Y.

Desde su exposición, la teoría del "trinquete de Muller" ha generado mucha polémica. Así, mientras algunos estudios han ido encaminados a probar vías por las que ciertos patógenos asexuales podrían escapar del efecto del "trinquete", (Gabriel & Bürger, 2000), otros se apoyan en la teoría para explicar fenómenos de disminución de *fitness* en la transmisión de virus ARN (Domingo *et al.*, 1996).

El efecto del trinquete en los microorganismos patógenos es realmente interesante. Se ha demostrado que la transmisión de patógenos actúa, en la mayoría de los casos, como cuello de botella de estas poblaciones. Esto favorece la acción del "trinquete de Muller", lo que provoca la drástica disminución del *fitness* del patógeno (Domingo *et al.* 1996; Bergstrom *et al.*, 1999). Sin embargo, es la transmisión vertical de patógenos el punto donde el cuello de botella ejerce un mayor efecto. Este hecho puede explicar las observaciones por las que los patógenos transmitidos verticalmente desarrollan menor virulencia que sus parientes de transmisión horizontal (Bergstrom *et al.*, 1999). En este sentido, diferentes pases con el efecto de cuello de botella realizados con el HIV-1, provocaron mutaciones asociadas al efecto del Trinquete de Muller que no habían sido registradas en los aislados naturales mantenidos durante más de dos décadas (Yuste *et al.*, 2000). Es posible que *in vivo* el HIV-1 no esté sujeto a grandes procesos de cuello de botella como los realizados en experimentos diseñados específicamente para acentuar el "trinquete de Muller".

### 1.2.3. EL MODELO TEÓRICO DE LENSKI Y TRAVISANO

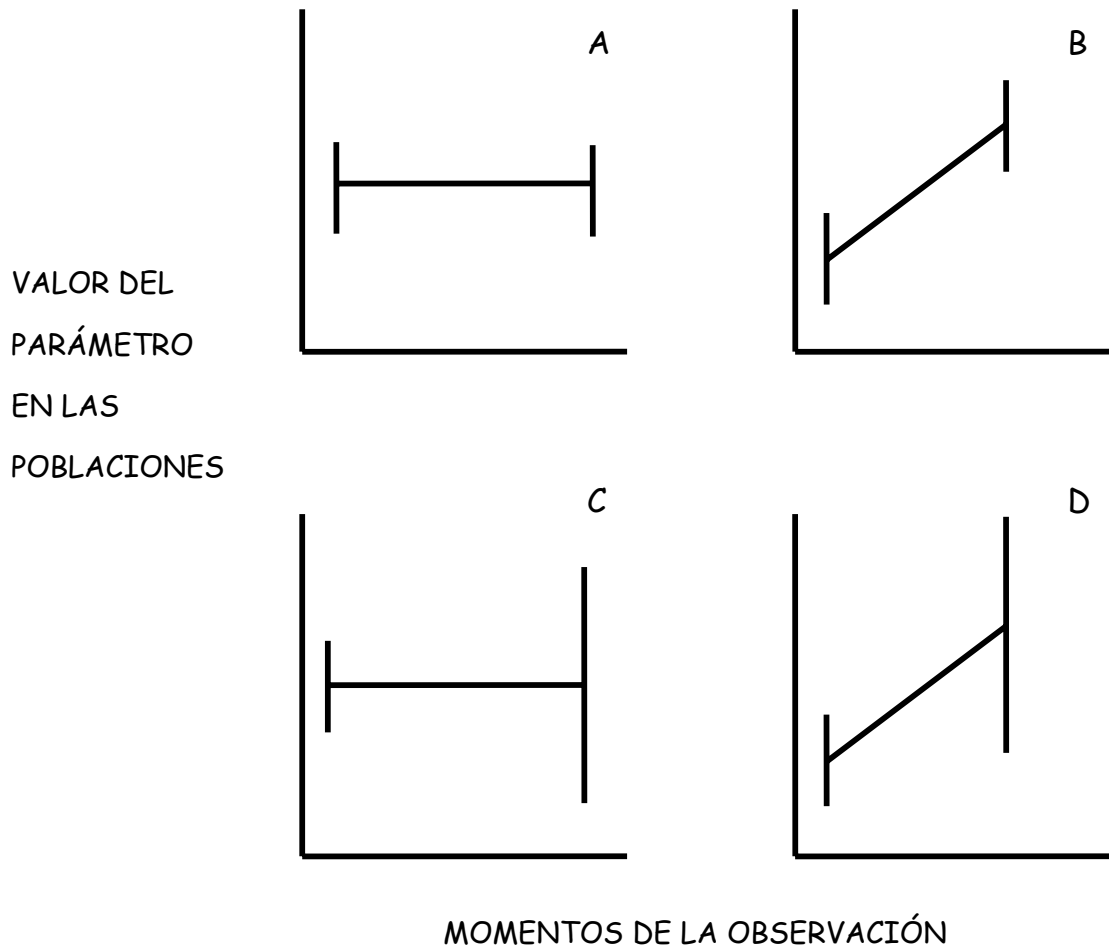
Lenski y Travisano (Travisano *et al.*, 1995), propusieron una prueba experimental para analizar las contribuciones del azar y de la adaptación en la evolución de poblaciones de bacterias en el laboratorio, cuando éstas eran expuestas a cambios medioambientales. En este modelo experimental, poblaciones idénticas entre sí (réplicas), se constituían a partir de un genotipo ancestral único, y las réplicas se propagaban bajo idénticas pero nuevas condiciones de cultivo. Para la aplicación de este modelo es imprescindible que haya una ausencia de sexo en las poblaciones, evitando de esta manera la posibilidad de recombinación.

En este modelo se media en cada población el valor medio inicial de un parámetro específico. Al comienzo del experimento, sería esperable que los valores para cada población fueran idénticos dentro de los límites estadísticos. De esta forma se podía calcular su Gran Media ( $M_0$ ) y Gran Varianza iniciales ( $SD_0$ ). Después de un tiempo, el valor medio de cada parámetro volvía de nuevo a ser medido, calculándose de esta forma la Gran Media y Gran Varianza finales ( $M_t$  y  $SD_t$ ). Las diferencias entre los valores inicial y final se explicaban como resultados de los efectos de adaptación, azar o ambos según se muestra en la figura 3.

En el gráfico A de la figura 3, el parámetro no se desarrolla. Nos encontramos con  $M_0 = M_t$  y  $SD_0 = SD_t$ . Ello ocurre cuando no aparecen mutantes en las réplicas durante el experimento, es decir, la población obtenida tras la fase experimental no había cambiado significativamente de la inicial. La segunda posibilidad que puede ocurrir, es que el parámetro se haya desarrollado, únicamente, debido a la selección natural (Gráfico B de la figura 3), con la consiguiente aparición de nuevos mutantes tras el experimento. La media incrementa su valor en el tiempo, sin que exista una variación significativa entre sus réplicas. Ello quiere decir que  $M_0 < M_t$  y  $SD_0 = SD_t$ . Cuando  $M_0 = M_t$  y  $SD_0 < SD_t$ , el parámetro no se ha desarrollado de forma similar en todas las réplicas, sino únicamente en algunas (Gráfico C de la figura 3). Se dice entonces que el

rasgo se ha desarrollado debido al azar (Deriva genética). Por último, puede aparecer una conjunción de las dos posibilidades anteriores ( $M_0 < M_t$  y  $SD_0 < SD_t$ ), cuando el parámetro se ha desarrollado por selección natural y por deriva genética (Gráfico D de la figura 3),

**Figura 3.-** Posibilidades de variación en el tiempo de la media y la desviación estandar de un parámetro en estudio.



#### 1.2.4. MACRO Y MICROEVOLUCIÓN EN PARÁSITOS

Price (1977, 1980), usando la idea que las poblaciones son la unidad básica de la evolución, enfatizó que la estructura de población es el mejor factor utilizable en la biología evolutiva de los organismos parásitos. En el terreno teórico, él argumentó que, debido a que los parásitos están adaptados a explotar medios ambientes pequeños y discontinuos (hospedadores) en una matriz de ambientes inhóspitos, ellos tendrían

poblaciones pequeñas y homogéneas con un pequeño flujo de genes entre ellas. Sin embargo, al considerar la variabilidad producida en el tiempo y en el espacio, podrían, además, aparecer tres tipos de poblaciones:

-Cuando el medio ambiente (hospedador) es estable en el tiempo y variable en el espacio, entonces la población local parasitaria sería monomórfica y especializada, con varias cepas geográficas.

-Si el ambiente es uniforme en el espacio pero variable en el tiempo, la población parasitaria sería polimórfica con varios tipos especializados.

-Cuando el hospedador es variable en el tiempo y en el espacio, (Price, 1980), la población parásita se encuadrará en cepas geográficas y polimorfismos.

Como ya se ha expresado, para que la evolución ocurra en una población, ésta debe de tener un cierto grado de variabilidad genética lo que aumentará la posibilidad de cambios en la frecuencia alélica en el tiempo. La variación heredable en las poblaciones puede surgir por mutación o recombinación genética. La deriva genética, el flujo de genes (migraciones) y la selección natural son, sin embargo, los procesos por los cuales estas variaciones aumentan, se reducen o son eliminadas de una población. Además, aunque los mecanismos de reproducción, no afectan a las frecuencias alélicas de una población, han de ser tomados en cuenta pues influyen las frecuencias del genotipo. En el nivel microevolutivo, la deriva genética y el flujo de genes (migraciones), son las fuerzas evolutivas que conducen la variabilidad genética de las poblaciones. La deriva genética es particularmente importante en la microevolución de pequeñas poblaciones.

#### 1.2.5. LA TEORÍA CLONAL DE LOS PROTOZOOS PARÁSITOS

La estructura de población y el sistema de emparejamiento de patógenos, están fuertemente ligados a fenómenos biológicos que tienen consecuencias cruciales en la

epidemiología de las enfermedades transmisibles (Tibayrenc & Ayala, 2002). Ésta es la razón por la que en los últimos años este tipo de investigaciones han recibido mucha atención. Ello sin duda, ha ido ligado a la disponibilidad de marcadores genéticos adecuados. En la mayoría de los estudios (Tibayrenc *et al.*, 1986 y 1990), se parte de una hipótesis nula, una situación panmíctica (una población en la cual los cambios genéticos ocurren al azar). Cuando aparecen fuertes desviaciones estadísticas a las expectativas panmícticas, son tomadas como evidencia circunstancial de que el patógeno bajo investigación sufre una propagación clonal predominante. Entre las pruebas realizadas sobre las poblaciones, requiere una atención particular el desequilibrio de ligamiento, o asociación no-al-azar entre genotipos en los diferentes loci; sin embargo no es la única prueba utilizada, pues existen pruebas complementarias que ayudan a esclarecer los criterios de clonalidad.

La teoría clonal no expone que el sexo está totalmente ausente en especies fundamentalmente clonales, sino que su aparición es tan poco frecuente que es insuficiente para romper el patrón de estructura de población clonal y todas sus manifestaciones clásicas entre las que destaca la presencia de un considerable desequilibrio de ligamiento (Tibayrenc *et al.*, 1990). Además, los clones identificados por unos pocos grupos de marcadores genéticos no son, en la mayoría de los casos, clones verdaderos, sino más bien familias de clones estrechamente emparentados (Tibayrenc *et al.*, 1990). El término CLON usado en este contexto tiene un sentido genético, y se refiere a la situación en la cual la descendencia es genéticamente idéntica a las células parentales, cualquiera que sea el sistema de reproducción de la especie investigada.

Smith *et al.* (1993), observaron que el desequilibrio de ligamientos encontrado podría ser el resultado de una evolución clonal "verdadera", o de una clonalidad epidémica o especiación biológica críptica. Estas distinciones tienen importantes implicaciones evolutivas y epidemiológicas. Los genotipos multilocus en especies epidémicas o especies biológicas crípticas cuentan con variantes individuales con un tiempo de vida de pocos años en el mejor de los casos, mientras que en las especies

clonales "verdaderas" (esto es, una especie que sufra evolución clonal a largo plazo), los genotipos multilocus están en líneas genéticas separadas y estables, con una antigüedad que se pueden medir en una escala evolutiva. Estas líneas divergen una de otra a partir de la acumulación de diferentes mutaciones en los genes, incluyendo los que presentan relevantes consecuencias médicas tales como la patogenicidad o la resistencia a los medicamentos (Tibayrenc *et al.*, 1986). Smith *et al.* (1993), propusieron distintos métodos para distinguir entre las diferentes clases de estructura de población. Si una especie está obviamente distribuida en dos o más grupos, realizaríamos un análisis de desequilibrio de ligamiento dentro de cada grupo por separado; si el resultado no llega a ser significativo, el grupo se correspondería a una especie biológica críptica. Esta aproximación se propuso para distinguir entre la especiación críptica y la evolución clonal en los casos de *T. gondii*, *Entamoeba histolytica* y *Giardia duodenalis* (Tibayrenc, 1993). Las estadísticas del desequilibrio de ligamiento fueron complementadas con los análisis filogenéticos que deciden si una especie sufre una evolución clonal verdadera o presenta una clonalidad epidémica.

En resumen, aparte del interés obvio en la epidemiología molecular (tipificando cepas) y de la sistemática de patógenos, el debate clonalidad/sexualidad ha adelantado en los últimos años los conocimientos de la biología de los protozoos parásitos. Aún sin interesarnos por la estrategia reproductiva, el cuadro emergente es fascinante desde una perspectiva evolutiva. La mayoría de los parásitos aprovechan un complejo marco de estrategias reproductivas pudiendo tomar ventaja, de acuerdo con las circunstancias, de ambas estrategias: la sexual (generando rápidamente nueva variabilidad genética) y la propagación clonal (estabilizando genotipos multilocus de éxito). Sin embargo, tal flexibilidad tiene sus limitaciones. Hasta el momento, no se ha demostrado que la estrategia reproductiva de los parásitos sea altamente flexible ni que sea influida por las presiones ambientales (Levin *et al.*, 1999). Los análisis de la genética de poblaciones muestran que las diferentes poblaciones de estas especies, no saltarían del apareamiento al azar a la evolución clonal a largo plazo. Sin embargo, estas poblaciones

están caracterizadas por patrones específicos de propagación, los cuales se pueden modular solo en algún grado.

#### 1.2.5.1. El ejemplo de *T. gondii*

*T. gondii* es un parásito que se encuentra íntimamente relacionado con *N. caninum*. Es por ello que todos los conocimientos obtenidos en esta especie deben de ser examinados atentamente, pues podrían extraerse conocimientos interesantes extrapolables a su pariente cercano. Además, dada la ausencia de información en *N. caninum*, los datos disponibles en *T. gondii* son todavía más importantes.

*T. gondii* muestra una estructura de población que no se puede deducir simplemente del conocimiento del ciclo biológico de la especie. Este protozoo parásito incluye en su ciclo biológico un estado sexual obligatorio que tiene lugar en el gato; sin embargo, los análisis de isoenzimas publicados, examinando 14 cepas y 4 loci variables, mostraron un desequilibrio de ligamiento considerable, lo que llevó a proponer que el ciclo uniparental era común y quizás predominante en esta especie (Tibayrenc *et al.*, 1991). Dos cepas fueron identificadas a continuación, una de las cuales está específicamente asociada a la virulencia en ratón (Sibley & Boothroyd, 1992). Los estudios realizados por Tibayrenc (1993), no eliminaron los interrogantes sobre si *T. gondii* actúa como líneas clonales o como especie biológica críptica. Finalmente, el uso de marcadores con un adecuado poder de resolución (microsatélites), demostró que *T. gondii* es un caso de líneas clonales (Ajzenberg *et al.*, 2002).

Las consecuencias a largo plazo de la evolución clonal en la estructura de población de *T. gondii* parecen incluso mayores que en *Plasmodium falciparum*, porque al contrario que este último, en *T. gondii* se han encontrado al menos dos cepas (Ajzenberg *et al.*, 2002), y posiblemente 3 (Howe & Sibley, 1995). Sin embargo, es interesante comprobar que, a pesar de la propagación clonal, la hibridación parece jugar un papel importante en la evolución genética de *T. gondii* (Grigg *et al.*, 2001). En este último

trabajo se observó que la recombinación sexual de polimorfismos combinantes entre dos cepas distintas y en competencia, pueden ser una fuerza poderosa que conduce a la evolución natural de la virulencia de *Toxoplasma*. En este mismo sentido, contrasta el hecho de que aunque el éxito biológico de las tres cepas (líneas clonales), demuestra que el cruzamiento entre ellas es un fenómeno raro (alrededor del 95% de las infecciones por *T. gondii* son debidas a estas tres cepas arquetipo), éste, sin embargo, beneficia tremendamente a la especie, pues genera una progenie rápidamente dominante (Grigg & Suzuki, 2003). Su *et al.*, (2003), razonaron que la clonalidad de las tres cepas (líneas clonales) predominantes, pueden resultar de la transmisión oral sucesiva a través de hospedadores intermediarios, evitando la fase sexual del ciclo biológico. Finalmente, debe señalarse que los análisis de población genética no han sido realizados en poblaciones felinas de *T. gondii*, las cuales pueden exhibir una estructura de población diferente.

#### 1.2.6. VARIACIÓN FENOTÍPICA CLONAL EN PROTOZOOS PARÁSITOS

Cuando un parásito unicelular, al infectar un hospedador, genera alguna diversidad fenotípica entre sus células hijas, provoca una ventaja competitiva pues cambia la presión selectiva, ya sea evadiéndose de la respuesta inmune del hospedador o por la adaptación a las diferencias genéticas entre especies hospedadoras o a los diferentes tejidos de un mismo hospedador (Meunier, 2001). Tal incremento de la diversidad del parásito, provoca un aumento en la probabilidad de que al menos uno de los descendientes sobreviva, haciendo posible la perpetuación de la línea parasitaria.

En la mayoría de los organismos, la reproducción sexual genera algún tipo de variación fenotípica, debido a que siempre se crea alguna nueva combinación de genes (Bell, 1982). Es por ello que la hipótesis de la Reina Roja afirma que el sexo proporciona a corto plazo ventajas en la interacción parásito-hospedador. Sin embargo, en protozoos parásitos, la diversidad fenotípica no puede ser generada por el sexo durante todo el ciclo biológico del parásito, debido a que parte del ciclo implica reproducción asexual. Es

decir, muchos parásitos presentan una estructura de población clonal (Tibayrenc & Ayala, 2002). Por lo tanto, otros mecanismos distintos del sexo y la recombinación deben de estar presentes en los parásitos, para que éstos puedan generar una diversidad fenotípica intraclonal en los diversos pasos de su ciclo biológico.

Sin el papel combinante del sexo, la diversidad fenotípica de cualquier rasgo en particular solo puede surgir debido a procesos de plasticidad fenotípica -hecho por el cual de un mismo genotipo aparecen distintos fenotipos- o a mutaciones. Un aumento en la razón de mutación en todo el genoma -como ocurre en las bacterias mutantes (Taddei *et al.*, 1997)-, o restringido a algunas partes -como ocurre con los loci de contingencia (Moxon *et al.*, 1994)-, generaría diversidad a corto plazo. Sin embargo, y aunque no han sido descartados, tales mecanismos no se han descrito hasta el momento en protozoos parásitos. Por el contrario, una expresión variable de los genes, la cual es uno de los mecanismos responsables de la plasticidad fenotípica, genera diversidad fenotípica entre los distintos componentes de una misma población parasitaria que se encuentra en una misma fase o estado (Meunier, 2001).

Los protozoos parásitos presentan familias de genes relacionados entre sí repartidos por todo el genoma, diferenciándose unos de otros por su extensión variable (Rudenko, 1999). Aunque esta diversidad es fundamental para la diferenciación celular (cada tipo celular parasitario, expresa un solo grupo específico de miembros de una familia de genes), también es una fuerza de diversidad fenotípica dentro de cada fase o estado parasitario. Tras una división celular, en momentos concretos del ciclo biológico del parásito, algunas células hijas ( $F_1$ ) pueden expresar miembros diferentes de una familia de genes. Cuando las células descendientes de éstas ( $F_2$ ) expresan las mismas familias de genes (igual que la célula madre - $F_1$ -), se dice que han aparecido los "clones fenotípicos" que son genética y morfológicamente idénticos al resto de la población clonal, pero con diferentes propiedades biológicas. Este fenómeno es conocido como Variación Fenotípica Clonal (CPV) (Rudenko, 1999; Preiser *et al.*, 1999) y es dependiente de la expresión variable de los miembros de una familia de genes en células parasitarias

del mismo tipo, fase o estado. Estos mecanismos pueden suponer o no un reordenamiento del ADN. Como ejemplos de los primeros se pueden encontrar los genes que expresan glicoproteínas de superficie variables en los estadios del torrente sanguíneo (B-VSG) en *Trypanosoma brucei*. Entre los segundos, cabe citar los genes *var* de *P. falciparum* que aparentemente pueden ser expresados de forma variable sin reordenamiento del ADN (Scherf *et al.*, 1998).

## **2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS**



Hasta el momento, son varios los estudios que sugieren la existencia de diversidad intraespecífica en *N. caninum*. En este sentido, se han descrito diferencias en la patogenicidad provocada en diferentes especies hospedadoras (Lindsay & Dubey, 1989, 1990; Lindsay *et al.*, 1995; McGuire *et al.*, 1997; Buxton *et al.*, 1998; Atkinson *et al.*, 1999; Quinn *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2002), en la razón de crecimiento en cultivo celular (Innes *et al.*, 1995; Shock *et al.*, 2001), en las características genéticas (Atkinson *et al.*, 1999; Shock *et al.*, 2001) e incluso en la respuesta inmune que desencadenan (Miller *et al.*, 2002). En *N. caninum*, los factores diferenciadores *a priori* de los aislados son el origen geográfico y la especie de la que procede el aislamiento. Las causas de tal diversidad podrían ser explicadas, en principio, por la existencia de estructuras de población sexual, o por la presencia de líneas clonales divergentes. Dado que las estructuras de población y los tipos de reproducción de los parásitos tienen consecuencias cruciales en la epidemiología de las enfermedades transmisibles (Tibayrenc & Ayala, 2002), el estudio de la diversidad intraespecífica de *N. caninum* es un hecho relevante tanto desde el punto de vista biológico como patológico.

Por otra parte, la teoría del "trinquete de Muller" (High, 1978), predice que los organismos con reproducción asexual (caso del taquizoíto de *N. caninum*) tendrían problemas para propagarse indefinidamente en el tiempo, si carecen de grandes mecanismos reparadores genéticos. Este fenómeno es más intenso cuando el número de individuos que componen la población inicial es bajo, tal y como ocurre en el momento de la transmisión en muchos patógenos. El fenómeno llega a ser crucial cuando el microorganismo patógeno utiliza, principalmente, el modo de transmisión vertical (Bergstrom *et al.*, 1999) como sucede en el caso de *N. caninum* en la especie bovina (Björkman *et al.*, 1996; Paré *et al.*, 1996; Anderson *et al.*, 1997; Schares *et al.*, 1998). Uniendo ambos conceptos, parece razonable plantear el interrogante de si *N. caninum* en su propagación en el ganado bovino, predominantemente asexual, no "necesitaría" intercalar periodos sexuales para evitar el efecto del "trinquete de Muller". Por ello, conocer si *N. caninum* es capaz de evitar el trinquete en condiciones de asexualidad se plantea como una cuestión relevante desde el punto de vista teórico y práctico.

A lo anteriormente expuesto cabe añadir la existencia de datos contradictorios sobre el efecto del mantenimiento del parásito en cultivo celular sobre su virulencia (Long *et al.* 1998; Atkinson *et al.*, 1999), junto a la ausencia de estudios de interacción competitiva entre aislados de *N. caninum*.

En función de lo anteriormente expuesto, en esta tesis doctoral se planteó, de una parte la adaptación del modelo de Lenski y Travisano (Travisano *et al.*, 1995) para estudiar la capacidad adaptativa de taquizoítos de diversos aislados de *N. caninum*, y de otra, el estudio de la diversidad patogénica del parásito en el modelo murino.

El primer objetivo consistió en el **estudio de la capacidad adaptativa de *N. caninum in vitro* en ausencia de reproducción sexual, comparando la variabilidad de comportamiento de distintos aislados del parásito** elegidos en función de sus diferencias de procedencia geográfica y de hospedador. Para ello, se desarrollaron tres subobjetivos:

- El subobjetivo 1.a. consistió en el estudio de la capacidad adaptativa del taquizoíto de *Neospora* en ausencia de reproducción sexual. Para ello se estudió la evolución del *fitness* de los taquizoítos de *N. caninum* tras de pases seriados por cultivo celular. Si la reproducción sexual es un fenómeno poco frecuente en el ciclo biológico de *N. caninum*, los taquizoítos que se multiplicaban por reproducción asexual, deberían de ser capaces de evitar el trinquete de Muller por tiempo indefinido hasta el momento en el que tuvieran la oportunidad de realizar la recombinación.
- El subobjetivo 1.b. consistió en el estudio de la variabilidad de comportamiento de tres aislados del parásito (NC-1, NC-Liverpool y NC-SweB1) frente a los parámetros designados en el subobjetivo anterior. De esta forma se obtendría información valiosa sobre la diversidad intraespecífica *in vitro* de *N. caninum*.

- El subobjetivo 1.c. consistió en el estudio de la interacción competitiva entre los tres aislados anteriormente mencionados, valorada por la evolución de su *fitness*, tras el paso por cultivo celular.

El segundo objetivo consistió en el estudio de la diversidad patogénica de *N. caninum* (diversidad *in vivo*) en el modelo murino, estudiando también la atenuación observada tras el mantenimiento continuado del parásito en cultivo celular. En este caso también se plantearon para su cumplimiento tres subobjetivos:

- El subobjetivo 2.a. consistió en el estudio comparativo de la patogenicidad de tres aislados (NC-1, NC-Liverpool y NC-SweB1) de *N. caninum* en un modelo murino. En concreto se realizó el estudio comparativo de la mortalidad, sintomatología, determinación de la Ig G sérica, intensidad de las lesiones y carga parasitaria en los tejidos y órganos diana, durante la fase aguda y crónica de la enfermedad.
- El subobjetivo 2.b. investigó el posible efecto del cultivo celular en la atenuación de la virulencia de *N. caninum*. Para ello, se estudió la patogenicidad provocada por cada aislado, tal y como se ha expuesto en el subobjetivo anterior, antes y después de su paso durante 19 semanas por cultivo celular.
- El subobjetivo 2.c. consistió en el estudio del efecto de la interacción competitiva entre los tres aislados, en relación con su patogenicidad en el modelo murino.



### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**



### 3.1. CULTIVOS CELULARES

#### 3.1.1. LÍNEAS CELULARES EMPLEADAS

En el trabajo de tesis doctoral se utilizaron dos líneas celulares establecidas: la línea Vero, procedente de fibroblastos de riñón de mono y la línea Marc-145, procedente de un clon de la línea celular MA-104 originada a partir de células epiteliales de riñón de mono. Ambas líneas celulares se emplearon para el mantenimiento y producción de taquizoítos de los diferentes aislados de *N. caninum* utilizados.

#### 3.1.2. MANTENIMIENTO DE LAS LÍNEAS CELULARES

Para el crecimiento tanto de la línea Vero como de la Marc-145, se utilizaron diferentes medios en función de su posterior utilización. Para el mantenimiento se utilizó el medio HAM-F10 (Gibco-BRL), un medio líquido al que se le añadieron diversos enriquecedores -Ultrosereg al 2% (Gibco-BRL) y suero fetal bovino (FBS) al 20% (Gibco-BRL)-, una solución tampón -HEPES (Gibco-BRL)-, y antibióticos -penicilina, estreptomina (Gibco-BRL) (100 U.I./ $\mu$ l y 100  $\mu$ g/ml) y fungizona al 2%- para prevenir posibles contaminaciones de origen bacteriano y fúngico. El medio, preparado previamente en cabina de flujo laminar y con todos sus componentes estériles, se guardó en alícuotas a -20°C hasta su uso posterior. Cuando las células se emplearon para el mantenimiento y multiplicación de taquizoítos de *N. caninum*, se utilizó el medio mínimo esencial (MEM) deshidratado (Sigma), suplementado con sales de Earle, L-glutamina y tampón HEPES. Este medio fue reconstituido con agua desmineralizada y desionizada (sistema Milli Q de Millipore) y posteriormente se añadió penicilina/estreptomina (100 U.I./ $\mu$ l, 100  $\mu$ g/ml) y bicarbonato sódico (2.2 g/L) (Sigma) con el objetivo de mantener el pH del medio neutro. Una vez preparado el medio, éste se esterilizó mediante un sistema de filtración (filtros Steritop GP de 0,22  $\mu$ m, Millipore). En este caso, el PBS fue sustituido por suero equino inactivado (SHI) (2-5%) (Sigma).

Las líneas celulares se mantuvieron en un incubador (Forma Scientific) a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub>. Tanto para el mantenimiento de las líneas celulares como para la obtención *in vitro* de taquizoítos de *N. caninum* se realizaron pases seriados de las células en una cabina de flujo laminar vertical (Telstar, mod. AV-100), dos veces por semana, utilizando frascos de cultivo de 25 y 75 cm<sup>2</sup> (TPP), en los que se sembraron 7x10<sup>5</sup> y 2,1x10<sup>6</sup> células respectivamente. Para ello, la monocapa de células confluentes se lavó con tampón fosfato salino (PBS) y se separó del soporte mediante tratamiento con 1,5 ml de una solución de tripsina (500mg/L)-EDTA (200mg/L) (Sigma) incubando en estufa a 37°C. Posteriormente, se resuspendió en el medio de cultivo adecuado. El número y la viabilidad de las células se determinó realizando una dilución 1:10 en tripán azul (Merck) al 0,05%. Para su recuento, se utilizó un hemocitómetro (Neubauer mejorado, Brand) y la viabilidad fue evaluada basándonos en la captación selectiva de este colorante por parte de las células con la membrana celular alterada.

### 3.1.3. CONSERVACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES

La conservación de las líneas celulares se realizó mediante criopreservación en N<sub>2</sub> líquido (-196°C). Para ello, una vez que las células eran separadas y resuspendidas en medio de cultivo, se centrifugaron (600 x *g*, 5 minutos) evaluando previamente su viabilidad con el colorante tripán azul. El sedimento obtenido fue resuspendido en el medio de mantenimiento de las células y se distribuyó en viales de congelación de 1,8 ml a los que se añadió dimetil sulfóxido (DMSO) (10%) (Sigma). La concentración final fue de 10<sup>7</sup> células/vial y los viales fueron guardados a -80°C durante 24 horas y posteriormente a -196°C en tanques de N<sub>2</sub> líquido (Air Liquide, mod. Arpege 40).

Cuando se necesitó descongelar las células, el contenido del vial se atemperó unos segundos a 37°C, posteriormente se mezcló lentamente con 20 ml de medio HAM-F10 y se centrifugó (600 x *g*, 5 minutos) para eliminar el DMSO. El sedimento se añadió al frasco de cultivo junto con medio HAM-F10.

### 3.2. CULTIVO DE TAQUIZOÍTOS DE *N. caninum*

#### 3.2.1. AISLADOS DE *N. caninum*

En este estudio se utilizaron tres aislados diferentes de *N. caninum*: NC-1 (Dubey *et al.*, 1988b) y NC-Liverpool (Barber *et al.*, 1993) de origen canino y NC-SweB1 (Stendlund *et al.*, 1997) de origen bovino. Los aislados NC-1 y NC-Liverpool fueron obtenidos en 1988 y 1993, respectivamente, a partir del cerebro de perros con manifestaciones nerviosas, mientras que el aislado NC-SweB1 fue obtenido en el año 1995 a partir del cerebro de un ternero recién nacido, infectado congénitamente, que presentaba sintomatología nerviosa. El aislado NC-1 fue cedido por la Dra. Innes (Moredun Research Institute; Edimburgo, Reino Unido), el aislado NC-Liverpool por la Dra. Diana Williams (Liverpool School of Tropical Medicine; Liverpool, Inglaterra) y el aislado NC-SweB1 por el Dr. Arvid Uggla (Swedish University of Agricultural Sciences; Upsala, Suecia).

#### 3.2.2. OBTENCIÓN DEL AISLADO NC-Mez

Para la realización de los estudios de competencia, fue elaborado un cuarto "aislado" artificial denominado NC-Mez. Dicho aislado fue obtenido a partir de la suma de un tercio de cada uno de los aislados mencionados en el apartado anterior. NC-Mez se obtuvo previamente al primer pase en la línea celular Marc-145.

#### 3.2.3. OBTENCIÓN DE TAQUIZOÍTOS *N. caninum* EN CULTIVO CELULAR

Los cuatro aislados señalados anteriormente se mantuvieron en el laboratorio mediante pases seriados en las líneas celulares Vero y Marc-145 a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub>. El día anterior a la infección del cultivo celular con taquizoítos de *N. caninum* se sembraron las células con las dosis descritas anteriormente, utilizando medio de cultivo MEM con 2% de SHI. A las 24 horas, se

añadieron  $2,8 \times 10^6$  taquizoítos de *N. caninum* a cada frasco de 25 cm<sup>2</sup> si contenía células Vero, y  $1,4 \times 10^6$ , si el frasco tenía células Marc-145. Los taquizoítos fueron recogidos 3,5 días después de la infección. El pase de células así como la recogida del parásito se realizó dos veces a la semana. El sobrenadante de los frascos de cultivo fue recogido con pipetas estériles (Biotech), y, en algunos casos, previamente se utilizaron rascadores de plástico (Nunc) para despegar los restos de tapiz celular con taquizoítos en su interior. La viabilidad de los taquizoítos se evaluó por la capacidad de captación selectiva del colorante tripán azul por parte de los taquizoítos con la membrana celular alterada. Para su recuento se empleó un hemocitómetro. Los taquizoítos obtenidos fueron utilizados para la obtención del antígeno usado en las pruebas serológicas, para las inoculaciones de nuevos cultivos celulares, para las inoculaciones experimentales en ratones y para la extracción de su ADN, usado como testigo positivo en la técnica de PCR.

#### 3.2.4. CONSERVACIÓN DE LOS AISLADOS

Los pases más bajos de cada uno de los aislados se conservaron criopreservados en N<sub>2</sub> líquido hasta su utilización (NC-1, pase 49; NC-Liv, pase 24 y NC-SweB1, pase 19). Para ello, el sobrenadante del cultivo celular se centrifugó a  $600 \times g$  durante 15 minutos, evaluando después el número y la viabilidad de los taquizoítos. El sedimento fue resuspendido en una mezcla de medio MEM (50%) y SHI (40%) y la suspensión se distribuyó en viales de congelación de 1,8 ml alcanzando una concentración final de  $10^7$  taquizoítos/ml. Finalmente, se añadió DMSO (10%) y se guardó a  $-80^\circ\text{C}$  durante 24 horas. Transcurrido este tiempo los viales se almacenaron a  $-196^\circ\text{C}$  en N<sub>2</sub> líquido.

Cuando se precisó descongelar alguno de los aislados, el contenido del vial de congelación se mezcló lentamente con 20 ml de medio MEM y se centrifugó ( $600 \times g$ , 5 minutos) para eliminar el DMSO. El sedimento se añadió al cultivo celular junto con medio MEM y SHI al 2% y, aproximadamente, transcurridos 8-10 días, comenzaron a visualizarse los primeros taquizoítos en el interior de las células.

### 3.3. DETERMINACIÓN DE LA EFICACIA BIOLÓGICA (*FITNESS*) DE LOS AISLADOS

#### 3.3.1. RECUENTO DE TAQUIZOÍTOS: MEDIAS PROGRESIVAS

La estimación del número final de taquizoítos utilizada para comparar la tasa de crecimiento (*fitness*) de las poblaciones, se realizó mediante el recuento de los mismos. Para este recuento de los taquizoítos se usó un hemocitómetro. Al contrario que en apartados anteriores, en el recuento de taquizoítos para la obtención del *fitness*, no fue necesario el uso del tripán azul. Ello fue así, debido a que los taquizoítos no se utilizaron en ninguna manipulación posterior que exigiera su viabilidad.

Con el fin de aportar una mayor fiabilidad al valor de los recuentos y teniendo en cuenta la variabilidad acaecida en todo experimento biológico, se realizó el método estadístico denominado de "medias progresivas" (Williams *et al.*, 1977). Esta prueba determina el número mínimo de mediciones a realizar en la muestra para que su media sea representativa del valor de la población. Con este método se elimina la posibilidad de obtener mediciones que no se correspondan con la realidad, aportando una probabilidad de error al valor. En nuestro caso, el número mínimo de recuentos fue de seis.

#### 3.3.2. ESTIMACIÓN DEL COMPONENTE MALTUSIANO DEL *FITNESS*

Se define el *fitness* maltusiano como la razón final de incremento en el tamaño de la población. El *fitness* de cada réplica de los diferentes aislados tras su cultivo en células Marc-145, se determinó después de la primera transferencia al nuevo cultivo celular ( $t = 0$ ), y justo al final del periodo experimental ( $t = 250$ ), es decir, tras aproximadamente 250 generaciones, aplicando la fórmula:

$$N_t = N_0 \cdot e^{mt} \quad (\text{Crow \& Kimura, 1970})$$

Donde "t" es 3,5 días, "N<sub>0</sub>" es el número de individuos de los que partía la población -en nuestro caso, el número de taquizoítos inoculado en el cultivo celular (1,4 x10<sup>6</sup>)- y "N<sub>t</sub>" es el número de individuos al final del periodo en el que se considere el *fitness* -en nuestro caso, número de taquizoítos que se obtuvo de cada réplica a los 3,5 días del inóculo-. La "m" es el *fitness*, por lo que despejando de la fórmula, aparece como

$$m = \ln(N_t/N_0)/t$$

Sin embargo y a efectos de calcular el *fitness* en función de la unidad de tiempo, hubo que corregir la formula dividiendo entre 3,5 y multiplicando por la constante  $-1/\ln 2$ , obteniendo así el aumento o disminución de *fitness* por día:

$$m = (1/\ln 2) \times \{ \ln(N_t/N_0)/t \} / 3,5$$

Así si  $m = 1$ , la población tendría el mismo número de individuos al pasar un día, con  $m = 2$ , tendría el doble de individuos, y así sucesivamente.

### 3.4. ANIMALES EXPERIMENTALES

#### 3.4.1. CARACTERÍSTICAS

Durante el desarrollo del experimento, se utilizaron ratones (*Mus musculus*) para realizar el estudio de patogenicidad. Se utilizaron 139 ratones, de los cuales 75 se corresponden con la prueba inicial de infección y 64 con la prueba final (modelo experimental del capítulo 5). Se usaron ratones de la estirpe BALB/c (Criffa, Barcelona), concretamente, hembras de seis semanas de edad en el momento de la infección. La estirpe BALB/c se caracteriza por presentar individuos con alta consanguinidad.

Los ratones se mantuvieron en jaulas de plástico con cierres superiores metálicos, a una temperatura ambiente regulada de 20°C, con un fotoperiodo de 12 horas de luz y una alimentación con dietas comerciales y agua *ad libitum*.

### 3.4.2. INFECCIÓN EXPERIMENTAL

La administración del parásito a los ratones se realizó mediante la inoculación por vía intraperitoneal de  $5 \times 10^6$  de taquizoítos suspendidos en 200  $\mu$ l de PBS estéril. Para los inóculos se usaron los aislados NC-1, NC-SweB1, NC-Liverpool y NC-Mez. A los testigos se les administró únicamente, 200  $\mu$ l de PBS. Para la inoculación se usaron jeringas con agujas de 0,5 mm de diámetro. Todas las inoculaciones se realizaron en un tiempo inferior a una hora desde la recogida de los taquizoítos del cultivo celular con el fin de mantener una viabilidad óptima del parásito.

Los taquizoítos usados en la infección se obtuvieron de los cultivos celulares, según se expone en el apartado 3.2.3 del Material y métodos. Para ello, se recogieron entre el tercer y cuarto día de cultivo, justo cuando el tapiz celular no estaba completamente destruido y presentaba un alto número de taquizoítos libres y vacuolas parasitóforas. Con el fin de romper las células y liberar los taquizoítos que hubiera en su interior, se pasaron primero las células y los taquizoítos por una aguja de 0,8 mm de diámetro x 40 mm de longitud y luego por otra de 0,5 mm de diámetro x 16 mm de longitud. Finalmente, se realizó el recuento de los taquizoítos para ajustar la dosis y se evaluó su viabilidad tal y como se cita en el apartado 3.2.3 del Material y métodos.

### 3.5. ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS OBSERVACIONALES

Dentro de este epígrafe incluimos los estudios de mortalidad y de morbilidad. Para los mismos se realizó la inspección diaria de los ratones. Por mortalidad se entiende el conjunto de fallecimientos en una población durante un determinado espacio de tiempo (Piédrola *et al.*, 1990). En nuestro caso, las poblaciones se obtuvieron en función del

modelo experimental (distintos aislados y diferente momento de infección). El tiempo estuvo en función de la duración del experimento (42 días).

Para los estudios de morbilidad se anotaron diariamente los síntomas. Hasta su sacrificio, se realizó la inspección diaria de los ratones con el fin de recoger la sintomatología aparecida. Se practicó una graduación de los síntomas, asignando dos cruces cuando eran intensos, una cruz si eran moderados y sin cruces cuando no existían. Para asignar tal valor a cada aislado en cada momento ( $t = 0$  y  $t = 250$ ) y en cada periodo de estudio (semana), el número de ratones que presentaban los síntomas debían superar a la mitad del total de cada aislado.

