

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal



TESIS DOCTORAL

**Nuevos modelos animales para el estudio de la infección por
"Neospora caninum" durante la gestación**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

David Arranz Solís

Directores

**Esther Collantes Fernández
Javier Regidor Cerrillo
Luis Miguel Ortega Mora**

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal



**NUEVOS MODELOS ANIMALES PARA EL
ESTUDIO DE LA INFECCIÓN POR
Neospora caninum DURANTE LA
GESTACIÓN**

TESIS DOCTORAL

D. David Arranz Solís

Madrid, octubre de 2015

COMPLUTENSE UNIVERSITY OF MADRID

VETERINARY FACULTY

Animal Health Department



**NEW ANIMAL MODELS FOR THE STUDY
OF *Neospora caninum* INFECTION
DURING GESTATION**

DOCTORAL THESIS

D. David Arranz Solís

Madrid, October 2015

Memoria presentada por D. David Arranz Solís para optar al grado de Doctor por la
Universidad Complutense de Madrid

Madrid, veintinueve de octubre de 2015

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la financiación del Ministerio de Economía y competitividad (MINECO), a través de la beca de Formación de Personal Investigador (FPI) BES-2011-043433, de la cual he sido beneficiario.

Asimismo, la participación de la Fundación Nacional para la Ciencia de Suiza (Swiss National Science Foundation, SNSF, ref. No. 310030_146162), la ayuda a la investigación de la Junta de Castilla y León (LE253UI3) y el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED, 113rt0469), han hecho posible la realización de los estudios presentes en esta tesis.

Dña. Esther Collantes Fernández, Doctora en Veterinaria y Profesora contratada Doctor en el Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid; **D. Javier Regidor Cerrillo**, Doctor en Farmacia e investigador contratado en el Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, y **D. Luis Miguel Ortega Mora**, Doctor en Veterinaria y Catedrático de Universidad adscrito al Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral titulada “Nuevos modelos animales para el estudio de la infección por *Neospora caninum* durante la gestación” que presenta el Licenciado en Veterinaria D. **David Arranz Solís** ha sido realizada en las dependencias del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria, de la Universidad Complutense de Madrid bajo su supervisión y cumple todas las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid con Mención Europea.

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

En Madrid, a veintinueve de octubre de 2015

Fdo. Prof. Dra. Esther
Collantes Fernández

Fdo. Dr. Javier
Regidor Cerrillo

Fdo. Prof. Dr. Luis Miguel
Ortega Mora



DOCTORADO CON MENCIÓN EUROPEA

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

- 1) Realización de una estancia mínima de tres meses en una institución de enseñanza superior o centro de investigación de un Estado miembro de la Unión Europea:
 - Centro receptor: Institut für Parasitologie, Vetsuisse fakultät, Universität Bern (Schweiz).
 - Investigador principal: Prof. Andrew Hemphill.
 - Duración de la estancia: 3 meses (01/08/2014-31/10/2014).

- 2) Los apartados de resumen, resultados, discusión y conclusiones de la tesis doctoral han sido redactados en una de las lenguas oficiales de la Unión Europea distinta a cualquiera de las lenguas oficiales en España (inglés).

- 3) La tesis doctoral ha sido evaluada por dos expertos pertenecientes a alguna institución de educación superior o instituto de investigación de un Estado miembro de la Unión Europea distinto de España:
 - Dra. Adriana Aguado Martínez. Institut für Parasitologie, Vetsuisse fakultät, Universität Bern (Schweiz).
 - Dra. Virginia Marugán Hernández. Pathology and Pathogen Biology Department, Royal Veterinary College, University of London (UK).

- 4) El Tribunal evaluador de la tesis está compuesto por, al menos, un experto perteneciente a alguna institución de educación superior o centro de investigación de un Estado miembro de la Unión Europea distinto de España:
 - Prof. Elizabeth Innes. Moredun Research Institute (Edinburgh, UK).

AGRADECIMIENTOS

Cuando echo la vista atrás y me doy cuenta de que han pasado tanto tiempo desde que empecé mi aventura en el grupo SALUVET, me siento inevitablemente emocionado y triste al mismo tiempo por el final de una gran etapa de mi vida. Dejo atrás muchos años en la universidad y es ahora cuando valoro todas las personas que se han cruzado en mi camino, tanto a nivel personal como profesional. Por ello creo que esta parte de la tesis es un resumen de las experiencias vividas y de un sentido agradecimiento a cada una de las personas que, de un modo u otro, forman parte de este trabajo. Sin todos vosotros esto no habría sido posible.

En primer lugar me gustaría dedicar las primeras líneas a mi familia: a mi padre **Pedro**, mi madre **Chelo**, mi hermana **Eva**, mi cuñado **Fran** y, por supuesto la nueva alegría de la familia, mi sobrinita **Paula**. Vosotros sois los que mejor conocéis de primera mano los buenos y malos momentos que he vivido estos años, los que más me habéis apoyado y los que me habéis visto crecer y evolucionar. Por eso me siento orgulloso y enormemente agradecido por vuestro apoyo incondicional. Nunca lo habría logrado sin vosotros. Mención especial a Chelo y Pedro por esas preciosas pinturas y maravillosas fotos que van incluidas en esta tesis.

Por supuesto, agradecer a mi director y tutores que han hecho posible que haya llegado donde estoy en estos momentos. Vosotros me habéis conducido en la carrera investigadora, me habéis enseñado los valores de hacer las cosas bien, de esforzarse al máximo, de no rendirse nunca, de levantarse en los malos momentos. **Luis**, gracias por tu liderazgo, tu apoyo y tus valiosos consejos durante todos estos años. **Esther**, tu fortaleza me ha dado ánimos para seguir adelante, siempre has sido un ejemplo para mí, un espejo en el que verme reflejado. **Javier**, contigo he compartido momentos especiales y hemos llegado a tener una buena amistad, gracias por enseñarme tantas cosas y por tu comprensión y ayuda incondicional.

A toda la gente del laboratorio con la he vivido el día a día, ya haya sido durante poco tiempo o durante toda mi estancia en el grupo SALUVET. En primer lugar, y de forma especial, gracias a mis compañeros Paula, Iván y Dani. Con vosotros he estado desde el principio y hemos compartido juntos todas las experiencias a lo largo de estos años. **Paula**, gracias por tu sonrisa, por ser tan sincera conmigo, por hacerme querer ser mejor persona. **Iván**, contigo he vivido los momentos más grandes y más duros, me acuerdo de esos experimentos con los ratones, esas tardes-noches con el sonido del teclado...gracias por toda tu ayuda. **Dani**, gracias por compartir parte de mi *frikismo*, por ayudarme a desconectar y arrancarme de vez en cuando alguna sonrisa.

Gracias también a todos los compañeros que estuvieron desde los inicios. **Javi Moreno**, el *tontaco*, la alegría del laboratorio y colega colchonero; **Vane**, por aportar ese toque especial en el labo, por todos los buenos momentos vividos. A mis otros "jefes", **Gema**, **Ignacio** y **Mercedes**, gracias por vuestra cercanía, vuestro apoyo, y por todo lo que he aprendido con vosotros estos años. A **Cinta**, **Chema** e **Isabel**, gracias por estar ahí, siempre he podido contar con vuestra ayuda. A **Eva**, por tu compañía.

A todos aquellos con los que he compartido algún momento en el laboratorio, los que ya no están y los que acaban de llegar. Cada uno de vosotros ha puesto un granito de arena para mi formación y mi maduración como persona, con vosotros he vivido situaciones inolvidables. A los antiguos doctorandos, gracias a vosotros aprendí las bases de lo que soy ahora, habéis sido mis maestros. A **Adri**, por ser tan peculiar, tanto que hemos compartido laboratorio en Madrid y en Berna, gracias por todo. A **Vir, Elena y Silvi**, cada una de vosotras me ha enseñado cosas distintas, pero todas y cada una de ellas me han llevado a donde estoy ahora. A mis antiguos compañeros durante los primeros momentos: a **Patricia**, por compartir tantos momentos juntos, gracias por ser como eres, no cambies nunca. A **Susan**, mi Susan, nunca se me olvidará mi primer contacto con este mundo, esos primeros días en el labo con los *cryptos* allá por 2006, gracias por todo. A **Alba, Carmen, Laura y Ali**, por hacer más fácil el día a día, por compartir tantas cosas juntos. A **Lidia, Fran y Belén**, por vuestra amistad. A **Ofe y Joaquí**, por toda vuestra inestimable ayuda administrativa, a **Espe**, por ser un ejemplo del trabajo bien hecho. Agradecer también a **Tom** por las clases de inglés y por tus aportaciones a la redacción de esta tesis.