### 3.6. NECROPSIA Y RECOGIDA DE MUESTRAS

Los días señalados en el modelo experimental del capítulo 5, se procedió al sacrificio de los ratones. También se recogieron muestras de los ratones que fallecieron a lo largo del experimento. En ambos casos se recogieron muestras para satisfacer los objetivos programados.

Previamente al sacrificio, se realizó la insensibilización de los ratones en campana de  $CO_2$ . Acto seguido, se sacrificaron mediante la sangría de cada ratón por punción intracardiaca. Esta punción se realizó con jeringa con agujas de 0,5 mm de diámetro x 16 mm de longitud. Tras el sacrificio (ó muerte en su caso), se realizó la necropsia y la recogida de muestras. En primer lugar, se depositó la sangre en tubos de 1,5 ml, donde se guardó 12 horas a temperatura ambiente hasta la retracción del coágulo. A continuación se centrifugaron los tubos a  $600 \times g$  durante 10 minutos, eliminando finalmente el coágulo. Una vez obtenido el suero, se almacenó a  $-80^\circ C$  hasta la determinación de IgG frente a *N. caninum* por la técnica de IFI.

Seguidamente, se realizó la necropsia de cada individuo, practicando una incisión de la piel desde el apéndice coronoides del esternón, siguiendo la línea alba, hasta la

símfisis pubiana. A continuación, se procedió a la apertura de las cavidades torácica y abdominal y finalmente, se abrió la cavidad craneal. Se obtuvieron datos de las lesiones macroscópicas de los órganos de las tres cavidades. El último fin de la necropsia fue la extracción de órganos para su estudio posterior: corazón, pulmones, hígado, riñones, bazo y la unidad cerebro-cerebelo-medula oblongada. El corazón se dividió en dos mediante un corte longitudinal desde las aurículas a la punta del corazón; también se dividieron el hígado -por medio de un corte longitudinal en el lóbulo medio- y la unidad cerebro-cerebelo que se dividió separando los dos hemisferios. Tras estas manipulaciones se procedió al procesado y almacenamiento de las muestras de dos formas diferentes según su fin:

-Riñón, bazo, un pulmón, y las porciones correspondientes de hígado, corazón y SNC, se guardaron en formol salino tamponado al 10%, hasta ser procesados para su estudio histopatológico.

-El otro pulmón, y las partes correspondientes de hígado, corazón y SNC, se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ , hasta la extracción del ADN previa al estudio de carga parasitaria por PCR cuantitativa en tiempo real.

### 3.7. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

Las muestras de órganos procedentes de los ratones, se fijaron con formol tamponado al 10%. Su procesado y posterior estudio se realizó en el Laboratorio de Histología del Hospital Clínico Veterinario de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, con la ayuda del Profesor Doctor D. Antonio Rodríguez Bertos.

### 3.7.1. FIJACIÓN E INCLUSIÓN

Las piezas fijadas en formol salino tamponado al 10%, fueron incluidas en parafina sintética con un punto de fusión de 56°C, utilizando un procesador automático de tejidos, con un programa de cambios automáticos de alcoholes de creciente graduación y bencenos. Los bloques fueron realizados en una unidad formadora de bloques, consola Tissue-Teck® (dispensador de parafina, consola térmica y crioconsola).

### 3.7.2. MICROTOMÍA Y TINCIÓN

Sobre las piezas incluidas en parafina se realizaron cortes de 4 µm de grosor usando un microtomo de rotación (Leica RM 2155) con portacuchillas y cuchillas desechables. Las secciones se desparafinaron en xilol, se deshidrataron con una serie decreciente de alcoholes, y se tiñeron con hematoxilina y eosina (HE) convencional mediante el empleo de un teñidor automático (Leica ST 4040). A continuación, se deshidrataron en una serie de alcoholes y se montaron en portaobjetos usando como compuesto montador DPX® (Merck).

### 3.7.3. GRADUACIÓN DE LAS LESIONES

Tras el estudio microscópico (microscopio óptico Olympus BX-50) de las lesiones se establecieron unos criterios de graduación de las lesiones para cada órgano estudiado considerando la intensidad de la lesión y la extensión del proceso en cada uno de los órganos estudiados: (0) ausencia del proceso; (1) inflamación ligera y focal o escasa presencia del proceso observado; (2) inflamación o proceso moderado con distribución difusa; (3) intensa inflamación difusa o amplia afectación del órgano; (4) grado máximo de intensidad y extensión del proceso que afecta a todo el órgano. En las lesiones con carácter focal (microgranulomas hepáticos, focos de calcificación o granulomas cerebrales), se ha considerado el número de focos y la gravedad de las lesiones.

### 3.8. TÉCNICAS DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ADN

#### 3.8.1. EXTRACCIÓN DEL ADN

El método de extracción del ADN varía en función del tipo de prueba que se realiza posteriormente. En nuestro caso, la PCR cuantitativa en tiempo real, requirió un ADN de alta calidad. Para ello, en la extracción del ADN se usó una prueba comercial: "Genomic-prep cell and tissue ADN isolation kit" (Amershan Biosciences). La extracción se realizó a partir de 10-20 mg de tejido congelado, pesado en balanza de alta precisión. El tejido se disgregó realizando cortes minuciosos con un bisturí.

En primer lugar, se añadieron 600  $\mu$ l del tampón de lisis de ADN (suministrado en la prueba comercial) y 3  $\mu$ l de proteinasa K a la muestra, resuspendiéndose la mezcla mediante agitación. A continuación se procedió a una incubación a 56°C en baño María durante toda la noche. Terminada la incubación se añadieron al lisado 3  $\mu$ l de ARNasa a una concentración de 4 mg/ml (contenida en la prueba comercial), y se incubó a 37°C durante 30 minutos en baño María. Posteriormente, las muestras se enfriaron en hielo y se añadió 200  $\mu$ l de una solución para la precipitación de las proteínas. Se agitó la muestra vigorosamente durante 20 s y se centrifugó a 13000-16000 x g durante 5 minutos. Las proteínas precipitadas formaron un sedimento blanquecino; el sobrenadante de las muestras se transfirió a un tubo de 1,5 ml limpio y el sedimento con las proteínas se eliminó. Finalmente, se procedió a la precipitación del ADN y para ello se añadieron 600  $\mu$ l de isopropanol 100% frío (guardado a -20°C), invirtiendo las muestras 50 veces. Acto seguido se incubaron a -20 °C durante 30 minutos para favorecer la precipitación del ADN. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 13000-16000 x g durante 15 minutos y se eliminó el sobrenadante, con cuidado de no desprender el ADN precipitado que aparecía como un pequeño sedimento blanquecino. El sedimento de ADN se lavó con 600  $\mu$ l de etanol frío (-20°C) al 70% y seguidamente las muestras se centrifugaron a 13000-16000 x g durante 5 min. Después se desechó el etanol y se dejaron secar las muestras al aire hasta la completa evaporación del alcohol. El sedimento se resuspendió

en 50  $\mu$ l de la solución de hidratación de ADN -TE- (suministrada en prueba comercial) y se dejó toda la noche a temperatura ambiente hasta su completa hidratación. Por último, se midió la concentración de cada muestra mediante espectrofotometría, ajustándose la concentración a 30-50 ng/ $\mu$ l en agua ultrapura estéril. Las muestras se conservaron hasta su posterior análisis a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Esta técnica de extracción de ADN se usó tanto para las muestras de los distintos tejidos murinos, como para la realización de la curva patrón de *N. caninum* usada en la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real.

### 3.8.2. ANÁLISIS DEL "ADN TOTAL" EXTRAÍDO

#### 3.8.2.1. Electroforesis en geles de agarosa

Para visualizar el "ADN total" extraído y comprobar su calidad, se realizó una electroforesis en agarosa siguiendo los protocolos descritos por Sambrook *et al.* (1989). De esta forma comprobamos la ausencia de degradación del ADN así como la ausencia de contaminación con ARN y proteínas. Los geles de agarosa (Sea Kem ME, FMC) se utilizaron a un porcentaje del 0,8% conteniendo 0,1 $\mu$ g/ml de bromuro de etídio (BrEt), en tampón tris borato (TBE) 0,5x. Como marcador de tamaño molecular se utilizó un patrón de ADN comercial (ADN Ladder 1Kb plus, Gibco-BRL) a una concentración de 100 ng/ $\mu$ l en solución de carga para ADN (solución de carga 5x; EDTA 25 mM, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,01%). El ADN se visualizó mediante un sistema de captación de imágenes Gel Printer (TDI) con luz ultravioleta.

#### 3.8.2.2. Cuantificación del ADN total extraído

La concentración del ADN extraído en la solución de hidratación, se determinó mediante la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro (Pharmacia-Biotech Mod.Ultrospec 3000 uv/visible spectrophotometer). Se realizó una dilución 1:100 de la

muestra en agua destilada y se utilizó para su lectura una cubeta de cuarzo de 1 ml. La longitud de onda seleccionada fue de 260 nm (1 OD = 50  $\mu$ g/ml de ADN) y 280 nm para determinar su pureza, calculándose la ratio OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>. Valores entre 1,7 y 2 indicaron una buena calidad y valores inferiores señalaban la existencia de contaminación con proteínas (Sambrook *et al.*, 1989).

### 3.8.3. CUANTIFICACIÓN DE *N. caninum* POR PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL

La estimación de la carga parasitaria se realizó mediante el desarrollo de una PCR cuantitativa en tiempo real (Collantes-Fernández *et al.*, 2002a). El fundamento de esta técnica se basa en la existencia de una relación cuantitativa entre la cantidad del ADN molde inicial y el producto de PCR que se amplifica. Para la detección del producto de PCR que se va sintetizando en el curso de la reacción se utilizan sistemas de marcaje con fluorescencia. Entre estos sistemas de detección está el SYBR<sup>TM</sup> Green I (Applied Biosystems). El SYBR<sup>TM</sup> Green I es un agente intercalante, análogo al Bromuro de Etidio, que se une al ADN de doble cadena recién sintetizado en cada ciclo de amplificación, dando un incremento de la fluorescencia que es proporcional a la concentración de ADN.

#### 3.8.3.1. Desarrollo de la PCR cuantitativa en tiempo real

Las reacciones para la cuantificación de *N. caninum* y el gen 28S ARNr del hospedador se realizaron a partir de la misma muestra pero por duplicado en tubos separados, en un termociclador ABI 7700 Prism Sequence Detector (Applied Biosystems). La mezcla de PCR (25 $\mu$ l) consistió en 5  $\mu$ l del ADN molde, 20 pmoles de cada oligonucleótido: PF20 (5'-ACTGGAGGCACGCTGAACAC-3') y PR21 (5'-AACAAATGCTTCGCAAGAGGAA-3') para la cuantificación del parásito, y PF28S (5'-TGCCATGGTAATCCTGCTCA-3') y PR28S (5'-CCTCAGCCAAGCACATACACC-3') para la cuantificación del ADN del hospedador (Amersham Biosciences), 1 x SYBR Green PCR Buffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M de dATP, dCTP, y dGTP, 400  $\mu$ M dUTP, 0,625 U de Amplitaq Gold ADN polimerasa, 0,25 U de AmpErase UNG (uracil-*N*-glycosilase), todo

incluido en el "kit SYBR Green PCR Core" (Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación utilizadas para la cuantificación de *N. caninum* y del gen 28S ARNr mediante SYBR Green fueron las recomendadas para el fabricante según se muestra en la tabla 3. Todas las reacciones se hicieron en placas de 96 pocillos tapadas con láminas ópticas (Applied Biosystems).

**Tabla 3.** Programa de PCR utilizado para la cuantificación de *N. caninum* y del gen 28S RNAr del hospedador utilizando SYBR Green™.

Pasos iniciales		Cada 40 ciclos	
<i>Activación de la AmpErase®</i>	<i>Activación de Taq Gold® ADN polimerasa</i>	95°C/ 15 s	60°C/ 1 min
50°C/ 2 min	95°C/10 min		

La determinación del valor del Ct y del número de copias se calculó mediante el "software" "Sequence detector 7700" (Applied Biosystems) y los datos se exportaron al programa informático Microsoft Excel para su análisis. El valor Ct es el llamado ciclo umbral, en el cual la fluorescencia supera 10 veces la desviación estándar de la media de la fluorescencia basal en los primeros ciclos de reacción. Toda muestra que alcance el valor Ct se considera positiva. La cuantificación de *N. caninum* y del ADN del hospedador se llevó a cabo mediante la interpolación del Ct de la muestra en la curva patrón construida con concentraciones conocidas de ADN del parásito o de ADN genómico del hospedador respectivamente, frente a los Ct correspondientes. Finalmente, solo hubo que relacionar los resultados parciales de cantidad de ADN del parásito y de ADN del tejido del hospedador para obtener el resultado final de la prueba.

### 3.8.3.2. Curvas patrón

Como primer paso para la construcción de la curva patrón de cantidad de ADN de *N. caninum*, se realizó la purificación de los taquizoítos. Éstos se obtuvieron de los

cultivos celulares, tal y como se expone en el punto 2.3 del Material y métodos. El sobrenadante del cultivo celular que contenía los taquizoítos se pasó por una aguja de 0,8 mm de diámetro x 40 mm de longitud y, posteriormente, por otra de 0,5 mm de diámetro x 16 mm de longitud para romper las células y así poder liberar los taquizoítos que hubiese en su interior. A continuación, los taquizoítos fueron lavados dos veces mediante centrifugación en PBS (600 x *g*, 15 minutos) y antes del último lavado la suspensión de taquizoítos se pasó por un filtro de 5  $\mu\text{m}$  (Biotech) para eliminar células y restos celulares, realizándose posteriormente el recuento, no solo de los taquizoítos sino también de las células, comprobándose la ausencia de contaminación celular. Tras un último lavado con PBS el sedimento que contenía los taquizoítos se guardó en tubos estériles de 1,5 ml a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

La extracción de ADN se realizó tal y como se señala en el apartado 3.8.1. de este mismo capítulo. La extracción del ADN se realizó a partir de  $10^7$  taquizoítos, realizando posteriormente diluciones decimales hasta la cantidad de  $10^{-1}$  taquizoítos. Dichas diluciones se realizaron en una suspensión de ADN genómico de tejido murino equivalente a una concentración de 20 ng/ $\mu\text{l}$ .

Para la realización de la curva patrón del ADN del hospedador, se partió de tejido de ratones testigo libres de la infección por *N. caninum*. Para ello, se realizó la extracción del ADN en las mismas condiciones que se han expuesto anteriormente. La curva se construyó con cuatro diluciones 1/5 del ADN, partiendo del 100 ng/ $\mu\text{l}$  y acabando con 0,8 ng/ $\mu\text{l}$ . La medida de la concentración del ADN se obtuvo mediante espectrofotometría según lo descrito en el apartado 3.8.2.2..

### 3.8.3.3. Electroforesis de los productos de amplificación de la PCR cuantitativa en tiempo real.

Los productos de la amplificación de la PCR de *N. caninum* y del gen 28S ARNr fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa de alta resolución al

3,5% (AG-7, Ecogen) en TBE 0,5x con bromuro de etidio. Como marcador de tamaño molecular se utilizó un patrón de ADN comercial de 100 pb (Biotools). Los fragmentos amplificados fueron visualizados mediante un sistema de captación de imágenes Gel Printer (TDI) con luz ultravioleta.

#### 3.8.4. MEDIDAS PARA EVITAR CONTAMINACIONES

Para prevenir posibles contaminaciones en la realización de la PCR anidada o de la PCR cuantitativa en tiempo real, se siguieron una serie de indicaciones (Sambrook *et al.*, 1989): se mantuvieron áreas y material de trabajo separado para la extracción de ADN, preparación de la mezcla de PCR, amplificación y zona de electroforesis, no trasladando nunca material de un área a otra. Para evitar la formación de aerosoles se emplearon recipientes con lejía diluida para el desecho de las puntas, se procuró abrir y cerrar los tubos delicadamente y se centrifugaron los tubos después de hervir muestras o de realizar digestiones con calor. Los guantes se cambiaron frecuentemente y se utilizaron puntas con filtro. El material empleado se limpió periódicamente y se esterilizó por radiación ultravioleta.

Para evitar la contaminación derivada de los productos de amplificación, se empleó en la PCR cuantitativa en tiempo real el sistema uracil-N-glucosilasa. Éste sistema consiste en la utilización del nucleótido dUTP en vez de dTTP y de la enzima "AmpErase UNG", la cual hidroliza el enlace entre uracilo y desoxirribosa, desestabilizando la cadena e impidiendo la acción posterior de la ADN-polimerasa.

#### 3.9. DETERMINACIÓN DE IgG SÉRICA ANTI-*N. caninum*

Para la determinación de las IgG anti-*N. caninum* en el suero de los ratones se utilizó una prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI). La prueba se realizó tanto en los ratones infectados con los aislados de *N. caninum* como en los ratones del grupo testigo.

### 3.9.1. OBTENCIÓN DE ANTÍGENO PARA LA PRUEBA DE IFI

Como antígeno para las pruebas de IFI se emplearon taquizoítos enteros del aislado NC-1 de *N. caninum*, siguiendo el protocolo descrito por Trees *et al.* (1993), expuesto anteriormente en el apartado 3.2.3 del Material y métodos. Únicamente se varió el almacenaje de los taquizoítos, pues en este caso tras el último lavado con PBS, el sedimento fue resuspendido en esta solución tampón hasta conseguir una concentración final de  $10^7$  taquizoítos/ml a la que se añadió formaldehído al 0,2%. Los taquizoítos formalinizados fueron distribuidos en alícuotas y almacenados a 4°C o a -20°C hasta su utilización.

### 3.9.2. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

La detección de anticuerpos específicos (IgG) frente a *N. caninum* mediante IFI se realizó en los sueros procedentes de los ratones infectados experimentalmente. Como antígeno se utilizaron taquizoítos de *N. caninum* (aislado NC-1) obtenidos de cultivo celular según se detalla en el apartado anterior.

Inicialmente, se depositaron 8  $\mu$ l de una suspensión de  $10^7$  taquizoítos formalinizados/ml, en cada pocillo de un portaobjetos de inmunofluorescencia (Cultek) de 18 pocillos de 4 mm de diámetro. Posteriormente, la preparación se dejó secar al aire, fijándose a continuación con acetona durante 10 minutos a -20°C.

Tras la fijación, se añadió el suero problema diluido en PBS (10  $\mu$ l/pocillo), incubándose posteriormente 30 minutos a 37°C en cámara húmeda. Posteriormente, los pocillos se lavaron dos veces con PBS (10 minutos cada vez) y se añadió el conjugado anti-IgG de ratón unido a fluoresceína (Sigma, purificado por afinidad ref. F), que fue utilizado a una dilución 1:128 en una solución PBS-azul de Evans (1:10000), incubándose a 37°C durante media hora en cámara húmeda. A continuación, los pocillos se lavaron de nuevo con PBS (3 veces durante 10 minutos cada vez) realizándose un último lavado de 10

minutos con agua destilada, tras el cual se secaron al aire los pocillos y se procedió al montaje del portaobjetos con Fluoprep (Biomerieux) y un cubreobjetos de 24 x 60 mm. Los pocillos fueron examinados con un microscopio de fluorescencia a 40x (Nikon, Lámpara de mercurio modelo HB-10101AF).

Las diluciones de los sueros de los ratones se realizaron en PBS comenzando por una dilución 1:50 y realizándose diluciones seriadas hasta conseguir la última dilución en la cual los sueros dejaron de ser positivos. Como testigo de la reacción se utilizó PBS.

### 3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La elección del número de individuos que compusieron la muestra, provocó que en los estudios de homogeneidad entre dos o más muestras, se optara en la mayoría de los análisis por el uso de pruebas no paramétricas. Con estas pruebas podemos inferir resultados estadísticos, independientemente de la distribución de la población (de distribución libre). Ello es debido a que estas pruebas no usan el valor numérico del puntaje, sino que se fijan en el orden o rango de los puntajes. Para el estudio de la correlación entre la carga parasitaria y la intensidad de lesiones, se usó una prueba paramétrica, dado que la distribución de la población se supuso normal.

#### 3.10.1. HOMOGENEIDAD DE DOS MUESTRAS INDEPENDIENTES

##### 3.10.1.1. Comparación de dos medias

Para dicho estudio se utilizó la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney. Dicha prueba es válida cuando se ha logrado por lo menos, una medida ordinal (ampliamente superado en nuestro caso). Es una de las pruebas no paramétricas más poderosas y constituye la alternativa más útil ante la prueba paramétrica  $t$  cuando se desea evitar la suposición de la distribución normal.

Debido a la discontinuidad de las medidas usadas en los recuentos del estudio adaptativo, y en la intensidad de las lesiones utilizadas en el estudio de patogenicidad, se usó la modificación de la U de Mann-Whitney con ligas.

### 3.10.1.2. Comparación de dos varianzas

Para el estudio comparativo de dos varianzas la prueba elegida fue la F de Snédecor, la cual estima unos valores límites de F por encima de los cuales la divergencia entre  $\sigma^2_1$  y  $\sigma^2_2$  es demasiado grande para poder atribuirlo solo al azar y debe ser considerada como significativa.

### 3.10.2. HOMOGENEIDAD DE K MUESTRAS INDEPENDIENTES ( $K > 2$ )

Cuando, durante el desarrollo de esta tesis, se han intentado comparar en grupo los tres aislados, la prueba no paramétrica elegida fue la H de Kruskal-Wallis. Este análisis de varianza de una clasificación por rangos, es una prueba extremadamente útil, para decidir si  $k$  muestras independientes son de poblaciones diferentes.

La prueba supone que la variable en estudio tiene como base una distribución continua, y requiere por lo menos una medida ordinal variable, aspectos ambos superados en este trabajo. Esta prueba presenta la ventaja como todas las pruebas no paramétricas, de no necesitar una distribución normal. Al igual que la prueba U de Mann-Whitney se usó la modificación con ligas.

### 3.10.3. REGRESIÓN LINEAL

Con el objetivo de establecer una correlación entre variables cuantitativas se determinó el coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ), cuyos valores pueden variar entre -1 y +1, y para determinar el grado de asociación se calculó el valor de  $r^2$ . El cálculo del coeficiente de correlación está incluido dentro de un análisis de regresión lineal

simple, que nos permite obtener una ecuación de regresión. Para poder obtener la ecuación de regresión, que relaciona las dos variables cuantitativas, es necesario que el coeficiente de correlación además de ser significativo sea alto; y tanto mejor cuanto más próximo sea a +1 ó -1.

#### 3.10.4. MODELO LINEAL GENERAL

Para la comparación de la intensidad de las lesiones se utilizó un modelo lineal general. Los modelos de componentes de varianza son modelos lineales que incorporan términos aleatorios, lo cual genera una matriz de varianzas y covarianzas con estructura conocida pero con valores paramétricos desconocidos. Cuando se tienen datos que provienen del muestreo o de diseños desbalanceados se presentan problemas que han dado lugar a diferentes criterios de estimación, y/o al uso de diferentes algoritmos cuando la solución no es cerrada. En función del criterio de estimación y del algoritmo que se use, es posible tener soluciones diferentes y por ello conviene disponer de un estudio que presente y compare los métodos.

En términos matriciales el modelo lineal mixto es:

$$Y = x\alpha + z\beta + \varepsilon$$

Donde  $Y$  es el valor de la observación (vector de la columna de observaciones);  $\alpha$  y  $\beta$  son las variables del estudio;  $x$  y  $z$  son matrices de incidencias de los efectos  $\alpha$  y  $\beta$ , usualmente conocidas como "*matrices de incidencias de ceros y unos*" y  $\varepsilon$  es el vector del error o fracción de la observación no explicada por los efectos considerados. Con ello, nuestro estudio planteó una ecuación de este tipo:

$$Y = x\alpha + z\beta + a\phi + \varepsilon$$

Donde  $Y$  es el valor concreto de la intensidad de la lesión;  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\phi$ , son las variables de nuestro estudio:

..  $\alpha$  es la variable aislado; podemos encontrar 3 puntos para esta variable en este apartado: NC-1, NC-SweB1 y NC-Liverpool.

..  $\beta$  es la variable fase del experimento; podemos encontrar 2 puntos para esta variable en este apartado: taquizoítos con o sin pases por la línea celular Marc-145 ( $t = 0$  y  $t = 250$ ).

..  $\phi$  es la variable día de sacrificio; Podemos encontrar 5 puntos para esta variable en este apartado: días 1, 7, 14, 21, 42.

### 3.10.5. MODELO DE REGRESIÓN "BOOTSTRAP"

Para el estudio estadístico de los resultados de las PCR utilizamos el método estadístico del Bootstrap. Es un sistema estadístico basado en remuestreos.

El "Bootstrap" es una aproximación a la inferencia estadística, basado en la construcción de una distribución muestral por una estadística de remuestreos a partir de los datos que se tienen en la mano. Esta basado en el uso de los datos de una muestra como si fueran de una población, a partir de la cual se repetirían los muestreos. Hay varios tipos de "bootstrap", es decir, existen varios métodos de remuestreo que están relacionados, entre los que destacamos las pruebas de permutación, las pruebas de azar, la validación de cruce, el "jackkniging", y los muestreos con reemplazamiento. Los hay no paramétricos y de poblaciones finitas. En nuestro trabajo de tesis se realizó un muestro con reemplazamiento.

Una aproximación tradicional a la inferencia estadística tendría que hacer suposiciones acerca de la estructura de una población (por ejemplo, de normalidad). Si luego realizamos un muestro al azar, al realizar la prueba estadística obtendríamos resultados extrapolables a la población.

El "bootstrap" no paramétrico permite estimar la distribución del muestreo de una estadística empírica sin presuponer nada acerca de la forma de la población, y sin derivar la distribución del muestreo explícitamente. Cuando consideramos un "bootstrap" no paramétrico suponemos que muestra  $S = (x_1, x_2, \dots, x_n)$  la "estiramos" para obtener una población  $P = (X_1, X_2, \dots, X_N)$ ; es decir, procedemos a "estirar" una muestra de tamaño  $n$  de entre los componentes de  $S$ , muestreando con reemplazamiento. Al resultado de este proceso se le denomina muestra bootstrap  $S^* = (x^*_1, x^*_2, \dots, x^*_n)$ . Ineludiblemente, este proceso de muestreo ha de ser con reemplazamiento pues de lo contrario, sencillamente estaríamos reproduciendo la muestra original  $S$ . Finalmente, trataríamos a la muestra  $S$  como una estimación de la población  $P$ . Podemos resumirlo así: la población es a la muestra, lo que la muestra es a la muestra "Bootstrap".

#### 3.10.6. PROGRAMAS INFORMÁTICOS

Para la realización del análisis estadístico de los datos de los apartados 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3 y 3.10.4, se emplearon los programas informáticos STAT-VIEW v.4.0. (Abacus Concepts, Inc. Berkeley, Ca. USA) y STATISTICA v.5.0. (StatSoft Inc.). El "bootstrap" utilizado se realizó en MATLAB v.6.5.. Para la realización del modelo lineal general se utilizó el programa informático SAS v. 8.2. El procedimiento GLM de SAS usa el método de mínimos cuadrados para ajustar modelos lineales generales.

## 4. DIVERSIDAD GENÉTICA Y VARIABILIDAD ADAPTATIVA *IN VITRO* DE *Neospora caninum*

Los resultados de este capítulo han sido comunicados en un congreso internacional y enviados para su publicación al Journal of Parasitology:

Pérez-Zaballos, F.J., L.M. Ortega-Mora, G. Álvarez-García, E. Collantes-Fernández, V. Navarro-Lozano, L. García-Villada, E. Costas. Adaptation of *Neospora caninum* to cell-culture changes: an argument in favour of its clonal population structure. (Enviado al J. Parasitol.)

Pérez-Zaballos, F.J, E. Costas, G. Álvarez-García, E. Collantes-Fernández, L.M. Ortega-Mora. Adaptation in cell-culture of *Neospora caninum* isolates to changing environments: an argument in favour of its asexual propagation. 6th International Meeting on Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases. Paris, Francia. 23-27 Julio, 2002.



#### 4.1. INTRODUCCIÓN

Hasta el momento, son escasos los estudios que han analizado las diferencias biológicas, antigénicas y genéticas entre aislados de *N. caninum*. En este sentido, las técnicas de tipificación molecular como la RAPD-PCR han puesto en evidencia la existencia de diversidad genética entre algunos aislados de *N. caninum* (Atkinson *et al.*, 1999; Shock *et al.*, 2001). Otras investigaciones han señalado la existencia de diferencias en la razón de crecimiento en cultivo celular, apoyando la hipótesis de la divergencia genética intraespecífica del parásito (Innes *et al.*, 1995; Shock *et al.*, 2001). Sin embargo, hasta la fecha, no se han abordado investigaciones sobre la capacidad adaptativa o las consecuencias de la interacción competitiva de los aislados de *N. caninum*. Sundermann & Estridge (1999), estudiaron la competencia *in vitro* del parásito, cultivando conjuntamente taquizoítos de *N. caninum* (aislado NC-1) y *T. gondii* (aislado RH), midiendo posteriormente los resultados de dicha competencia; el resultado mostró que todos los parámetros analizados fueron superiores en *T. gondii*: razón de crecimiento, razón de penetración y tiempo de generación.

Para el estudio *in vitro* de la capacidad adaptativa se han postulado diversos modelos. Trivisano *et al.* (1995), propusieron una prueba experimental para analizar las contribuciones del azar y de la adaptación en la evolución de poblaciones de bacterias en el laboratorio, cuando éstas eran expuestas a cambios medioambientales. En este modelo debían cumplirse dos condiciones: la incorporación de cambios ambientales que permitieran valorar la adaptación y la ausencia de reproducción sexual durante el experimento. Uno de los principales rasgos estudiados en este modelo fue el *fitness*, que es uno de los parámetros básicos ya que se trata de una medida directa de adaptación (Spiess, 1989). Para este modelo, las modificaciones en el *fitness* son debidas a cambios evolutivos, ya sea por selección natural (variaciones en la media), por deriva genética (variaciones en la varianza), o por ambas (variaciones en la media y en la varianza). Recientemente, se ha descrito la posibilidad de la existencia de la variación fenotípica clonal en protozoos, como fuerza de diversidad fenotípica complementaria a la

reproducción sexual (Meunier, 2001). Por el momento, la presencia de esta característica en *N. caninum* no se ha descrito, pero debe tenerse en cuenta a la hora de analizar los posibles resultados obtenidos.

El tipo de reproducción utilizado por los protozoos parásitos, repercute de forma directa en su estructura de población, y en consecuencia en la epidemiología de las enfermedades producidas por los mismos (Tibayrenc & Ayala, 2002). Una estructura de población clonal, con poca o ninguna presencia de reproducción sexual, mantiene líneas de genotipos idénticos con formas clínicas independientes. Sin embargo, cuando la reproducción sexual aparece frecuentemente en una especie, genera una gran diversidad de genotipos que se entrecruzan constantemente, causando cuadros clínicos homogéneos. Como ejemplo cabe citar a *T. gondii*, que mantiene un alto grado de parentesco con *N. caninum* y presenta una estructura de población clonal (Howe & Sibley, 1995). Este protozoo presenta tres líneas clonales (I, II, III), que se propagan asexualmente, generando genotipos con una secuencia de ADN idéntica. Estas líneas provocan el 95% de las infecciones, siendo causa del resto distintas variedades exóticas, que son genéticamente diversas (Volkman & Hart, 2003). Sin embargo, a pesar de la predominancia de la población clonal, la hibridación parece jugar un papel importante en la evolución genética de este parásito (Grigg, 2001).

Hasta el momento, se desconoce la estructura de población de *N. caninum*, aunque existen indicios que sugieren una estructura clonal (Shock *et al.*, 2001). El hecho de que *N. caninum*, evitando el trinquete de Muller en ausencia de reproducción sexual, pueda presentar una alta capacidad adaptativa, sugeriría el posible mantenimiento clonal del parásito. En este sentido, sabemos que la vía transplacentaria es el principal modo de transmisión en el ganado bovino, jugando un papel importante en el mantenimiento de la enfermedad (Björkman *et al.*, 1996; Paré *et al.*, 1996; Anderson *et al.*, 1997; Schares *et al.*, 1998). Por el contrario, se desconoce la importancia de la transmisión horizontal en la perpetuación del parásito en la naturaleza.

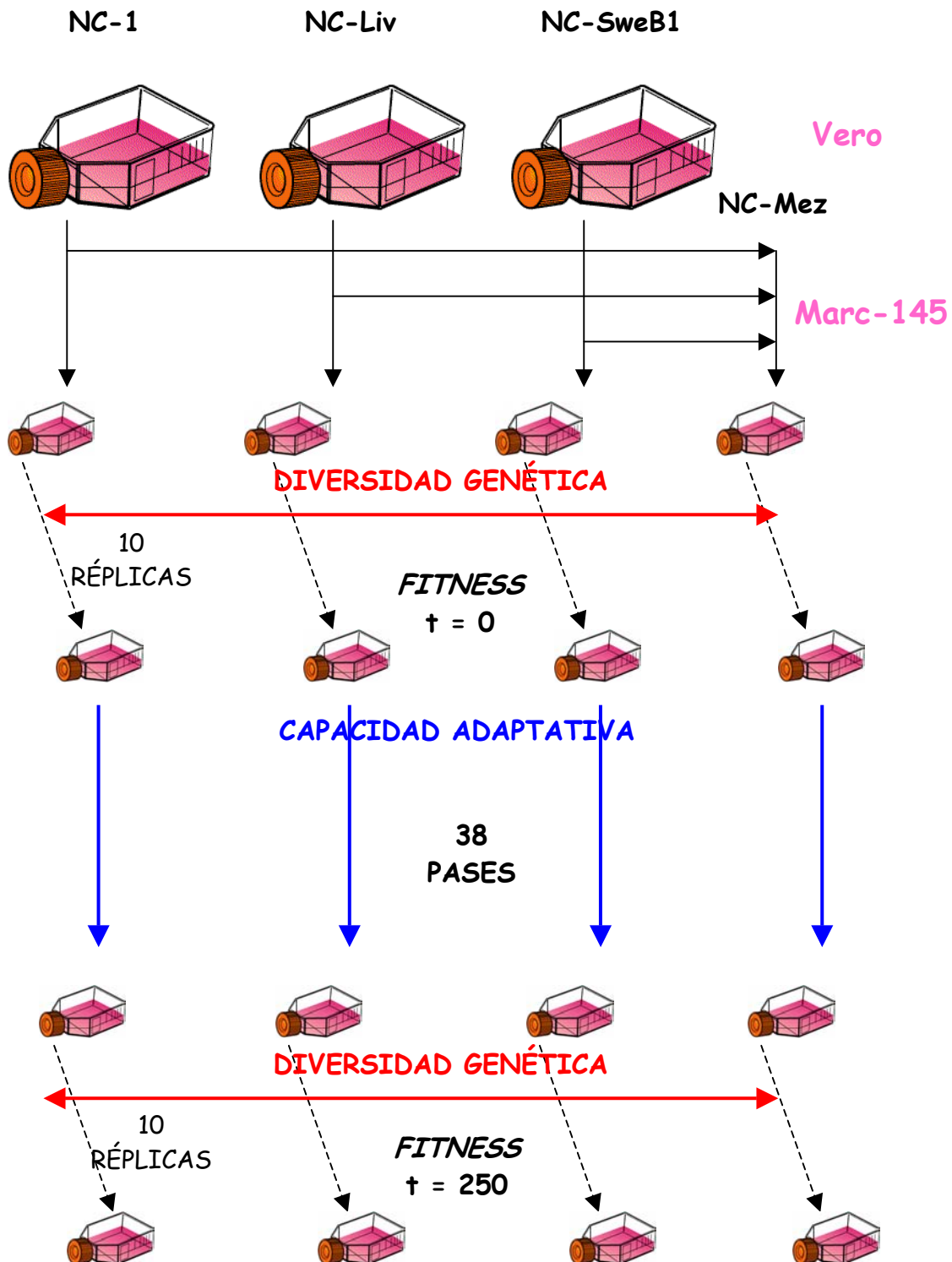
Para la consecución de este primer objetivo de la tesis, hemos adaptado el modelo de Lenski & Travisano (Travisano *et al.*, 1995), con objeto de estudiar la evolución del *fitness* de los taquizoítos de *N. caninum* tras pases seriados en cultivo celular. En particular, se investigó la capacidad de tres aislados de *N. caninum* para mantener el *fitness*, tras pases seriados en ausencia de reproducción sexual. Tres fueron los subobjetivos propuestos para este capítulo: i. Investigar la capacidad adaptativa de *N. caninum*; ii. Investigar la diversidad intraespecífica de *N. caninum*; iii. Estudiar el efecto de la interacción competitiva de los tres aislados utilizados.

#### 4.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Tres aislados de *N. caninum* (NC-1, NC-SweB1 y NC-Liverpool) se mantuvieron mediante pases seriados en la línea celular Marc-145 durante 19 semanas (38 pases ó 250 generaciones). NC-1 y NC-Liverpool son de origen canino y fueron aislados en EE.UU. y Reino Unido, respectivamente. NC-SweB1 se obtuvo en la especie bovina y fue aislado en Suecia. El diseño experimental se representa en la figura 4.

El pase de *N. caninum* en el cultivo celular se realizó dos veces por semana hasta un total de 38 pases. Para calcular el número de generaciones se tuvieron en cuenta los estudios previos sobre el cultivo del parásito en la línea celular Vero, realizados por Hemphill *et al.* (1996). Estos autores observaron que tras cuatro días en cultivo, los taquizoítos originales daban lugar a vacuolas parasitóforas que podían contener más de 100 taquizoítos. De este dato y de otros como el tiempo de generación (14 horas) (Sundermann & Estridge, 1999), puede concluirse que el parásito sufre entre 6 y 7 divisiones en cada pase. Estudios previos en nuestro laboratorio corroboraron que el parásito se multiplicaba más rápidamente cuando se cultivaba en línea celular Marc-145. Así, como mínimo, tras 19 semanas podemos encontrar taquizoítos que se han separado unas 250 generaciones, aproximadamente, de sus antecesores del inicio del experimento (7 generaciones x 38 pases = 266 generaciones en el experimento; 6 generaciones x 38 pases = 228 generaciones en el experimento).

**Figura 4.-** Esquema del diseño experimental. En el inicio del experimento los aislados de *N. caninum* fueron transferidos desde la línea celular Vero a la línea Marc-145. En ese momento se creó el aislado NC-Mez. Se obtuvieron diez réplicas de cada aislado que se mantuvieron mediante pases seriados en la línea celular Marc-145 durante 19 semanas (aproximadamente 250 generaciones). El *fitness* de cada réplica se calculó al inicio y al final del experimento. Asimismo se representan los estudios realizados en el experimento (diversidad genética en rojo y capacidad adaptativa en azul).



Hasta el comienzo del experimento, los taquizoítos se mantuvieron en la línea celular Vero, según se expone en los apartados 3.1.2., 3.1.3. y 3.2.3. del Material y métodos. El número de pases de los aislados de *N. caninum* en esta línea celular en el momento del cambio a la línea Marc-145 era de 49 para NC-1, 24 para NC-Liverpool y 19 para NC-SweB1. Para la prueba de interacción competitiva, se obtuvo un nuevo aislado, denominado NC-Mez, procedente de la adición de un tercio de la dosis total de cada uno de los otros tres aislados (figura 4).

Justo al comienzo del experimento, los aislados de *N. caninum* fueron transferidos desde los cultivos en células Vero a la línea celular Marc-145. Presenta especial relevancia este cambio de cultivo, pues es el cambio ambiental que debe generar las modificaciones adaptativas de los aislados. Los protocolos de trabajo con los cultivos y el procedimiento para la infección con los taquizoítos de *N. caninum* vienen reflejados en los apartados 3.1.2., 3.1.3. y 3.2.3. del capítulo de Material y métodos.

Para la obtención de la medida de la eficacia biológica (*fitness*) en los dos momentos,  $t = 0$  y  $t = 250$ , (apartado 3.3.2. del Material y métodos), se efectuaron en cada réplica los recuentos de los taquizoítos a las 84 horas de la anterior transferencia (apartado 3.3.1. del Material y métodos). En total, se realizaron 6 recuentos para cada réplica con el fin de aumentar la fiabilidad estadística (estudio de medias progresivas; apartado 3.3.1. del Material y métodos). La media de los 6 recuentos de cada réplica se adoptó como valor válido de la misma. El *fitness* se obtuvo introduciendo los valores medios de cada réplica en la ecuación formulada por Crow & Kimura, (1970):

$$N_t = N_0 \cdot e^{mt}$$

A continuación se realizó la media y la desviación estándar con los valores de *fitness* de cada réplica, con el fin de obtener los datos generales del aislado [para Lenski y Travisano, la Gran Media y la Gran Desviación Estándar (Travisano *et al.*, 1995)]. La comparación de los datos del *fitness* (media y desviación estándar), de los diferentes

aislados en cada momento del experimento, permitió obtener los resultados de diversidad genética. La capacidad adaptativa se estudió investigando el *fitness* de los aislados a lo largo del tiempo (figura 4). Finalmente, la comparación estadística de los datos del *fitness* del aislado NC-Mez con los datos del resto de aislados, nos permitió estudiar la interacción competitiva.

La comparación de las medias de los *fitness* de cada réplica en el estudio de capacidad adaptativa se realizó mediante la prueba estadística de la U de Mann-Whitney (apartado 3.10.1.1. del Material y métodos). La comparación de las varianzas en este estudio se realizó mediante la determinación de la F de Snedecor (apartado 3.10.1.2. del Material y métodos). Finalmente, la comparación de las medias en el estudio de diversidad genética se realizó mediante el uso de la H de Kruskal-Wallis (apartado 3.10.2. del Material y métodos).

### 4.3. RESULTADOS

#### 4.3.1. *FITNESS* DE LOS AISLADOS

La media de los recuentos obtenida para cada réplica (en  $t = 0$  y en  $t = 250$ ) se observa en las tablas 4 y 5. En la tabla 5 se puede observar que el aislado NC-SweB1, únicamente presenta 6 réplicas. Ello es debido a que cuatro de ellas se perdieron por contaminación del cultivo en el transcurso de los 38 pases que duró el experimento, por lo que se eliminaron del mismo.

Las variaciones del *fitness* (tanto de su valor medio como de su varianza) aparecidas durante el experimento, pueden ser apreciadas para los distintos aislados en la figura 5. El resultado medio de los recuentos de cada aislado se observa en la tabla 6.

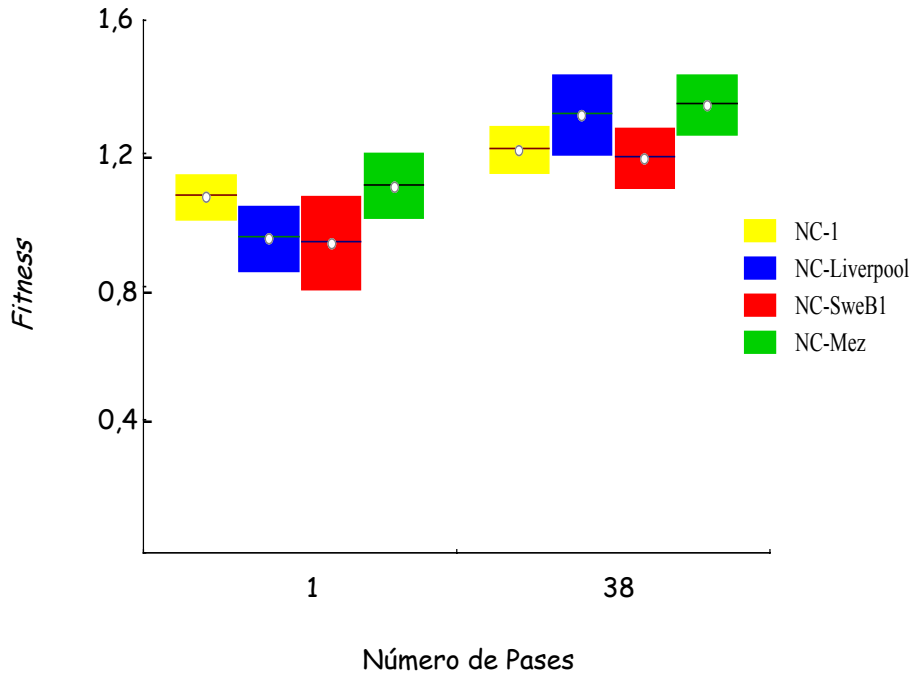
**Tabla 4.-** Media del número de taquizoítos de *N. caninum* obtenidos en cada réplica de los diferentes aislados en el experimento t = 0.

N° DE RÉPLICA	AISLADOS			
	NC-1	NC-Liv	NC-SweB1	NC-Mez
1	166,67	81,14	152,38	287,19
2	166,67	142,00	152,38	256,14
3	140,00	189,33	91,43	178,52
4	199,17	148,76	91,43	147,48
5	213,33	128,48	91,43	217,06
6	186,67	155,52	99,05	194,05
7	220,00	142,00	160,00	209,57
8	226,67	142,00	213,33	155,24
9	193,33	151,15	213,33	232,88
10	179,17	131,15	137,14	197,03

**Tabla 5.-** Media del número de taquizoítos de *N. caninum* obtenidos en cada réplica de los diferentes aislados en el experimento t = 250. (\* sin dato)

N° DE RÉPLICA	AISLADOS			
	NC-1	NC-Liv	NC-SweB1	NC-Mez
1	257,98	393,75	222,09	421,20
2	204,75	264,02	*	278,63
3	390,50	266,00	290,04	339,25
4	288,75	251,05	227,92	406,80
5	261,82	628,76	*	403,37
6	280,80	317,13	*	317,47
7	247,86	280,90	297,04	398,30
8	239,44	351,46	*	277,95
9	245,73	462,20	176,3	564,63
10	245,20	339,30	306,8	337,37

**Figura 5.-** Medias y desviaciones estándar de los valores del *fitness* de las réplicas de los diferentes aislados de *N. caninum* estudiados en los momentos pase 1 (t = 0) y pase 38 (t = 250).



**Tabla 6.-** Valor del *fitness* representado como la media y la desviación estándar de las diez réplicas de los diferentes aislados de *N. caninum* estudiados en los momentos t = 0 y t = 250.

<i>FITNESS</i>				
AISLADOS	EXPERIMENTO t = 0		EXPERIMENTO t = 250	
	Media	Desviación Estándar	Media	Desviación Estándar
NC-1	1,0684	0,0683	1,2227	0,0768
NC-Liverpool	0,9429	0,0997	1,3164	0,1192
NC-SweB1	0,9285	0,1392	1,1856	0,0899
NC-Mez	1,1016	0,0969	1,3458	0,0888

#### 4.3.2. VARIACIONES EN EL TIEMPO DEL *FITNESS*: ESTUDIO EVOLUTIVO

Los resultados de las variaciones en el tiempo del *fitness* aparecen en la tabla 7. La comparación de las medias de las réplicas para  $t = 0$  y  $t = 250$  presentó diferencias estadísticamente significativas para todos los aislados. NC-Liverpool fue el aislado que presentó mayores diferencias y NC-SweB1 y NC-1 los que menos. La comparación de las dispersiones de las réplicas en los dos momentos del experimento no presentó diferencias estadísticamente significativas en ningún aislado.

**Tabla 7.** - Valores de la U de Mann-Whitney y de la F de Snedecor resultantes de comparar las medias y las desviaciones estándar del *fitness* de las poblaciones de cada aislado de *N. caninum* estudiado en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$ .

AISLADOS	U MANN-WHITNEY		F SNEDECOR	
	U	p	F	p
NC-1	77	0,001	1,2639	0,3873
NC-Liverpool	80	0,0004	1,4287	0,3262
NC-SweB1	58	0,0024	0,4173	0,1743
NC-Mez	78	0,0007	0,8408	0,3948

#### 4.3.3. VARIACIONES INTRAESPECÍFICAS DEL *FITNESS*: ESTUDIO DE VARIABILIDAD *IN VITRO*

Los resultados del estudio de variabilidad intraespecífica aparecen en la tabla 8. Como se observa, aparecieron diferencias estadísticamente significativas en el *fitness* de los distintos aislados en los dos momentos del experimento.

**Tabla 8.** - Valor de la H de Kruskal-Wallis resultante de comparar los *fitness* de las réplicas de cada aislado de *N. caninum* en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$ .

	H	df	P
$t = 0$	13,412	3	0,0061
$t = 250$	12,132	3	0,007

#### 4.3.4. COMPETENCIA ENTRE AISLADOS

Los resultados del estudio de competencia se obtienen de la comparación estadística entre el "aislado" NC-Mez y el resto de aislados, tal y como se recoge en las tablas 4, 5, 6 y 7. Se puede observar que NC-Mez es el "aislado" con mayor *fitness* en los dos momentos del experimento ( $t = 0$  y  $t = 250$ ). Sin embargo, la pendiente de crecimiento de su *fitness* es superada por la de NC-Liverpool (figura 5 y tabla 6).

#### 4.4. DISCUSIÓN

Uno de los objetivos de este estudio fue investigar la capacidad adaptativa de *N. caninum* estudiando las diferencias encontradas en el *fitness* de tres aislados de *N. caninum* cuando se mantuvieron *in vitro*. Asimismo, también se estudiaron la diversidad genética -medida como divergencia del *fitness* de los diferentes aislados- y los fenómenos competitivos en el crecimiento conjunto de los tres aislados.

Para la consecución de estos objetivos se adaptó, mediante la comparación de su crecimiento *in vitro*, el modelo teórico propuesto por Lenski & Travisano (Travisano *et al.*, 1995). Este modelo servía a nuestros propósitos puesto que nos permitía comparar el *fitness* de los aislados en cultivo, cumpliendo las premisas básicas del mismo: realización de un cambio ambiental que supusiera un esfuerzo adaptativo para el parásito (cambio de línea celular) y ausencia de reproducción sexual durante el estudio (los taquizoítos de *N. caninum* solo se multiplican asexualmente). Además hay que considerar que el parámetro que mide este modelo teórico es el *fitness*, que es una medida directa de la capacidad de adaptación.

La elección de los aislados NC-1, NC-Liverpool y NC-SweB1, se justificó por diversos factores: representan un amplio abanico de orígenes geográficos (EE.UU., Reino Unido y Suecia) y de hospedador: NC-1 y NC-Liverpool son de origen canino; NC-SweB1 es de origen bovino.

En el presente trabajo hemos observado diferencias significativas del *fitness* entre los aislados estudiados. Estas diferencias existen en los dos momentos de medición:  $t = 0$  y  $t = 250$ , lo que sugiere la existencia de diferencias genéticas significativas entre los aislados referidos. De estas diferencias no se puede inferir razón geográfica o de especie pues NC-Liverpool (el aislado con mayor capacidad adaptativa) presenta un par para cada una de las variables: es de origen canino como NC-1 y europeo como NC-SweB1. La existencia de diversidad biológica y genética entre aislados de *N. caninum* ha sido descrita con anterioridad (Atkinson *et al.*, 1999; Schock *et al.*, 2001), con independencia del origen del hospedador y su localización geográfica (Schock *et al.*, 2001). En ambos estudios se realizaron estudios de diversidad intraespecífica, evaluándose en el primero la patogenicidad en ratón, mientras que en el segundo se midió la razón de crecimiento en cultivo celular. En los dos trabajos se estudiaron las diferencias genéticas mediante técnicas de RAPD-PCR. En ambos estudios las mayores diferencias genéticas, la mayor razón de crecimiento en cultivo celular e incluso la mayor patogenicidad se observaron, al igual que en nuestro estudio, en el aislado NC-Liverpool, por lo que se puede decir que las diferencias *in vivo* encontradas por Atkinson *et al.* (1999), tuvieron su correspondencia con los estudios *in vitro* de Shock *et al.* (2001). Nuestros resultados también corroboran los obtenidos por Innes *et al.* (1995), cuando al cambiar de cultivo celular a NC-1 y NC-Liverpool, la razón de crecimiento *in vitro* del primero fue superior al segundo (al igual que nuestros resultados en  $t = 0$ ).

Hasta el momento, no se ha estudiado la capacidad adaptativa de *N. caninum*. Únicamente Innes *et al.* (1995), realizaron un trabajo con características semejantes a las de un estudio adaptativo. En el mismo, cultivaron los aislados NC-1 y NC-Liverpool en la línea celular Vero, cambiando posteriormente a un nuevo tipo celular (fibroblastos ovinos) y midiendo a continuación la razón de crecimiento de ambos aislados. Sin embargo, los resultados no pudieron utilizarse para estudiar la adaptación, puesto que no hubo otros datos de referencia con los que relacionarlos. Nosotros en este capítulo de la

tesis hemos analizado la capacidad de *N. caninum* de evitar el trinquete de Muller, adaptándose a un nuevo hospedador, durante al menos 38 pases (250 generaciones) de cultivo seriado del parásito en la línea celular Marc-145. Nuestros resultados sugieren que *N. caninum* es capaz, no solo de evitar el trinquete de Muller a pesar de su reproducción asexual, sino que se desarrolla rápidamente debido a la sola acción de la selección natural. En solo 19 semanas, los tres aislados empleados mostraron un incremento significativo del *fitness*.

Aunque no se ha realizado ningún estudio molecular, podemos especular e incluso deducir la causa de la rápida evolución. Es importante señalar que nuestro experimento se realizó con organismos reproduciéndose en forma de población clonal. Bajo esta circunstancia, la única fuerza de variabilidad, desde el punto de vista clásico, es la mutación genética, dado que la variabilidad genética no pudo ser originada por recombinación. De este modo, el hecho de que las mutaciones confieran una ventaja en la explotación del nuevo ambiente puede ser favorecido por la selección natural. La rápida evolución observada en *N. caninum* se debería por lo tanto a raras mutaciones beneficiosas de gran efecto. Esto es así porque la otra explicación a los resultados parece improbable debido a que son necesarias muchas más generaciones para que las mutaciones beneficiosas de pequeño efecto alcancen una frecuencia en la cual tengan un efecto tan apreciable como el sucedido en nuestro experimento. Como ha sido bien ilustrado en organismos haploides, la frecuencia de aparición de un genotipo mutado en una población en un tiempo  $t$  esta dada por  $R(t) = \ln R(0) + st$  (Dykhuizen and Hartl, 1983; Elena *et al.*, 1996), donde  $R(0)$  es la frecuencia inicial del genotipo mutado en la población estudiada;  $R(t)$  es la frecuencia en el tiempo  $t$ ; y  $s$  es el coeficiente de selección. En concordancia con esta ecuación, considerando a *Neospora* haploide (una razón beneficiosa para una mutación de corto efecto), y teniendo una ventaja selectiva del 0,1%, se requerirían 8570 generaciones para alcanzar una frecuencia del 50% si se partiera de una frecuencia inicial de  $10^{-4}$ . Tal mutación tendría una probabilidad 100 veces mayor de perderse al azar por deriva genética que de acabar teniendo en la población un 10% de ventaja selectiva (Haldane, 1932). Por lo tanto, no existe posibilidad

de atribuir a mutaciones de pequeño efecto la perpetuación de *N. caninum* en el cultivo celular. Por el contrario, una mutación beneficiosa de gran efecto con una ventaja selectiva de un 10% solo necesitaría 85 generaciones, por lo que la presencia de una mutación beneficiosa de gran efecto es un fenómeno que no puede desecharse, en nuestro experimento.

Sin embargo, recientemente se han desarrollado nuevas hipótesis diferentes de la mutación que podrían explicar nuestros resultados. Así, la variación clonal de la expresión de genes, ha sido propuesta como una fuerza de diversidad fenotípica en protozoos parásitos (Meunier, 2001), y su presencia ha sido demostrada en *T. brucei* (Turner, 1997), *G. duodenalis* (Muller and Gottstein, 1998) y en diferentes especies de *Plasmodium* (Scherf *et al.*, 1998). Aunque nada se conoce sobre la existencia de este fenómeno en *N. caninum*, su aparente prevalencia en otros protozoos parásitos sugieren su posible presencia en este patógeno. Efectivamente, la variación fenotípica clonal puede ser una explicación para nuestros resultados. Al asegurar la aparición de diferentes fenotipos en cada generación, siempre alguno de ellos podría propagarse durante largo tiempo gracias a sus ventajas fenotípicas. Con todo ello podemos concluir que nuestros resultados evidencian cambios adaptativos en *N. caninum*, aunque no podamos definir si éstos son debidos al efecto de las mutaciones o al concurso de fenómenos de variación fenotípica clonal.

Las consecuencias prácticas que suponen la capacidad de *N. caninum* de salvar el trinquete de Muller *in vitro* son notables. En principio, podría especularse que el parásito tendría la capacidad de propagarse de modo vertical (con reproducción asexual) sin intervención del hospedador definitivo (cánidos). Estos datos confirmarían desde un punto de vista teórico los resultados que sugieren que la vía transplacentaria (como modo más frecuente e importante de transmisión vertical) es el principal modo de propagación de *N. caninum*, al menos en el ganado bovino, interpretando un papel dominante en el mantenimiento de la enfermedad (Björkman *et al.*, 1996; Paré *et al.*, 1996; Anderson *et al.*, 1997; Schares *et al.* 1998). Sin embargo, *in vivo*, el cuello de

botella que se produce en toda transmisión podría ser más intenso que el que hemos aplicado nosotros. Un ejemplo sería la transmisión vertical de algunos patógenos (Bergstrom *et al.*, 1999) (como *N. caninum*) que deben atravesar una gran variedad de barreras que protegen el desarrollo del embrión. En realidad, el hospedador y los factores externos -momento de la infección o estatus inmune del animal- pueden ser decisivos en la transmisión del parásito en la naturaleza.

El tipo de estructura de población en parásitos patógenos, tiene importantes consecuencias genéticas y médicas (Tibayrenc *et al.*, 1986). En ausencia de apareamiento, cada variedad de patógeno identificado sería un clon natural y, por lo tanto, una genética idéntica independiente que necesita ser estudiada por separado, con el fin de establecer sus características biológicas y patológicas (Tibayrenc *et al.*, 1986). Un modelo de estructura de población clonal, no implica que la reproducción sexual esté totalmente ausente, sino que se produce con una insuficiente frecuencia para prevenir la aparición y propagación de líneas uniparentales, caracterizadas por ser estables en el tiempo y el espacio (Tibayrenc *et al.*, 1991). La estructura de población clonal ha sido recientemente propuesta para un gran grupo de patógenos, desde bacterias a protozoos (Tibayrenc & Ayala, 2002). En este sentido, tiene especial relevancia la presencia de *T. gondii* dentro de este grupo de protozoos con estructura de población clonal (Howe & Sibley, 1995; Grigg *et al.*, 2001; Grigg & Suzuki, 2003 y Volkman & Hartl, 2003). En la actualidad se han encontrado al menos dos cepas (Ajzenberg *et al.*, 2002), y posiblemente una tercera (Howe & Sibley, 1995). Sin embargo, a pesar de la propagación clonal, los fenómenos de hibridación presentan importantes repercusiones clínicas y juegan un papel significativo en la evolución genética del parásito (Grigg *et al.*, 2001). Las poblaciones de parásitos con estructura clonal solo se pueden mantener si son capaces de evitar el trinquete de Muller. En relación con ello, como conclusión del presente estudio, puede señalarse que *N. caninum* es capaz, *in vitro*, de salvar el trinquete de Muller en ausencia de reproducción sexual, existiendo varios mecanismos para evitarlo, tales como presentar bajas razones de mutación, tener un gran tamaño de inóculo o que el número de replicaciones del patógeno entre cada transmisión sea muy

alto, entre otros (Bergstrom *et al.*, 1999). Por otro lado, en la actualidad es un hecho admitido que la vía transplacentaria presenta un papel determinante en el mantenimiento de la neosporosis bovina. Además, el pequeño valor de las dispersiones del *fitness* en nuestro estudio, indican la presencia de sobrerrepresentación y de genotipos idénticos en *N. caninum* (Travisano *et al.*, 1995). Todo ello nos hace sugerir que la estructura clonal se debe de mantener como posible base de las poblaciones de *N. caninum*. Será necesario comprobar más criterios (Tibayrenc & Ayala, 2002), tales como el desequilibrio de ligamientos, la fijación de heterocigotos, la ausencia de segregación de genotipos, la desviación del equilibrio de Hardy-Wiemberg o la ausencia de genotipos recombinantes entre otros, para alcanzar conclusiones definitivas.

Por otra parte, también hemos analizado el efecto de la interacción competitiva entre de NC-1, NC-SweB1 y NC-Liverpool sobre el *fitness*. El valor del *fitness* de la mezcla fue mayor que los de los otros aislados, tanto al principio como al final. Estos resultados concuerdan con la teoría de selección de parientes, que predice que la coinfección con parásitos genéticamente relacionados en el mismo hospedador, conduce hacia una mayor virulencia del parásito (Hamilton, 1964). Además la virulencia, considerada como el resultado directo de una reproducción más rápida del parásito (Bull, 1994), podría incrementarse inclusive en el primer pase bajo la infección de variedades mixtas (Davies *et al.*, 2002). Una interesante pregunta por resolver es, si el incremento de la virulencia es realmente debido a las alteraciones en la razón reproductiva del parásito o por una menor efectividad del hospedador contra las infecciones genéticamente heterogéneas, o ambas. Nuestros resultados apoyan la primera hipótesis, debido a que en un cultivo celular el motivo de un mayor crecimiento es la mayor razón reproductiva.

Como conclusión, en contraste con las predicciones clásicas del trinquete de Muller, los datos obtenidos del *fitness* de los tres aislados mostraron la capacidad de rápidos cambios adaptativos. Además, corroborando los trabajos hasta ahora existentes, se ha encontrado diversidad biológica y genética entre los aislados

estudiados. Todos los datos apoyan la importancia de la propagación asexual de *N. caninum* en la naturaleza mediante la vía transplacentaria y la existencia de una estructura de población clonal para este protozoo.

## 5. DIVERSIDAD PATOGENICA DE *Neospora caninum* EN EL MODELO MURINO

Los resultados parciales de este capítulo han sido comunicados en el siguiente congreso:

Pérez-Zaballos, F.J., E. Collantes-Fernández, A. Rodríguez-Bertos, G. Álvarez-García, M. Gómez-Bautista, L.M. Ortega-Mora. Comparison of the pathogenic diversity among *Neospora caninum* isolates in a mouse model. 6th International Meeting on Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases. Paris, Francia. 23-27 Julio, 2002.



## 5.1. INTRODUCCIÓN

En el momento actual, las evidencias existentes sugieren la presencia de una marcada variación en las propiedades biológicas de los diferentes aislados de *N. caninum*, semejante a la observada en su pariente cercano *T. gondii*. En principio, los diversos estudios realizados han comprobado la presencia de notables diferencias en el comportamiento patogénico de *N. caninum* en el modelo murino (Lindsay & Dubey, 1989d, 1990b; Lindsay *et al.*, 1995b; McGuire *et al.*, 1997; Atkinson *et al.*, 1999; Shibajara *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 2002; Collantes-Fernández *et al.*, 2004). Además, la existencia de esta variabilidad patogénica se ha visto correspondida *in vitro* con la aparición de diferencias genéticas y de multiplicación del parásito en cultivos celulares (Shock *et al.*, 2001). Esta variabilidad se ha observado tanto entre aislados obtenidos en diferentes zonas geográficas (McGuire *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 2002), como entre aislados obtenidos de diferentes especies animales (Atkinson *et al.*, 1999).

Por otra parte, los trabajos realizados hasta la fecha han presentado resultados controvertidos cuando analizaron la influencia del mantenimiento prolongado del parásito en cultivo celular sobre la virulencia ejercida *in vivo*. Por un lado, Long *et al.* (1998), encontraron que *N. caninum* atenuaba su virulencia *in vivo* tras someterle a pases continuados en cultivo celular; por otro, Atkinson *et al.* (1999), observaron que, tras 14 meses cultivando el parásito en la línea celular Vero, no aparecía atenuación de la sintomatología observada en un modelo murino.

La mayor parte del conocimiento sobre la patogenia de la neosporosis se debe a la información obtenida de las infecciones experimentales en el modelo murino (Khan *et al.*, 1997; Long *et al.*, 1998; Baszler *et al.*, 1999b; Eperon *et al.*, 1999; Shibahara *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 2000b), siendo muchos los factores que influyen en la respuesta del ratón a la infección: la estirpe de ratón utilizada, el aislado del parásito, la dosis y vía de inoculación o la utilización de tratamientos inmunodepresores (Innes *et al.*, 2000; Collantes-Fernández *et al.*, 2004). La influencia de estos factores hace que exista una

gran variabilidad en los cuadros clínicos en este modelo: desde ratones que presentaron resistencia a la infección, hasta la aparición de altas tasas de mortalidad. A pesar de ello, compilando la información disponible hasta el momento, se puede hablar de un patrón nosológico definido, con una fase aguda en la que se presentan signos inespecíficos y una fase crónica con sintomatología nerviosa (Lindsay & Dubey, 1989d, 1990b; Lindsay *et al.*, 1995b; McGuire *et al.*, 1997; Atkinson *et al.*, 1999; Eperon *et al.*, 1999; Gottstein *et al.*, 2001; Collantes-Fernández *et al.*, 2004). Los parámetros objeto de estudio en el modelo murino han sido muy variados. Junto a los parámetros básicos de cualquier infección -mortalidad, sintomatología y cuadro de lesiones (Lindsay & Dubey, 1989d y 1990b; Lindsay *et al.*, 1995b; Gottstein *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 2002; Collantes-Fernández *et al.*, 2004)-, encontramos parámetros diagnósticos más elaborados tales como la medición de anticuerpos específicos mediante IFI (Eperon *et al.*, 1999), ELISA (Baszler *et al.*, 2000) o Western-blot (Miller *et al.*, 2002) y la investigación de la distribución orgánica del parásito mediante la detección por técnicas histológicas (Shibahara *et al.*, 1999), o de PCR (Eperon *et al.*, 1999; Nishikawa *et al.*, 2001), o la cuantificación mediante técnicas inmunohistoquímicas (Long *et al.*, 1998; Baszler *et al.*, 1999) o de PCR-cuantitativa (Liddell *et al.*, 1999; Collantes-Fernández *et al.*, 2004).

Hasta el momento, no se han descrito estudios que investiguen el efecto de la interacción competitiva entre distintos aislados sobre la patogenicidad de *N. caninum*. Por lo tanto, se desconocen los cambios que se pudieran generar en el cuadro clínico de la neosporosis murina tras la coinfección por diferentes aislados del parásito. A este respecto, la infección múltiple con dos cepas de *T. gondii* generó una descendencia más virulenta que las poblaciones ancestrales.

El objetivo de este capítulo de la tesis doctoral fue investigar la diversidad patogénica de *N. caninum* en el modelo murino, así como el efecto sobre la misma del mantenimiento continuado del parásito en el cultivo celular. En particular se estudió la mortalidad y la sintomatología, se determinó la IgG sérica específica, la intensidad de

las lesiones y la carga parasitaria en los tejidos y órganos diana, durante la fase aguda y crónica de la infección. Para ello se plantearon los siguientes subobjetivos: i. Investigar la diversidad patogénica intraespecífica de *N. caninum*. ii. Estudiar el efecto del mantenimiento continuado en cultivo celular sobre la virulencia del parásito. iii. Estudiar el efecto de la interacción competitiva de los varios aislados sobre la patogenicidad.

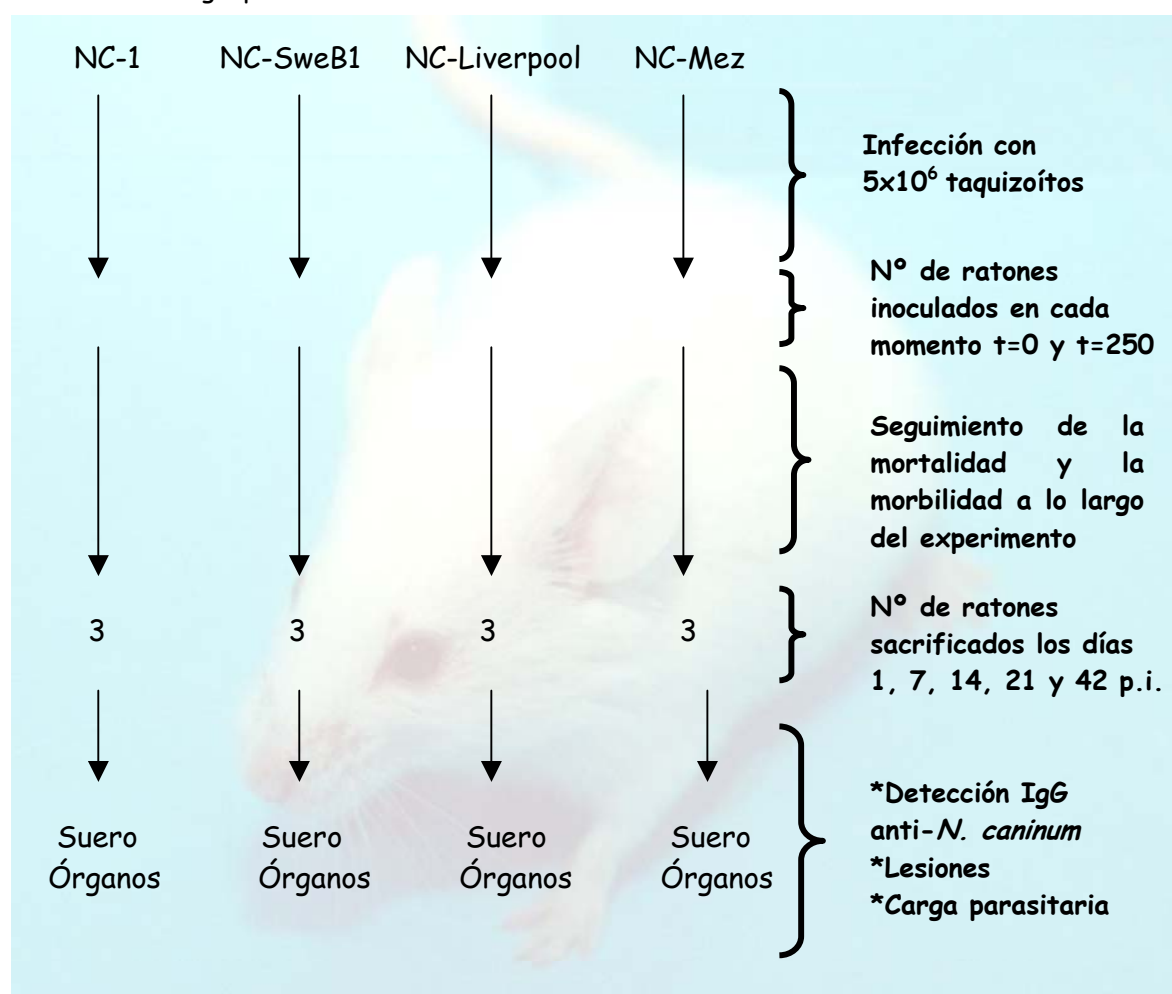
## 5.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la realización del experimento se infectaron 124 ratones hembra de la estirpe BALB/c de seis semanas de edad, tal y como se expone en el apartado 3.4.2. del Material y métodos. Los taquizoítos se obtuvieron a partir del cultivo celular del parásito en células Marc-145, siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2.3. del Material y métodos. Para la infección, se procedió a inocular intraperitonealmente los animales con  $5 \times 10^6$  taquizoítos de los aislados NC-1, NC-Liverpool y NC-SweB1, procedentes de los pases 1 (momento  $t = 0$ ) y 38 (momento  $t = 250$ ) en la línea celular Marc-145, tal y como se especifica en el capítulo 4 de la tesis. Se infectaron 15 ratones por aislado en cada momento del experimento (figura 6), excepto cuando se utilizó el aislado NC-Liverpool en el momento  $t = 250$ , en el que debido a la alta mortalidad observada con este aislado en el momento  $t = 0$  se aumentó el número de ratones ( $n = 19$ ). Para la realización del estudio de interacción competitiva se inocularon los ratones con el "aislado" NC-Mez (apartado 3.2.2. del Material y métodos), originando así, una coinfección con los aislados NC-1, NC-SweB1 y NC-Liverpool. También se inocularon 15 ratones con PBS estéril que fueron utilizados como grupo testigo.

Los ratones permanecieron a lo largo del experimento en condiciones de mantenimiento normalizadas (apartado 3.4.1. del Material y métodos). Se sacrificaron tres ratones de cada grupo (apartado 3.6. del Material y métodos) los días 1, 7, 14, 21 y 42 p.i.. Estos días se eligieron con el fin de abarcar la fase aguda y crónica de la infección. Durante el experimento se realizó la inspección clínica de los ratones con el fin de recoger la sintomatología aparecida. La sintomatología observada a lo largo de una semana en los ratones inoculados con cada aislado y en cada momento ( $t = 0$  y  $t = 250$ ), se

calificó mediante un sistema de cruces, asignando dos cruces cuando eran graves y una cruz si eran moderados. Para asignar tal valor al aislado en cuestión, el número de ratones que presentaban los síntomas en una semana determinada debían superar la mitad del total. Si se observara mortalidad durante el experimento, los datos clínicos correspondientes a los ratones fallecidos se agruparían con los valores obtenidos en los ratones sacrificados en los días preseñalados más próximos.

**Figura 6.-** Representación gráfica del diseño experimental. El esquema de trabajo fue el mismo en los dos momentos ( $t = 0$  y  $t = 250$ ). En el grupo testigo se siguieron los mismos procedimientos que en los demás grupos.



\*n = 15 en  $t = 0$  y n = 19 en  $t = 250$

Se realizó la necropsia (apartado 3.6. del Material y métodos) de los ratones sacrificados y fallecidos, anotándose las lesiones macroscópicas encontradas. Seguidamente, se procedió a la recogida de las siguientes muestras: suero, hígado,

pulmón, corazón, sistema nervioso central, bazo y riñón (apartado 3.6. del Material y métodos).

El análisis histológico de los órganos (apartado 3.7.1. y 3.7.2. del Material y métodos), se basó en la observación de las lesiones compatibles con la infección por *N. caninum*. Primero se describieron las lesiones, y a continuación se les asignó un grado de intensidad (apartado 3.7.3. Material y métodos). Los resultados se analizaron estadísticamente aplicando un GLM (apartado 3.10.4. del Material y métodos).

A continuación, se cuantificó mediante una PCR-cuantitativa en tiempo real el ADN del parásito en los órganos elegidos (apartado 3.8.3.1. del Material y métodos): hígado, pulmón, corazón y sistema nervioso central. Los resultados obtenidos en el estudio de las lesiones junto a otras investigaciones previas realizadas en el laboratorio desaconsejaron realizar esta prueba en el riñón y el bazo. Las lesiones encontradas en el riñón fueron siempre moderadas y, en ningún momento, superaron el grado de intensidad 2. Por otra parte, se observó que el tipo de lesiones encontradas en el bazo eran consecuencia de la respuesta inmunológica a la infección por el parásito y no de la multiplicación del mismo en el órgano. Los resultados de la cuantificación de ADN de *N. caninum* se procesaron estadísticamente mediante la prueba de "bootstrap" (apartado 3.10.5. del Material y métodos).

Por último, se realizó un estudio de correlación estadística entre la intensidad de las lesiones y la carga parasitaria en los órganos estudiados (apartado 3.10.3. del Material y métodos).

Las muestras de suero recogidas se analizaron por IFI (apartado 3.9.2. del Material y métodos), para la detección de la IgG sérica anti-*N. caninum*. El análisis estadístico de los datos obtenidos para los diferentes aislados en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$  se realizó mediante la prueba de la H de Kruskal-Wallis. La comparación de los

resultados obtenidos para los ratones inoculados con cada aislado entre  $t = 0$  y  $t = 250$ , se realizó mediante la prueba de la U de Mann-Whitney.

### 5.3. RESULTADOS

#### 5.3.1. MORTALIDAD Y MORBILIDAD

La mortalidad se presentó, principalmente, durante las fases aguda y subaguda de la infección, y únicamente, en los ratones infectados con el aislado NC-Liverpool, en los que se observó una alta mortalidad en los dos momentos del experimento (tablas 9 y 10). Por el contrario, los grupos de ratones infectados con los aislados NC-1 y NC-SweB1, no presentaron mortalidad.

**Tabla 9.** - Mortalidad en los ratones inoculados con el aislado NC-Liverpool en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$ . (\*Número de ratones fallecidos).

Día p.i.	$t = 0$	$t = 250$
6	2*	5
7	4	1
16	1	
17		1
20		2
21		

La sintomatología se presentó, fundamentalmente, en los ratones inoculados con el aislado NC-Liverpool, y fue aumentando tanto en número de animales afectados como en gravedad a partir del segundo día p.i. (tabla 10). En las primeras semanas se observaron síntomas inespecíficos, mostrándose los animales inmóviles, apáticos, encorvados y con el pelo erizado. Algunos animales no superaron este periodo y murieron durante la fase aguda de la enfermedad. A partir de la segunda semana p.i. se observó la presencia de sintomatología nerviosa que consistió en: debilidad del tercio posterior, que osciló desde

la paresia a la parálisis completa, incoordinación de movimientos, temblores de cabeza y torneo.

**Tabla 10.-** Mortalidad y sintomatología en los ratones inoculados con el aislado NC-Liverpool en t = 0 y t = 250. Se han graduado los síntomas en ++ (graves), + (moderados) y - (ausentes).

		Primera		Segunda		Tercera		4 <sup>a</sup> /6 <sup>a</sup>	
		Semana p.i.		semana p.i.		Semana p.i.		Semana p.i.	
		t = 0	t = 250	t = 0	t = 250	t = 0	t = 250	t = 0	t = 250
<b>Razón de Mortalidad</b>		<b>6/15</b>	<b>6/19</b>			<b>1/15</b>	<b>3/19</b>		
<b>Síntomas</b>	Pelo erizado	++	++	++	++	++	++	++	++
	Inmóviles Encorvados	++	++	++	++	-	-	-	-
	Torneo	-	-	-	-	++	++	++	++
	Paresia 1/3 posterior	-	-	-	-	++	++	++	++

Sin embargo, los ratones inoculados con los aislados NC-1 y NC-SweB1 presentaron una sintomatología mucho menos grave, afectando a un número pequeño de animales, y siempre circunscrita a los síntomas inespecíficos no nerviosos. Ésta apareció en la primera semana p.i. y se mantuvo durante toda la fase experimental. No se apreciaron signos clínicos (ni sintomatología, ni mortalidad) en el grupo testigo.

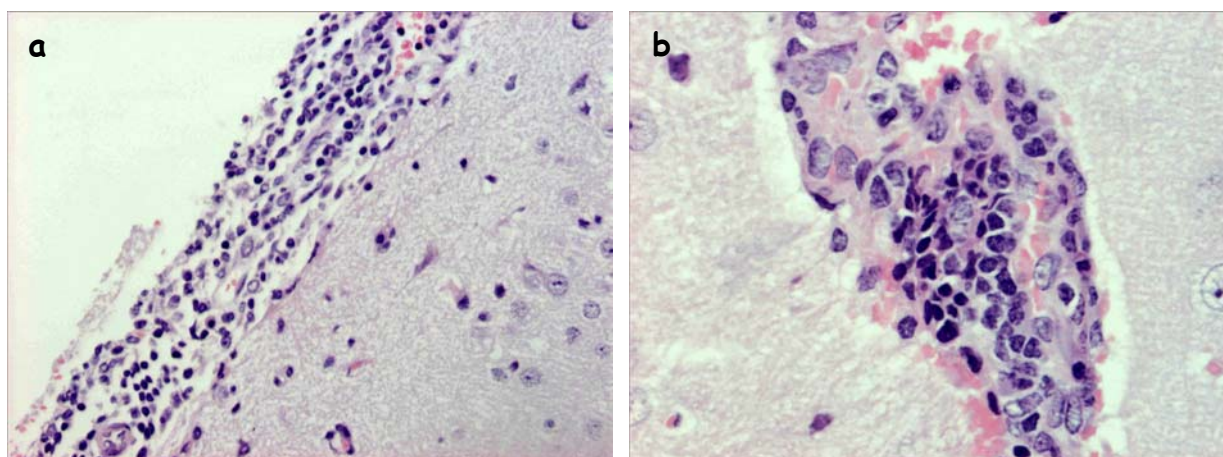
### 5.3.2. LESIONES

Los órganos en los que se realizó el estudio de las lesiones fueron: SNC, corazón, pulmón, hígado, bazo y riñón. No se detectó ninguna lesión cuando se analizaron los órganos de los ratones del grupo testigo.

### 5.3.2.1. Sistema Nervioso Central

No se apreciaron lesiones macroscópicas en el SNC. Los hallazgos histopatológicos se localizaron en la corteza cerebral y en la medula oblongada. Todas las lesiones encontradas tuvieron carácter inflamatorio. Se observó la presencia de meningitis linfocítica (figura 7a), consistente en una infiltración de células redondas a nivel meníngeo, manguitos perivascular (figura 7b), gliosis (figura 8c), y acúmulos focales de microglías (nódulos gliales)

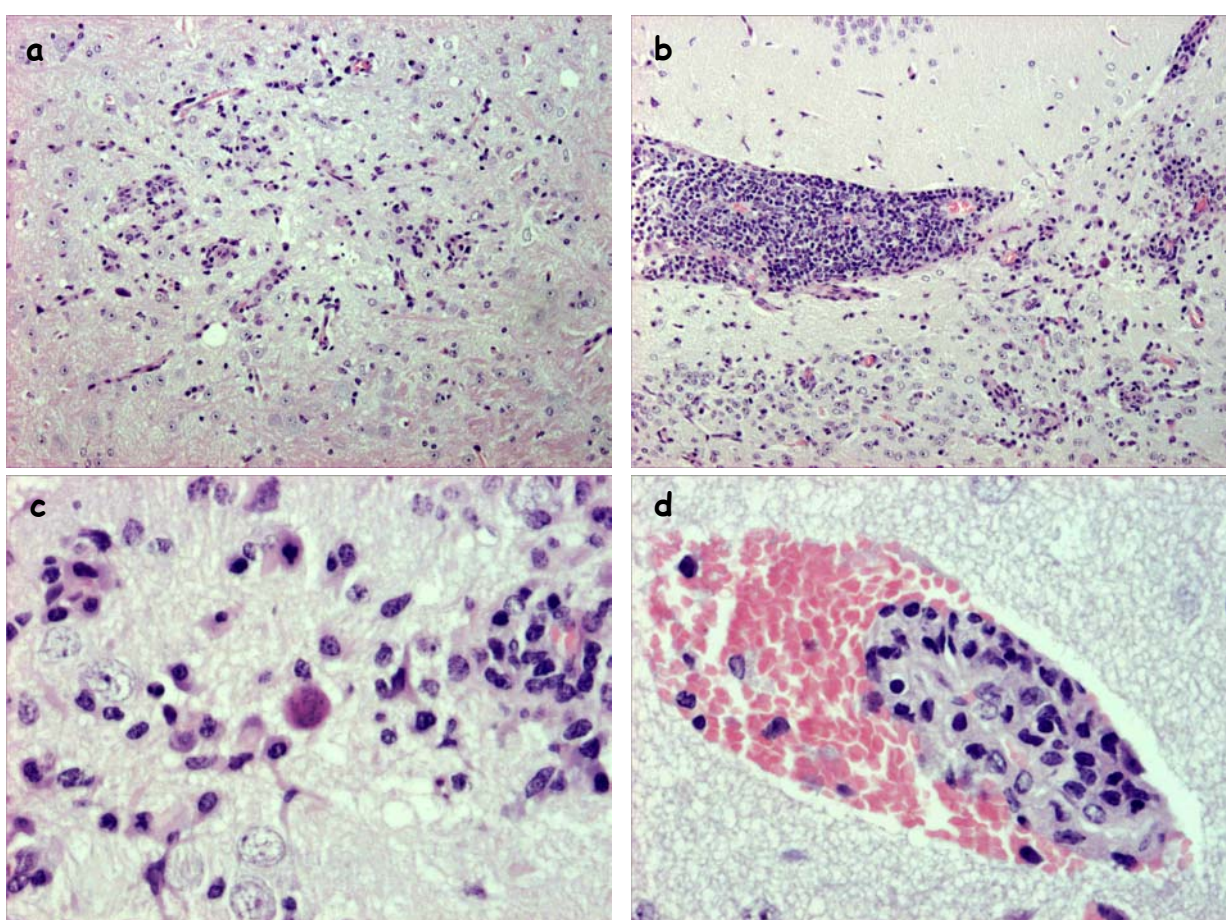
**Figura 7.-** Lesiones en el SNC de un ratón inoculado con el aislado NC-Liverpool (Día 42; t = 250): a) Meningitis no supurativa. HE. 10x; b) Manguito perivascular de células redondas. HE. 40x.