A todos los visitantes de fuera que estuvieron en el laboratorio: a mi *mamita*, gracias Claudia por ser tan especial, por todos los momentos *chévere*. A **Jesús Alberto**, gracias *viejo men* por iniciarme en el mundo de las *tricos*, por esos momentos fuera del labo. A **Carol**, por tu alegría, por tu asombrosa capacidad de adaptación y fortaleza. A los brasileños, **Wagner y Pomy**, por vuestra compañía y amistad. A los argentinos, **Andrea, Yanina, Lumi y Marcelo**, por vuestro salero argentino, por compartir tantas cosas juntos. A **Hipólito y Alessia**, aunque breve, se disfrutó vuestra estancia aquí.

A los recién llegados del laboratorio, los que empiezan su nueva aventura *saluветiana*: a **Rober**, por todas las risas que nos hemos echado juntos, por tu sencillez. A **Pili**, por toda tu ayuda con las ovejas, por ser una más de nosotros. A **Laura, Marta, Álex y Carlos**, los nuevos “polluelos”, por mostrarme que los inicios no deben olvidarse. A Lola, por tu amabilidad y toda tu ayuda.

Durante estos años he tenido la gran suerte de poder trabajar en diferentes laboratorios, conociendo excelentes personas que, de un modo u otro, merecen mi agradecimiento. A todas las personas del IGM en León, donde inicié todos mis experimentos de ovejas, y que han contribuido a la realización de éstos, en especial a **Julio**, por ser más que un compañero, un amigo, por toda tu inestimable ayuda. *To all the people in Bern. Thank you for making me have an incredible time there, I cannot put into words all the gratitude I feel towards each one of you. Andrew, thank you for absolutely everything, for being so kind, supportive and friendly, for making me feel at home. Adri, what would I have done without your advice, your invaluable help. Thierry, thanks for everything you did for me and your support from the beginning. Thanks also to Vreni, for being so special and friendly, for making me laugh so many times. Brigitte, for your support and friendship. Vera, Reto y Britta, my office partners, for sharing very special moments, for your help. Carol and Nelson, for your friendship and support from the very first moment, I really appreciated it. And to all the people from the institute and the uni who helped me one way or another: Bruno, Markus, Joachim, Stefan, Isabel, David,*

Daniela. Special thanks to Leti, your presence was really precious to me, we visited so many places, shared so many things...I will never forget it.

Aunque no está directamente relacionado con los trabajos presentes en esta tesis, también me gustaría agradecer a toda la gente del CIAM con la que compartí mis primeros pasos en las infecciones experimentales: **Marta, Javier, Ignacio, Mercedes, Andrés, Jose Antonio**. Mis estancias allí fueron muy agradables y aprendí mucho gracias a vosotros. Del mismo modo también me gustaría agradecer al grupo del Prof. **Juanma Irache** en la universidad de Navarra. Gracias a **Maite, Irene, Marijose, Patricia, Rebeca, Laura, Ander** y toda la gente que seguro me dejó en el tintero. Gracias por acogerme y enseñarme tantas cosas del mundo farmacéutico.

Por último dedico estas últimas palabras a mis fieles amigos. Los colegas de la carrera, inolvidables, eternos, inigualables. A Javi *el gitano*, Pablo *el cántabro*, Dani *el borracho* y Juan *juanovi*. Los momentos juntos que hemos pasado no tienen precio, gracias por todo. A mi querido amigo el *zumbao*, cuántas cosas hemos vivido, cuantas locuras me habrás hecho hacer (y las que quedan), experiencias geniales, dramas, juergas, risas y lágrimas...en fin gracias por aceptarme como soy con todos mis defectos, porque sé que vas a estar ahí pase lo que pase. A **Gisella**, por tu sonrisa, por ser mi amiga y darme todo tu apoyo. A Sergio *abuela blasa*, a Lucía, *lucy* y Carlos *rivas* por vuestra amistad. A todos los amigos del fútbol, en especial a Javi *jeko*, Nacho *kostron* y Edu *pedu*, gracias por esos momentos geniales dentro y fuera del campo.

No quiero terminar sin antes agradecer a mis pies por apoyarme en todo momento, y a mis brazos por estar siempre a mi lado. Y como olvidar a mis dedos que siempre puedo contar con ellos.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	IX
CAPÍTULO I RESUMEN/SUMMARY	1
CAPÍTULO II ANTECEDENTES/BACKGROUND.....	11
1. NEOSPOROSIS BOVINA.....	13
1.1. Antecedentes históricos	13
1.2. Agente etiológico	14
1.2.1. Taxonomía	14
1.2.2. Estadios del parásito	15
1.2.3. Espectro de hospedadores y ciclo biológico	17
1.2.4. Aislados y variabilidad intraespecífica	19
1.3. Transmisión.....	21
1.4. Signos clínicos y lesiones	23
1.5. Patogenia.....	25
1.5.1. Periodo de gestación y respuesta inmunitaria fetal	25
1.5.2. Periodo de gestación e inmunidad materna	27
1.5.3. Aislado.....	28
1.6. Inmunidad.....	28
1.7. Prevalencia e impacto económico	30
1.8. Diagnóstico.....	31
1.9. Control.....	32
1.9.1. Control de la transmisión.....	33
1.9.2. Quimioterapia.....	33
1.9.3. Vacunación	34
2. MODELOS EXPERIMENTALES	36
2.1. Modelos <i>in vitro</i>	36
2.1.1. Ciclo lítico.....	37
2.1.2. Utilidades del modelo <i>in vitro</i>	40
2.2. Modelos animales de neosporosis	42
2.2.1. Ventajas e inconvenientes.....	43
2.2.2. Modelo murino	46
2.2.2.1. Modelo murino no gestante	46
2.2.2.2. Modelo murino gestante	47
2.2.2.2.1. Modelo gestante de primoinfección.....	48
2.2.2.2.2. Modelo de recrudescencia.....	50
2.2.2.3. Factores que influyen en el resultado de la infección.....	50
2.2.2.4. Utilidades	54

2.2.3. Modelo bovino.....	55
2.2.3.1. Modelo bovino no gestante.....	55
2.2.3.2. Modelo bovino gestante.....	56
2.2.3.2.1. Modelo de mortalidad fetal.....	56
2.2.3.2.2. Modelo de transmisión vertical.....	58
2.2.3.2.3. Factores que influyen en el resultado de la infección.....	59
2.2.3.3. Utilidades.....	60
2.2.4. Modelo ovino.....	61
2.2.4.1. Modelo ovino no gestante.....	62
2.2.4.2. Modelo ovino gestante.....	62
2.2.4.3. Utilidades.....	63
2.2.5. Estandarización y refinamiento.....	65
CAPÍTULO III JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS/JUSTIFICATION AND OBJECTIVES.....	67
CAPÍTULO IV RESULTADOS (PUBLICACIONES)/RESULTS (PUBLICATIONS).....	73
Objetivo 1 Normalización del modelo murino de infección por <i>N. caninum</i> en ratones BALB/c gestantes mediante un ensayo de titulación de dosis con el aislado virulento Nc-Spain7.....	75
Dose-dependent effects of experimental infection with the virulent <i>Neospora caninum</i> Nc-Spain7 isolate in a pregnant mouse model.....	77
1. Introduction.....	80
2. Materials and methods.....	81
2.1. Parasite culture and dose preparation.....	81
2.2. Mice and ethics statement.....	81
2.3. Experimental design, sampling and data collection.....	81
2.4. Humoral immune responses.....	82
2.5. Parasite detection and quantification in brains.....	82
2.6. Statistical analysis.....	82
3. Results.....	83
3.1. Evaluation of <i>N. caninum</i> infection in dams.....	83
3.1.1. Pregnancy rate and litter size.....	83
3.1.2. Morbidity and mortality.....	83
3.1.3. Body weight.....	84
3.1.4. Quantification of cerebral parasite load.....	84
3.1.5. Humoral immune responses.....	85
3.2. <i>N. caninum</i> infection in offspring mice.....	85
3.2.1. Morbidity, weight analysis and mortality in pups.....	86
3.2.2. Vertical transmission.....	86
3.3. Evaluation of <i>N. caninum</i> infection in non-pregnant mice.....	88
3.3.1. Morbidity and mortality.....	88
3.3.2. Quantification of cerebral parasite load.....	88
3.3.3. <i>Neospora</i> -specific antibody levels in non-pregnant mice.....	88
4. Discussion.....	88

Objetivo 2 Caracterización de la infección experimental por <i>N. caninum</i> en la oveja durante los tres tercios de gestación	95
Sub-objective 2.1 Influence of the gestational stage on the clinical course, lesional development and parasite distribution in experimental ovine neosporosis.....	97
1. Introduction.....	99
2. Material and methods.....	100
2.1. Ethics statement.....	100
2.2. Animals and experimental design	100
2.3. Parasites.....	101
2.4. Clinical monitoring and collection of samples.....	101
2.5. Serological analyses: IFAT.....	102
2.6. Histopathology and lesion scoring	102
2.7. DNA extraction and PCR for parasite detection and quantification in tissues	103
2.8. Statistical analysis.....	104
3. Results.....	104
3.1. Clinical observations.....	104
3.2. Neospora-specific IgG responses.....	104
3.3. Pathology and lesion quantification	105
3.3.1. Gross lesions	105
3.3.2. Microscopic lesions.....	105
3.3.3. Placenta.....	105
3.3.4. Liver.....	106
3.3.5. Brain.....	107
3.3.6. Other organs.....	107
3.4. Parasite distribution and burden in placental and foetal tissues.....	110
3.4.1. Maternal tissues.....	110
3.4.2. Placental and foetal tissues	110
4. Discussion	111
Sub-objective 2.2 Systemic and local immune responses in sheep after <i>Neospora caninum</i> experimental infection at early, mid and late gestation.....	119
1. Introduction.....	121
2. Material and methods.....	122
2.1. Experimental design.....	122
2.2. Clinical monitoring and collection of samples.....	122
2.3. Serological analysis: IgG responses.....	123
2.4. <i>N. caninum</i> -specific IFN- γ and IL-4 responses.....	123
2.5. Immunohistochemistry	123
2.6. RNA extraction and reverse transcription	124
2.7. Quantitative real-time PCR (qPCR).....	124
2.8. Statistical analysis.....	125
3. Results.....	125
3.1. Specific anti- <i>Neospora</i> IgG antibody responses	125
3.2. IFN- γ and IL-4 kinetics in sera	125
3.3. Characterization of inflammatory cell populations in placenta.....	127
3.3.1. T cells (CD3+, CD4+, CD8+).....	127
3.3.2. Macrophages (CD163+)	127

3.3.3. <i>B cells (CD79αcy)</i>	128
3.4. <i>Parasite antigen distribution</i>	128
3.5. <i>Cytokine and TLR mRNA expression levels in placental tissues</i>	130
4. Discussion	130
CAPÍTULO V DISCUSIÓN GENERAL/GENERAL DISCUSSION	139
CAPÍTULO VI CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	153
CAPÍTULO VII BIBLIOGRAFÍA/REFERENCES	159

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO II ANTECEDENTES

Tabla 1 - Principales características de los modelos animales más frecuentemente utilizados en la experimentación animal con <i>N. caninum</i>	44
Tabla 2 - Modelos murinos gestantes de infección experimental por <i>N. caninum</i>	51
Tabla 3 - Infecciones experimentales llevadas a cabo en modelos bovinos gestantes.....	57
Tabla 4 - Infecciones experimentales llevadas a cabo en modelos ovinos durante la gestación.....	64

CAPÍTULO IV RESULTADOS

Objetivo 1. Normalización del modelo murino de infección por *N. caninum* en ratones BALB/c gestantes mediante un ensayo de titulación de dosis con el aislado virulento Nc-Spain7.

Table 1 - Summary of the effects of <i>Neospora</i> Nc-Spain7 infection in pregnant mice.....	83
Table 2 - Summary of the effects of <i>Neospora</i> Nc-Spain7 infection in delivered pups.....	86

Sub-objective 2.1. Influence of the gestational stage on the clinical course, lesional development and parasite distribution in experimental ovine neosporosis

Table 1 - Experimental design.....	101
Table 2 - Serological results in dams and foetuses/lambs.....	105
Table 3 - Lesion quantification and PCR detection and quantification of <i>N. caninum</i> in placenta and foetal liver and brain.....	107
Additional file 1 - Individual serological titres in dams and foetuses/lambs at the time of necropsy.....	115
Additional file 2 - Individual quantification of lesions in the placenta, foetal liver and brain.....	116
Additional file 4 - Individual frequency of parasite DNA detection.....	118

Subobjective 2.2. Systemic and local immune responses in sheep after *Neospora caninum* experimental infection at early, mid and late gestation

Table 1 - Summary of lesion and PCR detection and quantification of <i>N. caninum</i> in placenta and foetal liver and brain.....	126
--	-----

Additional file 1 - Primary antibodies used in the immunohistochemical labelling of antigens in the placentas.....	136
Additional file 2 - Sequences of primers used for cytokine real-time PCR (qPCR) and standard curve data.....	137

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO II ANTECEDENTES

Figura 1 - Clasificación taxonómica de <i>Neospora caninum</i>	14
Figura 2 - Representación e imágenes microscópicas de los estadios parasitarios de <i>N. caninum</i>	15
Figura 3 - Representación gráfica de la ultraestructura del taquizoíto de <i>N. caninum</i>	16
Figura 4 - Ciclo biológico de <i>N. caninum</i>	19
Figura 5 - Representación gráfica de la transmisión transplacentaria de <i>N. caninum</i>	23
Figura 6 - Representación gráfica del ciclo lítico de <i>N. caninum</i> y seguimiento del mismo en cultivo celular.....	39
Figura 7 - Imagen de quistes con bradizoítos de <i>N. caninum</i> en diferente grado de maduración.....	41
Figura 8 - Morfología y estructura de la placenta de los rumiantes y roedores.....	44
Figura 9 - Diseño experimental del modelo murino gestante desarrollado por el grupo SALUVET.....	53

CAPÍTULO IV RESULTADOS

Objetivo 1. Normalización del modelo murino de infección por *N. caninum* en ratones BALB/c gestantes mediante un ensayo de titulación de dosis con el aislado virulento Nc-Spain7.

Figure 1 - Effect of <i>N. caninum</i> Nc-Spain7 isolate inoculation in pregnant mice.....	84
Figure 2 - Humoral immune responses in challenged mice.....	85
Figure 3 - Effect of <i>N. caninum</i> Nc-Spain7 isolate inoculation in the offspring.....	87
Additional file 1 - Individual body weight progression of neonates.....	92
Additional file 2 - Effect of <i>N. caninum</i> Nc-Spain7 isolate inoculation in non-pregnant mice.....	93

Sub-objective 2.1. Influence of the gestational stage on the clinical course, lesional development and parasite distribution in experimental ovine neosporosis

Figure 1 - Macroscopic lesions in foetuses and placentas.....	106
Figure 2 - Box-plot graphs of histological scores.....	108

Figure 3 - Comparison of the characteristic microscopic lesions found in placenta and foetal liver and brain.....109

Figure 4 - Dot-plot graph of *N. caninum* burdens.....110

Additional file 3 - Sections of skeletal muscle from non-viable foetuses.....117

Sub-objective 2.2. Systemic and local immune responses in sheep after *Neospora caninum* experimental infection at early, mid and late gestation

Figure 1 - Humoral and cellular immune responses in sera.....126

Figure 2 - Quantification of immunohistochemical labelled T lymphocytes and macrophages in the placenta.....128

Figure 3 - Comparison of the immunohistochemical labelling of T inflammatory cells and parasite antigen in the placenta.....129

Figure 4 - Placental cytokine and *Toll-like* receptor transcript expression.....131

Additional file 3 - Housekeeping gen β -actin mRNA expression levels in placentomes.....138

Additional file 4 - Placental cytokine expression levels per group.....138

LISTADO DE ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados	Grades centigrade
ADN/DNA	Ácido desoxirribonucleico	Deoxyribonucleic acid
ARN/RNA	Ácido ribonucleico	Ribonucleic acid
ARNm/mRNA	Ácido ribonucleico mensajero	Messenger ribonucleic acid
BAG	Antígeno de bradizoíto	Bradyzoite antigen
BKI	Inhibidores de la protein kinasa	Bumped kinase inhibitor
bp	Pares de bases	Base pairs
CD	Cúmulo de diferenciación	Cluster of differentiation
CDPK	Protein quinasa dependiente de calcio	Calcium dependent protein kinase
cm	Centímetro	Centimetre
cm ²	Centímetro cuadrado	Square centimetre
CO ₂	Dióxido de carbono	Carbon dioxide
CV	Coefficiente de variación	Coefficient of variation
dg	Días de gestación	Days of gestation
dpi	Días post-infección	Days post-infection
dpp	Días postparto	Days postpartum
dsDNA	ADN de doble cadena	Double-stranded DNA
e.g.	<i>Exempli gratia</i> (por ejemplo)	<i>Exempli gratia</i> (for instance)
EE. UU.	Estados Unidos	United States
ELISA	Ensayo inmunoenzimático	Enzyme-linked immunosorbent assay
fg	Femtogramo (10 ⁻¹⁵ gramos)	Femtogram (10 ⁻¹⁵ grams)
GRA	Antígeno de gránulos densos	Dense granule antigen
h	horas	hours
HE	Hematoxilina y eosina	Haematoxylin and eosin
HFF	Fibroblastos de piel de prepucio humana	Human Foreskin fibroblasts
i.e.	<i>Id est</i> (esto es)	<i>Id est</i> (this is)
IFI/IFAT	Inmunofluorescencia indirecta	Indirect immunofluorescence assay
IFN-γ	Interferón gamma	Gamma Interferon
IgG	Inmunoglobulina G	Immunoglobulin G
IHQ/IHC	Inmunohistoquímica	Immunohistochemistry
IL	Interleuquina	Interleukin
IM	Intramuscular	Intramuscular
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible	Inducible nitric oxide synthase
IP	Intraperitoneal	Intraperitoneal
ITS1	Espacio transcrito interno-1	Internal transcribed spacer-1
IV	Intravenoso/a	Intravenous
Linfocito Th/ Th lymphocyte	Linfocito T colaborador	T helper lymphocyte