También se observó encefalitis (figura 8b), consistente en una infiltración difusa de células inflamatorias (linfocitos, microglías y/o monocitos, células plasmáticas e incluso algunos neutrófilos), tanto en sustancia blanca como gris, y granulomas parasitarios (figura 8a), caracterizados por áreas de necrosis por coagulación, rodeadas por microglías y células redondas (linfocitos, histiocitos y células plasmáticas). En algunos animales se detectó la presencia de estructuras compatibles con estadios de desarrollo del parásito (vacuolas parasitóforas o quistes; figura 8c), fundamentalmente en el SNC de los ratones infectados con el aislado NC-Liverpool en ambos momentos (t = 0 y t = 250), a partir del día 6 p.i. hasta el último día del experimento. También se

detectaron estas estructuras en los ratones infectados con el aislado NC-1 el día 21 p.i. del momento  $t = 0$  y el día 7 p.i. del momento  $t = 250$ , y con el aislado NC-SweB1 el día 21 del momento  $t = 250$ .

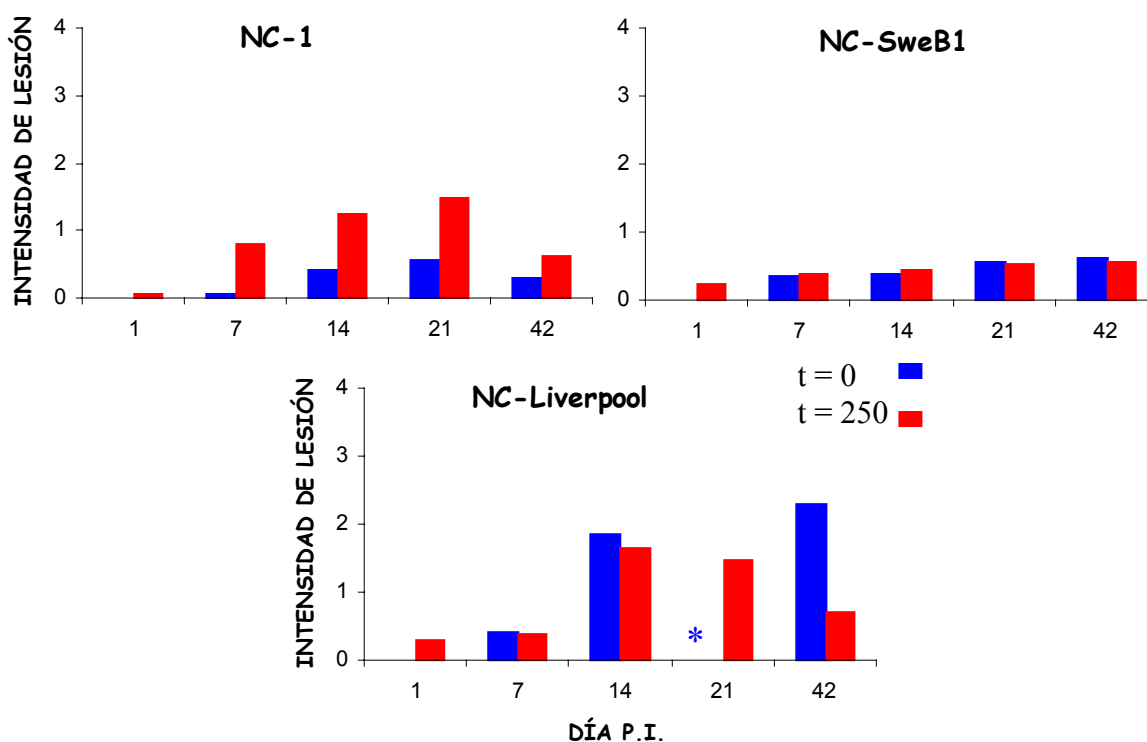
**Figura 8.-** Lesiones en el SNC de un ratón inoculado con el aislado NC-Liverpool (Día 42;  $t = 250$ ): a) Granuloma. Reacción glial. HE 10x; Lesiones en el SNC del ratón inoculado con el aislado NC-Liverpool (Día 7;  $t = 0$ ): b) Reacción encefalítica a la presencia de vacuolas parasitóforas de *N. caninum*. HE. 10x; c) Foco inflamatorio en la sustancia blanca con marcada gliosis asociada a la presencia de estadios de desarrollo del parásito. HE. 40x; d) Foco hemorrágico perivascular. HE. 40x.



El SNC fue uno de los órganos que presentó un cuadro histopatológico más marcado. La evolución de la intensidad de las lesiones del SNC durante el experimento fue ascendente, con lesiones más graves en los días 14-21 p.i., disminuyendo posteriormente en el día 42 p.i., excepto en el momento  $t = 0$ , donde los ratones inoculados con el aislado NC-Liverpool presentaron las lesiones más intensas en el día 42

p.i. (figura 9). Sin embargo, la cinética de la intensidad de las lesiones mostró que los ratones infectados con el aislado NC-SweB1 presentaron lesiones leves durante todo el experimento. La presentación de las lesiones fue más precoz en el momento  $t = 250$  para todos los aislados.

**Figura 9.-** Evolución de la media aritmética de la intensidad de las lesiones en el SNC de los ratones inoculados con los distintos aislados de *N. caninum* en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$  de su pase por el cultivo celular. (\* Sin datos)



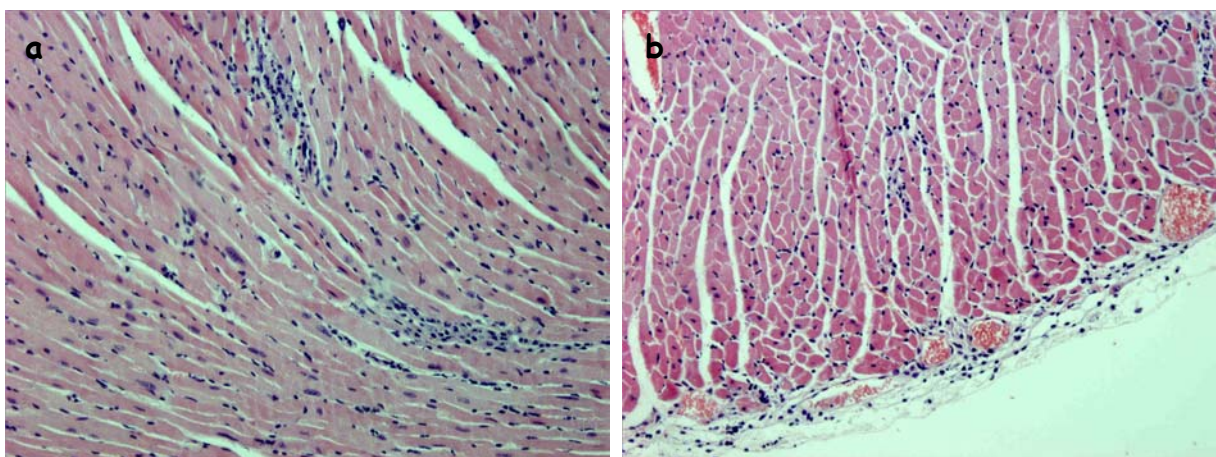
Los resultados del GLM (Anexo I), evidenciaron importantes diferencias estadísticas en las lesiones causadas en el SNC por los distintos aislados. La probabilidad de error de estas diferencias para el factor aislado fue de  $p < 0,0001$ . Así, la intensidad de las lesiones de los ratones infectados con el aislado NC-Liverpool presentó diferencias significativamente estadísticas de  $p < 0,0001$  con respecto de la observada en los ratones infectados con NC-SweB1 y de  $p < 0,0004$  con respecto de la intensidad existente en los inoculados con NC-1. La intensidad de las lesiones de los grupos de ratones infectados con los aislados NC-1 y NC-SweB1 presentó un comportamiento estadísticamente homogéneo. Cuando se estudió el efecto del pase por

cultivo celular sobre la virulencia del parásito, se encontraron diferencias significativas entre las lesiones encontradas en  $t = 0$  y  $t = 250$  a favor de las segundas con  $p < 0,0001$ . El estudio estadístico de la intensidad de las lesiones también reveló diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ) cuando analizamos la evolución de las mismas a través de los distintos días p.i.. El valor del coeficiente de determinación fue de  $R = 0,742035$ .

### 5.3.2.2. Corazón

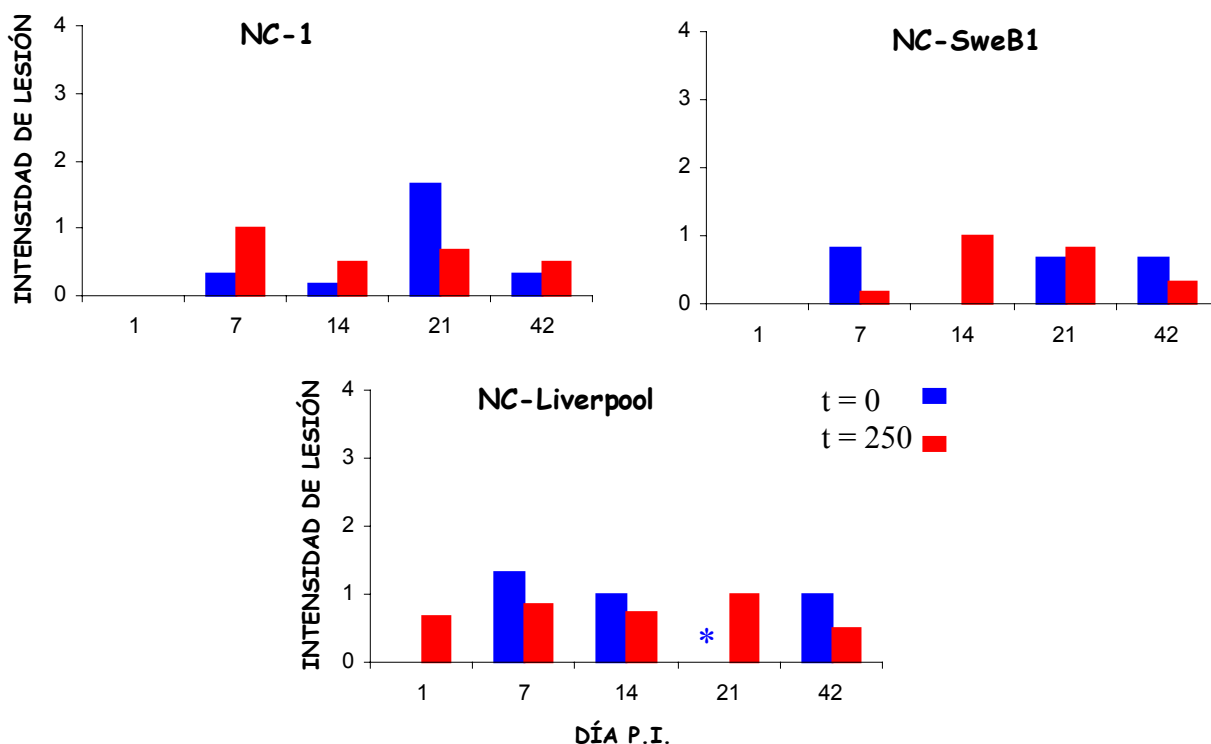
No se apreciaron lesiones macroscópicas en el corazón. Histológicamente las lesiones observadas fueron poco intensas. Se observó una infiltración de células redondas en pericardio (pericarditis; figura 10b) y una infiltración difusa de linfocitos, células plasmáticas e histiocitos en las fibras musculares cardíacas (miocarditis linfocítica difusa; figura 10a).

**Figura 10.-** Lesiones en corazón de un ratón inoculado con el aislado NC-Liverpool (Día 7;  $t = 250$ ) a) Miocarditis linfocítica moderada. HE. 20x; b) Pericarditis linfocítica. HE. 20x.



La intensidad de las lesiones en el corazón presentó un carácter de leve a moderado. El estudio de la evolución en el tiempo de esta intensidad (figura 11), revela que las lesiones comenzaron, por regla general, a partir del día 7 p.i. y se mantienen, con algunas ligeras variaciones, hasta el día 42 p.i..

**Figura 11.** - Evolución de la media aritmética de la intensidad de las lesiones en el corazón de los ratones inoculados con los distintos aislados de *N. caninum* en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$  de su pase por el cultivo celular. (\* Sin datos)

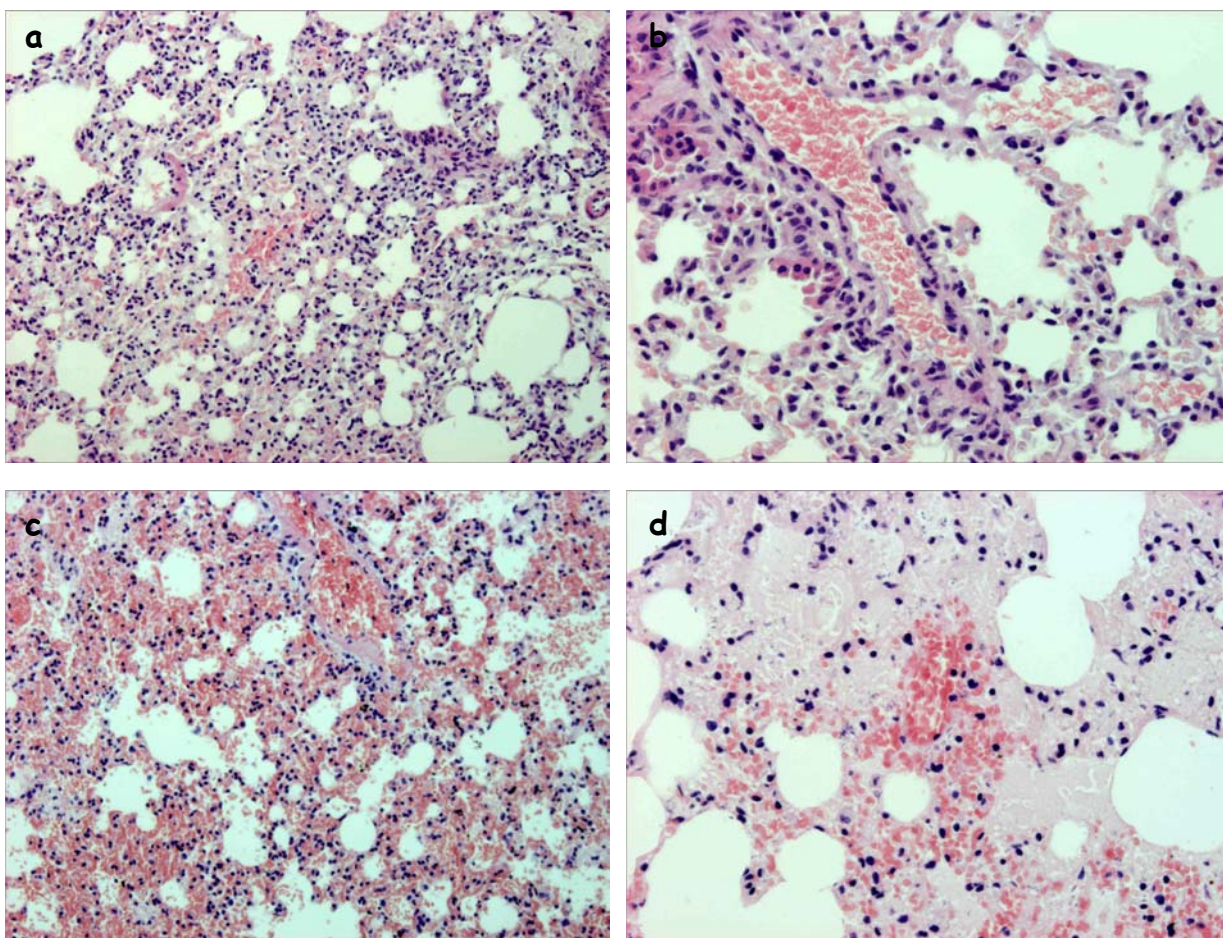


Los resultados del GLM (Anexo I), pusieron en evidencia diferencias estadísticas en las lesiones causadas en el corazón por los distintos aislados. La probabilidad de error de estas diferencias para el factor aislado fue de  $p < 0,0001$ . Así, la intensidad de las lesiones en los ratones infectados con el aislado NC-Liverpool presentó diferencias significativamente estadísticas de  $p < 0,0014$  con respecto a la observada en los ratones infectados con NC-SweB1 y de  $p < 0,0002$  con respecto a la intensidad existente en los inoculados con NC-1. La intensidad de las lesiones de los grupos de ratones infectados con los aislados NC-1 y NC-SweB1 presentó un comportamiento estadísticamente homogéneo. Cuando se estudió el efecto del pase por cultivo celular sobre la virulencia del parásito, no se encontraron diferencias significativas entre las lesiones encontradas en  $t = 0$  y  $t = 250$  ( $p = 0,5858$ ). Por el contrario, el estudio estadístico de la intensidad de las lesiones reveló diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ) cuando analizamos la evolución de las mismas a través de los distintos días p.i.. El valor del coeficiente de determinación fue de  $R = 0,584643$ .

### 5.3.2.3. Pulmón

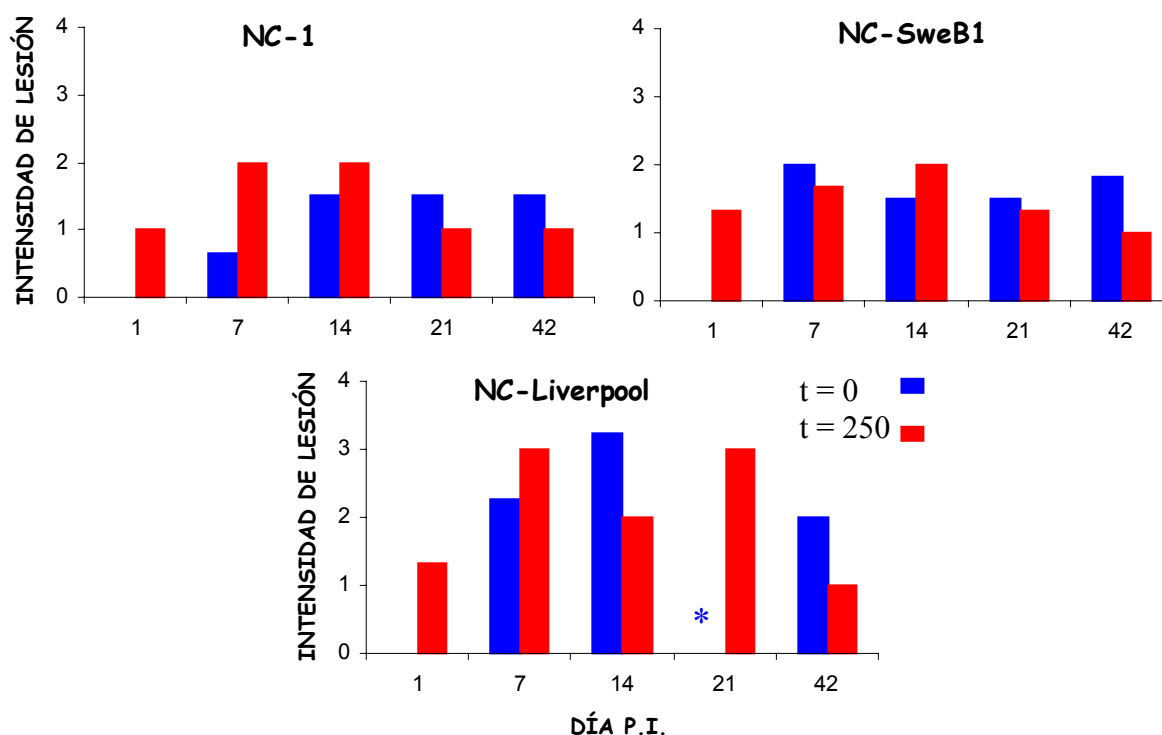
Macroscópicamente, se detectó congestión, en los animales que fallecieron. Histológicamente, se apreció una progresiva infiltración de células redondas a partir del día 7 p.i.. Ésta apareció tanto en el septo alveolar como en el intersticio pulmonar (neumonía intersticial; figura 12). Los ratones que murieron en el transcurso del experimento, presentaron un pulmón de "shock", caracterizado por una marcada congestión capilar, edema alveolar y focos de hemorragia pulmonar.

**Figura 12.** - Lesiones en el pulmón de un ratón inoculado con el aislado NC-Liverpool (Día 6;  $t = 0$ ): a) Neumonía intersticial crónica. HE. 10x; b) Moderada infiltración linfocítica en los septos alveolares. HE. 20x. Lesiones en el pulmón de un ratón inoculado con el aislado NC-Liverpool (Día 7;  $t = 0$ ): c) Pulmón de "shock". HE. 10x; d) Pulmón de "shock". Marcado edema y hemorragia en luz alveolar. HE. 20x.



Cuando se realizó la graduación de las lesiones se observó que el pulmón fue el órgano más afectado. El estudio de la evolución en el tiempo de la intensidad de las lesiones (figura 13), revela que existe un periodo de máxima intensidad en los días 7, 14 y 21. Los valores máximos varían en función del aislado y del momento del experimento. La intensidad de la lesión en el día 42 p.i. fue más moderada (con excepción de los ratones NC-SweB1 en el experimento  $t = 0$ ). Existe una mayor precocidad en la aparición de las lesiones en el experimento  $t = 250$ .

**Figura 13.** - Evolución de la media aritmética de la intensidad de las lesiones en el pulmón de los ratones inoculados con los distintos aislados de *N. caninum* en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$  de su pase por el cultivo celular. (\* Sin datos)



Los resultados del GLM (Anexo I), pusieron en evidencia diferencias estadísticas en las lesiones causadas en el pulmón por los distintos aislados. La probabilidad de error de estas diferencias para el factor aislado fue de  $p < 0,0001$ . Así, la intensidad en las lesiones de los ratones infectados con el aislado NC-Liverpool presentó diferencias significativamente estadísticas de  $p < 0,0001$  con respecto a la observada en los ratones infectados con NC-SweB1 y de  $p < 0,0001$  en relación a la intensidad existente en los

inoculados con NC-1. La intensidad de las lesiones de los grupos de ratones infectados con los aislados NC-1 y NC-SweB1 presentó un comportamiento estadísticamente homogéneo. Cuando se estudió el efecto del pase por cultivo celular sobre la virulencia del parásito, no se encontraron diferencias significativas entre las lesiones encontradas en  $t = 0$  y  $t = 250$  ( $p = 0,5153$ ). Por el contrario, el estudio estadístico de la intensidad de las lesiones reveló diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ) cuando analizamos la evolución de las mismas a través de los distintos días p.i.. El valor del coeficiente de determinación fue de  $R = 0,702$ .

#### 5.3.2.4. Hígado

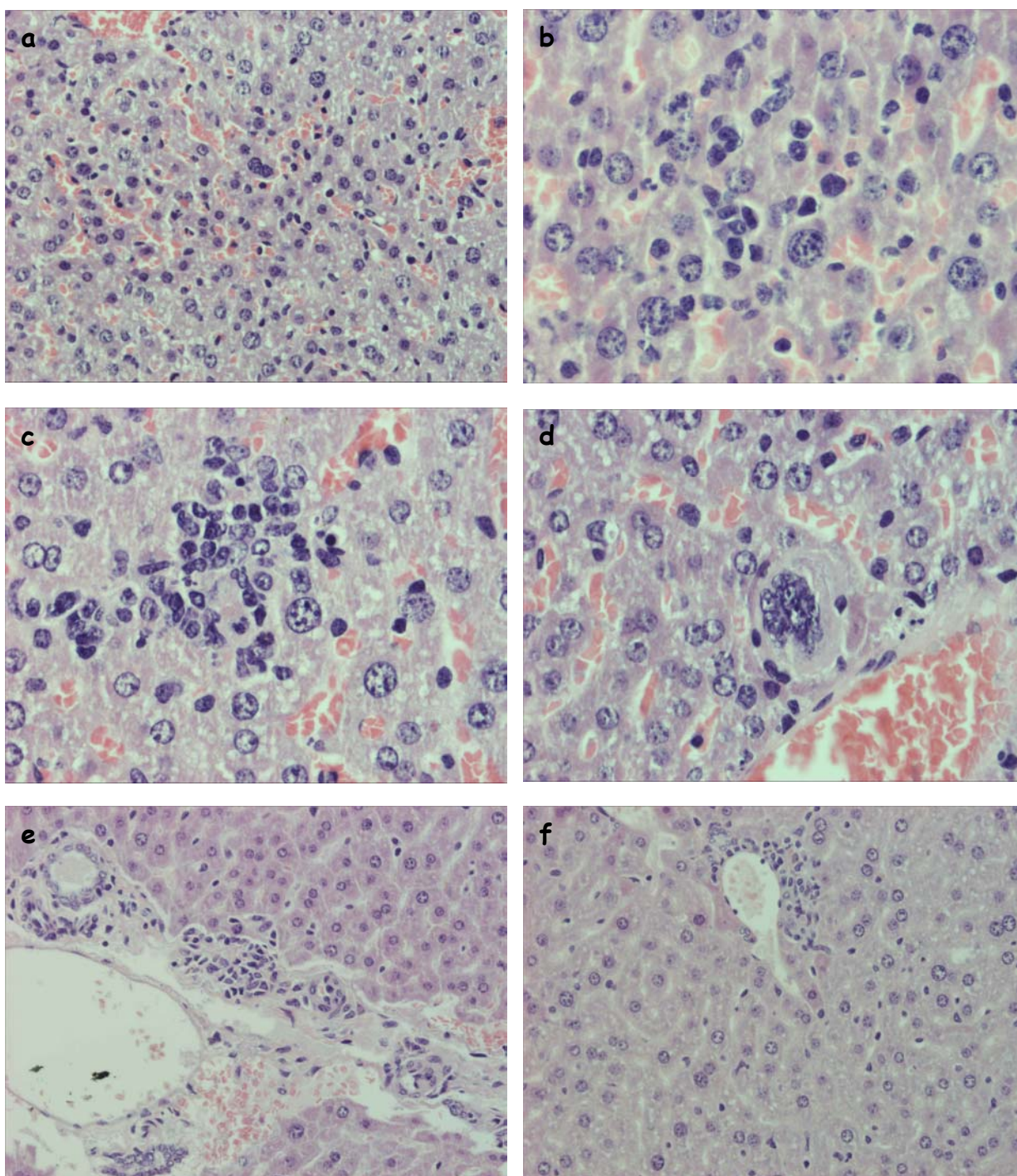
No se detectaron lesiones macroscópicas en este órgano. Las alteraciones histológicas (figuras 14) que se encontraron fueron: la degeneración hidrópica, y la hepatitis crónica activa (figura 14a y 14b), con una infiltración difusa de células redondas a nivel de los sinusoides hepáticos asociado a una activación de las células de Kupffer. También se observaron granulomas (figura 14c), en los que se encontraron neutrófilos, linfocitos y algunos macrófagos, apreciándose una necrosis focal de los hepatocitos.

El estudio de la evolución en el tiempo de la intensidad de lesiones (figura 15), revela que el hígado presenta lesiones de forma casi constante a lo largo de todo el estudio, desde el día 1 al 42 p.i..

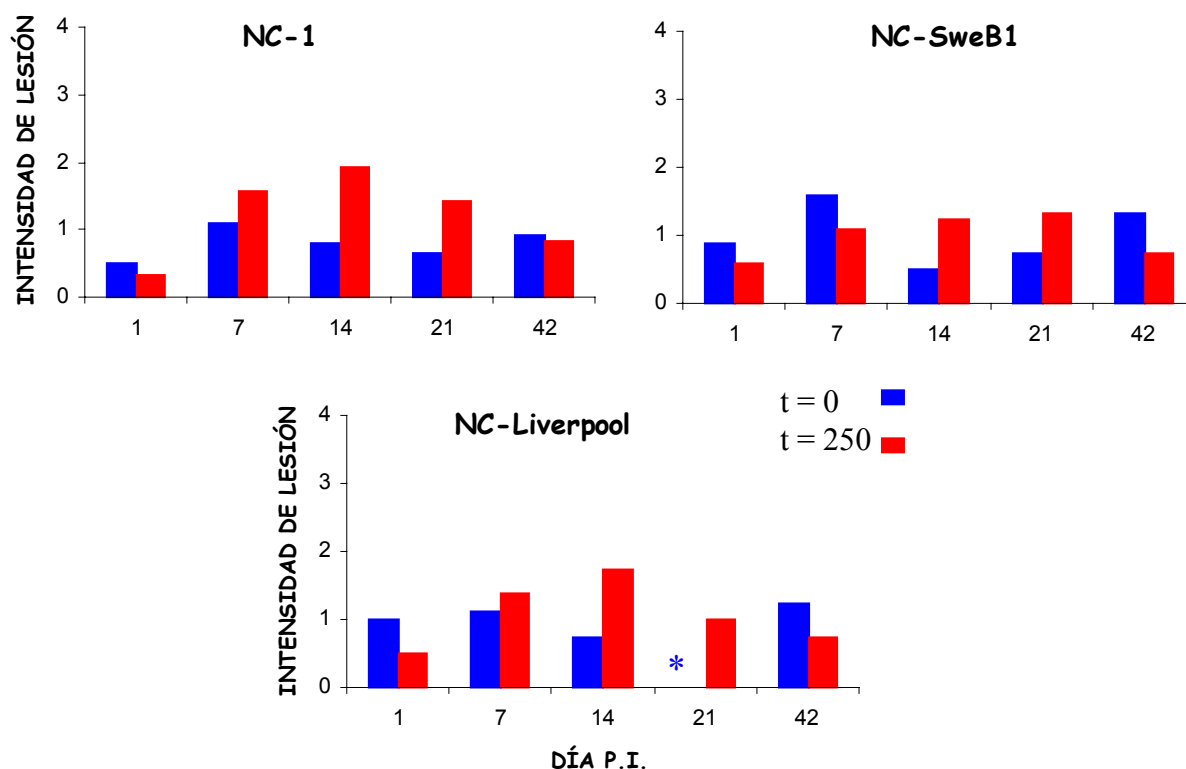
Los resultados del GLM (Anexo I), no evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en las lesiones causadas en el hígado por los distintos aislados ( $p = 0,2597$ ). Al contrario, cuando se estudió el efecto del pase por cultivo celular sobre la virulencia del parásito, se encontraron diferencias significativas entre las lesiones encontradas en  $t = 0$  y  $t = 250$ , a favor de las segundas ( $p = 0,0019$ ). El estudio estadístico de la intensidad de las lesiones también reveló diferencias significativas ( $p <$

0,0001) cuando analizamos la evolución de las mismas a través de los distintos días p.i.. El valor del coeficiente de determinación fue de  $R = 0,686232$ .

**Figura 14.-** Lesiones en hígado de un ratón inoculado con el aislado NC-Liverpool (Día 7;  $t = 0$ ): Hepatitis crónica reactiva: a) HE. 20x b) HE. 40x. Lesiones en hígado de ratón inoculado con el aislado NC-Liverpool (Día 7;  $t = 250$ ): c) Microgranuloma. HE. 40x; d) Hematopoyesis extramedular. HE. 40x; Lesiones en hígado de un ratón inoculado con el aislado NC-Liverpool (Día 42;  $t = 250$ ): Actividad portal caracterizada por un discreto infiltrado de células redondas en el tejido conjuntivo periportal: e) HE. 20x; f) HE. 10x.



**Figura 15.-** Evolución de la media aritmética de la intensidad de las lesiones en el hígado de los ratones inoculados con los distintos aislados de *N. caninum* en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$  de su pase por el cultivo celular. (\* Sin datos)

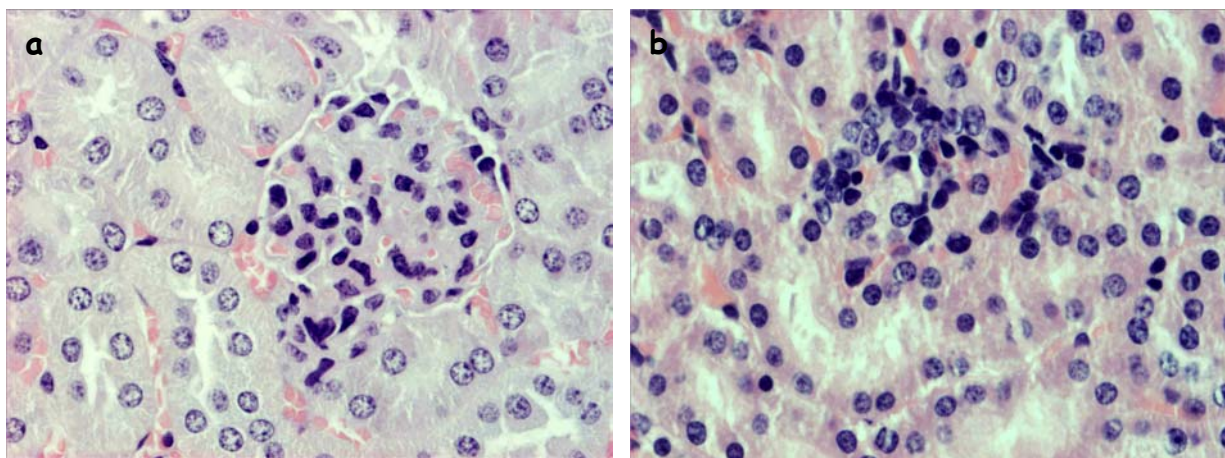


### 5.3.2.5. Riñón

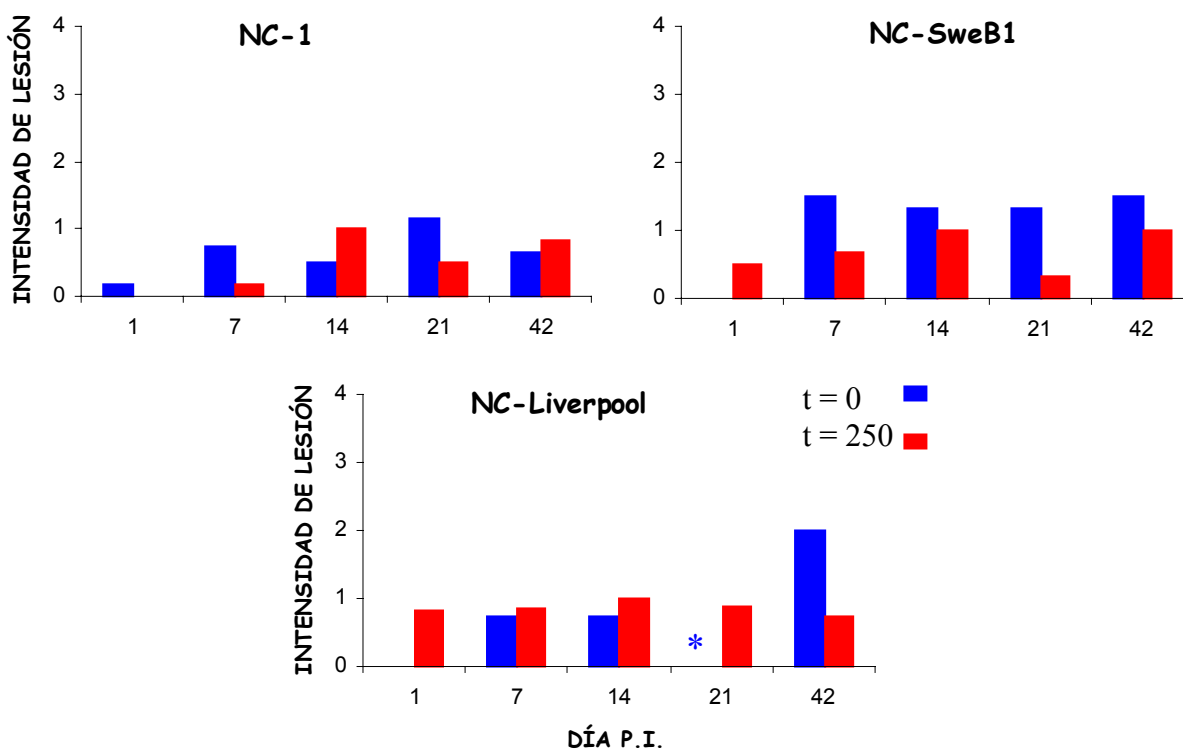
No se apreciaron lesiones macroscópicas en el riñón. El estudio histológico evidenció que las lesiones renales se centraron en los túbulos y los glomérulos. Se observó un discreto infiltrado de linfocitos principalmente en el intersticio de la zona medular y en menor medida en la zona cortical (nefritis intersticial; figura 16b). A partir del día 7 se apreció un engrosamiento de la membrana basal de los capilares a nivel glomerular (glomerulonefritis membranosa; figura 16a).

El estudio de la intensidad de las lesiones, puso en evidencia que el riñón es un órgano poco afectado por la infección. El estudio de la evolución en el tiempo de la intensidad de lesiones (figura 17), revela que el riñón presenta lesiones de forma casi constante a lo largo de todo el estudio, desde el día 1 al 42 p.i..

**Figura 16.** - Lesiones en riñón de un ratón inoculado con el aislado NC-Liverpool (Día 7; t = 0): a) Glomerulonefritis membranoproliferativa. HE. 40x; b) Discreta nefritis intersticial. HE. 40x.



**Figura 17.** - Evolución de la media aritmética de la intensidad de las lesiones en el riñón de los ratones inoculados con los distintos aislados de *N. caninum* en los momentos t = 0 y t = 250 de su pase por el cultivo celular. (\* Sin datos)



Los resultados del GLM (Anexo I), no evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en las lesiones causadas en el riñón por los distintos aislados ( $p = 0,3639$ ). Cuando se estudió el efecto del pase por cultivo celular sobre la virulencia del parásito, no se encontraron diferencias significativas entre las lesiones encontradas en t = 0 y t =

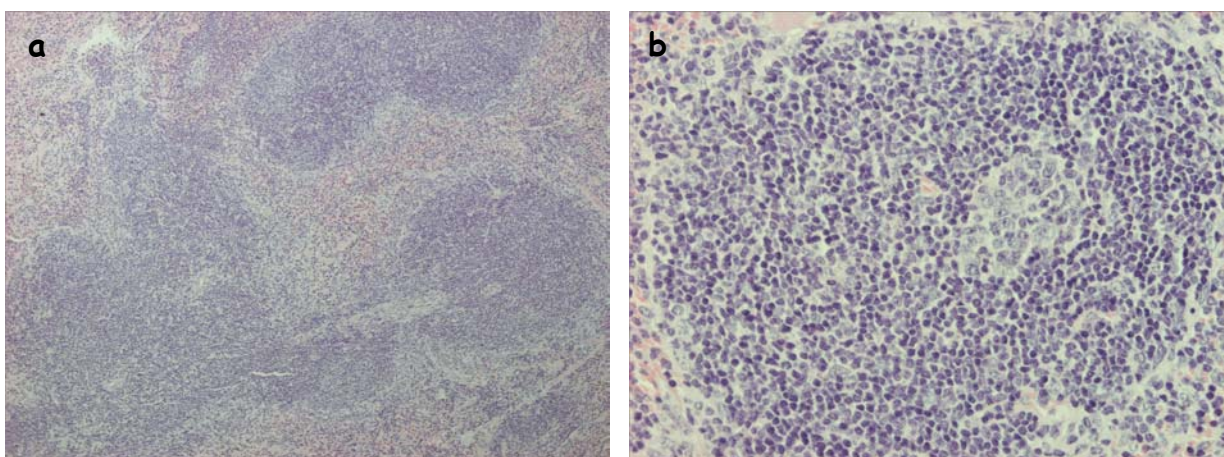
250 ( $p = 0,6133$ ). Por el contrario, el estudio estadístico de la intensidad de las lesiones reveló diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ) cuando analizamos la evolución de las mismas a través de los distintos días p.i.. El valor del coeficiente de determinación fue de  $R = 0,590471$ .

#### 5.3.2.6. Bazo

Al realizar la necropsia se observó esplenomegalia en ratones infectados con el aislado NC-Liverpool que habían presentado sintomatología grave o que habían fallecido. El estudio microscópico determinó la presencia de dos lesiones de forma predominante: una marcada activación de los folículos correspondientes a la sustancia blanca esplénica (hiperplasia folicular; figura 18a) y la presencia de una deplección linfoide, caracterizada por una práctica ausencia de linfocitos en el centro germinal, siendo sustituidos por restos celulares y una infiltración histiocítica.