Listado de abreviaturas

M	Molar	Molar
MIC	Proteína de micronemas	Microneme protein
min	Minuto	Minute
ml	Mililitro	Millilitre
mM	Mili molar	Milli molar
mm	Milímetro	Millimetre
mm²	Milímetro cuadrado	Square millimetre
n	Número de muestra	Sample number
NA	No aplicable	Not applicable
Nc	<i>Neospora caninum</i> (prefijo)	<i>Neospora caninum</i> (prefix)
ng	Nanogramo (10 ⁻⁹ gramos)	Nanogram (10 ⁻⁹ grams)
NK	(Células) asesinas naturales	Natural killer (cells)
NO	Óxido nítrico	Nitric oxide
No.	Número	Number
NRC	Consejo Nacional de Investigación	National Research Council
OD	Densidad óptica	Optical density
OR	Odds ratio	Odds ratio
PBS	Tampón fosfato salino	Phosphate Buffer Saline
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	Polymerase chain reaction
pg	Picogramo (10 ⁻¹² gramos)	Picogram (10 ⁻¹² grams)
pi	Post-infección	Post-infection
pp	Postparto	Postpartum
qPCR	PCR cuantitativa	Quantitative PCR
RAPD	ADN polimórfico amplificado al azar	Randomly amplified polymorphic DNA
RIPC	Índice relativo por cien	Relative index per cent
RON	Proteína de cuello de roptrias	Rhoptry neck protein
ROP	Proteína de cuerpo de roptrias	Rhoptry bulb protein
RT	Temperatura ambiente	Room temperature
s	Segundos	Seconds
SAG	Antígeno de superficie	Surface antigen
SC	Subcutánea	Subcutaneous
SD	Desviación estándar	Standard deviation
SNC/CNS	Sistema nervioso central	Central nervous system
SNP	Nitroprusiato sódico	Sodium nitroprusiate
SRS	Secuencia SAG1 relacionada	SAG1-related sequence
SUB	Subtilisina	Subtilisin
Tg	<i>Toxoplasma gondii</i> (prefijo)	<i>Toxoplasma gondii</i> (prefix)
TGF-β	Factor transformante de crecimiento beta	Transforming growth factor beta
TLR	Receptor tipo <i>toll</i>	<i>Toll</i> -like Receptor
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alpha	Tumour necrosis factor alpha

UE/EU	Unión europea	European union
UK	Reino Unido	United Kingdom
US	Ultrasonografía	Ultrasonography
USA	Estados Unidos de América	United States of America
UV	Ultravioleta	Ultraviolet
VO	Vía oral	Oral route (<i>per os</i>)
WB	Western blot	Western blot
µg	Microgramo (10 ⁻⁶ gramos)	Micrograms (10 ⁻⁶ grams)
µl	Microlitro (10 ⁻⁶ litros)	Microliter (10 ⁻⁶ litres)
x²	Chi cuadrado	Chi square

CAPÍTULO I

RESUMEN/SUMMARY

Neospora caninum es un parásito intracelular apicomplejo causante de la neosporosis, una enfermedad considerada como una de las principales causas de aborto en el ganado bovino. Esta parasitosis origina cuantiosas pérdidas económicas a nivel mundial, presentando una amplia distribución y una elevada prevalencia en el ganado bovino en la mayoría de países donde se ha estudiado. Actualmente, la inmunoprofilaxis se considera como la medida más importante para el control de la enfermedad, aunque, desafortunadamente, no existe una vacuna eficaz disponible. La única vacuna comercializada hasta el momento (Neoguard) ha sido retirada del mercado hace años debido a la baja eficacia mostrada. Por tanto, el esfuerzo de muchos grupos de investigación se centra hoy en día en el desarrollo de nuevas vacunas y fármacos eficaces y seguros frente a la neosporosis bovina.

Con este fin, los modelos animales, además de ser de gran utilidad para estudiar la relación parásito-hospedador, la respuesta inmunitaria o la patogenia, son herramientas esenciales para realizar una evaluación adecuada de la eficacia y seguridad de vacunas y fármacos. Sin embargo, no existe un modelo normalizado, ya que aquellos descritos en la literatura se han llevado a cabo bajo condiciones experimentales muy variables. Estas diferencias incluyen, entre otras, la raza o estirpe de los animales empleados, el aislado de *N. caninum*, la manipulación del parásito para la inoculación, la vía de administración y la dosis utilizada en el ensayo. Además, en el caso de los modelos gestantes, el momento de la gestación en el cual se infecta a los animales supone una importante variable adicional. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de modelos animales consensuados entre los diferentes laboratorios de investigación que permitan comparar y validar los resultados obtenidos en cada uno de ellos.

Bajo estas premisas, el **objetivo general** de la presente Tesis Doctoral fue la mejora y el desarrollo de nuevos modelos animales para el estudio de la infección por *N. caninum*. Con este fin, se normalizó un modelo murino gestante y se caracterizó la infección experimental en la oveja en los tres tercios de gestación. Todos los experimentos se llevaron a cabo con el aislado español de origen bovino Nc-Spain7 mantenido en cultivo celular con un número limitado de pases desde su aislamiento. Este aislado ha sido ampliamente caracterizado tanto en modelos *in vitro* como en modelos *in vivo* (murino y bovino), habiéndose clasificado como un aislado de alta virulencia. Además, se siguieron las mismas condiciones de manipulación del parásito para la preparación de las dosis de inoculación con la finalidad de asegurar la viabilidad, capacidad infectante y de invasión óptimas en el momento de la infección.

En el **primer objetivo específico** se acometió la normalización del modelo murino gestante mediante un ensayo de potencia de dosis. Entre todos los modelos de neosporosis basados en animales de laboratorio, el ratón ha sido el más utilizado. En esta especie, y debido a la implicación de la infección en el fallo reproductivo, ha destacado el modelo murino BALB/c gestante, que se ha empleado ampliamente como prueba de concepto para la evaluación de fármacos y formulaciones vacunales frente a la neosporosis. Sin embargo, la dosis de desafío habitualmente empleada en el modelo murino (2×10^6 taquizoítos) es proporcionalmente mucho mayor en comparación con el peso y tamaño del animal, que la empleada en otras pruebas realizadas en rumiantes (10^7 en vacuno y 10^6 en ovino). Por ello, se realizó una titulación de la dosis de infección (desde 2×10^6 hasta 100 taquizoítos) del

aislado virulento Nc-Spain7 administrado subcutáneamente. Los resultados mostraron que se produce la infección en todos los animales inoculados independientemente de la dosis. No obstante, la respuesta inmunitaria humoral varió en función de la dosis, observándose menores niveles de IgG1 en animales infectados con las dosis más bajas, principalmente en los no gestantes. Además, la infección con una dosis de 10^5 taquizoítos (20 veces inferior a la dosis habitualmente empleada por otros grupos de investigación) produce un 100% de transmisión vertical y de mortalidad postnatal en la progenie. Incluso las infecciones con dosis más bajas mostraron tasas de transmisión y mortalidad postnatal muy elevadas (por encima del 75%). Estos resultados sugieren que una dosis superior a 10^5 taquizoítos del aislado Nc-Spain7 inoculados por vía subcutánea supone unas condiciones excesivamente agresivas para el ratón que podrían comprometer la evaluación de una vacuna potencialmente eficaz. Con los resultados obtenidos, se plantea el uso de un modelo basado en una dosis máxima de 10^5 taquizoítos en futuros ensayos, de forma que se puedan obtener conclusiones más precisas y realistas.