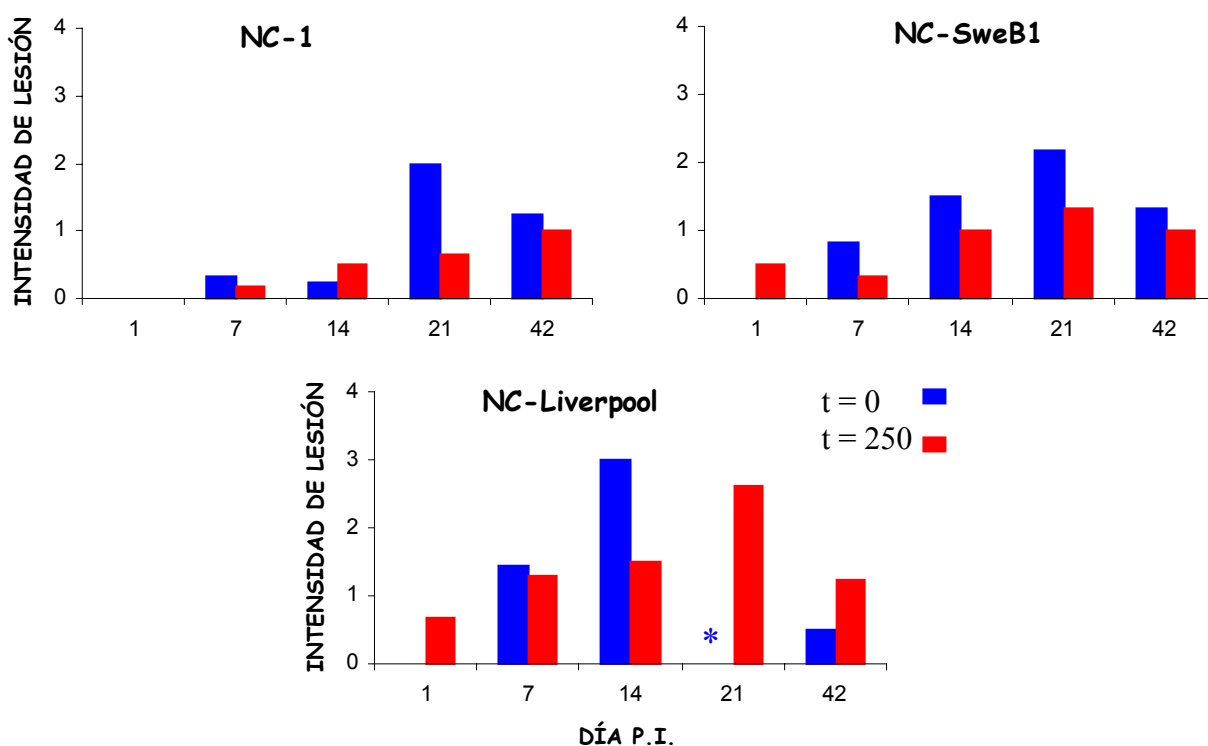
La evolución de la intensidad de las lesiones presentó un aumento progresivo de las lesiones, presentando una cinética semejante a la del SNC; hasta alcanzar los máximos en el día 21 p.i., descendiendo levemente en el día 42 (figura 19). Sin embargo, el aislado NC-Liverpool en el momento  $t = 0$ , presenta el valor máximo el día 14 p.i. (no existen datos el día 21 p.i.). Como en órganos anteriores existe una precocidad en la aparición de las lesiones en el experimento  $t = 250$ .

**Figura 18.-** Lesiones en bazo de un ratón inoculado con el aislado NC-SweB1 (Día 14;  $t = 0$ ): a) Hiperplasia folicular esplénica: HE. 10x; b) Marcada activación de la pulpa blanca, principalmente en la zona T. HE. 20x.



Los resultados del GLM (Anexo I), pusieron en evidencia diferencias estadísticas en las lesiones causadas en el bazo por los distintos aislados. La probabilidad de error de estas diferencias para el factor aislado fue de  $p < 0,0001$ . Así, la intensidad de las lesiones en los ratones infectados con el aislado NC-Liverpool presentó diferencias significativamente estadísticas de  $p < 0,0001$  con respecto a la observada en los ratones infectados con NC-SweB1 y de  $p < 0,0001$  con respecto de la intensidad existente en los inoculados con NC-1. Al contrario que el resto de órganos, la intensidad de las lesiones en los ratones infectados con el aislado NC-1 presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto de NC-SweB1 ( $p = 0,0003$ ). Cuando se estudió el efecto del pase por cultivo celular sobre la virulencia del parásito, se encontraron diferencias significativas entre las lesiones encontradas en  $t = 0$  y  $t = 250$ , a favor de las segundas con  $p < 0,0413$ . El estudio estadístico de la intensidad de las lesiones también reveló diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ) cuando analizamos la evolución de las mismas a través de los distintos días p.i.. El valor del coeficiente de determinación fue de  $R = 0,822833$ .

**Figura 19.-** Evolución de la media aritmética de la intensidad de las lesiones en el bazo de los ratones inoculados con los distintos aislados de *N. caninum* en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$  de su pase por el cultivo celular. (\* Sin datos)



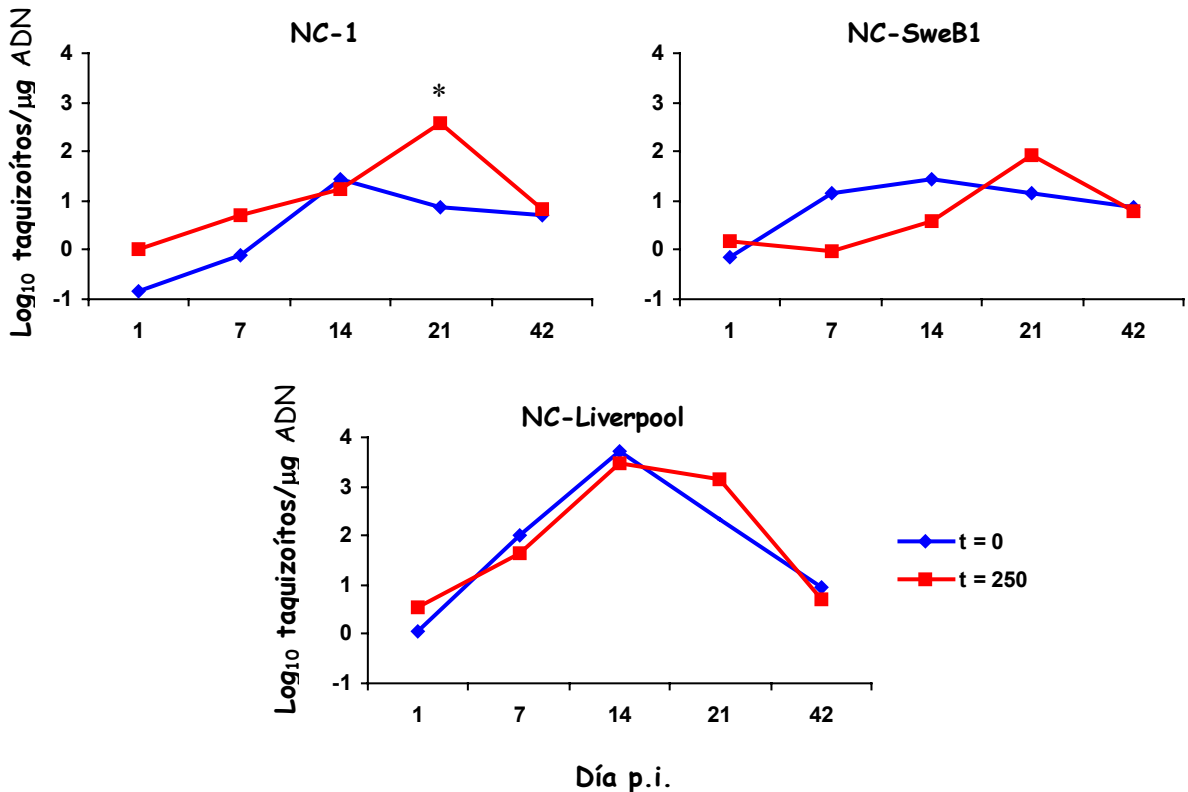
### 5.3.3. CARGA PARASITARIA

La carga parasitaria se investigó mediante PCR cuantitativa en tiempo real en el SNC, corazón, pulmón e hígado. En este estudio no se detectó ADN de *N. caninum* en ninguno de los órganos estudiados en los ratones del grupo testigo.

#### 5.3.3.1. Sistema Nervioso Central

La carga parasitaria en el SNC aumentó exponencialmente desde el día 1 p.i., para alcanzar los valores máximos en los días 14-21 p.i. (llegando a máximos de 10.000 parásitos por  $\mu\text{g}$  de ADN del hospedador), disminuyendo su valor en el día 42 p.i.. La cinética de la carga se ve reflejada en la figura 20.

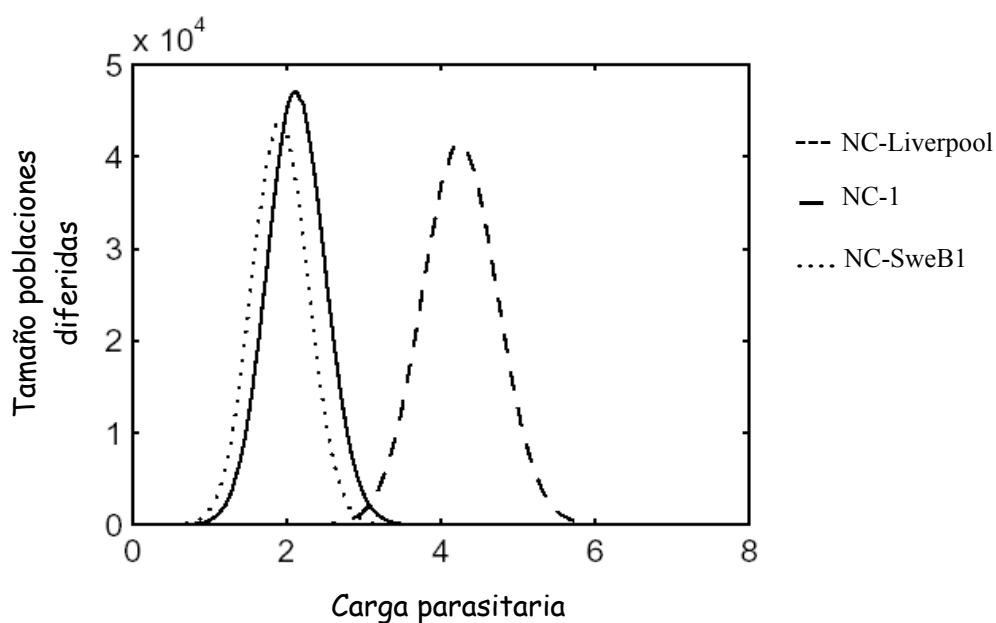
**Figura 20.-** Cinética del número de parásitos en el SNC de los ratones infectados con los distintos aislados de *N. caninum* en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$ . Los resultados están expresados como la media del logaritmo en base 10 del número de parásitos por  $\mu\text{g}$  de ADN del hospedador. (\* $p < 0,05$ ).



Cuando comparamos las cargas parasitarias del SNC de los grupos de ratones infectados con los aislados NC-Liverpool, NC-1 y NC-SweB1, el estudio "bootstrap" mostró grandes diferencias a favor del primero (figura 21). Sin embargo, podemos comprobar que el comportamiento de los ratones infectados con NC-1 y NC-SweB1 fue estadísticamente homogéneo.

Por el contrario, al comparar los valores de la carga parasitaria del SNC en los ratones infectados por un mismo aislado en los dos momentos del experimento, la U de Mann-Whitney reveló diferencias significativas ( $*p < 0,05$ ) únicamente en el grupo de ratones inoculados con el aislado NC-1 el día 21 p.i., a favor del momento  $t = 250$ .

**Figura 21.**- Distribuciones obtenidas por "bootstrap" en el estudio de la cinética de la carga parasitaria en SNC. En el eje de las abscisas están representados los valores del logaritmo de la carga parasitaria, y en el de las ordenadas el número de observaciones simuladas por el remuestreo.



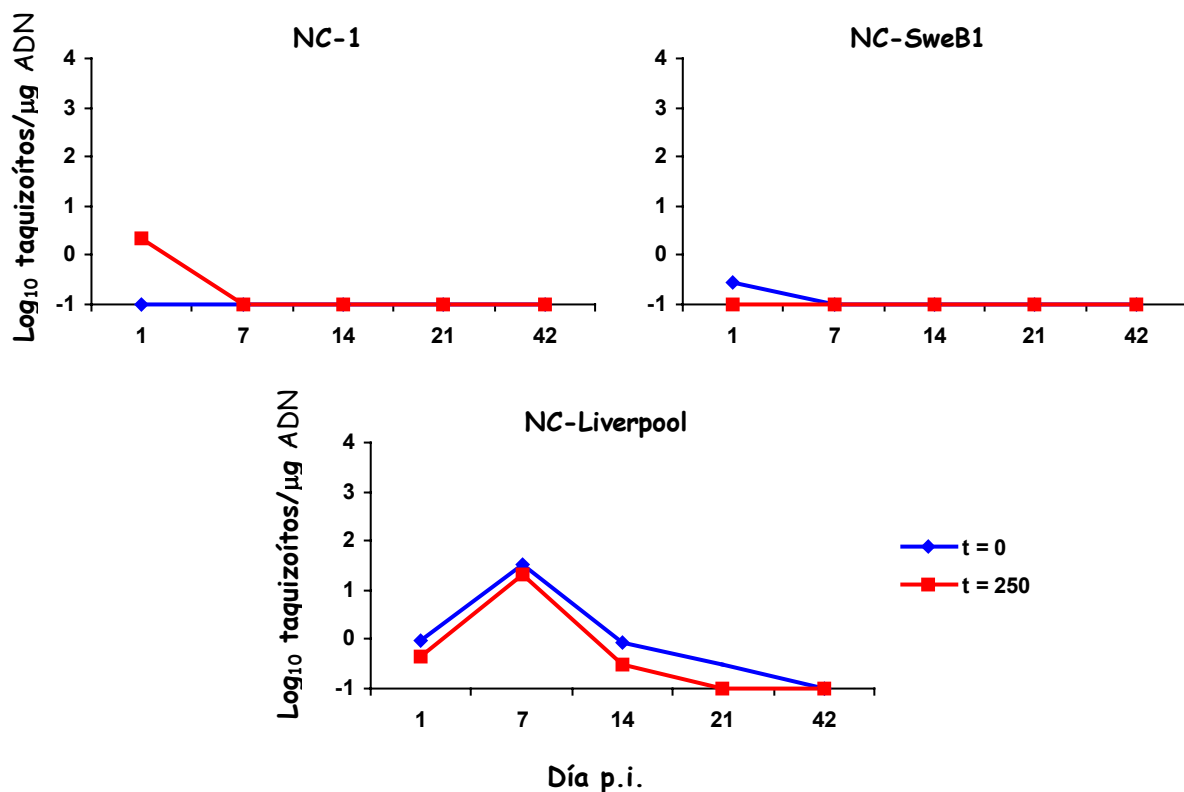
### 5.3.3.2. Corazón

En el corazón se detectó una baja cantidad de ADN parasitario a lo largo de todo el experimento. Éste se observó por primera vez el día 1 p.i., no volviéndose a detectar posteriormente en los aislados NC-1 y NC-SweB1; En ratones infectados con NC-

Liverpool se observó el valor máximo en el día 7 p.i., debido a las cargas moderadas observadas en los ratones fallecidos los días 6 y 7 p.i. (figura 22).

El estudio de diversidad intraespecífica en función de la carga parasitaria realizado por "bootstrap", no reveló diferencias de comportamiento entre los ratones infectados con los diferentes aislados. Al analizar el efecto del mantenimiento de *N. caninum* en cultivo celular sobre la carga parasitaria, no se obtuvieron diferencias significativas entre los dos momentos del experimento:  $t = 0$  y  $t = 250$  ( $p > 0,05$ ; U de Mann-Whitney).

**Figura 22.-** Cinética del número de parásitos en el corazón de los ratones infectados con los distintos aislados de *N. caninum* en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$ . Los resultados están expresados como la media del logaritmo en base 10 del número de parásitos por  $\mu\text{g}$  de ADN del hospedador.

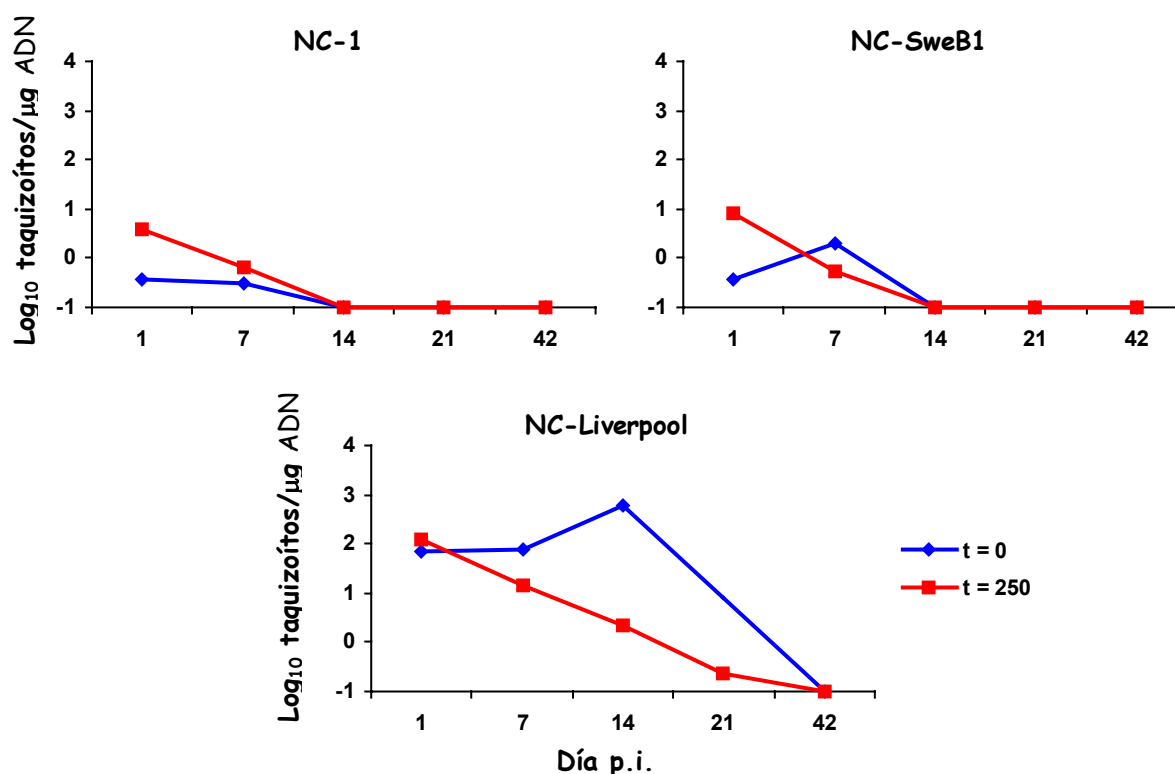


### 5.3.3.3. Pulmón

La evolución de la carga parasitaria en el pulmón, reflejó una tendencia general decreciente a partir de los valores máximos detectados el día 1 p.i.; a partir de este

momento el parásito disminuye progresivamente su presencia en el órgano y en el día 42 p.i. no se detecta ADN parasitario en ningún grupo de ratones (figura 23). La excepción a este modelo son los valores observados en los días 7 y 14 del momento  $t = 0$  en los ratones infectados con los aislados NC-SweB1 y NC-Liverpool respectivamente.

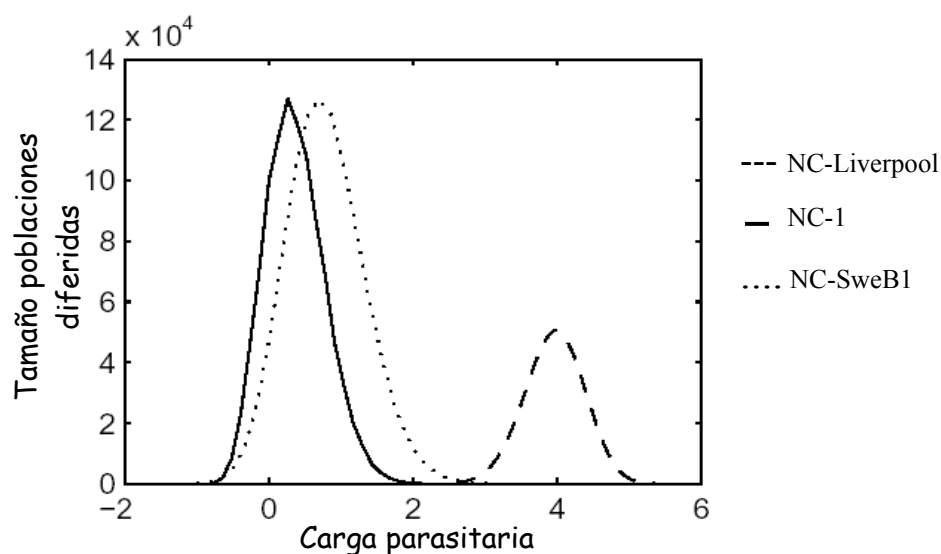
**Figura 23.-** Cinética del número de parásitos en el pulmón de los ratones infectados con los distintos aislados de *N. caninum* en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$ . Los resultados están expresados como la media del logaritmo en base 10 del número de parásitos por  $\mu\text{g}$  de ADN del hospedador.



Cuando comparamos las cargas parasitarias del pulmón de los grupos de ratones infectados con NC-Liverpool, NC-1 y NC-SweB1, el estudio "bootstrap" mostró grandes diferencias a favor del primero (figura 24). Sin embargo, podemos comprobar que el comportamiento de los ratones infectados con NC-1 y NC-SweB1 fue estadísticamente homogéneo.

Al analizar el efecto del mantenimiento de *N. caninum* en cultivo celular sobre la carga parasitaria, no se obtuvieron diferencias significativas entre los dos momentos del experimento:  $t = 0$  y  $t = 250$  ( $p > 0,05$ ; U de Mann-Whitney).

**Figura 24.-** Distribuciones obtenidas por "bootstrap" en el estudio de la cinética de carga parasitaria en pulmón. En el eje de las abcisas están representados los valores del logaritmo de la carga parasitaria, y en el de las ordenadas el número de observaciones simuladas por el remuestreo.

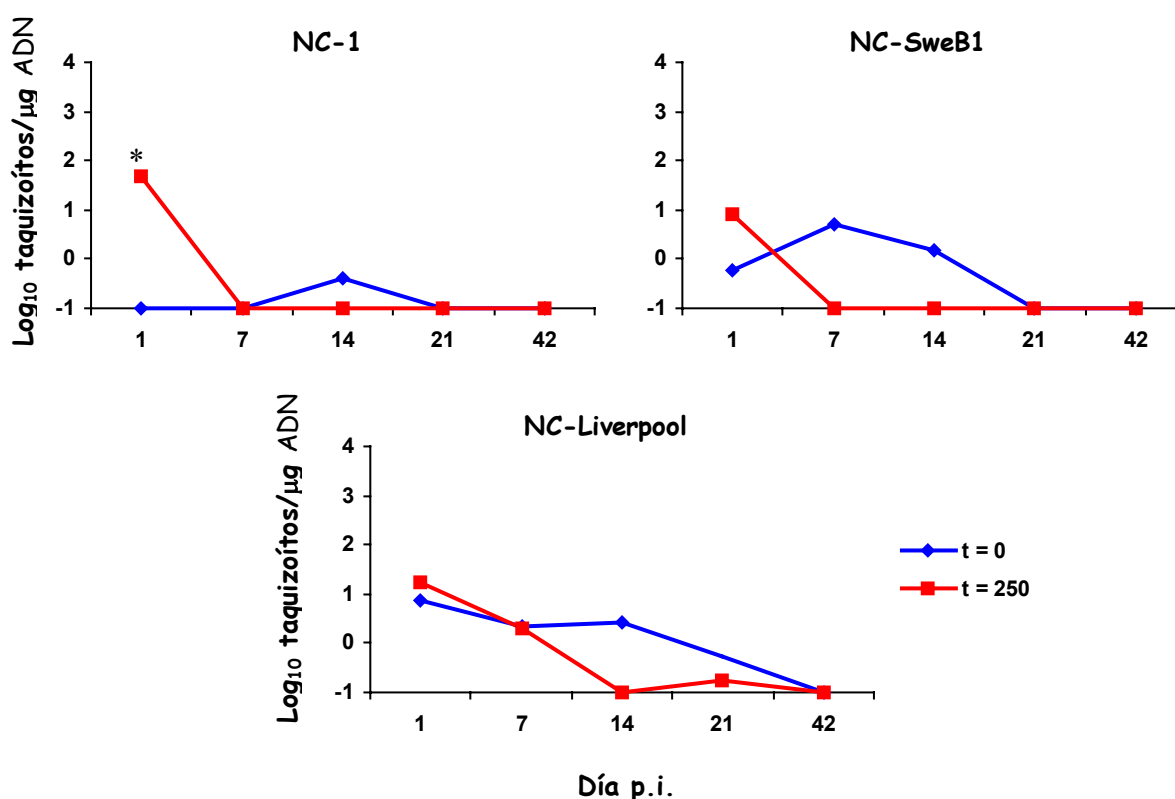


#### 5.3.3.4. Hígado

La evolución de la carga parasitaria en el hígado, reflejó una tendencia general decreciente a partir de los valores máximos del día 1 p.i., no detectándose ADN parasitario en el día 42 p.i. en ningún grupo de ratones (figura 25).

El estudio de diversidad intraespecífica en función de la carga parasitaria realizado por "bootstrap", no reveló diferencias estadísticas de comportamiento entre los aislados. Por el contrario, al comparar los valores de la carga parasitaria del hígado de los ratones infectados por un mismo aislado en los dos momentos del experimento, la U de Mann-Whitney reveló diferencias significativas ( $*p < 0,05$ ) únicamente en el grupo de ratones inoculados con el aislado NC-1 el día 1 p.i., a favor del momento  $t = 250$ .

**Figura 25.-** Cinética del número de parásitos en el hígado de los ratones infectados con los distintos aislados de *N. caninum* en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$ . Los resultados están expresados como la media del logaritmo en base 10 del número de parásitos por  $\mu\text{g}$  de ADN del hospedador. (\* $p < 0,05$ ).

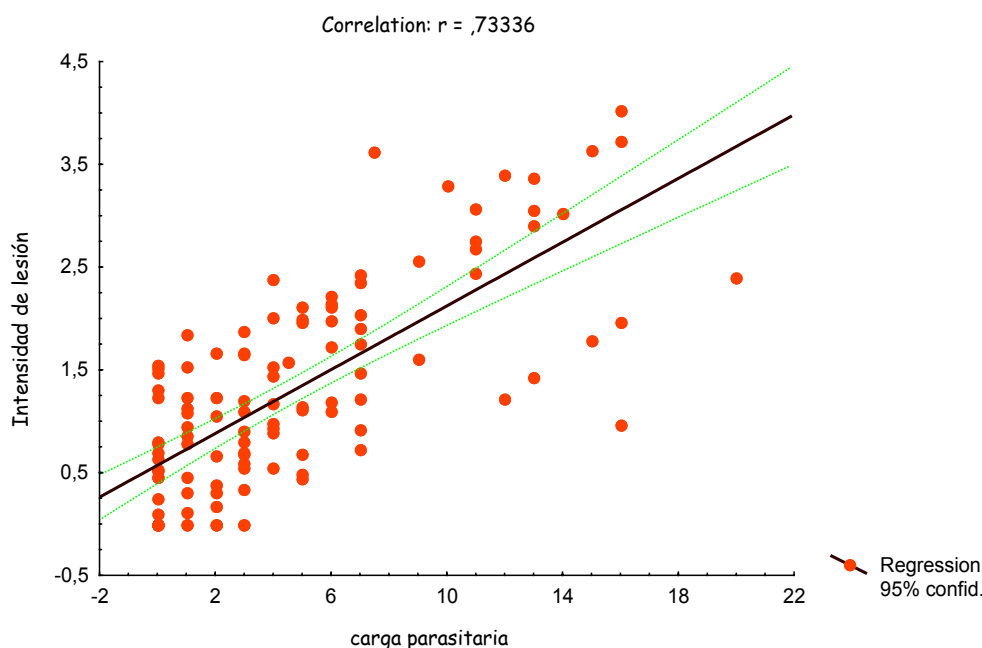


#### 5.3.4. CORRELACIÓN ENTRE LA INTENSIDAD DE LESIÓN Y LA CARGA PARASITARIA

El estudio de correlación se realizó en el SNC, corazón, pulmón e hígado, órganos en los que se habían determinado los dos parámetros. Este estudio sólo reveló una asociación de caracteres en el SNC. El estudio de regresión simple entre la carga parasitaria y la intensidad de las lesiones en el SNC reveló una asociación moderada: coeficiente de correlación  $r^2 = 0,54$ , con una probabilidad de error de  $p < 0,05$  (figura 26).

Los resultados en el resto de órganos demostraron que no existe ninguna asociación entre los caracteres estudiados. Los coeficientes de correlación fueron de  $r^2 = 0,1$  para el corazón,  $r^2 = 0,12$  para el pulmón y de  $r^2 = 0,05$  para el hígado, con una probabilidad de error en todos los casos de  $p < 0,05$ .

**Figura 26.** - Recta de regresión entre la carga parasitaria y la intensidad de lesión en el SNC.



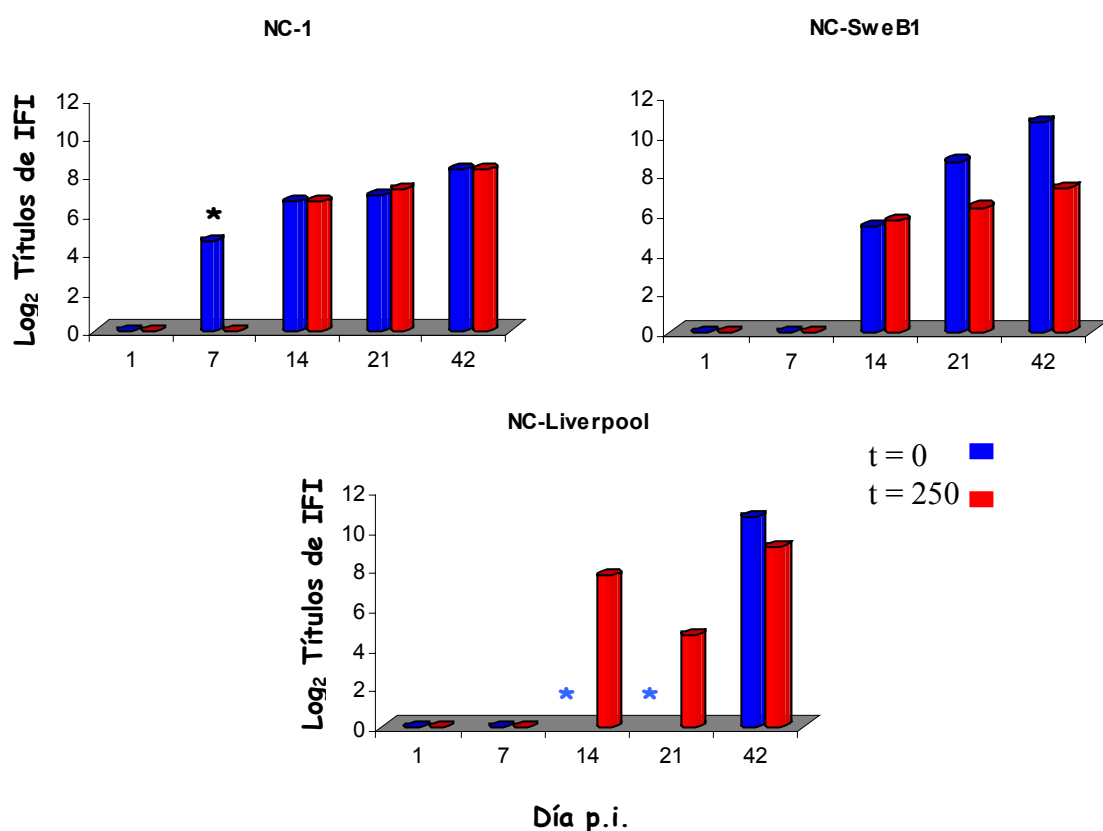
### 5.3.5. DETERMINACIÓN DE LA IgG SÉRICA ANTI-*N. caninum*

La IgG específica empezó a detectarse entre los días 7 y 14 p.i. en los ratones inoculados con los diversos aislados en ambos momentos ( $t = 0$  y  $t = 250$ ), con unos títulos de anticuerpos que oscilaron entre 1:25 y 1:200. Los valores máximos se observaron en los días 21 y 42 p.i., donde los títulos de anticuerpos llegaron a ser de 1:1600 (figura 27).

No se detectó IgG sérica anti-*N. caninum* en ninguno de los ratones del grupo testigo. Los estudios estadísticos de homogeneidad de muestras, únicamente señalaron diferencias significativamente estadísticas en el día 7 p.i. del momento  $t = 0$ , ( $p < 0,05$ ;

H de Kruskal-Wallis) a favor de los ratones inoculados con el aislado NC-1. Cuando realizamos la U de Mann-Whitney para analizar las diferencias de los ratones inoculados con el mismo aislado pero en distinto momento del experimento, únicamente se observaron diferencias en el día 7 p.i. para el aislado NC-1 a favor del momento  $t = 0$  (\* $p < 0,05$ ).

**Figura 27.-** Títulos de inmunoglobulinas séricas anti-*N. caninum* medidos por IFI en los ratones infectados con los diferentes aislados de *N. caninum* en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$ . (\* $p < 0,05$ ). (\* Sin datos). No se detectaron anticuerpos en los grupos testigo.



### 5.3.6. COMPETENCIA ENTRE AISLADOS

Los resultados del estudio de competencia entre aislados en relación con la mortalidad y la morbilidad aparecen en la tabla 11.

Sólo se observó mortalidad en los ratones infectados con NC-Mez en el experimento  $t = 250$  (2/15). Por lo tanto, la mortalidad provocada por NC-Mez fue superior que la observada en los ratones infectados con NC-1 o NC-SweB1 pero menor

que la inducida por NC-Liverpool. Observaciones similares se producen cuando comparamos los resultados de la morbilidad: los síntomas encontrados en los ratones infectados con el aislado NC-Mez presentan una graduación intermedia entre los aislados NC-1 y NC-SweB1 y el aislado NC-Liverpool (tabla 11). Únicamente, el estudio de la sintomatología en la fase aguda de la enfermedad del momento  $t = 0$ , muestra un comportamiento estadísticamente homogéneo de NC-Mez frente a NC-1 y NC-SweB1.

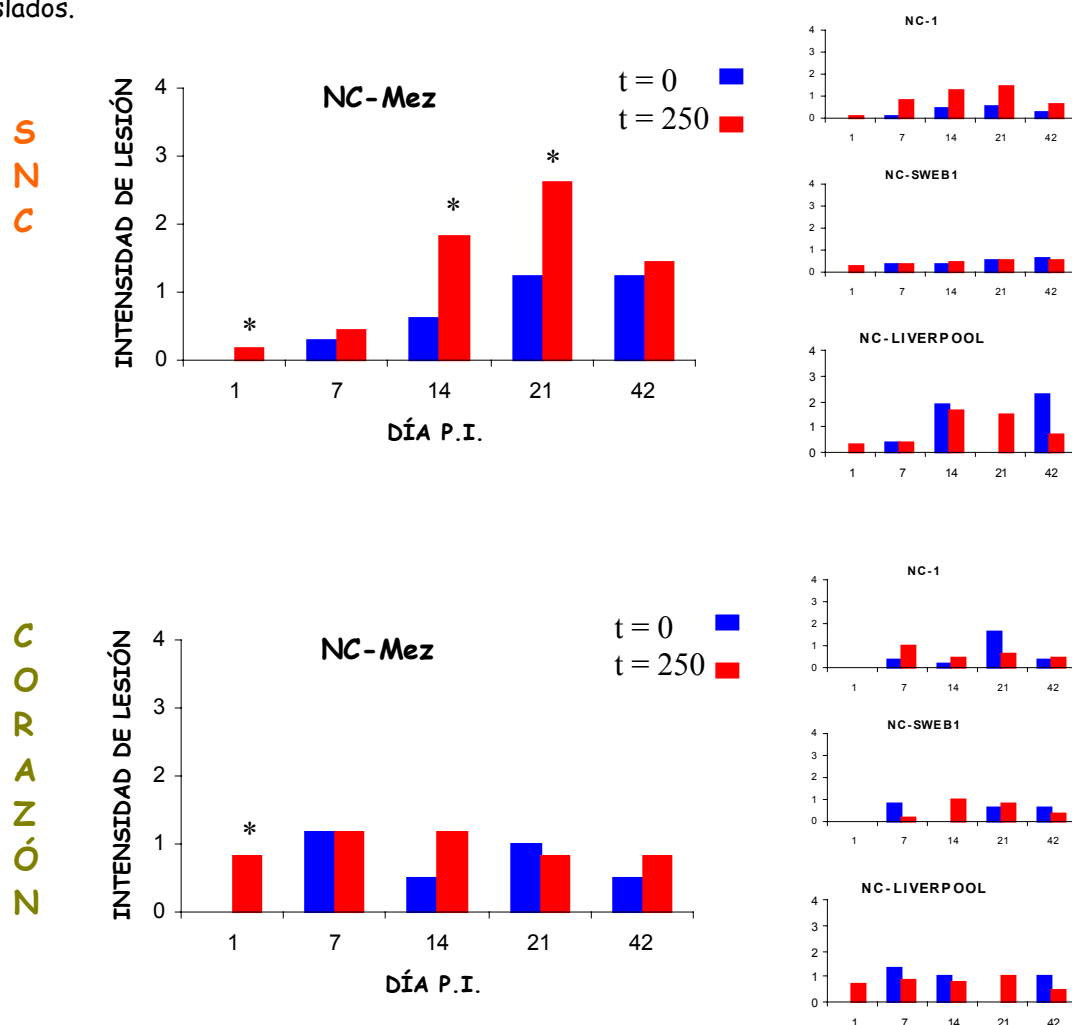
**Tabla 11.** - Comparación de la mortalidad y la sintomatología entre los ratones inoculados con el aislado NC-Mez en  $t = 0$  y  $t = 0$  250. Se han graduado los síntomas en ++ (graves), + (moderados) y - (ausentes).

		Primera		Segunda		Tercera		4 <sup>a</sup> /6 <sup>a</sup>	
		Semana p.i.		semana p.i.		Semana p.i.		Semana p.i.	
		$t = 0$	$t = 250$	$t = 0$	$t = 250$	$t = 0$	$t = 250$	$t = 0$	$t = 250$
<b>Razón de Mortalidad</b>		<b>2/15</b>							
<b>Síntomas</b>	Pelo erizado	-	+	-	+	+	+	+	+
	Inmóviles Encorvados	-	+	-	+	-	-	-	-
	Torneo	-	-	-	-	+	+	+	+
	Paresia 1/3 posterior	-	-	-	-	+	+	+	+

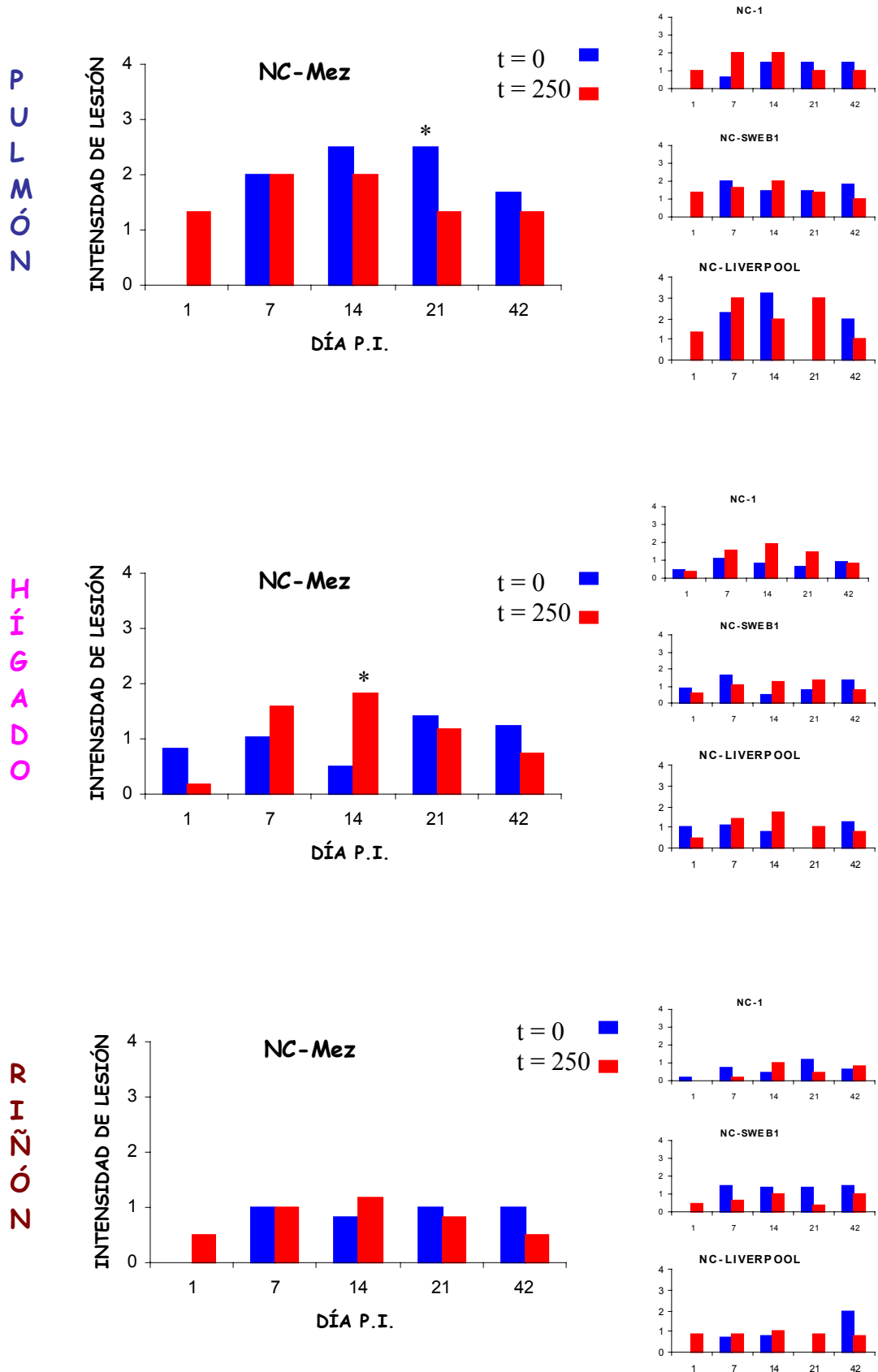
La comparación de los resultados de mortalidad y morbilidad de los ratones infectados con el aislado NC-Mez en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$ , revela una moderada exacerbación en la clínica provocada por el aislado NC-Mez tras su pase continuado por el cultivo celular. Así, únicamente aparecen ratones fallecidos cuando fueron inoculados con el aislado tras su pase por el cultivo celular ( $t = 250$ ). La intensidad de los síntomas fue la misma en ambos momentos, pero en  $t = 250$  se observó una mayor precocidad en la aparición de signos clínicos.

El estudio descriptivo de las lesiones histológicas del aislado NC-Mez no presenta ninguna diferencia con las expuestas para el resto de aislados. De la misma forma, la evolución de la intensidad de las lesiones del SNC de NC-Mez presenta idéntico patrón de presentación que para el resto de los aislados (figura 28). Podemos realizar la misma afirmación cuando nos referimos al corazón (figura 28), pulmón, hígado, riñón (figura 29) y bazo (figura 30). La comparación de los resultados de la intensidad de las lesiones del SNC de los ratones infectados con el aislado NC-Mez en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$ , revela diferencias significativas ( $*p < 0,05$ ; U de Mann-Whitney) en los días 1, 14 y 21 p.i. a favor del momento  $t = 250$ . Cuando realizamos la misma comparación en otros órganos detectamos diferencias ( $*p < 0,05$ ; U de Mann-Whitney) en el hígado el día 14 p.i. y en el corazón el día 1 p.i. a favor del momento  $t = 250$ , y en el pulmón en el día 21 p.i. a favor del momento  $t = 0$ .

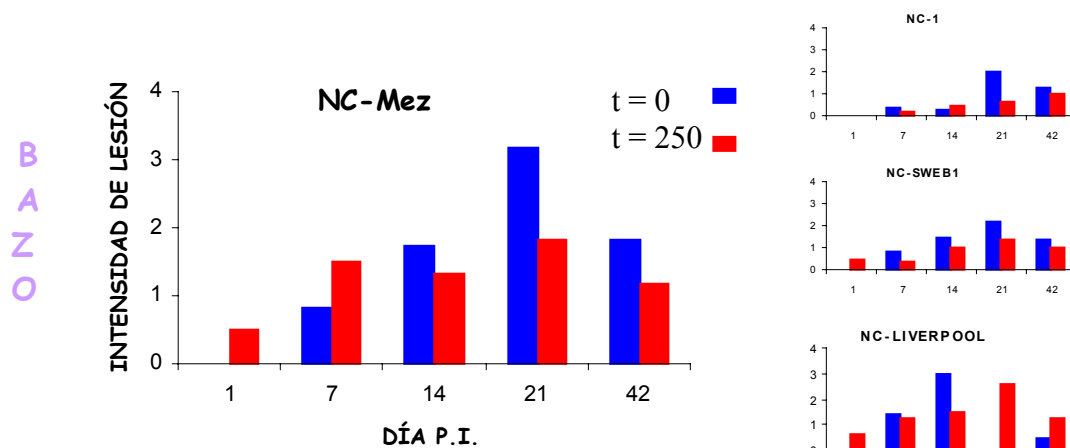
**Figura 28.-** Evolución de la media aritmética de la intensidad de las lesiones del SNC y corazón de los ratones infectados con el aislado NC-Mez en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$  del experimento. En el lado derecho se muestran, en menor tamaño, la gráfica equivalente para el resto de aislados.



**Figura 29.** - Evolución de la media aritmética de la intensidad de las lesiones del pulmón, hígado y riñón de los ratones infectados con el aislado NC-Mez en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$  del experimento. En el lado derecho se muestran, en menor tamaño, la gráfica equivalente para el resto de aislados.

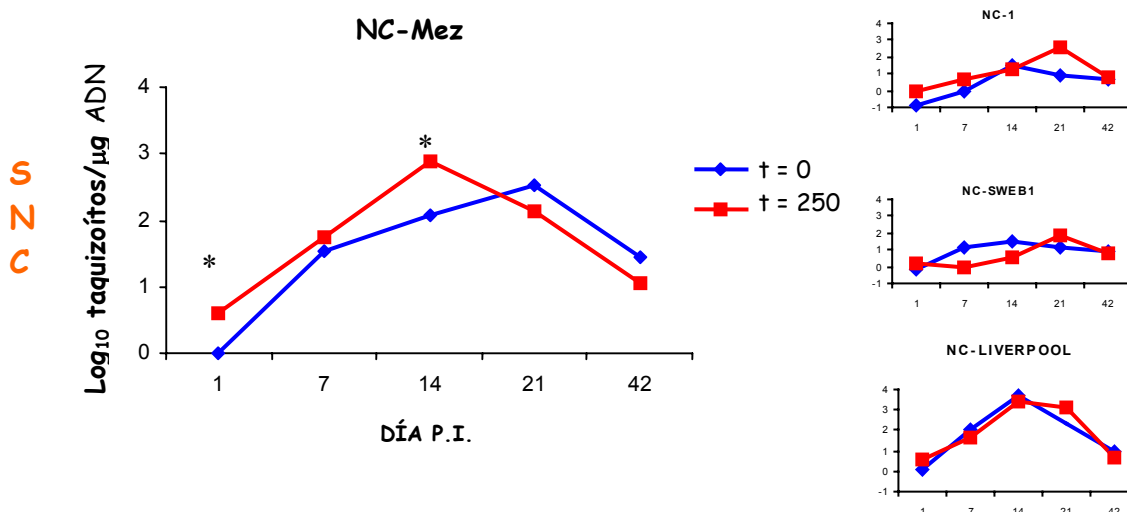


**Figura 30.-** Evolución de la media aritmética de la intensidad de las lesiones del bazo de los ratones infectados con el aislado NC-Mez en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$  del experimento. En el lado derecho se muestran, en menor tamaño, la gráfica equivalente para el resto de aislados.

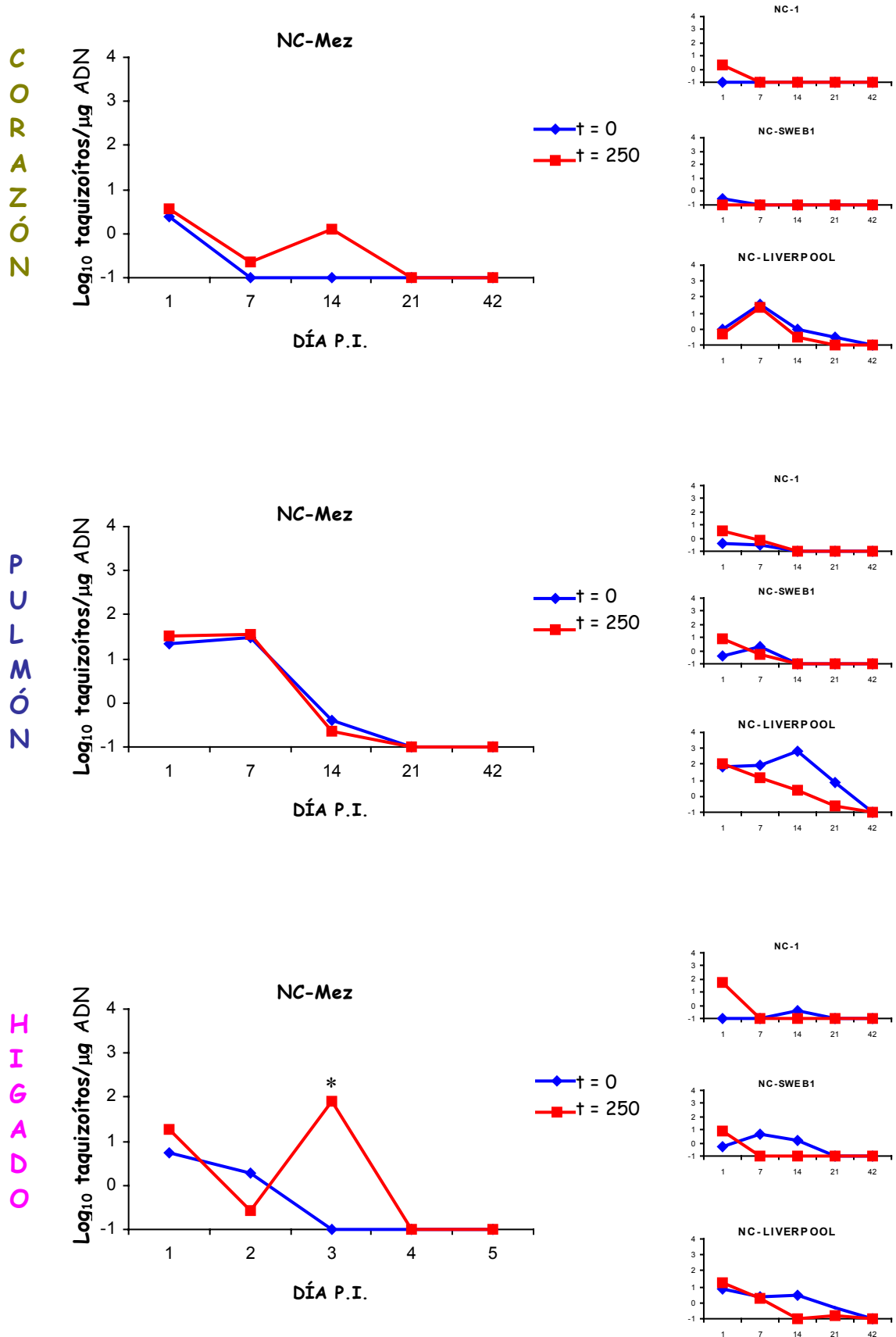


El estudio estadístico GLM sobre la intensidad de las lesiones mostró que NC-Mez no presenta suficientes diferencias frente al resto de aislados que indiquen un comportamiento especial que denote el origen de su composición. NC-Mez se comporta como un aislado algo menos lesivo que NC-Liverpool, pero mucho más que NC-1 y NC-Sweb1. Se observan los mismos resultados cuando analizamos mediante Bootstrap la carga parasitaria en los órganos (figura 31 y 32).

**Figura 31.-** Evolución de la media aritmética de la carga parasitaria en el SNC de los ratones infectados con el aislado NC-Mez en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$  del experimento. En el lado derecho se muestran, en menor tamaño, la gráfica equivalente para el resto de aislados.



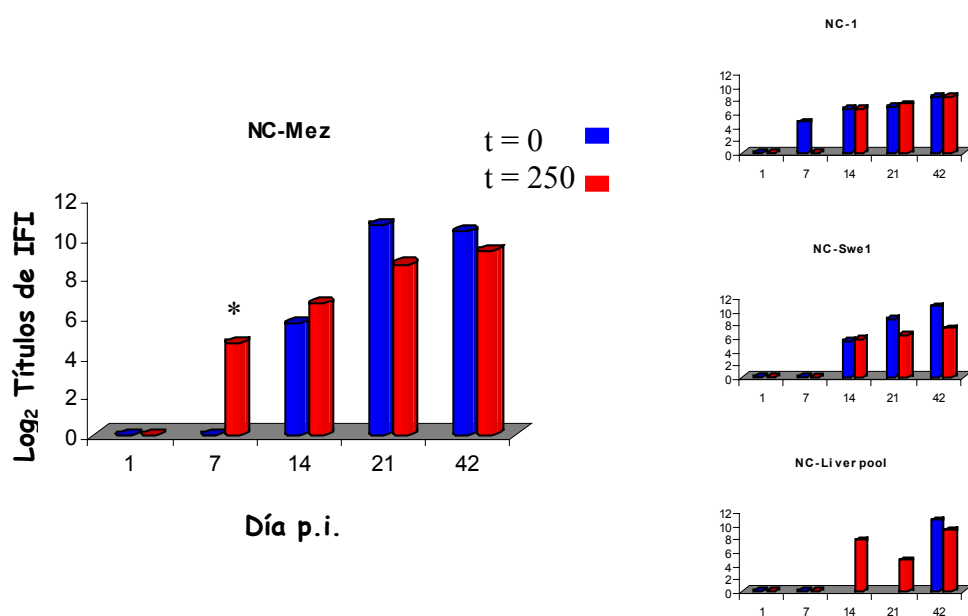
**Figura 32.-** Evolución de la media aritmética de la carga parasitaria en el corazón, pulmón e hígado de los ratones infectados con el aislado NC-Mez en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$  del experimento. En el lado derecho se muestran, en menor tamaño, la gráfica equivalente para el resto de aislados.



La comparación de los resultados de carga parasitaria del SNC de los ratones infectados con el aislado NC-Mez en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$ , revela diferencias significativas ( $*p < 0,05$ ; U de Mann-Whitney) en los días 1, 14 p.i. a favor del momento  $t = 250$ . Cuando realizamos la misma comparación en otros órganos detectamos únicamente diferencias ( $*p < 0,05$ ; U de Mann-Whitney) en el hígado el día 14 p.i. a favor del momento  $t = 250$ .

Los resultados del estudio de competencia entre aislados en referencia a los títulos de IgG específica aparecen reflejados en la figura 33. Las pruebas estadísticas realizadas con los títulos de anticuerpos revelan que NC-Mez no presenta diferencias estadísticas con el resto de aislados excepto en el día 7 del momento  $t = 250$  ( $p < 0,05$ , H de Kruskal-Wallis). La comparación de los títulos de anticuerpos del aislado NC-Mez en los dos momentos experimentales ( $t = 0$  y  $t = 250$ ) sólo reveló una mayor precocidad en la aparición de estos en el momento  $t = 250$  ( $*p < 0,05$ ; U de Mann-Whitney).

**Figura 33.** - Títulos de inmunoglobulinas séricas anti-*N. caninum* medidos por IFI en los ratones infectados con el aislado NC-Mez en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$ . ( $*p < 0,05$ ).



#### 5.4. DISCUSIÓN

El objetivo fundamental de este trabajo fue estudiar la variabilidad intraespecífica *in vivo* de la virulencia de *N. caninum*. Para ello, se escogió un modelo murino no gestante. El gran coste y tamaño de los animales y la disponibilidad de reactivos y técnicas han estimulado la búsqueda de otros modelos distintos del natural para estudiar la patogenia de la neosporosis. Por ello, al igual que ha ocurrido con la toxoplasmosis (Derouin & Garin, 1991; Howe *et al.*, 1996; Zenner *et al.*, 1998; Sibley *et al.*, 1999), gran parte de la información sobre la patogenia de la neosporosis procede de infecciones experimentales en las que se ha utilizado al ratón como modelo de laboratorio (Khan *et al.*, 1997; Long *et al.*, 1998; Baszler *et al.*, 1999; Eperon *et al.*, 1999; Shibahara *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 2000; Collantes-Fernández *et al.*, 2002 b, 2004). Ya hemos comentado que las investigaciones realizadas hasta el momento han estudiado un gran número de parámetros relacionados con la patogenia de la enfermedad en este modelo. Pese a los avances diagnósticos, la mayor parte de los estudios siguen manteniendo entre las determinaciones a realizar la mortalidad, la morbilidad y el cuadro de lesiones, ya que aportan valiosos datos sobre la historia natural de la enfermedad (Lindsay & Dubey, 1989d y 1990b; Lindsay *et al.*, 1995b; Gottstein *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 2002; Collantes-Fernández *et al.*, 2002 b, 2004). En nuestro estudio se empleó la técnica de IFI para medir la presencia de anticuerpos específicos. La IFI es una de las técnicas más usadas para el diagnóstico serológico de las infecciones por *N. caninum* y ha sido considerada la técnica de referencia en el diagnóstico serológico de la neosporosis. Por otro lado, el uso de la PCR- cuantitativa en tiempo real para la cuantificación del parásito en los tejidos de hospedadores infectados es reciente (Collantes-Fernández *et al.*, 2002a y 2004). Esta prueba es más sensible y rápida que las técnicas inmunohistoquímicas utilizada en otros estudios para el mismo fin (Long *et al.*, 1998; Baszler *et al.*, 1999). Basándonos en lo anteriormente expuesto, para la consecución de los objetivos planteados optamos por el uso de un modelo murino en el que estudiamos la mortalidad, la morbilidad, el cuadro de lesiones, la detección de la IgG anti-*N. caninum* y la cuantificación del parásito en los órganos diana. Se eligieron los días de estudio 1, 7,

14, 21 y 42 p.i., con el fin de obtener datos de las diferentes fases de la enfermedad: aguda, subaguda y crónica.

Debido a que el desenlace de la infección por *N. caninum* en el modelo murino parece depender de múltiples factores dependientes del parásito y del hospedador (Long *et al.*, 1998; Collantes-Fernández *et al.*, 2004), una de las principales cuestiones que nos planteamos al principio de nuestro estudio fue fijar y seleccionar adecuadamente todos ellos. Hasta el momento, la primera cuestión que se tuvo que definir fue la elección de la estirpe murina. En este sentido, se han descrito variaciones en la receptividad a la infección dependiendo de la estirpe murina utilizada, por lo que se seleccionó la estirpe consanguínea BALB/c, la cual ha demostrado ser sensible a la infección por *N. caninum* (Lindsay *et al.*, 1995; Long *et al.*, 1998; Collantes-Fernández *et al.*, 2004). Para la elección de la dosis se utilizó el criterio de buscar un inóculo suficiente para poder apreciar en la estirpe elegida los parámetros clínicos típicos de la enfermedad sin causar una mortalidad excesiva, basándonos para ello en trabajos previos (Lindsay *et al.*, 1995b; Long *et al.*, 1998; Collantes-Fernández *et al.*, 2004). En cuanto a la vía de administración, diversos autores no obtuvieron síntomas ni lesiones características de la neosporosis en el ratón cuando han utilizado la vía intraperitoneal (Atkinson *et al.*, 1999); sin embargo, otros trabajos (Eperon *et al.*, 1999; Gottstein *et al.*, 2001; Nisikawa *et al.*, 2001) y el presente experimento han demostrado que la inoculación del parásito vía intraperitoneal genera un cuadro sintomático y de lesiones típico de la enfermedad.

Para estudiar la variabilidad intraespecífica *in vivo*, se seleccionaron tres aislados que abarcaban las dos variables que *a priori* los diferencian: la procedencia geográfica y de hospedador. A estos criterios hay que añadirles otra consideración y es que cuando se inició este trabajo en el año 1999, la disponibilidad de aislados de *N. caninum* no era grande. Para esa fecha, únicamente se habían obtenido en todo el mundo 17 aislados procedentes de 7 laboratorios diferentes. Para nuestro experimento elegimos tres aislados procedentes de laboratorios diferentes: **NC-1** y **NC-Liverpool** se aislaron del

cerebro de perros con sintomatología nerviosa en EE.UU. y Reino Unido, respectivamente, y **NC-SweB1** se aisló a partir del cerebro de un ternero congénitamente infectado con sintomatología nerviosa en Suecia.

Nuestro estudio confirma la existencia de diversidad intraespecífica en la virulencia *in vivo* entre diversos aislados de *N. caninum* utilizando un modelo murino de infección. Diversos trabajos previos (Lindsay & Dubey, 1990b; Lindsay *et al.*, 1995; Atkinson *et al.*, 1999) han sugerido la existencia de esta diversidad. Sin embargo, la presente investigación por el número y características de los aislados estudiados, por el seguimiento exhaustivo de la infección en los diferentes días p.i. y por el número y características de los parámetros estudiados, constituye la demostración más rigurosa de variabilidad *in vivo* realizada hasta el momento. En este sentido, la combinación del estudio lesional en órganos diana junto a la utilización de herramientas novedosas que permiten cuantificar la carga parasitaria en los mismos, nos ha permitido obtener una información muy valiosa para poder interrelacionar los parámetros clásicos (mortalidad y síntomas) con las lesiones observadas en los órganos y su relación precisa con la distribución y multiplicación del parásito en los mismos. Con todo ello, los resultados obtenidos en este estudio indican que el aislado NC-Liverpool fue más patogénico en el modelo murino aquí empleado que NC-1 y NC-SweB1, ya que los animales infectados con NC-Liverpool presentaron mayor número de bajas, una sintomatología y cuadro lesional más grave y una mayor carga parasitaria en los órganos estudiados. Por el contrario, cuando se compararon los ratones inoculados con NC-1 y NC-SweB1 no se encontraron importantes variaciones. De estas diferencias no se puede inferir razón geográfica o de hospedador pues NC-Liverpool presenta un par para cada una de las variables: es de origen canino como NC-1 y europeo como NC-SweB1.

Hasta la fecha, la información disponible sobre la diversidad patogénica de los diferentes aislados de *N. caninum* es escasa. En los primeros estudios utilizando un modelo murino, el aislado NC-1 demostró ser más virulento que NC-3 y NC-2 (Lindsay & Dubey, 1990; Lindsay *et al.*, 1995b) y NC-2 provocaba mayor mortalidad que NC-

Liverpool (McGuire *et al.*, 1997). Atkinson *et al.* (1999) compararon la patogenicidad de 2 aislados en ratones BALB/c y observaron importantes diferencias entre ellos, ya que los ratones inoculados con el aislado NC-Liv desarrollaron síntomas y lesiones más graves que los infectados con NC-SweB1. En este estudio también se encontraron diferencias biológicas y genéticas entre los dos aislados mediante un análisis por la técnica de RAPD-PCR. Asimismo, los ratones BALB/c inoculados con el aislado japonés JPA1 no desarrollaron sintomatología, detectándose muy pocas lesiones y de carácter leve en los diversos órganos estudiados (Shibahara *et al.*, 1999). El aislado australiano NC-Nowra mostró también poca patogenicidad cuando se inoculó a ratones BALB/c; sólo 3 de 10 ratones mostraron síntomas, siendo las lesiones observadas en el cerebro de grado leve a moderado (Miller *et al.*, 2002).

La mortalidad fue uno de los parámetros fundamentales a la hora de poder observar la variabilidad intraespecífica. La presencia de casi el 50% de bajas en los ratones infectados con el aislado NC-Liverpool, comparada con la ausencia total de las mismas en los ratones infectados con los aislados NC-1 y NC-SweB1 constituye un dato definitivo. El estudio de la distribución de la mortalidad a lo largo del experimento, indica que, con la dosis utilizada, éstas aparecen fundamentalmente durante la fase aguda de la enfermedad, ya que, el 85% y el 66% de los ratones fallecidos aparecen antes del día 7 p.i., en los momentos  $t = 0$  y  $t = 250$ . Los animales fallecidos en la fase aguda (días 6 y 7 p.i.), en los que se había detectado previamente una sintomatología inespecífica grave, presentaron lesiones intensas fundamentalmente en el pulmón (pulmón de "shock"), bazo (deplección linfoide) e hígado (hepatitis reactiva), y cargas parasitarias elevadas en el pulmón. En estos ratones las lesiones del SNC son muy escasas y su carga parasitaria moderada. Es reseñable que en el corazón de estos ratones fallecidos fue el único caso donde se detectó al menos, una carga parasitaria moderada en este órgano. Los animales fallecidos en la fase subaguda-crónica de la enfermedad (días 16, 17, 20 y 21 p.i.), en los que se había detectado previamente una sintomatología nerviosa muy grave, presentaron lesiones intensas y una carga parasitaria muy elevada en el SNC. Los pulmones de estos ratones tuvieron lesiones graduadas entre

moderadas e intensas, pero el parásito estuvo ausente. El resto de órganos de estos animales no estuvieron especialmente afectados. Con todo ello, podríamos sugerir que mientras en la fase aguda de la enfermedad las alteraciones respiratorias tienen una relación directa con el fallecimiento de los ratones, en la fase crónica son las alteraciones del SNC las causantes principales de la mortalidad. Cuando se comparan nuestros resultados con los obtenidos en trabajos previos se observaron semejanzas y diferencias. Long *et al.* (1998), utilizando dosis de  $2 \times 10^6$  y de  $2 \times 10^7$  taquizoítos del aislado NC-1 en ratones BALB/c, sólo encontró mortalidad con la dosis de  $2 \times 10^7$ , lo que concuerda con los datos obtenidos en nuestro estudio. En el mismo sentido, Collantes-Fernández *et al.* (2004), con dosis de  $10^6$  y  $5 \times 10^6$  del aislado NC-1 en ratones BALB/c, sólo encuentran mortalidad a partir del día 50 p.i.. Sin embargo, Atkinson *et al.* (1999), cuando inocularon ratones BALB/c con dosis de  $10^6$  ó  $10^7$  taquizoítos de los aislados NC-Liverpool y NC-SweB1 no describen la aparición de mortalidad. Si ello fue así, nuestros resultados están en clara contraposición con los suyos, pues con una dosis menor, el aislado NC-Liverpool origina la muerte de un número elevado de ratones.

El estudio pormenorizado de la sintomatología, reveló diferencias entre aislados, semejantes a las encontradas en el estudio de mortalidad: NC-Liverpool origina intensos signos clínicos inespecíficos y nerviosos en la fase crónica, mientras NC-1 y NC-SweB1 causan una sintomatología menos intensa afectando a un número mucho menor de ratones. Además la escasa sintomatología mostrada en los animales infectados con NC-1 y NC-SweB1 fue siempre de carácter inespecífico. Aun cuando existe una gran variabilidad sintomatológica dependiente de diversos factores (dosis, estirpe murina, aislados etc.), se han descrito signos clínicos comunes en los trabajos realizados hasta el momento (Lindsay & Dubey, 1989d, 1990b; Lindsay *et al.*, 1995b; Atkinson *et al.*, 1999; Eperon *et al.*, 1999; McGuire *et al.*, 1997; Gottstein *et al.*, 2001): la fase aguda de la enfermedad cursa con sintomatología inespecífica, apareciendo inactividad, anorexia y erizamiento del pelo. Si la infección es grave el ratón puede morir. La fase crónica cursa con sintomatología nerviosa: debilidad, parálisis del tercio posterior, ataxia y torneo. En nuestro trabajo sólo el aislado NC-Liverpool ha originado este modelo de enfermedad.

No se realizó ningún estudio estadístico con los datos obtenidos de la mortalidad y la morbilidad dadas las evidentes diferencias observadas en ambos parámetros entre los ratones inoculados con NC-Liverpool y los infectados con NC-1 y NC-SweB1

Las lesiones macroscópicas y microscópicas encontradas fueron similares a las descritas con anterioridad por otros autores (Lindsay & Dubey 1989d, 1990b; Lindsay *et al.*, 1995b; Long *et al.*, 1998; Baszler *et al.*, 1999; Atkinson *et al.*, 1999; Dreier *et al.*, 1999; Shibahara *et al.*, 1999). El estudio histológico también demostró la existencia de notables diferencias entre los aislados demostrándose la variabilidad lesional, no solo en función del aislado (en 4 de 6 órganos), sino en función de la fase de la enfermedad (en todos los órganos). Adquiere especial relevancia el uso de un GLM en nuestro experimento. Esta prueba estadística presenta una potencia elevada frente a otras técnicas no paramétricas clásicas, que si bien podrían darnos resultados parciales de la comparación, nos proporcionarían menor información del conjunto. Es destacable el hecho de obtener coeficientes de determinación elevados en el GLM (Anexo I). Ello nos indica que la técnica presenta una gran fiabilidad, pues el porcentaje de los resultados que pueden ser explicados por el modelo es muy alto, o dicho de otra forma, el residuo es muy pequeño. En nuestro estudio, los ratones infectados con el aislado NC-Liverpool presentaron lesiones más intensas, detectadas por el GLM, en el SNC, el corazón, el pulmón y el bazo, que las observadas en los inoculados con los aislados NC-1 y NC-SweB1. Entre los ratones infectados con estos últimos, el GLM mostró diferencias estadísticamente significativas solo en el bazo, en el que las lesiones más intensas aparecieron en los ratones inoculados con el aislado NC-1. Las diferencias encontradas en el SNC pudieron ser aún más evidentes, pues la gran mortalidad aparecida en los ratones infectados con el aislado NC-Liverpool en la fase aguda de la infección, provocó que en el día 21 p.i., del momento  $t = 0$ , no hubiera ratones infectados con este aislado para sacrificar, día en el cual la intensidad de las lesiones en el SNC presentan su valor máximo. Las diferencias encontradas en la intensidad de las lesiones en el SNC entre el aislado NC-Liverpool y los aislados NC-1 y NC-SweB1 aparecen únicamente a partir del día 14 p.i., momento en el cual aparecen los síntomas nerviosos y las cargas parasitarias

en este órgano en los ratones infectados con NC-Liverpool comienzan a detectarse de forma sobresaliente. Las diferencias encontradas en las lesiones cardiacas son debidas fundamentalmente a la presencia constante de las mismas en los ratones infectados con el aislado NC-Liverpool y no a valores de intensidad superiores a los encontrados con NC-1 y NC-SweB1. Cuando analizamos la intensidad de las lesiones en el pulmón, detectamos que las diferencias encontradas a favor de los ratones infectados con NC-Liverpool son debidas a una mayor intensidad de las mismas en todo el periodo experimental. Este hecho presenta gran importancia, pues como ya hemos expuesto, posiblemente, las alteraciones pulmonares tienen una relación directa con las muertes acaecidas en los ratones infectados con este aislado. Las diferencias encontradas en las lesiones del bazo también fueron debidas, como en el órgano anterior, a la mayor intensidad general de las mismas en los ratones infectados con NC-Liverpool. Estas diferencias tienen su lógica, pues al ser NC-Liverpool el aislado que provocó un cuadro clínico más grave, ello pudiera determinar que fuera el que desencadenara una mayor respuesta celular por parte del hospedador.

En función de la fase de la infección, se pudo advertir que durante la fase aguda, el pulmón fue el órgano más afectado, independientemente del aislado utilizado. Sin embargo, es destacable la gravedad de las lesiones presentes en éste órgano en los ratones fallecidos: éstos presentan un moderado infiltrado linfocitario intersticial, una congestión vascular, un edema septal y alveolar y focos de hemorragia (pulmón de "shock"). De acuerdo con lo establecido por López *et al.* (2001), el pulmón de "shock" puede considerarse como una neumonía intersticial en fase exudativa, por lo que en nuestro estudio se le consideró el grado máximo de lesión dentro de las neumonías intersticiales. Durante la fase crónica, el pulmón sigue siendo el órgano más lesionado junto con el SNC en el caso particular de los ratones infectados con el aislado NC-Liverpool. De forma general, se puede decir que el corazón y el riñón presentaron lesiones de carácter leve a moderado a lo largo de toda la fase experimental en los tres grupos de ratones. La intensidad de las lesiones en el bazo evolucionó de forma paralela

a la encontrada en el SNC. Las lesiones en este órgano fueron de tipo inespecífico provocadas por la respuesta linfocitaria a la infección.

El estudio de la carga parasitaria también reveló diferencias en el comportamiento de los aislados en el modelo utilizado. El uso de una técnica como la PCR-cuantitativa en tiempo real para medir la carga parasitaria en tejidos de *Neospora* constituye una de las ventajas del presente estudio. La carga parasitaria se determinó mediante una PCR-cuantitativa en tiempo real diseñada específicamente para la detección del parásito en tejidos (Collantes-Fernández *et al.*, 2002). Diversos estudios (Long *et al.*, 1998; Baszler *et al.*, 1999) han utilizado la IHQ como herramienta para estudiar la carga parasitaria en los tejidos del hospedador, aunque como ya se ha comentado con anterioridad la PCR-cuantitativa en tiempo real tiene diferentes ventajas sobre IHQ. Como ya hemos expuesto, el estudio comparativo de la carga parasitaria se realizó mediante la prueba estadística del modelo de regresión "bootstrap". Los diseños experimentales biológicos presentan el "inconveniente" del alto coste de los elementos objetos de estudio. El beneficio del uso de esta prueba consiste en la obtención de datos fiables de la distribución de la muestra cuando el tamaño de la muestra es bajo. A pesar de que el patrón de distribución del parásito fue similar entre los tres aislados, se pudieron observar marcadas diferencias en las cargas parasitarias en diversos órganos según el aislado empleado y la fase de la infección. El estudio del "bootstrap" mostró diferencias estadísticas a favor del aislado NC-Liverpool en el análisis de la carga parasitaria en el pulmón y el SNC. Éstos se corresponden además con los órganos que presentaron una mayor carga parasitaria absoluta en el transcurso del experimento. El "bootstrap" no puso en evidencia diferencias estadísticas entre los ratones infectados con los diferentes aislados en el corazón e hígado. Todo ello, junto con los datos del estudio lesional (con excepción del corazón), hace pensar en el SNC y el pulmón como los órganos diana de las diferentes fases de la enfermedad. Por otro lado, el estudio de la carga parasitaria puede darnos una idea de los pasos que sigue el parásito dentro del ratón en el transcurso de la infección. En los primeros días p.i. se detectaron cargas en los ratones infectados con los distintos aislados en todos los órganos menos en el SNC.

Posteriormente, cuando disminuye la presencia del parásito en el resto de órganos, en el SNC comienza el incremento de la carga parasitaria. Esta descripción de los resultados se adapta a la idea más o menos generalizada de que existe una multiplicación de los taquizoítos en diferentes órganos durante la fase aguda de la infección; posteriormente el hospedador contrarrestaría esta multiplicación, eliminando al parásito de todos los órganos excepto del SNC, en el cual se acantonaría hasta la reactivación. Esta idea se refuerza cuando observamos la sintomatología obtenida en nuestro trabajo: la aparición de sintomatología inespecífica en la fase aguda de la enfermedad y de sintomatología nerviosa en la fase subaguda-crónica. Existen diversos trabajos que miden la carga parasitaria con diferentes herramientas y objetivos (Long *et al.*, 1998; Drier *et al.*, 1999; Gottstein *et al.*, 2001; Nishikawa *et al.*, 2001). En tal sentido, nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Nishikawa *et al.* (2001), pues aunque la dosis usada no fue la misma que la nuestra, la cinética de presentación del parásito es semejante.

Un aspecto importante de este capítulo fue el estudio de la correlación entre la intensidad de las lesiones y la carga parasitaria en el SNC, el corazón, el pulmón y el hígado. Los resultados han determinado que existe una asociación estadística positiva de ambas variables en el SNC. Es decir, mientras el parásito se multiplica en el SNC la gravedad de las lesiones va aumentando, disminuyendo ésta cuando las cargas se moderan. Estos resultados confirman la correlación entre la carga y las lesiones encontrada por Long *et al.* (1998). Sin embargo, no encontramos el mismo paralelismo en el resto de órganos estudiados. En éstos se describe la ausencia del parásito junto con la presencia de lesiones leves o moderadas en las últimas fases de la infección. Hemos sugerido que el parásito se multiplica activamente en el corazón, pulmón e hígado en la fase aguda de la enfermedad, siendo eliminado del mismo en las fases posteriores. La aparición de lesiones en estas últimas fases puede ser debida a la acción de los mediadores inflamatorios (interleuquinas), que siguen induciendo una respuesta durante bastante tiempo después de la desaparición del parásito. Por otro lado, cuando el parásito genera una lesión en un órgano, ésta no desaparece inmediatamente, pudiendo

ser observada la respuesta inflamatoria semanas después de que el parásito haya desaparecido.

En el modelo murino utilizado el tipo de aislado es un factor crítico que condiciona la gravedad de los síntomas y lesiones, así como la carga de parásitos que presenta el animal. Durante la fase aguda de la infección por *N. caninum* el parásito se detectó en todos los órganos estudiados independientemente del aislado utilizado. Las lesiones en esta fase consisten, principalmente, en la aparición de necrosis, microgranulomas y una marcada marginación linfocitaria. Las lesiones más intensas, así como las cargas parasitarias más elevadas se observaron principalmente en el pulmón y fundamentalmente en los ratones infectados con el aislado más virulento (NC-Liverpool). En esta fase, si las lesiones en este órgano son graves y el número de parásitos alto, el animal puede desarrollar una sintomatología inespecífica probablemente debida a un estado febril, e incluso morir. Durante la fase subaguda, el parásito es rápidamente eliminado, disminuyendo las cargas parasitarias en todos los órganos, excepto en el cerebro donde éstas van aumentando. Al igual que lo anteriormente descrito, si las lesiones son graves y el hospedador no puede controlar la multiplicación del parásito en el cerebro, el ratón puede desarrollar graves síntomas nerviosos y morir. Durante la fase crónica se observa una discreta inflamación crónica en el resto de los órganos y sólo se detectan bajas cargas del parásito en el cerebro. Durante esta fase no se observó la presencia de mortalidad y sintomatología. El curso de la infección aquí descrito, es similar al que muestran experimentos anteriores utilizando ratones infectados con *T. gondii* (Zenner *et al.*, 1998, 1999) o con *N. caninum* (Lindsay *et al.*, 1995b; Baszler *et al.*, 1999b; Eperon *et al.*, 1999; Liddell *et al.*, 1999; Nishikawa *et al.*, 2001). Long *et al.* (1998) observaron una asociación evidente entre un incremento en el número de lesiones, carga parasitaria en cerebro, presencia de síntomas y mortalidad. Posteriormente, Gottstein *et al.* (2001) encontraron en ratones de la estirpe C57BL/6 inoculados con diferentes dosis, una asociación evidente entre el incremento de la tasa de morbilidad y mortalidad y la presencia del parásito en cerebro.

En referencia al estudio de la respuesta inmune humoral es destacable que a pesar de las variaciones intraespecíficas descritas anteriormente, la respuesta inmune entre los tres aislados fue homogénea. La presencia de Ig G específica se detectó en los días 7 y 14 y los títulos de anticuerpos más elevados se observaron en los días 21 y 42.

Cuando comparamos los aislados en los dos estudios de esta tesis, encontramos un resultado común: NC-Liverpool fue el aislado que presentó más capacidad adaptativa *in vitro* y una mayor patogenicidad en el modelo murino (*in vivo*). En este sentido, se ha demostrado que *T. gondii*, íntimo pariente de *N. caninum*, presenta una estructura de población clonal (Howe & Sibley, 1995; Grigg *et al.*, 2001; Grigg & Suzuki, 2003 y Volkman & Hartl, 2003), incluyendo tres cepas (I, II y III) que generan el 95 % de las infecciones. Cada cepa comprende la propagación de una línea clonal con idéntica secuencia de ADN. (Volkman & Hartl, 2003). En concordancia con nuestro estudio es realmente interesante observar que la cepa tipo más virulenta (I), presentó un crecimiento *in vitro* más rápido que las otras dos cepas. Sin embargo, *in vivo* las tres cepas muestran una rápida diseminación a partir del punto de infección, indicando que esta habilidad no es responsable de la virulencia. Las diferencias más importantes se detectaron en las cargas parasitarias de los tejidos, siendo más elevadas en las cepas más virulentas (Sibley *et al.*, 1999). Estos resultados también presentaron una concordancia con los obtenidos en nuestro estudio con el aislado NC-Liverpool.

Si la presencia de marcadas diferencias entre aislados nos resulta un aspecto interesante, no lo debe ser menos el comportamiento homogéneo mostrado por NC-1 y NC-SweB1. Como hemos observado en el apartado de resultados, únicamente el análisis GLM de la intensidad de las lesiones en el bazo señaló diferencias entre estos dos aislados. Los experimentos revisados en la bibliografía encontraron siempre diversidad intraespecífica. Los resultados de Shock *et al.* (2001) mostraron diversidad genética entre ambos aislados cuando se sometieron a análisis de PCR-RAPD. Por tanto, es un hecho relevante comprobar que no existen diferencias en la clínica provocada por estos

dos aislados en el modelo murino, más cuando observamos que presentan un origen geográfico (EE.UU. y Suecia) y animal (canino y bovino) diferente.