Por otra parte, a pesar de que el modelo murino representa un modelo muy valioso como prueba de concepto, ya que permite la obtención de resultados en un corto periodo de tiempo, el ratón presenta notables diferencias anatómicas y fisiológicas (destacando el tipo de placenta y la respuesta inmunitaria) con el ganado bovino. Estas diferencias dificultan en gran medida la extrapolación de resultados, por lo que el empleo de otros modelos animales más próximos al bovino podría resultar de gran utilidad. En este sentido, la oveja, además de ser un hospedador intermediario natural de *N. caninum*, presenta una serie de ventajas sobre la vaca en relación al número de animales, manejo, costes y duración de los experimentos. Además, estudios recientes sugieren que la neosporosis puede ser una causa de fallo reproductivo en la oveja más importante de lo que se consideraba tradicionalmente. Por todo lo anteriormente expuesto, el **segundo objetivo específico** se centró en el estudio del efecto de la infección en ovejas gestantes en los tres tercios de gestación, con el fin de profundizar en el conocimiento de la patogenia y respuesta inmunitaria de la neosporosis ovina, así como desarrollar un nuevo modelo de neosporosis basado en esta especie como alternativa al modelo bovino. Para ello, se inocularon ovejas gestantes con 10^6 taquizoítos del aislado Nc-Spain7 por vía intravenosa en los tres tercios de gestación (día 40, 90 y 120 de gestación). Las consecuencias clínicas, lesiones y distribución y carga del parásito (Sub-objetivo 2.1), así como la respuesta inmunitaria local y periférica (Sub-objetivo 2.2) fueron estudiadas en estos animales.

La infección durante el primer tercio de gestación causó la muerte fetal en todos los animales inoculados entre los días 19 y 21 pi. El examen de los fetos y de la placenta mostró principalmente lesiones necróticas en el hígado fetal y la mayor detección y carga parasitaria tanto en placenta como en los órganos fetales. En la placenta, el análisis inmunohistoquímico demostró la presencia del parásito en la parte fetal de la misma, mientras que el escaso infiltrado de células inflamatorias se localizó principalmente en la parte materna. El análisis serológico mostró una producción temprana de IFN- γ previa a la de anticuerpos IgG específicos. Por su parte, el análisis de la expresión de citoquinas en la placenta reveló una respuesta mixta de tipo Th1 y Th2, con una elevada expresión de IFN- γ e IL-4 seguido de

niveles más moderados de TNF- α e IL-10, mientras que la expresión de TGF- β estuvo disminuida.

Tras la infección en el día 90 de gestación, también se produjo la muerte fetal en todos los animales, aunque ésta se detectó de forma más tardía (días 34-48 pi). En este grupo, las lesiones fueron principalmente de tipo inflamatorio, siendo el hígado fetal el que mostró la frecuencia más baja de lesiones, detección del parásito y carga parasitaria. En la placenta, el parásito fue detectado en menor cantidad, principalmente en forma de antígeno particulado, mientras que las lesiones fueron mucho mayores en extensión y gravedad, estando frecuentemente asociadas a un infiltrado inflamatorio. La respuesta periférica fue similar al primer tercio, aunque los niveles de IFN- γ fueron menores. La expresión de citoquinas en la placenta mostró un patrón similar al del primer tercio, aunque de menor intensidad y mostrando además un ligero aumento en los niveles de IL-12 e IL-6 que no se observaron en otro periodo.

Por su parte, todas las ovejas infectadas en el último tercio de gestación parieron corderos viables, aunque 3/9 nacieron antes del día 145 de gestación y mostraron signos de debilidad y postración. Se produjo la transmisión vertical en todas las ovejas infectadas, siendo la carga parasitaria en los corderos similar a la observada en el grupo infectado en el segundo tercio de gestación. Sin embargo, las lesiones en este grupo mostraron un patrón inflamatorio más evidente y una frecuencia más alta en el cerebro y músculo fetal en comparación con los otros dos grupos. En la placenta, las lesiones fueron similares a las observadas en el segundo tercio, aunque el infiltrado de células inflamatorias fue mucho menor. El análisis serológico mostró una menor y más tardía producción de IFN- γ e IgG, lo que sugiere una menor estimulación producida por el parásito en este periodo. En la placenta, se observaron valores de IL-4 similares a los de IFN- γ , al contrario que en los otros dos grupos donde los niveles de ARNm de IFN- γ fueron más elevados. En este periodo, y al contrario que en los otros dos grupos, no se observó un incremento de la expresión de IL-10 ni una disminución de los niveles de TGF- β .

Por último, cabe destacar que no se observaron incrementos significativos en los niveles de IL-4 en suero, ni de la expresión de TLR2 o TLR4 en la placenta en los grupos experimentales. Cuando se analizó la población de células inflamatorias en la placenta de los diferentes grupos, los linfocitos B (CD79+) se detectaron en muy baja cantidad, sin mostrar diferencias entre animales infectados y no infectados. Finalmente, aunque el infiltrado inflamatorio varió en intensidad entre los grupos, en todos ellos consistió principalmente en LT CD8+ y, en menor medida, LT CD4+ y macrófagos (CD163+).

Estos resultados ponen de manifiesto que las consecuencias de la infección dependen en gran medida del momento de la gestación en el que se produzca ésta, de forma similar a lo que ocurre en el ganado bovino. Además, parece que el aborto tras la infección en el primer tercio es debido principalmente a la multiplicación incontrolada del parásito en el feto, mientras que en la infección en el segundo tercio el aborto se produce probablemente como consecuencia de las graves lesiones desarrolladas en la placenta. Por otra parte, el corto espacio de tiempo transcurrido entre el momento de la infección en el tercer tercio hasta el nacimiento podría haber evitado la producción del aborto por la afectación de la placenta.

Finalmente, aunque muy similares, existen algunas diferencias entre el modelo ovino y los modelos bovinos de neosporosis estudiados hasta el momento. Éstas incluyen una mayor probabilidad de aborto en el segundo tercio de gestación, así como niveles más bajos de IL-12 y una mayor expresión de células CD8+ en placenta en el caso de la oveja. A pesar de ello, la oveja representa un modelo apropiado de transmisión transplacentaria exógena de la neosporosis en rumiantes, sirviendo como una buena alternativa al modelo bovino. En este sentido, se propone un nuevo modelo ovino basado en la inoculación intravenosa de 10^6 taquizoítos del aislado Nc-Spain7 en el día 90 de gestación. En dicho modelo se produce el aborto en todos los animales inoculados, pero en un entorno menos agresivo para el feto en comparación con la inoculación en el día 40 de gestación, debido al desarrollo de la respuesta inmunitaria materno-fetal en este periodo. Por lo tanto, el modelo propuesto permitiría evaluar la eficacia de fármacos y vacunas frente a la transmisión transplacentaria y el aborto en un modelo de rumiante.

En conclusión, los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral establecen las bases de un modelo murino gestante estandarizado y refinado de *Neospora*, así como las condiciones de un modelo de primoinfección en la oveja como una alternativa válida al bovino. Por otra parte, se ha profundizado en el conocimiento de la patogénesis del aborto en la neosporosis ovina, una enfermedad con una relevancia creciente en los últimos años. Estos modelos promueven el desarrollo de un consenso sobre normas estandarizadas e internacionalmente aceptadas para modelos animales de neosporosis, que podrían resultar de gran utilidad para investigadores en este campo, especialmente para la valoración de fármacos o nuevas vacunas frente a la transmisión y el aborto causado por *N. caninum*.

Neospora caninum is an apicomplexan protozoan parasite considered to be one of the main causes of abortion in cattle worldwide. It shows a high prevalence and produces important economic losses as a consequence of the reproductive failure triggered by infection during pregnancy or recrudescence. To date, immunoprophylaxis is considered the best control strategy against the disease. Unfortunately, there are no current drugs or vaccines available in the market against *Neospora*, since the only vaccine commercialised so far (Neoguard) was withdrawn from the market on account of the low efficacy shown. Therefore, a large amount of research focuses its efforts on the development of new candidates that may be effective in protecting against abortion and vertical transmission. For this purpose, animal models, besides being of great utility for the study of parasite-host relationship, immune responses or pathogenesis, are essential tools for performing an appropriate assessment of the efficacy and safety of vaccines and drugs.

However, there is not a normalized model of neosporosis, since the models described in the literature differ in the experimental designs employed. These include, among others, the strain or breed of animals used, the *N. caninum* isolate, the parasite manipulation for infection, route of administration and dose. Besides, for pregnant models, the time of gestation when infection takes place implies an important additional variable. All of this leads to a high degree of variability, rendering meaningful comparison of results from different laboratories a difficult task. Therefore, the elaboration of common models achieving a consensus among different laboratories is necessary, so as to permit comparison and validation of results obtained in each one of them.