El estudio global de los resultados descarta cualquier tipo de atenuación del parásito tras el mantenimiento continuado en el cultivo celular. Los estudios de mortalidad y morbilidad presentan resultados prácticamente idénticos en los dos momentos del experimento. Los resultados de las IFI no mostraron ningún resultado concluyente de atenuación. Cuando sometimos la intensidad de las lesiones al análisis mediante GLM, los resultados con respecto a la atenuación fueron controvertidos. Tres órganos no presentaron diferencias estadísticas con respecto al momento del experimento en cuestión ( $t = 0$  y  $t = 250$ ): pulmón, corazón y riñón. Sin embargo, el GLM encontró diferencias significativas a favor del momento  $t = 250$  en el SNC e hígado y  $t = 0$  para el bazo. Es destacable que las lesiones del SNC se exacerben cuando el aislado se mantiene en el cultivo celular. Ello pudiera indicar que el pase continuado en cultivo celular podría aumentar el tropismo de *N. caninum* por el SNC, aumentando la capacidad de multiplicación en este órgano. Los resultados de la carga parasitaria mostraron que no solo no hubo atenuación de la carga, sino que en algunos puntos del estudio la presencia de ADN parasitario fue superior para el momento  $t = 250$ . Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Atkinson *et al.* (1999), en los que tras pasar a NC-Liverpool 14 meses por la línea celular Vero, no perdía virulencia. Por el contrario nuestros resultados están en contraposición con los hallazgos de Long *et al.* (1998), que determinaron que NC-1 perdía virulencia cuando se sometía durante largo tiempo a pases por cultivo celular.

Fue llamativo el hecho que el aislado NC-Mez, propuesto para el estudio de la interacción competitiva no tuviera un comportamiento que denotara su composición mixta. Su comportamiento homogéneo al resto de aislados indica que el efecto competitivo no ha modificado las propiedades biológicas de éstos. Como viéramos en los antecedentes, no se ha producido el "comportamiento altruista" que beneficie a la población y vaya en detrimento del individuo. En este estudio *N. caninum* no se ha

comportado como podría esperarse de acuerdo a la Teoría de Selección de Parientes (Hamilton *et al.*, 1964). El comportamiento parecido que presentan NC-Liverpool y NC-Mez nos hace pensar la posibilidad que el primero de ellos haya desplazado a NC-SweB1 y NC-1, pasando a liderar numéricamente el aislado NC-Mez (Principio de exclusión competitiva de Gauss). Cuando analizamos los resultados del aislado responsable de la interacción competitiva en relación al momento de infección ( $t = 0$  y  $t = 250$ ), observamos que en todos los parámetros estudiados existen diferencias que siempre se inclinan a favor de la exacerbación del proceso clínico (mayor gravedad en  $t = 250$ ). Así, en los ratones infectados con NC-Mez encontramos una mayor mortalidad y una mayor precocidad en la sintomatología y en la detección de anticuerpos en el momento  $t = 250$ . El análisis estadístico nos reveló que en los días 1, 14 y 21 p.i., la intensidad de las lesiones del SNC presentó diferencias significativas a favor de  $t = 250$ . También las encontramos en el hígado en el día 14 p.i. y en el corazón el día 1 p.i.. El análisis de la carga parasitaria confirmó estos resultados en el SNC en los días 1 y 14 p.i. y en el hígado el día 14 p.i.. Únicamente se encontró una comparación estadística a favor de la atenuación cuando analizamos estadísticamente la intensidad de las lesiones en el pulmón el día 21 p.i.. Estos resultados podrían deberse a dos causas diferentes. Por una parte, el aislado NC-Liverpool pudo haber desplazado a los otros dos aislados durante los 38 pases debido a su mayor capacidad adaptativa al cultivo celular (Capítulo 4 de la Tesis), por lo que la infección con NC-Mez en el momento  $t = 250$  provocaría un cuadro clínico más grave por contener una mayor concentración de NC-Liverpool (el aislado más virulento) (Principio de exclusión competitiva de Gauss). Por otra, los aislados menos favorecidos (NC-1 y NC-SweB1) en el crecimiento en cultivo celular, al estar sometidos a una gran presión selectiva por el aislado con una mayor capacidad adaptativa (NC-Liverpool: Capítulo 4 de la Tesis), aumentarían su *fitness*, mejorando sus propiedades biológicas (Hipótesis de la Reina Roja).

En conclusión, nuestro estudio proporciona evidencias de la diversidad biológica y clínica intraespecífica de *N. caninum*, sustentadas en las amplias diferencias encontradas en la mayoría de los parámetros estudiados en nuestro modelo murino:

mortalidad, morbilidad, intensidad de lesiones y carga parasitaria. Además, hemos demostrado que el mantenimiento prolongado del parásito en cultivo celular no genera atenuación de la enfermedad provocada por *N. caninum* en el modelo murino.

**ANEXO I****VARIABLE DEPENDIENTE: SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**

FUENTE	DF	CUAD.	MEDIA CUAD.	Σ F	Pr > F
MODELO	27	49,47244195	1,83231266	10,12	<,0001
ERROR	95	17,19882634	0,18104028		
TOTAL C.	122	66,67126829			
<b>Coef. Det (R)</b>	<b>Coef. Var.</b>	<b>Raiz MSE</b>	<b>Media</b>		
<b>0,742035</b>	<b>56,91687</b>	<b>0,425488</b>	<b>0,747561</b>		
FUENTE	DF	E. Tipo I	MEDIA CUAD.	Σ F	Pr > F
AISLADO	3	6,17275557	2,05758519	11,37	<,0001
MOMENTO	1	4,04010799	4,04010799	22,32	<,0001
FASE	4	25,60241823	6,40060456	35,35	<,0001
AIS/MOM	3	3,42665849	1,14221950	6,31	0,0006
AIS/FASE	12	8,13671776	0,67805981	3,75	0,0001
MOM/FASE	4	2,09378392	0,52344598	2,89	0,0,0263
FUENTE	DF	E. Tipo III	MEDIA CUAD.	Σ F	Pr > F
AISLADO	3	8,33305632	2,77768544	15,34	<,0001
MOMENTO	1	2,56009438	2,56009438	14,14	0,0003
FASE	4	25,08150598	6,27037650	34,64	<,0001
AIS/MOM	3	3,16398755	1,05466252	5,83	0,0011
AIS/FASE	12	8,17079329	0,68089944	3,76	0,0001
MOM/FASE	4	2,09378392	0,52344598	2,89	0,0263
CONTRASTE	DF	CONTRASTE	MEDIA CUAD.	Σ F	Pr > F
LIV/1/SW/M	1	2,65031857	2,65031857	14,64	0,0002
1/LIV	1	2,48481952	2,48481952	13,73	0,0004
1/SW	1	0,48960667	0,48960667	2,70	0,1034
LIV/SW	1	4,88000043	4,88000043	26,96	<,0001

**VARIABLE DEPENDIENTE: CORAZÓN**

FUENTE	DF	CUAD.	MEDIA CUAD.	Σ F	Pr > F
MODELO	27	19,58078992	0,72521444	4,95	<,0001
ERROR	95	13,91107999	0,14643242		
TOTAL C.	122	33,49186992			
<b>Coef. Det (R)</b>	<b>Coef. Var.</b>	<b>Raiz MSE</b>	<b>Media</b>		
<b>0,584643</b>	<b>56,70817</b>	<b>0,382665</b>	<b>0,674797</b>		
FUENTE	DF	E. Tipo I	MEDIA CUAD.	Σ F	Pr > F
AISLADO	3	4,45474871	1,48491624	10,14	<,0001
MOMENTO	1	0,04378788	0,04378788	0,30	0,5858
FASE	4	9,24132309	2,31033077	15,78	<,0001
AIS/MOM	3	1,10991278	0,36997093	2,53	0,0621
AIS/FASE	12	1,65396207	0,13783017	0,94	0,5100
MOM/FASE	4	3,07705539	0,76926385	5,25	0,0007
FUENTE	DF	E. Tipo III	MEDIA CUAD.	Σ F	Pr > F
AISLADO	3	3,61728293	1,20576098	8,23	<,0001
MOMENTO	1	0,03538409	0,03538409	0,24	0,6242
FASE	4	9,32759412	2,33189853	15,92	<,0001
AIS/MOM	3	0,91116463	0,30372154	2,07	0,1088
AIS/FASE	12	1,63307987	0,13608999	0,93	0,5214
MOM/FASE	4	3,07705539	0,76926385	5,25	0,0007
CONTRASTE	DF	CONTRASTE	MEDIA CUAD.	Σ F	Pr > F
LIV/1/SW/M	1	0,89167100	0,89167100	6,09	0,0154
1/LIV	1	1,57604920	1,57604920	10,76	0,0014
1/SW	1	0,06666667	0,06666667	0,46	0,5015
LIV/SW	1	2,21679892	2,21679892	15,14	0,0002

## VARIABLE DEPENDIENTE: PULMÓN

FUENTE	DF	CUAD.	MEDIA CUAD.	Σ F	Pr > F
MODELO	27	86,5685450	3,2062424	8,29	<,0001
ERROR	95	36,7485281	0,3868266		
TOTAL C.	122	123,3170732			
<b>Coef. Det (R)</b> 0,702000	<b>Coef. Var.</b> 36,69080	<b>Raiz MSE</b> 0,621954	<b>Media</b> 1,695122		
FUENTE	DF	E. Tipo I	MEDIA CUAD.	Σ F	Pr > F
AISLADO	3	21,90873984	7,30291328	18,88	<,0001
MOMENTO	1	0,16500000	0,16500000	0,43	0,5153
FASE	4	39,32455390	9,83113848	25,41	<,0001
AIS/MOM	3	1,24642439	0,41547480	1,07	0,3639
AIS/FASE	12	8,01914145	0,66826179	1,73	0,0728
MOM/FASE	4	15,90468545	3,97617136	10,28	<,0001
FUENTE	DF	E. Tipo III	MEDIA CUAD.	Σ F	Pr > F
AISLADO	3	14,36050427	4,78683476	12,37	<,0001
MOMENTO	1	0,03090094	0,03090094	0,08	0,7781
FASE	4	39,23044344	9,80761086	25,35	<,0001
AIS/MOM	3	1,78876822	0,59625607	1,54	0,2089
AIS/FASE	12	9,97704969	0,83142081	2,15	0,0205
MOM/FASE	4	15,90468545	3,97617136	10,28	<,0001
CONTRASTE	DF	CONTRASTE	MEDIA CUAD.	Σ F	Pr > F
LIV/1/SW/M	1	0,11784766	0,11784766	0,30	0,5823
1/LIV	1	12,98472471	12,98472471	33,57	<,0001
1/SW	1	0,60000000	0,60000000	1,55	0,2160
LIV/SW	1	8,42728729	8,42729729	21,79	<,0001

## VARIABLE DEPENDIENTE: HIGADO

FUENTE	DF	CUAD.	MEDIA CUAD.	Σ F	Pr > F
MODELO	27	18,88780532	0,69954835	7,70	<,001
ERROR	95	8,63612385	0,90090657		
TOTAL C.	122	27,52392917			
<b>Coef. Det (R)</b> 0,686232	<b>Coef. Var.</b> 29,30446	<b>Raiz MSE</b> 0301507	<b>Media</b> 1,028878		
FUENTE	DF	E. Tipo I	MEDIA CUAD.	Σ F	Pr > F
AISLADO	3	0,37098864	0,12366288	1,36	0,2597
MOMENTO	1	0,92453048	0,92453048	10,17	0,0019
FASE	4	6,57693201	1,64423300	18,09	<,0001
AIS/MOM	3	0,97765263	0,32588421	3,58	0,0166
AIS/FASE	12	1,31986770	0,10998898	1,21	0,2878
MOM/FASE	4	8,71783386	2,17945846	23,97	<,0001
FUENTE	DF	E. Tipo III	MEDIA CUAD.	Σ F	Pr > F
AISLADO	3	0,15363658	0,05121219	0,56	0,6405
MOMENTO	1	1,05705992	1,05705992	11,63	0,0010
FASE	4	6,62427427	1,65606857	18,22	<,0001
AIS/MOM	3	0,96252119	0,32084040	3,53	0,0178
AIS/FASE	12	1,37638037	0,11469836	1,26	0,2542
MOM/FASE	4	8,71783386	2,17945846	23,97	<,0001
CONTRASTE	DF	CONTRASTE	MEDIA CUAD.	Σ F	Pr > F
LIV/1/SW/M	1	0,08118016	0,08118016	0,89	0,3471
1/LIV	1	0,5967349	0,5967349	0,66	0,4198
1/SW	1	0,02024007	0,02024007	0,22	0,6381
LIV/SW	1	0,01337075	0,01337075	0,15	0,7022

## VARIABLE DEPENDIENTE: RIÑÓN

FUENTE	DF	CUAD.	MEDIA CUAD.	$\Sigma F$	Pr > F
MODELO	27	16,40058320	0,60742901	5,07	<,0001
ERROR	95	11,37482331	0,11973498		
TOTAL C.	122	27,77540650			
<b>Coef. Det (R)</b>	<b>Coef. Var.</b>	<b>Raiz MSE</b>	<b>Media</b>		
0,590471	44,45052	0,346027	0,778455		
FUENTE	DF	E. Tipo I	MEDIA CUAD.	$\Sigma F$	Pr > F
AISLADO	3	0,24453529	0,08151176	0,68	0,5659
MOMENTO	1	0,03040825	0,03040825	0,25	0,6155
FASE	4	8,58274668	2,14568667	17,92	<,0001
AIS/MOM	3	1,10657485	0,36885828	3,08	0,0311
AIS/FASE	12	2,47876117	0,20656343	1,73	0,0733
MOM/FASE	4	3,95755695	0,98938924	8,26	<,0001
FUENTE	DF	E. Tipo III	MEDIA CUAD.	$\Sigma F$	Pr > F
AISLADO	3	0,50048855	0,16682952	1,39	0,2496
MOMENTO	1	0,03696134	0,03696134	0,31	0,5798
FASE	4	9,24284228	2,31071057	19,30	<,0001
AIS/MOM	3	0,86515239	0,28838413	2,41	0,0719
AIS/FASE	12	2,79423584	0,23285299	1,94	0,0383
MOM/FASE	4	3,95755695	0,98938924	8,26	<,0001
CONTRASTE	DF	CONTRASTE	MEDIA CUAD.	$\Sigma F$	Pr > F
LIV/1/SW/M	1	0,07733304	0,07733304	0,65	0,4236
1/LIV	1	0,39351720	0,39351720	3,29	0,0730
1/SW	1	0,23437500	0,23437500	1,96	0,1650
LIV/SW	1	0,03592058	0,03592058	0,30	0,5852

## VARIABLE DEPENDIENTE: BAZO

FUENTE	DF	CUAD.	MEDIA CUAD.	$\Sigma F$	Pr > F
MODELO	27	63,80134288	2,36301270	16,34	<,0001
ERROR	95	13,73524249	0,14458150		
TOTAL C.	122	77,53658537			
<b>Coef. Det (R)</b>	<b>Coef. Var.</b>	<b>Raiz MSE</b>	<b>Media</b>		
0,822855	34,07604	0,380239	1,115854		
FUENTE	DF	E. Tipo I	MEDIA CUAD.	$\Sigma F$	Pr > F
AISLADO	3	14,02541112	4,67513704	32,34	<,0001
MOMENTO	1	0,61737795	0,61737795	4,27	0,0415
FASE	4	36,81682736	9,20420684	63,66	<,0001
AIS/MOM	3	0,22398302	0,07466101	0,52	0,6720
AIS/FASE	12	6,37952550	0,53162713	3,68	0,0001
MOM/FASE	4	5,73821792	1,43455448	9,92	<,0001
FUENTE	DF	E. Tipo III	MEDIA CUAD.	$\Sigma F$	Pr > F
AISLADO	3	16,09020522	5,36350174	37,10	<,0001
MOMENTO	1	1,98417251	1,98417251	13,72	0,0004
FASE	4	38,81426402	9,70356600	67,11	<,0001
AIS/MOM	3	0,13214238	0,04404746	0,30	0,8220
AIS/FASE	12	7,25333978	0,60444498	4,18	<,0001
MOM/FASE	4	5,73821792	1,43455448	9,92	<,0001
CONTRASTE	DF	CONTRASTE	MEDIA CUAD.	$\Sigma F$	Pr > F
LIV/1/SW/M	1	1,34453736	1,34453736	9,30	0,0030
1/LIV	1	13,82027434	13,82027434	95,59	<,0001
1/SW	1	2,01666667	2,01666667	13,95	0,0003
LIV/SW	1	5,92144387	5,92144387	40,96	<,0001



## **6. CONCLUSIONES**



---

## DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA Y LA VARIABILIDAD ADAPTATIVA *IN VITRO* DE *N. caninum*:

**Primera.** Los aislados de *N. caninum* estudiados, presentan variaciones significativas en su *fitness*, lo que sugiere la existencia de diversidad intraespecífica. Estas diferencias no guardan relación con el origen geográfico o con la especie de procedencia de los aislados.

**Segunda.** En contraste con las predicciones clásicas del trinquete de Muller, los taquizoítos de *N. caninum* presentan rápidos cambios adaptativos *in vitro*, apoyando la hipótesis de la existencia de una estructura de población clonal para el parásito. El estudio realizado no permite definir si los cambios observados son debidos al efecto de las mutaciones o al concurso de fenómenos de variación fenotípica clonal.

**Tercera.** El aislado NC-Liverpool es el que presenta una mayor capacidad adaptativa, seguido de NC-1 y NC-SweB1.

## DE LA DIVERSIDAD PATOGENICA DE *N. caninum* EN EL MODELO MURINO:

**Primera.** Se confirma la presencia de diversidad patogénica intraespecífica en *N. caninum*. Las consecuencias de la infección con los aislados estudiados son diferentes para la mayoría de los parámetros estudiados.

**Segunda.** El aislado NC-Liverpool es más virulento en el modelo murino empleado que los aislados NC-1 y NC-SweB1, causando más mortalidad, un cuadro sintomático y de lesiones más grave y una mayor carga parasitaria en algunos órganos diana. Esta mayor patogenicidad observada *in vivo* se corresponde con la mayor capacidad adaptativa obtenida *in vitro*. Por el contrario, no se observan diferencias en la virulencia entre los aislados NC-1 y NC-SweB1.

**Tercera.** Se confirma la existencia de una asociación moderada entre la intensidad de las lesiones y la carga parasitaria en el SNC de los ratones infectados con *N. caninum*. Sin embargo, esta asociación no se presenta en el resto de órganos estudiados: pulmón, hígado y corazón.

**Cuarta.** La infección por los aislados de *N. caninum* estudiados induce una respuesta de anticuerpos parecida en el hospedador murino, no presentándose diferencias en la respuesta de IgG sérica anti-*N. caninum* por parte de los ratones infectados con los diferentes aislados objeto de estudio.

**Quinta.** El mantenimiento prolongado en cultivo celular del parásito no provoca su atenuación en un modelo murino no gestante.

#### DE LA INTERACCIÓN COMPETITIVA DE *N. caninum*:

**Primera.** Los resultados obtenidos *in vitro* son compatibles con la teoría de la selección de parientes ya que el *fitness* de los aislados en competencia es superior al observado en los aislados individuales. *In vivo*, su comportamiento similar al resto de aislados indica que el efecto competitivo no ha modificado las propiedades biológicas de los aislados componentes iniciales. Sin embargo, el cultivo continuado origina una exacerbación de algunos parámetros relacionados con su patogenicidad en el modelo murino.

## **7. RESUMEN**



*Neospora caninum* es un protozoo parásito que infecta principalmente al perro y al ganado bovino, con estrechas semejanzas biológicas y estructurales con *Toxoplasma gondii*. Evidencias recientes sugieren la existencia de una marcada variación de las propiedades genéticas y biológicas entre los diferentes aislados del parásito, similar a las observadas en *T. gondii*. Tal variabilidad apuntaría a la existencia una estructura de población sexual para el parásito, debido a la aparente ausencia de sobrerrepresentación y de genotipos idénticos extendidos, los cuales representan criterios de reproducción clonal. Desde el punto de vista clásico, el desarrollo asexual de poblaciones de parásitos unicelulares, tal y como ocurre en la transmisión vertical de *N. caninum*, supone la incapacidad de presentar rápidos cambios adaptativos, ya que la progresiva acumulación de mutaciones deletéreas reducirían su *fitness* (trinquete de Muller).

En el primer experimento de esta tesis doctoral, se ha comparado la adaptación de tres aislados de *N. caninum* (NC-1, NC-SweB1 y NC-Liverpool) a nuevos ambientes, cultivando al parásito en una nueva línea celular, usando un modelo experimental similar al propuesto por Travisano *et al.* (*Science*, 267:87-90, 1995), para estudiar el papel de la adaptación en las poblaciones de bacterias en el laboratorio. En nuestro experimento, el parámetro maltusiano del *fitness* se determinó en cada aislado, midiendo la multiplicación asexual, en 10 réplicas diferentes, de taquizoítos de cada uno de los aislados antes y después de realizar 38 pases en la línea celular Marc-145, (aproximadamente a 250 generaciones). El valor medio ( $M_{250}$ ) y la varianza ( $V_{250}$ ) de este rasgo se comparó para cada aislado con la medida de las réplicas de los ancestros ( $M_0$  y  $V_0$ ) utilizando la prueba de la U-Mann-Whitney y la F-Snedecor, respectivamente. La variabilidad entre los tres aislados al inicio y al final del experimento se compararon mediante la prueba de la H-Kruskal-Wallis. Los resultados de la prueba de evolución mostraron un incremento significativo de la media ( $M_{250} > M_0$ ) para los tres aislados de *N. caninum* ( $p < 0.001$ ). La prueba de la F-Snedecor indicó que la varianza no presentó incrementos significativos para ninguno de los tres aislados. Los resultados de la prueba de diversidad genética revelaron diferencias significativas del *fitness* entre los tres cultivos clonales de *N. caninum* en  $t = 0$  y  $t = 250$ . En contraste con las clásicas

predicciones del trinquete de Muller, los valores del *fitness* obtenidos para los tres aislados mostraron rápidos cambios adaptativos, aunque no se pudo determinar si tales cambios fueron consecuencia de la selección natural o de la variación fenotípica clonal. Todo ello, apoya la idea de que la propagación asexual de *N. caninum* de modo vertical por la vía transplacentaria en la naturaleza, u otras alternativas de transmisión horizontal, tales como la ingestión de placentas contaminadas, en ausencia de reproducción sexual del parásito, podrían permitir la adaptación de éste a nuevos cambios ambientales. Todas las evidencias de nuestro estudio confirman que la estructura de población clonal debe ser mantenida como posible base de las poblaciones de *Neospora*. La estructura de población y el sistema de apareamiento de los protozoos parásitos están fuertemente ligados a fenómenos biológicos con consecuencias cruciales en la epidemiología de las enfermedades transmisibles.

En el segundo experimento, los objetivos fueron comparar la patogenicidad, durante las fases aguda y crónica de la neosporosis, de tres aislados de *N. caninum* (NC-1, NC-SweB1 y NC-Liverpool) en un modelo de ratón, antes ( $t = 0$ ) y después ( $t = 250$ ) del paso del parásito por el cultivo celular durante aproximadamente 250 generaciones. Para ello, 15 ratones hembra BALB/c fueron inoculados con  $5 \times 10^6$  taquizoítos de cada aislado y pase ( $t = 0$  y  $t = 250$ ) por cultivo celular o solo con PBS (nueve grupos de ratones en total). La mortalidad y los signos clínicos de enfermedad (erizamiento del pelo, inmovilidad, torneo y debilidad del tercio posterior y parálisis) se recogieron diariamente durante todo el periodo experimental. Se sacrificaron tres ratones de cada grupo en los días 1, 7, 14, 21 y 42 p.i. de los que se extrajo sangre y se procedió a la recogida de muestras de los diversos órganos diana. Las muestras de suero se alicuotaron y se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la determinación de la IgG anti-*N. caninum* por IFI. Secciones múltiples de cerebro, cerebelo y médula oblonga (SNC) y porciones del corazón, pulmón, hígado, riñón y bazo fueron fijadas en formol al 10% y procesadas utilizando técnicas histológicas de rutina, cortándose en  $5 \mu\text{m}$  y tiñéndose con hematoxilina y eosina o se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta ser procesadas para la detección y cuantificación del ADN de *N. caninum* mediante PCR-cuantitativa. La gravedad de las

lesiones histológicas en cada órgano se graduó de 0 = ausente a 4 = extrema. La comparación de los títulos de IFI y de la graduación de las lesiones entre aislados y entre los momentos del experimento se realizó mediante el uso de un GLM, y las pruebas de H-Kruskal-Wallis y de U-Mann-Whitney. La comparación de los resultados de la PCR-cuantitativa se realizó mediante un "bootstrap". La mortalidad y la morbilidad fueron significativamente mayores en NC-Liverpool que en los otros dos aislados, en ambos momentos del experimento,  $t = 0$  y  $t = 250$ , aunque no hubo diferencias significativas en los distintos parámetros estudiados cuando fueron observados los ratones inoculados con el parásito procedente de estos dos momentos. El GLM determinó que las lesiones de los diferentes órganos fueron significativamente más graves en los dos momentos del experimento en los ratones inoculados con el aislado NC-Liverpool. El estudio por PCR-cuantitativa mostró diferencias significativas en el SNC y en el pulmón en los ratones inoculados con el aislado NC-Liverpool cuando se compararon con los ratones infectados con los otros dos aislados. El estudio de correlación demostró una asociación estadística en el SNC entre la carga parasitaria y la intensidad de las lesiones. La IgG específica fue detectada a partir de los días 7 y 14 p.i. en los diferentes grupos y presentó los valores máximos en los días 21 y 42. No hubo diferencias significativas entre los títulos de IFI observados entre los diferentes grupos de ratones. En conclusión, los resultados han demostrado diferencias significativas entre la patogenicidad de tres aislados de *N. caninum* y la ausencia de atenuación del parásito tras el pase continuado en cultivo celular.



## **8. SUMMARY**



*Neospora caninum* is a protozoan parasite that mainly infects cattle and dogs with close structural and biological similarities to *Toxoplasma gondii*. Recent evidence suggests the existence of a marked variation in biological and genetic properties among different parasite isolates similar to that observed in the close relative *Toxoplasma gondii*. Such variability could claim more for a sexual population structure rather than for a clonal one due to the apparent absence of overrepresented, widespread identical genotypes, which represents a criterion of clonal reproduction. From a classical viewpoint, asexually growing populations of unicellular parasites, like those occurring in vertical transmission in bovine neosporosis, may be incapable of rapid adaptive change. In these organisms, progressive accumulation of deleterious mutations should reduce their *fitness* (Muller's ratchet).

In the first experiment, we have compared the adaptation of three *N. caninum* isolates (NC-1, NC-SweB1 and NC-Liverpool) to a new environment, culturing the parasite in a new cell line, using an experimental model similar to that proposed by Travisano *et al.* (*Science*, 267:87-90, 1995) to analyze the roles of adaptation, in laboratory populations of bacteria. In our experiment, the Malthusian parameter of *fitness* was determined in each isolate by measuring 10 different replicates of asexually growing tachyzoites in tissue culture after 38 passages in the Mark-145 cell line corresponding to approximately 250 parasite generations. The mean value of this trait ( $M_{250}$ ) and the variance ( $V_{250}$ ) were compared for each isolate with measurements made on ancestral replicates ( $M_0$ ,  $V_0$ ) using a U-Mann Whitney test and F-test, respectively. Variability among the three isolates at the beginning and the end of the experiment were compared by the Kruskal-Wallis H-test. The results of the evolution test showed a significant increase in the mean *fitness* ( $M_{250} > M_0$ ) for the three *Neospora* isolates ( $p < 0.001$ ). F tests indicated that the variance didn't significantly increase for the three *Neospora* isolates. The results of the genetic diversity test revealed significant *fitness* differences among the three clonal cultures of *N. caninum* at  $t = 0$  y  $t = 250$ . In contrast with classical Muller's ratchet predictions, the *fitness* data obtained for the three isolates showed a rapid adaptive change, even though our studies did not

determine if these changes were due to the effect of natural selection or a clonal phenotypic variation. support the idea that asexual propagation of *N. caninum* in nature via a transplacental route, or other alternatives of horizontal transmission such as ingestion of contaminated placentae, in the absence of parasite sexual reproduction, could permit parasite adaptation to new environmental challenges. On the other hand, evidence from our study suggests that clonal structure must be maintained as the possible basis of *Neospora* population. Population structure and mating system of parasitic protozoa are tightly linked biological phenomena with crucial consequences for the epidemiology of transmissible diseases.

In the second experiment, the aims were to compare the pathogenicity during the acute and chronic phases of neosporosis of three different *N. caninum* isolates (Nc-1, NC-Liverpool and Nc-SweB1) in a mouse model, before (t=0) and after (t=250) parasite passage in cell-culture during approximately 250 generations. Fifteen inbred six-week-old female BALB/c mice were inoculated intraperitoneally with  $5 \times 10^6$  tachyzoites resuspended in sterile PBS of each isolate and cell-culture passage or with PBS alone (nine groups of mice in total). Clinical signs of disease (rough hair coats, immobility, head tilts, limb weakness/paralysis) were recorded daily throughout the experimental period. Blood was collected and necropsies performed on three mice from each group on days 1, 7, 14, 21 and 42 postinfection. Serum samples were aliquoted and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until specific IgG determinations were performed using IFAT. Multiple sections of brain, cerebellum and medulla oblongata (CNS) and portions of heart, lung, liver, kidney and spleen tissues were fixed in 10% formalin and processed using routine histological techniques, cut at  $5 \mu\text{m}$  and stained with haematoxylin and eosin or stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until processed for detection and quantification of *N. caninum* ADN by a quantitative PCR. Severity of histological lesions in each organ was graded from 0 = none to 4 = extreme. Comparison of IFAT titres and lesion scores was accomplished among mice inoculated with different isolates and cell-culture passages using GLM, Kruskal-Wallis H-tests and Mann-Whitney U-tests. Comparison of results of quantitative-PCR were determined by bootstrap. Mortality and morbidity were significantly higher in NC-Liverpool compared

to the other isolates, both in t=0 and t=250, although non-significant differences were observed in mice inoculated with different passages of this isolate. GLM determined that lesions in the different organs were consistently more severe at different times pi in mice inoculated with NC-Liverpool. Quantitative-PCR determinations showed significant differences in parasite load between isolates in the SNC and lung. A positive correlation was found between intensity of lesions and parasite load in the SNC. Specific IgG were detected from days 7-14 pi in the different groups and peaked on days 21-42. No significant differences were observed in IFAT titres between the different groups of parasite-inoculated mice. In conclusion, the results have demonstrated a significant difference in pathogenicity among different *N. caninum* isolates and the absence of attenuation after parasite passage in cell-culture.



## **9. BIBLIOGRAFÍA**



- Ajzenberg, D., A.L. Bañuls, M. Tibayrenc and M.L. Dardé. 2002. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *Int. J. Parasitol.* 32: 27-38.
- Almería, S., D. Ferrer, M. Pabon, J. Castella, and S. Manas. 2002. Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediate host of *Neospora caninum*. *Vet.Parasitol.* 107:287-294.
- Anderson, M. L., A. G. Andrianarivo, and P. A. Conrad. 2000. Neosporosis in cattle. *Anim Reprod.Sci.* 60-61:417-431.
- Anderson, M. L., C. W. Palmer, M. C. Thurmond, J. P. Picanso, P. C. Blanchard, R. E. Breitmeyer, A. W. Layton, M. McAllister, B. Daft, and H. Kinde. 1995. Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 207:1206-1210.
- Anderson, M. L., J. P. Reynolds, J. D. Rowe, K. W. Sverlow, A. E. Packham, B. C. Barr, and P. A. Conrad. 1997. Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp infection in dairy cattle. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 210:1169-1172.
- Anderson, M. L., P. C. Blanchard, B. C. Barr, J. P. Dubey, R. L. Hoffman, and P. A. Conrad. 1991. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 198:241-244.
- Andrianarivo, A. G., B. C. Barr, M. L. Anderson, J. D. Rowe, A. E. Packham, K. W. Sverlow, and P. A. Conrad. 2001. Immune responses in pregnant cattle and bovine fetuses following experimental infection with *Neospora caninum*. *Parasitol.Res.* 87 :817-825.
- Andrianarivo, A. G., J. D. Rowe, B. C. Barr, M. L. Anderson, A. E. Packham, K. W. Sverlow, L. Choromanski, C. Loui, A. Grace, and P. A. Conrad. 2000. A POLYGEN-adjuvanted killed *Neospora caninum* tachyzoite preparation failed to prevent foetal infection in pregnant cattle following i.v./i.m. experimental tachyzoite challenge. *Int.J.Parasitol.* 30:985-990.
- Atkinson, R., P. A. Harper, C. Ryce, D. A. Morrison, and J. T. Ellis. 1999. Comparison of the biological characteristics of two isolates of *Neospora caninum*. *Parasitology* 118 ( Pt 4):363-370.
- Baillargeon, P., G. Fecteau, J. Pare, P. Lamothe, and R. Sauve. 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. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 218:1803-1806.
- Baker, D. G., T. Y. Morishita, D. L. Brooks, S. K. Shen, D. S. Lindsay, and J. P. Dubey. 1995. Experimental oral inoculations in birds to evaluate potential definitive hosts of *Neospora caninum*. *J.Parasitol.* 81:783-785.
- Barber, J. S., L. van Ham, I. Polis, and A. J. Trees. 1997. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in Belgian dogs. *J.Small Anim Pract.* 38:15-16.
- Barber, J., A. J. Trees, M. Owen, and B. Tennant. 1993. Isolation of *Neospora caninum* from a British dog. *Vet.Rec.* 133:531-532.
- Barber, J.S. and A.J. Trees. 1998. Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *Int. J. Parasitol.* 28: 57-64.
- Barr, B. C., J. D. Rowe, K. W. Sverlow, R. H. BonDurant, A. A. Ardans, M. N. Oliver, and P. A. Conrad. 1994a. Experimental reproduction of bovine fetal *Neospora* infection and death with a bovine *Neospora* isolate. *J.Vet.Diagn.Invest* 6:207-215.
- Barr, B. C., M. L. Anderson, J. P. Dubey, and P. A. Conrad. 1991a. *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. *Vet.Pathol.* 28:110-116.

- Barr, B. C., M. L. Anderson, L. W. Woods, J. P. Dubey, and P. A. Conrad. 1992. *Neospora*-like protozoal infections associated with abortion in goats. *J.Vet.Diagn.Invest* 4:365-367.
- Barr, B. C., M. L. Anderson, P. C. Blanchard, B. M. Daft, H. Kinde, and P. A. Conrad. 1990. Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections. *Vet. Pathol.* 27: 354-61.
- Barr, B. C., P. A. Conrad, J. P. Dubey, and M. L. Anderson. 1991b. *Neospora*-like encephalomyelitis in a calf: pathology, ultrastructure, and immunoreactivity. *J.Vet.Diagn.Invest* 3:39-46.
- Barr, B. C., P. A. Conrad, K. W. Sverlow, A. F. Tarantal, and A. G. Hendrickx. 1994b. Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. *Lab.Invest.* 71:236-242.
- Barr, B. C., P. A. Conrad, R. Breitmeyer, K. Sverlow, M. L. Anderson, J. Reynolds, A. E. Chauvet, J. P. Dubey, and A. A. Ardans. 1993. Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora*-infected fetuses: four cases (1990-1992). *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 202:113-117.
- Bartels, C. J., W. Wouda, and Y. H. Schukken. 1999. Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology* 52:247-257.
- Basso, W., L. Venturini, M. C. Venturini, D. E. Hill, O. C. Kwok, S. K. Shen, and J. P. Dubey. 2001. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. *J.Parasitol.* 87:612-618.
- Baszler, T. V., M. T. Long, T. F. McElwain, and B. A. Mathison. 1999. Interferon-gamma and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. *Int.J.Parasitol.* 29:1635-1646.
- Baszler, T. V., T. F. McElwain, and B. A. Mathison. 2000. Immunization of BALB/c mice with killed *Neospora caninum* tachyzoite antigen induces a type 2 immune response and exacerbates encephalitis and neurological disease. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 7:893-898.
- Beckers, C. J., T. Wakefield, and K. A. Joiner. 1997. The expression of *Toxoplasma* proteins in *Neospora caninum* and the identification of a gene encoding a novel rho-trypan protein. *Mol.Biochem.Parasitol.* 89:209-223.
- Bell, G. 1982. *The masterpiece of nature: The evolution and genetics of sexuality.* University of California Press.
- Bell, G. 1988. Recombination and the immortality of the germ line. *J. Evol Biol.* 1: 67-82.
- Bergeron, N., C. Girard, J. Pare, G. Fecteau, J. Robinson, and P. Baillargeon. 2001a. Rare detection of *Neospora caninum* in placentas from seropositive dams giving birth to full-term calves. *J.Vet.Diagn.Invest* 13:173-175.
- Bergeron, N., G. Fecteau, A. Villeneuve, C. Girard, and J. Pare. 2001b. Failure of dogs to shed oocysts after being fed bovine fetuses naturally infected by *Neospora caninum*. *Vet.Parasitol.* 97:145-152.
- Bergstrom, C., P. McElhany and L. Real. 1999. Transmission bottlenecks as determinants of virulence in rapidly evolving pathogens. *Evolution.* 96 :5095-5100.
- Bjerkas, I. and J. P. Dubey. 1991. Evidence that *Neospora caninum* is identical to the *Toxoplasma*-like parasite of Norwegian dogs. *Acta Vet.Scand.* 32:407-410.
- Bjerkas, I. and J. Presthus. 1989. The neuropathology in toxoplasmosis-like infection caused by a newly recognized cyst-forming sporozoon in dogs. *APMIS* 97:459-468.
- Bjerkas, I., S. F. Mohn, and J. Presthus. 1984. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z.Parasitenkd.* 70:271-274.

- Björkman, C., O. Johansson, S. Stenlund, O. J. Holmdahl, and A. Uggla. 1996. *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 208:1441-1444.
- Boulton, J. G., P. A. Gill, R. W. Cook, G. C. Fraser, P. A. Harper, and J. P. Dubey. 1995. Bovine *Neospora* abortion in north-eastern New South Wales. *Aust. Vet. J.* 72:119-120.
- Butcher, D. 1995. Muller's ratchet epistasis and mutation effects. *Genetics.* 141: 431-437.
- Bryan, L. A., A. A. Gajadhar, J. P. Dubey, and D. M. Haines. 1994. Bovine neonatal encephalomyelitis associated with a *Neospora* sp. protozoan. *Can. Vet. J.* 35:111-113.
- Bull, J.J. 1994. Perspective: virulence. *Evolution* 48, 1423-1437
- Buxton, D. 1998. Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp.) in sheep and goats: recent advances. *Vet. Res.* 29:289-310.
- Buxton, D., M. M. McAllister, and J. P. Dubey. 2002. The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends Parasitol.* 18:546-552.
- Buxton, D., S. W. Maley, S. Wright, K. M. Thomson, A. G. Rae, and E. A. Innes. 1998. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. *J. Comp. Pathol.* 118:267-279.
- Buxton, D., S. Wright, S. W. Maley, A. G. Rae, A. Lundén, and E. A. Innes. 2001. Immunity to experimental neosporosis in pregnant sheep. *Parasite Immunol.* 23:85-91.
- Campero, C. M., M. L. Anderson, G. Conosciuto, H. Odriozola, G. Bretschneider, and M. A. Poso. 1998. *Neospora caninum*-associated abortion in a dairy herd in Argentina. *Vet. Rec.* 143:228-229.
- Canada, N., C. S. Meireles, A. Rocha, S. Sousa, G. Thompson, J. P. Dubey, S. Romand, P. Thulliez, and J. M. Correia da Costa. 2002. First Portuguese isolate of *Neospora caninum* from an aborted fetus from a dairy herd with endemic neosporosis. *Vet. Parasitol.* 110:11-15.
- Charlesworth, B., and D. Charlesworth. 1997. Rapid fixation of deleterious alleles can be caused by Muller's ratchet. *Genet. Res.* 70: 63-73.
- Chaves-Velázquez, A., G. Álvarez García, E. Collantes Fernández, E. Casas Astos, R. Rosario Alcántara, E. Serrano Martínez, L. M. Ortega Mora. 2004. First report of *Neospora caninum* infection in adult alpacas (*Vicugna pacos*) and llamas (*Lama glama*). (Aceptado en *J. Parasitol.*).
- Cheadle, M. A., J. A. Spencer, and B. L. Blagburn. 1999. Seroprevalences of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in nondomestic felids from southern Africa. *J. Zoo. Wildl. Med.* 30:248-251.
- Collantes-Fernández, E., A. Zaballos, G. Álvarez-García and L.M. Ortega-Mora. 2002a. Quantitative detection of *Neospora caninum* in bobine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. *J. Clin. Microb.* 40: 1194-1198.
- Collantes-Fernández, E., G. Álvarez-García, I. López-Pérez, L.M. Ortega-Mora. 2002b. Parasite load in blood and organs related to systemic immune response during acute and chronic *Neospora caninum* infection in mice. European Union International Congress Cost- 854. Münchenwiler, Switzerland, December 20.
- Collantes-Fernández, E., G. Álvarez-García, V. Pérez-Pérez, J. Pereira-Bueno, L. M. Ortega-Mora. 2004. Characterization of pathology and parasite load in outbred and inbred mouse models of chronic *Neospora caninum* infection. (Aceptado en *J. Parasitol.*)
- Cole, R. A., D. S. Lindsay, B. L. Blagburn, and J. P. Dubey. 1995. Vertical transmission of *Neospora caninum* in mice. *J. Parasitol.* 81:730-732.