With this background, the **general objective** of the present Doctoral Thesis was the improvement and development of new animal models for the study of *N. caninum* infection. For this purpose a pregnant mouse model was normalised and the experimental infection in sheep in the three terms of gestation was characterised. All experiments were performed with the Spanish bovine isolate Nc-Spain7 maintained in cell cultured with a limited passage number from its isolation. This isolate has been widely characterised in both *in vitro* and *in vivo* (murine and bovine) models, being regarded as a highly virulent isolate. Parasite manipulation conditions were strictly followed for the preparation of inoculation doses so as to maintain optimum invasion capacities of the parasite.

In the **first specific objective**, the normalisation of the pregnant mouse model by means of a dose titration assay was performed. Among all models of neosporosis based on laboratory animals, the mouse has been the most used. In this species, the BALB/c pregnant mouse model stands out on account of the implication of the infection in reproductive failure and its wide use as proof-of-concept for the evaluation of vaccines or drugs candidates against neosporosis. However, the challenge dose usually employed in this model (2×10^6 tachyzoites) is much higher, in terms of weight and size, than those employed in assays carried out in ruminants, in which a similar number of parasites is used (10^7 for cows and 10^6 for sheep). Thus, a titration of the challenge dose (from 2×10^6 to 100 tachyzoites) of the virulent Nc-Spain7 isolate administered subcutaneously was carried out. Results showed that infection is produced in all inoculated animals regardless of the dose employed. Nevertheless, humoral immune response varied depending on the dose, as lower levels of IgG1 were

observed in mice inoculated with the lowest doses, especially in non-pregnant mice. Furthermore, infection with a dose of 10^5 tachyzoites (20 times lower than the dose usually employed by other research groups) produces 100% vertical transmission and postnatal mortality in the offspring. Even infection with the lowest doses showed high vertical transmission and postnatal mortality rates (above 75%). These results suggest that a dose beyond 10^5 Nc-Spain7 tachyzoites subcutaneously inoculated implies excessively aggressive conditions for mice, which might lead to a premature dismissal of potential active formulations. Considering these results, we propose the usage of a model based on a maximum dose of 10^5 tachyzoites in further assays, so that more accurate and realistic conclusions could be obtained in such studies.

On the other hand, despite the mouse model representing a highly valuable proof-of-concept model on account of its ability to provide results in a short time span, it presents obvious anatomical and physiological differences (especially the type of placentation and immune response) with cattle. This fact hinders to a great extent data extrapolation, and therefore, the employment of other animal models more related to bovine could be of great utility. In this sense, sheep, besides being a natural intermediate host of *N. caninum*, provide several advantages over cattle as an experimental animal model in terms of number of animals, ease of handling, cost and length of the experiments. In addition, recent studies in small ruminants suggest that neosporosis may be a more important cause of reproductive disorders than it has traditionally been considered. Taking this into account, the **second specific objective** focused on the study of the effect that infection exerts on pregnant sheep in the three terms of gestation, so as to delve into the knowledge of pathogenesis and immune response of ovine neosporosis, as well as to develop a new model of neosporosis based on this species as a valuable alternative to cattle. For that purpose, pregnant ewes were intravenously inoculated with 10^6 tachyzoites of the Nc-Spain7 isolate in the three terms of gestation (days 40, 90 and 120 of gestation). The outcome of infection, lesional development and parasite distribution and burden (Sub-objective 2.1), as well as local and peripheral immune responses (Sub-objective 2.2) were studied in these animals.

Infection during the first term of gestation resulted in foetal death in all inoculated animals between days 19 and 21 pi. The analysis of the foetuses and placenta showed mainly necrotic lesions in the foetal liver and the highest parasite detection and burden both in placenta and foetal tissues. In the placenta, immunohistochemical analysis confirmed parasite dissemination in the foetal part, while the scarce infiltrate of inflammatory cells was mainly located in the maternal part. Serological analysis showed an early production of IFN- γ previous to specific IgG antibodies. On the other hand, cytokine expression levels in the placenta revealed a mixed Th1-Th2 response, showing a high upregulation of IFN- γ and IL-4 followed by modest increases of TNF- α and IL-10, whereas TGF- β expression levels were downregulated.

After infection at day 90 of gestation, foetal death also occurred in all dams, although it occurred later (days 34-48 pi). In this group, lesions were mainly inflammatory, the foetal liver being the organ that showed the lowest frequency of lesions, parasite detection and burden. By contrast, in the placenta, the parasite was detected in very low amounts, mainly

as particulate antigen, while severe lesions were much more frequent and severe, being associated to inflammatory infiltrate. Peripheral immune responses were similar to that observed after infection at day 40, although IFN- γ levels were lower. Cytokine profile at the materno-foetal interface was similar, but showing lower levels and also a slight increase of IL-12 and IL-6, which were not observed in any other group.

On the other hand, all dams infected in the last term of gestation delivered viable lambs, although 3/9 were born before day 145 of gestation and showed weakness and recumbency. Vertical transmission occurred in all infected sheep, the parasite burden in lambs being similar to that observed in the group infected at mid-gestation. However, lesions in this group showed a more evident inflammatory pattern and a higher frequency in foetal brain and muscle compared to the other two groups. In the placenta, lesions were similar to those from the group infected at mid-gestation, but showing a much lower infiltrate of inflammatory cells. Serological analysis revealed a lower and later production of both IFN- γ and IgG, suggesting a lower stimulation triggered by the parasite in this term. At the materno-foetal interface, a more balanced IFN- γ /IL-4 was observed, contrary to that from the other two groups in which IFN- γ mRNA levels were higher. In contrast to the other groups, an increase in IL-10 and decline in TGF- β was not observed in this term.

Finally, it is worth mentioning that no significant increments in IL-4 levels in sera and TLR2 and TLR4 expression levels in placenta were observed in any experimental group. When the inflammatory cells population was analysed in placenta from the different groups, B lymphocytes (CD79+) were detected in a very small amount, showing no differences between infected and uninfected animals. Moreover, although the infiltrate of inflammatory cells varied in intensity between groups, in all of them it consisted mainly of CD8+ T lymphocytes and, to a lesser extent, CD4+ T lymphocytes and macrophages (CD163+).

These studies highlight that the outcome of infection depends greatly on the time of gestation when infection take place, similarly to that described in cattle. Furthermore, abortion produced after infection during the first term of gestation is seemingly provoked by the uncontrolled multiplication of the parasite in the foetus, whereas abortion in the second term is probably accounted for by the severity of lesions developed in the placenta. On the other hand, the short time elapsed between infection and birth in the last term of gestation could have limited the production of abortion in this group due to the placenta damage. Finally, yet very similar, a number of differences between sheep and cattle are evident, such as the increased likelihood of abortion at mid-gestation, as well as the much lower IL-12 secretion and the higher expression of LT CD8+ in placenta for ewes. Despite this, sheep represent a valuable model of exogenous transplacental transmission of ruminant neosporosis, serving as a reasonably good alternative to cattle. In this sense, a new sheep model based on an intravenous dose of 10^6 tachyzoites of the Nc-Spain7 isolate inoculated at day 90 of gestation is proposed. In this model, abortion is induced in all infected ewes but under less aggressive conditions for the foetus compared to inoculation at day 40 of gestation, due to the development of the materno-foetal immune response at this stage. Therefore, this model would allow the assessment of vaccines and drug candidates against transplacental transmission and abortion in ruminants.

In summary, the results of this Doctoral Thesis lay the foundations for a standardised and refined *Neospora* pregnant mouse model, as well as the conditions of a primoinfection model in sheep as a valuable alternative to cattle. In addition, new insights have been gained into the pathogenesis of abortion in ovine neosporosis, a disease with an increasing relevance during recent years. These models foster the development of a consensus for internationally accepted standard guidelines for animal models of neosporosis, which would be helpful for researchers in this field, especially for the assessments of drug or vaccine candidates against transmission and abortion caused by *N. caninum*.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES/BACKGROUND

1. NEOSPOROSIS BOVINA

Neospora caninum es un protozoo parásito intracelular perteneciente al *phylum* Apicomplexa y agente causal de la neosporosis, una enfermedad considerada como una de las principales causas de aborto de origen transmisible en el ganado bovino y que produce importantes pérdidas económicas a nivel mundial (Reichel *et al.*, 2013).

1.1. Antecedentes históricos

N. caninum se describió por primera vez en el año 1984 por Bjerkås y colaboradores en Noruega, cuando un protozoo formador de quistes, similar a *Toxoplasma gondii*, fue observado en perros que presentaban trastornos nerviosos graves caracterizados por meningoencefalomielitis y miositis (Bjerkås *et al.*, 1984). Posteriormente, varios autores describieron la presencia de este mismo agente, aún sin identificar, en terneros neonatos con cuadros de encefalomielitis (Parish *et al.*, 1987; O'Toole & Jeffrey, 1987). No fue, sin embargo, hasta 1988 cuando Dubey *et al.* propusieron la descripción de un nuevo género, *Neospora*, y especie, *N. caninum*, tras identificar el parásito en perros que presentaban signos clínicos neuromusculares idénticos a los observados en 1984 (Dubey *et al.*, 1988a). Seguidamente, se obtuvo el primer aislado del parásito en ratón y en cultivo celular a partir de tejido nervioso de estos perros (aislado Nc-1), lográndose reproducir experimentalmente la infección en perros sanos (Dubey *et al.*, 1988b).

La neosporosis como causa de aborto en el ganado bovino se describió por primera vez en 1989 en una granja de Nuevo México (EE. UU.) (Thilsted & Dubey, 1989). En años sucesivos, la infección por *N. caninum* fue descrita en numerosos países asociada a fallo reproductivo (Anderson *et al.*, 1991; Barr *et al.*, 1991a; Dubey & Lindsay, 1996). En 1992, se demostró experimentalmente la transmisión transplacentaria del parásito en la especie bovina (Dubey *et al.*, 1992b) y, un año después, se obtuvo el primer aislado procedente de un feto bovino abortado (Conrad *et al.*, 1993a). Posteriormente, se consiguió reproducir el cuadro clínico en vacas gestantes tras la infección experimental con este aislado, produciéndose la muerte fetal (Barr *et al.*, 1994b). Desde entonces, se han realizado numerosos estudios de prevalencia de la infección en diversas regiones del mundo, tanto en animales adultos como en fetos abortados, pasando la neosporosis a considerarse como una de las principales causas de aborto bovino a nivel mundial (Dubey *et al.*, 2007a).

Por otra parte, cabe destacar dos acontecimientos que ayudaron a esclarecer diversos aspectos de la biología del parásito. En 1998, McAllister *et al.* demostraron que el perro era el hospedador definitivo de *N. caninum* al identificar ooquistes del parásito en las heces de perros infectados experimentalmente, completando de este modo el ciclo biológico (McAllister *et al.*, 1998). Ese mismo año, se describió una segunda especie de *Neospora*, *N. hughesi*, aislada del tejido nervioso de un caballo adulto con signos clínicos nerviosos (Marsh *et al.*, 1996; 1998). A pesar del escaso conocimiento existente en la actualidad sobre esta especie, diversos autores han puesto de manifiesto diferencias estructurales, antigénicas, genéticas y patogénicas entre las dos especies del género *Neospora* (Marsh *et al.*, 1998; Walsh

et al., 2001). No cabe duda que, desde su descubrimiento, el interés en el campo veterinario por *N. caninum* ha ido en aumento, habiéndose realizado numerosas investigaciones sobre la biología del parásito, así como sobre el diagnóstico, la epidemiología y el control de la enfermedad (Ortega-Mora *et al.*, 2006; Dubey & Schares, 2011; Reichel *et al.*, 2013; 2014).

1.2. Agente etiológico

1.2.1. Taxonomía

N. caninum es un protozoo intracelular obligado perteneciente al *phylum* Apicomplexa, que se caracteriza por la disposición típica de algunas de sus organelas en la parte anterior de la célula, formando lo que se denomina complejo apical. Además, se incluye dentro de la familia Sarcocystidae, que comprende otros géneros de apicomplejos de ciclo biológico heteroxeno y formadores de quistes tisulares (*Toxoplasma*, *Hammondia*, *Besnoitia*, *Sarcocystis* y *Frenkelia*). Las diferencias proteicas, antigénicas, estructurales, moleculares y, sobre todo, biológicas entre *Neospora* y los otros integrantes de la familia Sarcocystidae son suficientemente significativas como para considerarlos géneros diferentes (Ellis *et al.*, 1994; Dubey *et al.*, 2002). La clasificación taxonómica del parásito y sus principales características se encuentran resumidas en la Figura 1.

Figura 1 - Clasificación taxonómica de *Neospora caninum*.

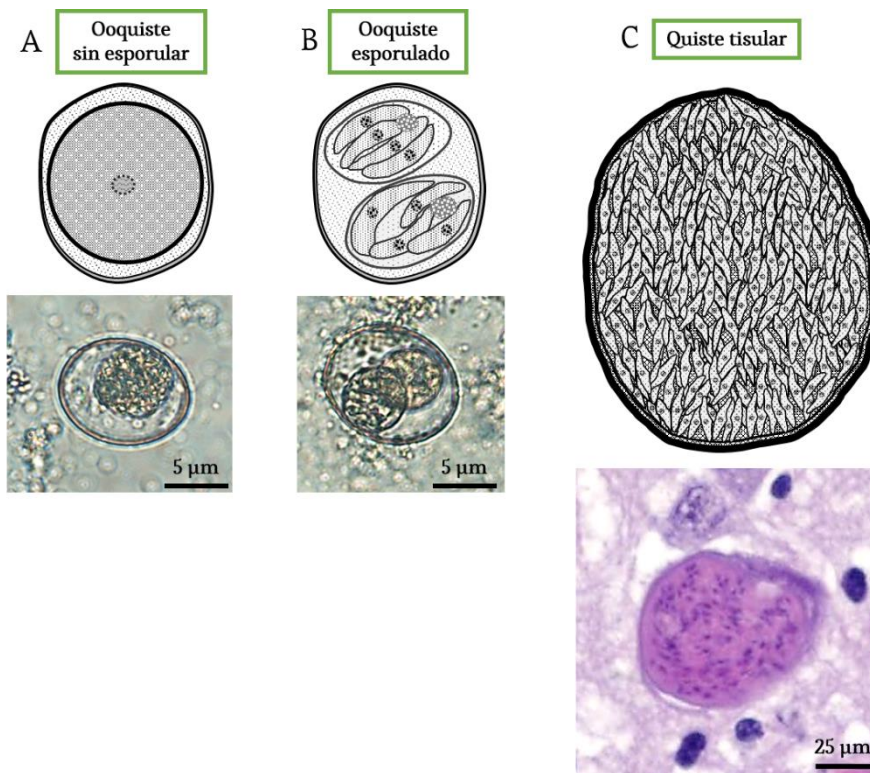


1.2.2. Estadios del parásito

En el ciclo biológico de *N. caninum* se han descrito tres estadios bien diferenciados del parásito: taquizoítos, bradizoítos en el interior de quistes tisulares y esporozoítos en el interior de ooquistes (Figura 2). Los taquizoítos y los quistes tisulares son las fases infectantes que se localizan en diversos tejidos del hospedador intermediario, mientras que los ooquistes son eliminados al medio ambiente con las heces del hospedador definitivo, el perro.

Figura 2 – Representación e imágenes microscópicas de los estadios parasitarios de *N. caninum*.

Representación e imágenes de un ooquiste sin esporular (A) y esporulado (B). Representación e imagen de un quiste tisular en tejido cerebral teñido con hematoxilina-eosina (HE) (C).