- Cole, R. A., D. S. Lindsay, J. P. Dubey, M. A. Toivio-Kinnucan, and B. L. Blagburn. 1994. Characterization of a murine monoclonal antibody generated against *Neospora caninum* tachyzoites by use of western blot analysis and immunoelectron microscopy. *Am.J.Vet.Res.* 55:1717-1722.
- Conrad, P. A., B. C. Barr, K. W. Sverlow, M. Anderson, B. Daft, H. Kinde, J. P. Dubey, L. Munson, and A. Ardans. 1993. *In vitro* isolation and characterization of a *Neospora* sp. from aborted bovine fetuses. *Parasitology* 106 ( Pt 3):239-249.
- Crow, J.F.. 1986. Basic concepts in population, quantitative and evolutionary genetics. W.H. Freeman. New York.
- Crow, J.F. and M. Kimura. 1970. An introduction to population genetics theory. Harper and Row. New York, 591 pp.
- Cuddon, P., D. S. Lin, D. D. Bowman, D. S. Lindsay, T. K. Miller, I. D. Duncan, A. deLahunta, J. Cummings, M. Suter, and B. Cooper. 1992. *Neospora caninum* infection in English Springer Spaniel littermates. Diagnostic evaluation and organism isolation. *J.Vet.Intern.Med.* 6:325-332.
- Davies, C.M., E. Fairbrother and J. Webster. 2002. Mixed strain schistosome infections of snails and the evolution of parasite virulence. *Parasitol.* 124, 31-38.
- Davison, H. C., A. Otter, and A. J. Trees. 1999a. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *Int.J.Parasitol.* 29:1683-1689.
- Davison, H. C., C. S. Guy, J. W. McGarry, F. Guy, D. J. Williams, D. F. Kelly, and A. J. Trees. 2001. Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. *Res.Vet.Sci.* 70:163-168.
- Davison, H. C., N. P. French, and A. J. Trees. 1999b. Herd-specific and age-specific seroprevalence of *Neospora caninum* in 14 British dairy herds. *Vet.Rec.* 144:547-550.
- De Marez, T., S. Liddell, J. P. Dubey, M. C. Jenkins, and L. Gasbarre. 1999. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. *Int.J.Parasitol*
- Derouin, F & Y.J.F. Garin. 1991. *Toxoplasma gondii*: blood and tissue kinetics during acute and chronic infections in mice. *J. Parasitol.* 73: 460-468.
- Dijkstra, T., H. W. Barkema, J. W. Hesselink, and W. Wouda. 2002b. Point source exposure of cattle to *Neospora caninum* consistent with periods of common housing and feeding and related to the introduction of a dog. *Vet.Parasitol.* 105:89-98.
- Dijkstra, T., H. W. Barkema, M. Eysker, and W. Wouda. 2001a. Evidence of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. *Int.J.Parasitol.* 31:209-215.
- Dijkstra, T., M. Eysker, G. Schares, F. J. Conraths, W. Wouda, and H. W. Barkema. 2001b. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int.J.Parasitol.* 31:747-752.
- Dobzhabsky, T.. 1955. *Genetics of the evolutionary process.* Columbia University Press. New York.
- Domingo,E., C. Escarmis, N. Sevilla. 1996. Basic concepts in RNA virus evolution. *FASEB J.* 10: 859-864
- Dreier, K. J., L. W. Stewarter, R. L. Kerlin, D. M. Ritter, and D. A. Brake. 1999. Phenotypic characterisation of a *Neospora caninum* temperature-sensitive strain in normal and immunodeficient mice. *Int.J.Parasitol.* 29:1627-1634.
- Dubey, J. P. 1999a. Neosporosis in cattle: biology and economic impact. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 214:1160-1163.

- Dubey, J. P. 1999b. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Vet.Parasitol.* 84:349-367.
- Dubey, J. P. 2003. Neosporosis in cattle. *J.Parasitol.* 89 (Suppl):S42-S56.
- Dubey, J. P. and A. d. Lahunta. 1993. Neosporosis associated congenital limb deformities in a calf. *Appl.Parasitol.* 34:229-233.
- Dubey, J. P. and D. S. Lindsay . 1989a. Fatal *Neospora caninum* infection in kittens. *J.Parasitol.* 75:148-151.
- Dubey, J. P. and D. S. Lindsay . 1989b. Transplacental *Neospora caninum* infection in cats. *J.Parasitol.* 75:765-771.
- Dubey, J. P. and D. S. Lindsay. 1989c. Transplacental *Neospora caninum* infection in dogs. *Am.J.Vet.Res.* 50:1578-1579.
- Dubey, J. P. and D. S. Lindsay. 1990. *Neospora caninum* induced abortion in sheep. *J.Vet.Díagn.Invest* 2:230-233.
- Dubey, J. P. and D. S. Lindsay. 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet.Parasitol.* 67:1-59.
- Dubey, J. P. and D. S. Lindsay. 2000. *Gerbils (Meriones unguiculatus)* are highly susceptible to oral infection with *Neospora caninum* oocysts. *Parasitol.Res.* 86:165-168.
- Dubey, J. P., A. L. Hattel, D. S. Lindsay, and M. J. Topper. 1988a. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 193:1259-1263.
- Dubey, J. P., B. C. Barr, J. R. Barta, I. Bjerkas, C. Björkman, B. L. Blagburn, D. D. Bowman, D. Buxton, J. T. Ellis, B. Gottstein, A. Hemphill, D. E. Hill, D. K. Howe, M. C. Jenkins, Y. Kobayashi, B. Koudela, A. E. Marsh, J. G. Mattsson, M. M. McAllister, D. Modry, Y. Omata, L. D. Sibley, C. A. Speer, A. J. Trees, A. Ugglá, S. J. Upton, D. J. Williams, and D. S. Lindsay. 2002a. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *Int.J.Parasitol.* 32:929-946.
- Dubey, J. P., D. E. Hill, D. S. Lindsay, M. C. Jenkins, A. Ugglá, and C. A. Speer. 2002b. *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni* are separate species/organisms. *Trends Parasitol.* 18:66-69.
- Dubey, J. P., D. S. Lindsay, M. L. Anderson, S. W. Davis, and S. K. Shen. 1992. Induced transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 201:709-713.
- Dubey, J. P., J. A. Morales, P. Villalobos, D. S. Lindsay, B. L. Blagburn, and M. J. Topper. 1996. Neosporosis-associated abortion in a dairy goat. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 208:263-265.
- Dubey, J. P., J. L. Carpenter, C. A. Speer, M. J. Topper, and A. Ugglá. 1988b. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 192:1269-1285.
- Dubey, J. P., K. R. Dorrough, M. C. Jenkins, S. Liddell, C. A. Speer, O. C. Kwok, and S. K. Shen. 1998a. Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. *Int.J.Parasitol.* 28:1293-1304.
- Dubey, J. P., S. Liddell, D. Mattson, C. A. Speert, D. K. Howe, and M. C. Jenkins. 2001. Characterization of the Oregon isolate of *Neospora hughesi* from a horse. *J.Parasitol.* 87:345-353.
- Dubey, J. P., S. Romand, M. Hilali, O. C. Kwok, and P. Thulliez. 1998b. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Egypt. *Int.J.Parasitol.* 28:527-529.

- Dubey, J. P., W. J. Hartley, and D. S. Lindsay. 1990. Congenital *Neospora caninum* infection in a calf with spinal cord anomaly. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 197:1043-1044.
- Dykhuizen, D.E. and D.L. Hartl. 1983. Selection in chemostats. *Microb. Rev.* 47(2), 150-68.
- Elena, S.F., V.S. cooper, and R.E. lenski. 1996. Punctuated evolution caused by selection of rare beneficial mutations. *Science* 272, 1802-1804.
- Ellis, J. T., D. A. Morrison, S. Liddell, M. C. Jenkins, O. B. Mohammed, C. Ryce, and J. P. Dubey. 1999. The genus *Hammondia* is paraphyletic. *Parasitology* 118 ( Pt 4):357-362.
- Eperon, S., K. Bronnimann, A. Hemphill, and B. Gottstein. 1999. Susceptibility of B-cell deficient C57BL/6 (microMT) mice to *Neospora caninum* infection. *Parasite Immunol.* 21:225-236.
- Ezio, F. and T. Anna. 2003. Antibodies to *Neospora caninum* in European brown hare (*Lepus europaeus*). *Vet. Parasitol.* 115:75-78.
- Fisher. R.A.. 1930. *The genetical theory of natural selection*. Clarendon Press (Reimpreson en 1958 por Dover Press). Oxofrd.
- Gabriel, W., M. Lynch and R. Burger. 1993. Muller`s Ratchet and mutational meltdowns. *Evolution.* 47: 1744-1757.
- Gabriel, W, and R.Burger. 2000. Fixation of clonal lineages under Muller`s ratchet. *Evolution*, 54(4): 1116-1125.
- Gessler, D. 1995. The constraints of finite size in asexual population and the rate of the ratchet. *Genet Res.* 66: 241-253.
- Gondim, L. F. P., L. Gao, and M. M. McAllister. 2002. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and *in vitro* isolation from oocysts. *J. Parasitol.* 88:1159-1163.
- Gondim, L. F., A. M. Pinheiro, P. O. Santos, E. E. Jesus, M. B. Ribeiro, H. S. FeRNANdes, M. A. Almeida, S. M. Freire, R. Meyer, and M. M. McAllister. 2001. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. *Vet. Parasitol.* 101:1-7.
- Gondim, L.F., M.M. McAllister, W.C. Pitt and D.E. Zemlicka. 2004. Coyotes (*canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 34 (2): 159-161.
- González, L., D. Buxton, R. Atxaerandio, G. Aduriz, S. Maley, J. C. Marco, and L. A. Cuervo. 1999. Bovine abortion associated with *Neospora caninum* in northern Spain. *Vet. Rec.* 144:145-150.
- Gottstein, B., S. Eperon, W. J. Dai, A. Cannas, A. Hemphill, and G. Greif. 2001. Efficacy of toltrazuril and ponazuril against experimental *Neospora caninum* infection in mice. *Parasitol. Res.* 87:43-48.
- Gould, S.J.. 1982. Darwinism and expansion of evolutionary theory. *Science.* 216: 380-387.
- Grigg, M.E. S. Bonnefoy, A.B. Hehl, Y. Suzuki, J.C. Boothroyd. 2001. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. *Science.* 294: 161-165.
- Grigg, M.E. and Y. Suzuki. 2003. Sexual recombination and clonal evolution of virulence in *Toxoplasma*. *Microb. Infect.* 5: 685-690.
- Guarino, A., G. Fusco, G. Savini, G. Di Francesco, and G. Cringoli. 2000. Neosporosis in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Southern Italy. *Vet. Parasitol.* 91:15-21.

- Guo, Z. G. and A. M. Johnson. 1995. Genetic comparison of *Neospora caninum* with *Toxoplasma* and *Sarcocystis* by random amplified polymorphic ADN-polymerase chain reaction. *Parasitol.Res.* 81:365-370.
- Haldane, J. B. S. 1932. *The causes of evolution*, longman green ed., London.
- Hamilton, W. D. 1964. The genetical evolution of social behavior. I and II. *J. Theor. Biology.* 7 : 1-52.
- Hay, W. H., L. G. Shell, D. S. Lindsay, and J. P. Dubey. 1990. Diagnosis and treatment of *Neospora caninum* infection in a dog. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 197:87-89.
- Hemphill, A. 1999. The host-parasite relationship in neosporosis. *Adv.Parasitol.* 43:47-104..
- Hemphill, A., B. Gottstein, and H. Kaufmann. 1996. Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by *Neospora caninum*. *Parasitology* 112 ( Pt 2):183-197.
- Heydorn, A. O. and H. Mehlhorn. 2002a. A re-evaluation of *Neospora* and *Hammondia* spp. *Trends Parasitol.* 18 :246.
- Heydorn, A. O. and H. Mehlhorn. 2002b. *Neospora caninum* is an invalid species name: an evaluation of facts and statements. *Parasitol.Res.* 88:175-184.
- Hietala, S. K. and M. C. Thurmond. 1999. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. *Int.J.Parasitol.* 29:1669-1676.
- Higgs, P. and G. Woodcock. 1995. The accumulation of mutations in asexual populations and structure of genealogical trees in the presence of selection. *J.Math. Biol.* 33: 677-702
- High, J. 1978. The accumulation of deleterious genes in a population -Muller`s ratchet. *Theor. Popul. Biol.* 14: 251-267.
- Hilali, M., S. Romand, P. Thulliez, O. C. Kwok, and J. P. Dubey. 1998. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in sera from camels from Egypt. *Vet.Parasitol.* 75:269-271.
- Howe, D.K. and L.D. Sibley. 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.* 172: 1561-1566.
- Howe, D.K., B.C. Summers, L.D. Sibley. 1996. Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immune.* 64: 5193-5198.
- Howe, D.K. & L.D. Sibley. 1997. Development of molecular genetics for *Neospora caninum*: A complementary system to *Toxoplasma gondii*. *Methods* 13:123-133.
- Howe, D. K., C. Mercier, M. Messina, and L. D. Sibley. 1997. Expression of *Toxoplasma gondii* genes in the closely-related apicomplexan parasite *Neospora caninum*. *Mol.Biochem.Parasitol.* 86:29-36.
- Huong, L. T., B. L. Ljungstrom, A. Uggl, and C. Björkman. 1998. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle and water buffaloes in southern Vietnam. *Vet.Parasitol.* 75:53-57.
- Innes, E. A., A. G. Andrianarivo, C. Björkman, D. J. Williams, and P. A. Conrad. 2002. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends Parasitol.* 18:497-504.
- Innes, E. A., Buxton, D., Eperon, S., Gottstein, B. 2000. Immunology of *Neospora caninum* infection in cattle and mice, in: Hemphill, A., Gottstein, B. A European perspective on *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 30: 877-924.

- Innes, E. A., S. E. Wright, S. Maley, A. Rae, A. Schock, E. Kirvar, P. Bartley, C. Hamilton, I. M. Carey, and D. Buxton. 2001. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *Int.J.Parasitol.* 31:1523-1534.
- Innes, E. A., W. R. Panton, J. Marks, A. J. Trees, J. Holmdahl, and D. Buxton. 1995. Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum*, as shown by incorporation of 3H uracil. *J.Comp Pathol.* 113:95-100.
- Jakubek, E. B., C. Brojer, C. Regnersen, A. Ugglá, G. Scharés, and C. Björkman. 2001. Seroprevalences of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in Swedish red foxes (*Vulpes vulpes*). *Vet.Parasitol.* 102:167-172.
- Jardine, J. E. 1996. The ultrastructure of bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum* in dogs: absence of distinguishing morphological features between parasites of canine and bovine origin. *Vet.Parasitol.* 62:231-240.
- Jensen, L., T. K. Jensen, P. Lind, S. A. Henriksen, A. Ugglá, and V. Bille-Hansen. 1998. Experimental porcine neosporosis. *APMIS* 106:475-482.
- Kasper, L. H. and I. A. Khan. 1998. Antigen-specific CD8+ T cells protect against lethal toxoplasmosis in mice infected with *Neospora caninum*. *Infect.Immun.* 66:1554-1560.
- Kaufmann, H., M. Yamage, I. Roditi, D. Dobbelaere, J. P. Dubey, O. J. Holmdahl, A. Trees, and B. Gottstein. 1996. Discrimination of *Neospora caninum* from *Toxoplasma gondii* and other apicomplexan parasites by hybridization and PCR. *Mol.Cell Probes* 10:289-297.
- Khan, I. A., J. D. Schwartzman, S. Fonseka, and L. H. Kasper. 1997. *Neospora caninum*: role for immune cytokines in host immunity. *Exp.Parasitol.* 85:24-34.
- Kim, J. H., H. J. Sohn, W. S. Hwang, E. K. Hwang, Y. H. Jean, I. Yamane, and D. Y. Kim. 2000. *In vitro* isolation and characterization of bovine *Neospora caninum* in Korea. *Vet.Parasitol.* 90:147-154.
- Klug, S.W. & M.R. Cummings. 1999. *Conceptos de Genética*. (5ª ed). Prentice Hall Iberia. 695-742.
- Kobayashi, Y., M. Yamada, Y. Omata, T. Koyama, A. Saito, T. Matsuda, K. Okuyama, S. Fujimoto, H. Furuoka, and T. Matsui. 2001. Naturally-occurring *Neospora caninum* infection in an adult sheep and her twin fetuses. *J.Parasitol.* 87:434-436.
- Koyama, T., Y. Kobayashi, Y. Omata, M. Yamada, H. Furuoka, R. Maeda, T. Matsui, A. Saito, and T. Mikami. 2001. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a pregnant sheep. *J.Parasitol.* 87:1486-1488.
- Landmann, J. K., D. Jillella, P. J. O'Donoghue, and M. R. McGowan. 2002. Confirmation of the prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle by the use of embryo transfer. *Aust.Vet.J.* 80:502-503.
- Levin, B.R., M. Lipsitch and S. Bonhoeffer. 1999. Population biology, evolution, and infectious disease: convergence and synthesis. *Science* .283 :806-809.
- Liddell, S., M. C. Jenkins, and J. P. Dubey. 1999. Vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice determined by polymerase chain reaction detection. *J.Parasitol.* 85:550-555.
- Lindsay, D. S. and J. P. Dubey. 1989a. Evaluation of anti-coccidial drugs' inhibition of *Neospora caninum* development in cell cultures. *J.Parasitol.* 75:990-992.
- Lindsay, D. S. and J. P. Dubey. 1989b. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. *Am.J.Vet.Res.* 50:1981-1983.

- Lindsay, D. S. and J. P. Dubey. 1989c. *In vitro* development of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) from dogs. *J.Parasitol.* 75:163-165.
- Lindsay, D. S. and J. P. Dubey. 1989d. *Neospora caninum* (Protozoa: apicomplexa) infections in mice. *J.Parasitol.* 75:772-779.
- Lindsay, D. S. and J. P. Dubey. 1990a. Effects of sulfadiazine and amprolium on *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) infections in mice. *J.Parasitol.* 76:177-179.
- Lindsay, D. S. and J. P. Dubey. 1990b. Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa). *J.Parasitol.* 76:410-413.
- Lindsay, D. S. and J. P. Dubey. 1990c. *Neospora caninum* (Protozoa: *Apicomplexa*) infections in rats. *Can.J.Zool.* 68:1595-1599.
- Lindsay, D. S., D. M. Ritter, and D. Brake. 2001a. Oocyst excretion in dogs fed mouse brains containing tissue cysts of a cloned line of *Neospora caninum*. *J.Parasitol.* 87:909-911.
- Lindsay, D. S., E. J. Kelly, R. D. McKown, F. J. Stein, J. Plozer, J. Herman, B. L. Blagburn, and J. P. Dubey . 1996a. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in coyotes (*Canis latrans*) and experimental infections of coyotes with *Neospora caninum*. *J.Parasitol.* 82:657-659.
- Lindsay, D. S., H. Steinberg, R. R. Dubielzig, S. D. Semrad, D. M. Konkle, P. E. Miller, and B. L. Blagburn. 1996b. Central nervous system neosporosis in a foal. *J.Vet.Diagn.Invest* 8:507-510.
- Lindsay, D. S., J. M. Butler, and B. L. Blagburn. 1997. Efficacy of decoquinatate against *Neospora caninum* tachyzoites in cell cultures. *Vet.Parasitol.* 68:35-40.
- Lindsay, D. S., J. M. Butler, N. S. Rippey, and B. L. Blagburn. 1996c. Demonstration of synergistic effects of sulfonamides and dihydrofolate reductase/thymidylate synthase inhibitors against *Neospora caninum* tachyzoites in cultured cells, and characterization of mutants resistant to pyrimethamine. *Am.J.Vet.Res.* 57:68-72.
- Lindsay, D. S., J. P. Dubey, and R. B. Duncan. 1999a. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Vet.Parasitol.* 82:327-333.
- Lindsay, D. S., J. Spencer, C. Rupprecht, and B. L. Blagburn. 2001b. Prevalence of agglutinating antibodies to *Neospora caninum* in raccoons, *Procyon lotor*. *J.Parasitol.* 87:1197-1198.
- Lindsay, D. S., N. S. Rippey, R. A. Cole, L. C. Parsons, J. P. Dubey, R. R. Tidwell, and B. L. Blagburn. 1994. Examination of the activities of 43 chemotherapeutic agents against *Neospora caninum* tachyzoites in cultured cells. *Am.J.Vet.Res.* 55:976-981.
- Lindsay, D. S., N. S. Rippey, T. A. Powe, E. A. Sartin, J. P. Dubey, and B. L. Blagburn. 1995a. Abortions, fetal death, and stillbirths in pregnant pygmy goats inoculated with tachyzoites of *Neospora caninum*. *Am.J.Vet.Res.* 56:1176-1180.
- Lindsay, D. S., S. D. Lenz, B. L. Blagburn, and D. A. Brake. 1999b. Characterization of temperature-sensitive strains of *Neospora caninum* in mice. *J.Parasitol.* 85:64-67.
- Lindsay, D. S., S. D. Lenz, R. A. Cole, J. P. Dubey, and B. L. Blagburn. 1995b. Mouse model for central nervous system *Neospora caninum* infections. *J.Parasitol.* 81:313-315.
- Lindsay, D. S., S. J. Upton, and J. P. Dubey. 1999c. A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. *Int.J.Parasitol.* 29:1521-1523.

- Lynch, M., R. Burger, D. Butcher and W. Gabriel. 1993. The mutational meltdown in asexual populations. *J. Hered.* 84: 339-344.
- Locatelli-Dittrich, R., R. R. Richartz, M. E. Joineau, R. D. Pinckney, R. S. de Sousa, L. C. Leite, and V. Thomaz-Soccol. 2003. Isolation of *Neospora caninum* from a blind calf in Parana, southern Brazil. *Vet.Rec.* 153:366-367.
- Long, M. T. and T. V. Baszler. 1996. Fetal loss in BALB/C mice infected with *Neospora caninum*. *J.Parasitol.* 82:608-611.
- Long, M. T., T. V. Baszler, and B. A. Mathison. 1998. Comparison of intracerebral parasite load, lesion development, and systemic cytokines in mouse strains infected with *Neospora caninum*. *J.Parasitol.* 84:316-320.
- Lopez, A. 2001. Respiratory Sistem. En Thomson's Special veterinary pathology. 3<sup>nd</sup> ed. McGarin M.D., W.W. Carton, J.F. Zarachy. (Ed Mosby; St Louis).
- López - Fanjúl, C. and M.A. Toro . 1987 . Polémicas del evolucionismo. 1<sup>a</sup> ed. Eudema Actualidad, Madrid. 13-25.
- Lundén, A., J. Marks, S. W. Maley, and E. A. Innes. 1998. Cellular immune responses in cattle experimentally infected with *Neospora caninum*. *Parasite Immunol.* 20:519-526.
- Magnino, S., P. G. Vigo, M. Fabbi, M. Colombo, C. Bandi, and C. Genchi. 1999. Isolation of a bovine *Neospora* from a newborn calf in Italy. *Vet.Rec.* 144:456.
- Maley, S. W., D. Buxton, A. G. Rae, S. E. Wright, A. Schock, P. M. Bartley, I. Esteban-Redondo, C. Swales, C. M. Hamilton, J. Sales, and E. A. Innes. 2003. The pathogenesis of neosporosis in pregnant cattle: inoculation at mid-gestation. *J.Comp Pathol.* 129:186-195.
- Marsh, A. E., B. C. Barr, A. E. Packham, and P. A. Conrad. 1998. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: *Sarcocystidae*). *J.Parasitol.* 84:983-991.
- Marsh, A. E., B. C. Barr, J. Madigan, J. Lakritz, R. Nordhausen, and P. A. Conrad. 1996. Neosporosis as a cause of equine protozoal myeloencephalitis. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 209:1907-1913.
- Mayhew, I. G., K. C. Smith, J. P. Dubey, L. K. Gatward and N.J. McGlennon. 1991. Treatment of encephalomyelitis due to *Neospora caninum* in a litter puppies. *J. Small Anim. Pract.* 32, 609-612.
- Mayr, E.. 1963. Animal species and evolution. Harvard University Press. Cambridge, MA.
- McAllister, M. M., A. M. McGuire, W. R. Jolley, D. S. Lindsay, A. J. Trees, and R. H. Stobart. 1996. Experimental neosporosis in pregnant ewes and their offspring. *Vet.Pathol.* 33:647-655.
- McAllister, M. M., C. Björkman, R. Anderson-Sprecher, and D. G. Rogers. 2000. Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 217:881-887.
- McAllister, M. M., J. P. Dubey, D. S. Lindsay, W. R. Jolley, R. A. Wills, and A. M. McGuire. 1998. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int.J.Parasitol.* 28:1473-1478.
- McGarry, J. W., C. M. Stockton, D. J. Williams, and A. J. Trees. 2003. Protracted shedding of oocysts of *Neospora caninum* by a naturally infected foxhound. *J.Parasitol.* 89:628-630.
- McGuire, A. M., M. M. McAllister, W. R. Jolley, and R. C. Anderson-Sprecher. 1997. A protocol for the production of *Neospora caninum* tissue cysts in mice. *J.Parasitol.* 83:647-651.

- Mehlhorn, H. and A. O. Heydorn. 2000. *Neospora caninum*: is it really different from *Hammondia heydorni* or is it a strain of *Toxoplasma gondii*? An opinion. *Parasitol.Res.* 86:169-178.
- Mettler, L.E., T. Gregg, H.E. Schaffer.1988. Population genetics and evolution. 2nd ed. Prentice Hall. Englewood Cliffs.
- Meunier, L. 2001. Clonal variation of gene expression as a source of phenotypic diversity in parasitic protozoa. *Trends. Parasitol.* 17: 475-479.
- Miller, C. M., H. E. Quinn, P. A. Windsor, and J. T. Ellis. 2002. Characterisation of the first Australian isolate of *Neospora caninum* from cattle. *Aust.Vet.J.* 80:620-625.
- Moen, A. R., W. Wouda, M. F. Mul, E. A. Graat, and T. van Werven. 1998. Increased risk of abortion following *Neospora caninum* abortion outbreaks: a retrospective and prospective cohort study in four dairy herds. *Theriogenology* 49:1301-1309.
- Moxon, E.R., P.B. Rainey, M.A. Nowak and R.E. Lenski.1994. Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria. *Curr Biol.*1: 24-33.
- Mugridge, N. B., D. A. Morrison, A. R. Heckerth, A. M. Johnson, and A. M. Tenter. 1999. Phylogenetic analysis based on full-length large subunit ribosomal RNA gene sequence comparison reveals that *Neospora caninum* is more closely related to *Hammondia heydorni* than to *Toxoplasma gondii*. *Int.J.Parasitol.* 29:1545-1556.
- Mugridge, N. B., D. A. Morrison, T. Jakel, A. R. Heckerth, A. M. Tenter, and A. M. Johnson. 2000. Effects of sequence alignment and structural domains of ribosomal DNA on phylogeny reconstruction for the protozoan family *sarcocystidae*. *Mol.Biol.Evol.* 17:1842-1853.
- Muller, H. 1964 . The relation of recombination to mutational advance. *Mutat. Res.* 1:2-9
- Muller, N., & B. Gottstein. 1998. Antigenic variation and the murine immune response to *Giardia lamblia*. *Int. J. Parasitol.* 28: 1829-1839.
- Müller, N., N. Vonlaufen, C. Gianinazzi, S. L. Leib, and A. Hemphill. 2002. Application of real-time fluorescent PCR for quantitative assessment of *Neospora caninum* infections in organotypic slice cultures of rat central nervous system tissue. *J.Clin.Microbiol.* 40:252-255.
- Nishikawa, Y., K. Tragoopua, N. Inoue, L. Makala, H. Nagasawa, H. Otsuka, and T. Mikami. 2001. In the absence of endogenous gamma interferon, mice acutely infected with *Neospora caninum* succumb to a lethal immune response characterized by inactivation of peritoneal macrophages. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 8:811-816.
- Nishikawa, Y., T. Mikami, and H. Nagasawa. 2002. Vaccine development against *Neospora caninum* infection. *J.Vet.Med.Sci.* 64:1-5.
- O'Handley, R., S. Liddell, C. Parker, M. C. Jenkins, and J. P. Dubey. 2002. Experimental infection of sheep with *Neospora caninum* oocysts. *J.Parasitol.* 88:1120-1123.
- Ortega-Mora, L. M., I. Ferre, I. del Pozo, A. Caetano-da-Silva, E. Collantes-Fernández, J. Regidor-Cerrillo, C. Ugarte-Garagalza, and G. Aduriz. 2003. Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. *Vet.Parasitol.* 117:301-308.
- Osburn, B.I. 1988. Ontogeny of immune responses in cattle. In: Morrison, I., Ivan, W., (Eds.), *The ruminant immune system in health and disease*. Great Britain, pp. 252-260.

- Pamilo, P., M. Nei and W. Li. 1987. Accumulation of mutations in sexual and asexual populations. *Genet. Res.* 49: 135-146.
- Paré, J., M. C. Thurmond, and S. K. Hietala. 1996. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calftooth mortality. *Can.J.Vet.Res.* 60:133-139.
- Payne, S. and J. Ellis. 1996. Detection of *Neospora caninum* DNA by the polymerase chain reaction. *Int.J.Parasitol.* 26:347-351.
- Pereira-Bueno, J., Quintanilla-Gozalo, A., Seijas-Carballedo, A., Costas, E., Ortega-Mora, L. M. 2000. Observational studies in *Neospora caninum* infected dairy cattle: pattern of transmission and age-related antibody fluctuations, in: Hemphill, A., Gottstein, B. A European perspective on *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 30: 906-909.
- Peters, M., E. Lutkefels, A. R. Heckerroth, and G. Schares. 2001a. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. *Int.J.Parasitol.* 31:1144-1148.
- Peters, M., F. Wagner, and G. Schares. 2000. Canine neosporosis: clinical and pathological findings and first isolation of *Neospora caninum* in Germany. *Parasitol.Res.* 86:1-7.
- Peters, M., P. Wohlsein, A. Knieriem, and G. Schares. 2001b. *Neospora caninum* infection associated with stillbirths in captive antelopes (*Tragelaphus imberbis*). *Vet.Parasitol.* 97:153-157.
- Piédrola Gil, G. 1988. *Medicina preventiva y salud pública*. 8nd ed. Salvat. Barcelona. 68
- Preiser, P.R. and W. Jarra. 1999. A rhoptry-protein-associated mechanism of clonal phenotypic variation in rodent malaria. *Nature.* 398: 618-622.
- Price, P. W. 1977. General concepts on the evolutionary biology of parasites. *Evolution.* 31: 405-420
- Price, P.W. 1980. *Evolutionary Biology of Parasites*. Princeton: Princeton University Press.
- Quinn, H. E., C. M. Miller, C. Ryce, P. A. Windsor, and J. T. Ellis. 2002. Characterization of an outbred pregnant mouse model of *Neospora caninum* infection. *J.Parasitol.* 88:691-696.
- Ritter, D. M., R. Kerlin, G. Sibert, and D. Brake. 2002. Immune factors influencing the course of infection with *Neospora caninum* in the murine host. *J.Parasitol.* 88:271-280.
- Rogers, D. G., D. M. Grotelueschen, M. L. Anderson, M. S. McCullough, W. S. Shain and J.P. Dubey. 1993. Endemic protozoal abortions in a dairy cow herd. *Agri. Practice.* 14, 16-21.
- Rudenko, G. 1999. Genes involved in phenotypic and antigenic variation in African *Trypanosomes* and malaria. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 651-656.
- Sager, H., I. Fischer, K. Furrer, M. Strasser, A. Waldvogel, P. Boerlin, L. Audige, and B. Gottstein. 2001. A Swiss case-control study to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. *Vet.Parasitol.* 102:1-15.
- Sambrook, J., E. J. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> edition. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbord, New York.
- Sawada, M., H. Kondo, Y. Tomioka, C. Park, T. Morita, A. Shimada, and T. Umemura. 2000. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected adult dairy cow. *Vet.Parasitol.* 90:247-252.

- Scherf, A., R. Hernández-Rivas, P. Buffet, E. Bottius, C. Benatar, J. Poubelgysin and M. Lancer. 1998. Antigenic variation in malaria: *in situ* switching, relaxed and mutually exclusive transcription of var genes during intraerythrocytic development in *Plasmodium falciparum*. *EMBO J.* 18: 5418-5426.
- Schares, G., A. O. Heydorn, A. Cuppers, H. Mehlhorn, L. Geue, M. Peters, and F. J. Conraths. 2002b. In contrast to dogs, red foxes (*Vulpes vulpes*) did not shed *Neospora caninum* upon feeding of intermediate host tissues. *Parasitol.Res.* 88:44-52.
- Schares, G., M. Peters, R. Wurm, A. Barwald, and F. J. Conraths. 1998. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. *Vet.Parasitol.* 80:87-98.
- Schares, G., U. Wenzel, T. Müller, and F. J. Conraths. 2001. Serological evidence for naturally occurring transmission of *Neospora caninum* among foxes (*Vulpes vulpes*). *Int.J.Parasitol.* 31 :418-423.
- Shock, A., E. A. Innes, I. Yamane, S. M. Latham, and J. M. Wastling. 2001. Genetic and biological diversity among isolates of *Neospora caninum*. *Parasitol.* 123:13-23.
- Shibahara, T., T. Kokuho, M. Eto, M. Haritani, T. Hamaoka, K. Shimura, K. Nakamura, Y. Yokomizo, and I. Yamane. 1999. Pathological and immunological findings of athymic nude and congenic wild type BALB/c mice experimentally infected with *Neospora caninum*. *Vet.Pathol.* 36:321-327.
- Shivaprasad, H. L., R. Ely, and J. P. Dubey. 1989. A *Neospora*-like protozoon found in an aborted bovine placenta. *Vet.Parasitol.* 34:145-148.
- Sibley, L.D. and J.C. Boothroyd. 1992. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature.* 359: 82-85.
- Sibley, L.D., D. Mordue, D.K. Howe. 1999. Experimental approaches to understanding virulence in toxoplasmosis. *Immunology.* 201: 210-224.
- Slapeta, J. R., D. Modry, I. Kyselova, R. Horejs, J. Lukes, and B. Koudela. 2002. Dog shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. *Vet.Parasitol.* 109:157-167.
- Smith, J.M., N.H. Smith, M. O'Rourke and B.G. Spratt. 1993. How clonal are bacteria? *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 90: 4334-4336.
- Speer, C. A. and J. P. Dubey. 1989. Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum*. *J.Protozool.* 36:458-463.
- Speer, C. A., J. P. Dubey, M. M. McAllister, and J. A. Blixt. 1999. Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Int.J.Parasitol.* 29:1509-1519.
- Spiess, E. B. 1989. *Genes in populations*, 2<sup>nd</sup> ed. Wiley, New York. 441-450.
- Stephan, W., L.Chao and J. Smale. 1993. The advance of Muller`s ratchet in a haploid asexual population: approximate solution based on diffusion theory. *Genet. Res.* 61: 225- 232.
- Stenlund, S., C. Björkman, O. J. Holmdahl, H. Kindahl, and A. Uggla. 1997. Characterization of a Swedish bovine isolate of *Neospora caninum*. *Parasitol.Res.* 83:214-219.
- Su, C., D. Evans, R.H. Cole, J.C. Kinssinger, J.W. Ajioka, L.D. Sibley. 2003. Recient expansion of *Toxoplasma* through enhance oral transmission. *Science.* 299: 41-416.
- Sundermann, C. A. and B. H. Estridge. 1999. Growth of and competition between *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* *in vitro*. *Int.J.Parasitol.* 29:1725-1732.

- Taddei, F. 1997. To be mutator, or how pathogenic and commensal bacteria can evolve rapidly. *Trends Microbiol.* 5: 427-428.
- Tanaka, T., T. Hamada, N. Inoue, H. Nagasawa, K. Fujisaki, N. Suzuki, and T. Mikami. 2000. The role of CD4(+) or CD8(+) T cells in the protective immune response of BALB/c mice to *Neospora caninum* infection. *Vet.Parasitol.* 90:183-191.
- Thilsted, J. P. and J. P. Dubey. 1989. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. *J.Vet.Diagn.Invest* 1:205-209.
- Tibayrenc, M. 1993. *Entamoeba, Giardia* and *Toxoplasma*: clones or cryptic species? *Parasitol.* 9: 102-105.
- Tibayrenc, M. and F.J. Ayala. 2002. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *Trends. Parasitol.* 18: 405-410.
- Tibayrenc, M., F. Kjellberg, and F.J. Ayala. 1990. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *entamoeba, giardia, leishmania, naegleria, plasmodium, trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Pro. Nat. Ac. Sci. USA.* 87, 2414-2418.
- Tibayrenc, M., F. Kjellberg, J. Arnaud, B. Oury, F. Brenière, M. Dardé and F.J. Ayala. 1991. Are eukaryotic microorganisms clonal or sexual? a population genetics vantage. *Pro. Nat. Ac. Sci. USA* 88, 5129-5133
- Tibayrenc, M., P. Ward, A. Moya and F.J. Ayala. 1986. Natural populations of *trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Pro. Nat. Ac. Sci. USA.* 83, 115-119.
- Travisano, M., J.A. Mongold, A.F. Bennett and R.E. Lenski. 1995. Experimental test of the roles of adaptation, chance, and history in evolution. *Science.* 267: 87-90.
- Trees, A.J., F. Guy, B.J. Tennant, A.H. Balfour, and P. Dubey. 1993. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in a population of urban dogs in England. *Vet. Rec.* 132:1125-1126
- Trees, A. J., and D. J. Williams. 2000. Neosporosis in the United Kingdom. in: Hemphill, A., Gottstein, B. A European perspective on *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 30: 891-893.
- Trees, A. J., M. M. McAllister, C. S. Guy, J. W. McGarry, R. F. Smith, and D. J. Williams. 2002. *Neospora caninum*: oocyst challenge of pregnant cows. *Vet.Parasitol.* 109:147-154.
- Turner, C.M. 1997. The rate of antigenic variation in fly-transmitted and syringe-passaged infections of *Trypanosoma brucei*. *FEMS Microbiol. Lett.* 153: 227-231.
- Uggla, A., S. Stenlund, O. J. Holmdahl, E. B. Jakubek, P. Thebo, H. Kindahl, and C. Björkman. 1998. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. *Int.J.Parasitol.* 28:1467-1472.
- Volkman, S.K. and D.L. Hartl. 2003. A game of cat and mouse. *Science.* 299: 353-354.
- Weiss, L. M., Y. F. Ma, S. Halonen, M. M. McAllister, and Y. W. Zhang. 1999. The *in vitro* development of *Neospora caninum* bradyzoites. *Int.J.Parasitol.* 29:1713-1723.
- Williams, D. J., C. S. Guy, J. W. McGarry, F. Guy, L. Tasker, R. F. Smith, K. MacEachern, P. J. Cripps, D. F. Kelly, and A. J. Trees. 2000. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitol.* 121 ( Pt 4):347-358.
- Williams, D. J., C. S. Guy, R. F. Smith, F. Guy, J. W. McGarry, J. S. McKay, and A. J. Trees. 2003. First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection. *Int.J.Parasitol.* 33:1059-1065.

- Williams, J. H., I. Espie, E. van Wilpe, and A. Matthee. 2002. Neosporosis in a white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) calf. *J.S.Afr.Vet.Assoc.* 73:38-43.
- Williams, M. 1977. Stereological techniques. in practical methods in electron microscopy. hayat, m. (ed). new york: elsevier Sci Publ Co., pp. 23-45.
- Woods, L. W., M. L. Anderson, P. K. Swift, and K. W. Sverlow. 1994. Systemic neosporosis in a California black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*). *J.Vet.Diagn.Invest* 6:508-510.
- Wouda, W., A. R. Moen, and Y. H. Schukken. 1998a. Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. *Theriogenology* 49:1311-1316.
- Wouda, W., A. R. Moen, I. J. Visser, and F. van Knapen. 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. *J.Vet.Diagn.Invest* 9:180-185.
- Wouda, W., A. Moen, A. De Gee, and F. Van Knapen. 1996. Laboratory and field experiences with bovine *Neospora* abortion in Dutch dairy herds. *Proceedings 41<sup>st</sup> Annual meeting AAVP*. Louisville, Kentucky, July, 21.
- Wouda, W., J. Brinkhof, C. van Maanen, A. L. de Gee, and A. R. Moen. 1998b. Serodiagnosis of neosporosis in individual cows and dairy herds: A comparative study of three enzyme-linked immunosorbent assays. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 5:711-716.
- Wouda, W., T. Dijkstra, A. M. Kramer, C. van Maanen, and J. M. Brinkhof. 1999b. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. *Int.J.Parasitol.* 29:1677-1682.
- Yamane, I., T. Kokuho, K. Shimura, M. Eto, M. Haritani, Y. Ouchi, K. W. Sverlow, and P. A. Conrad. 1996. *In vitro* isolation of a bovine *Neospora* in Japan. *Vet.Rec.* 138:652.
- Yamane, I., T. Shibahara, T. Kokuho, K. Shimura, T. Hamaoka, M. Haritani, P. A. Conrad, C. H. Park, M. Sawada, and T. Umemura. 1998. An improved isolation technique for bovine *Neospora* species. *J.Vet.Diagn.Invest* 10:364-368.
- Yuste, E., C. López-Galindez and E. Domingo. 2000. Unusual distribution of mutations associated with serial bottleneck. Passages of Human Immunodeficiency virus tipe 1. *J. Virol.* 74 :9546-9552.
- Zenner, L., F. Darcy, A. Capron, M.F. Cesbron-Delauw. 1998. *Toxoplasma gondii*: Kinetics of the dissemination in the host tissues during the acute phase of infection of mice and rats. *Exp. Parasitol.* 90: 86-94.
- Zenner, L, A. Foulet, Y. Caudrelier, F. Darcy, B. Gosselin, A. Capron, M.F. Cesbron-Delauw. 1999. Infection with *Toxoplasma gondii* RH and prugniaud strains in mice, rats and nude rats: kinetics of infection in blood and tissues related to pathology in acute and chronic infection. *Patho. Res.Pract.* 195: 475-48