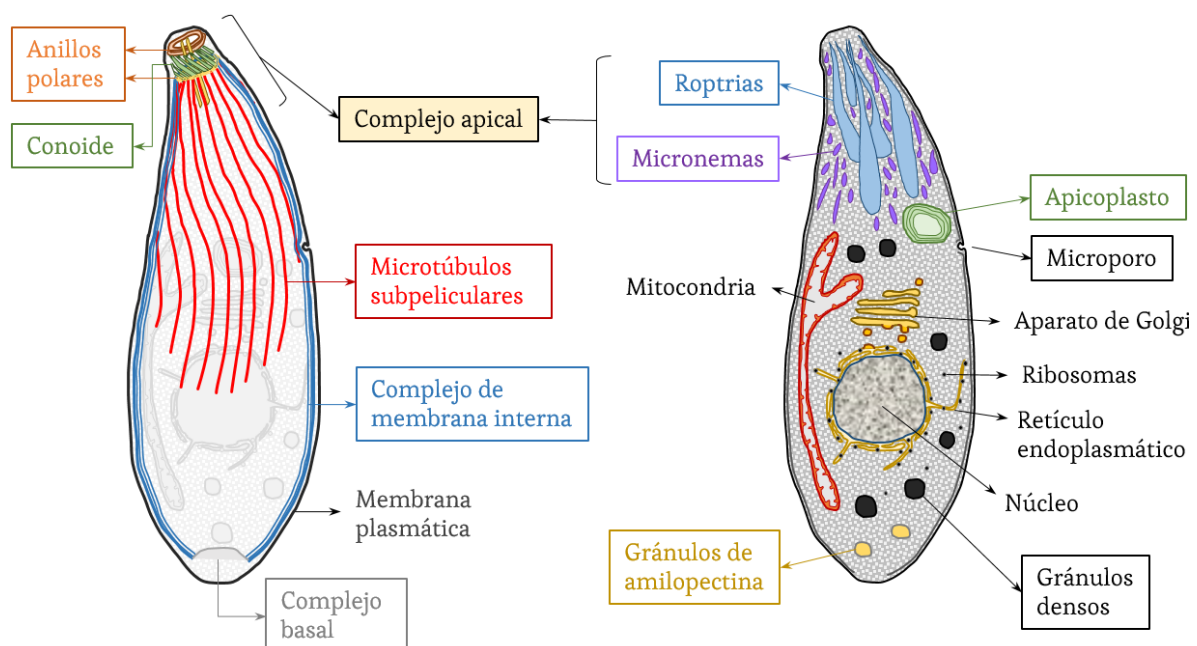


Los **taquizoítos** constituyen las formas invasivas de multiplicación rápida, siendo responsables de la fase aguda de la infección, diseminación intraorgánica y daño tisular en el hospedador intermediario (Dubey *et al.*, 2006). Los taquizoítos presentan una morfología ovoide, lunar u ovalada, en función de la etapa de división en la que se encuentren, y su tamaño oscila entre 3 y 7 µm de longitud y entre 1 y 5 µm de anchura (Dubey *et al.*, 2002). Ultraestructuralmente, el taquizoíto presenta, además de las organelas típicas de cualquier célula eucariota, todas las estructuras características de los parásitos apicomplejos (Figura 3). La membrana de los taquizoítos es una estructura compuesta por una triple capa que incluye

la membrana plasmática y el complejo interno de membrana, formado a su vez por una serie de alveolos aplanados que interaccionan externamente con el glideosoma e internamente con los microtúbulos subpeliculares (Ouologuem & Roos, 2014). El glideosoma constituye el sistema motor y está formado por un entramado de proteínas entre las que destacan la actina y la miosina (Jacot *et al.*, 2014). Los microtúbulos subpeliculares recorren longitudinalmente el citoplasma y ejercen una función de citoesqueleto. Estas estructuras se anclan en dos anillos polares anteriores, entre los que se encuentra el conoide, un cono truncado y móvil de filamentos de tubulina, y un anillo polar posterior (Speer & Dubey, 1989; Lindsay *et al.*, 1993; Speer *et al.*, 1999). Además, en el citoplasma se encuentran cuatro organelas características del filo: las roptrias y los micronemas, distribuidas principalmente en la porción apical del parásito, y los gránulos densos y de amilopectina (polisacárido de reserva), distribuidos más homogéneamente en el mismo (Speer *et al.*, 1999) (Figura 3). Las roptrias poseen una función importante en la formación y maduración de la vacuola parasitófora dentro de la célula hospedadora. Los micronemas son pequeñas vesículas que secretan proteínas al exterior, participando en el reconocimiento y adhesión a la célula hospedadora (Hemphill *et al.*, 2013). Al conjunto formado por el conoide, anillos polares, micronemas y roptrias se le denomina complejo apical (Dubey *et al.*, 1988a). Los gránulos densos participan, mediante productos de secreción, tanto en la formación como en el mantenimiento de la vacuola parasitófora en el interior de la célula hospedadora (Hemphill, 1999).

Figura 3 - Representación gráfica de la ultraestructura del taquizoíto de *N. caninum*.

Componentes del citoesqueleto (izquierda) y del citoplasma (derecha). Los nombres encuadrados señalan estructuras exclusivas de los protozoos apicomplejos.



Por su parte, los **bradizoítos** son la forma de multiplicación lenta del parásito, asociada a la fase crónica de la infección en el hospedador intermediario. Los bradizoítos miden aproximadamente 5-8 μm de largo y 1-2 μm de ancho y poseen las mismas estructuras que el taquizoíto, aunque existen ciertas diferencias en cuanto a la disposición y número de las organelas secretoras en su interior (Speer & Dubey, 1989; Dubey *et al.*, 2004). Este estadio se localiza dentro de los quistes tisulares formados en el espacio intracitoplasmático de una sola célula, principalmente en el SNC y el tejido muscular esquelético (Dubey & Lindsay, 1996; Peters *et al.*, 2001; Dubey, 2003). Los quistes tisulares tienen forma redondeada u oval, miden aproximadamente 100 μm de diámetro y pueden contener en su interior hasta 200 bradizoítos (Figura 2). La pared quística, de hasta 4 μm de espesor y formada por dos membranas, es más gruesa e irregular que la descrita para los quistes de *Toxoplasma* (Speer *et al.*, 1999).

Por último, los **esporozoítos** se localizan en el interior de los ooquistes, que son las formas de resistencia del parásito eliminadas con las heces del hospedador definitivo (Figura 2). Los ooquistes se eliminan al medio sin esporular y deben sufrir una esporogonia para ser infectantes. La esporulación se completa, en condiciones adecuadas de temperatura y humedad, transcurridas aproximadamente 24 h. El ooquiste esporulado, morfológicamente muy similar a los de *Toxoplasma* y *Hammondia*, tiene forma esférica y su tamaño es aproximadamente de 12 μm de longitud y 11 μm de anchura. En su interior se encuentran dos esporoquistes elipsoidales que, a su vez, contienen cuatro esporozoítos y un cuerpo residual esporoquístico (Dubey *et al.*, 2002).

1.2.3. Espectro de hospedadores y ciclo biológico

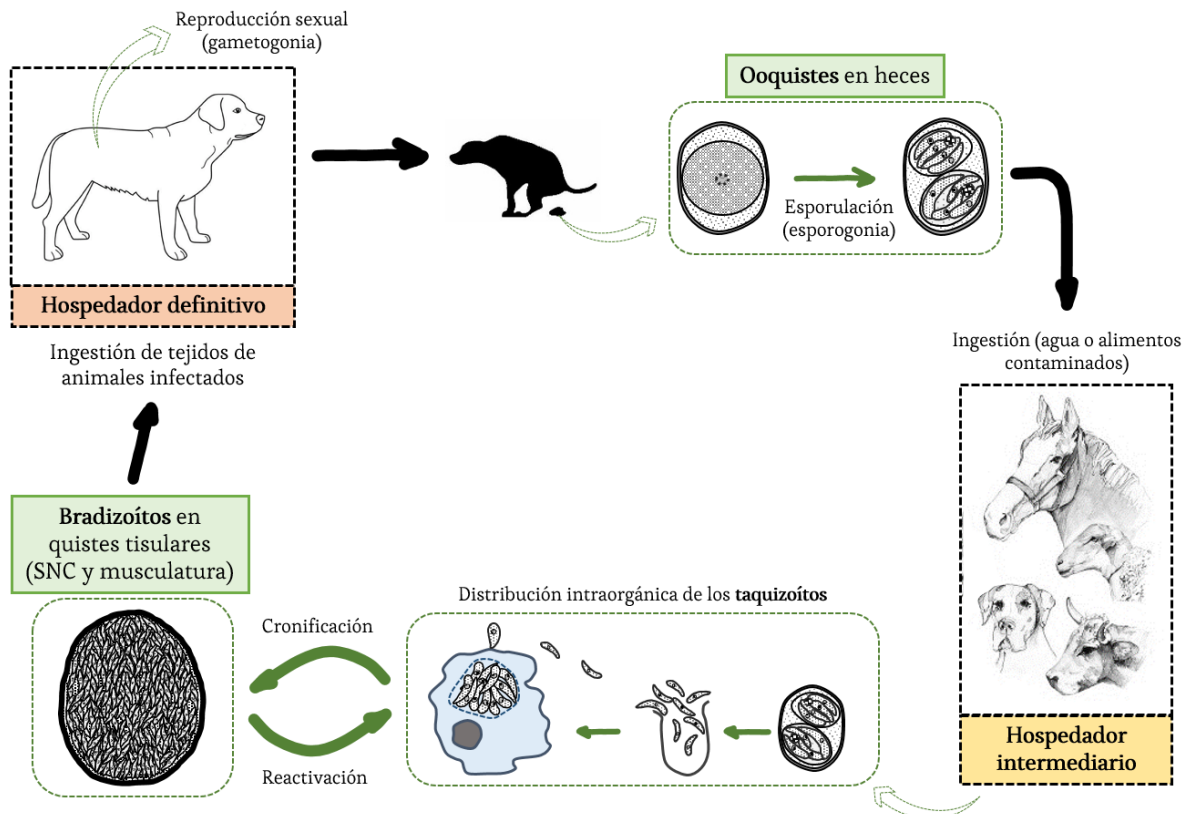
N. caninum presenta un ciclo biológico heteroxeno facultativo con dos tipos de hospedadores, uno definitivo y otro intermediario, en los que se desarrollan las fases de multiplicación sexual y asexuales del parásito, respectivamente (Figura 4). Hasta la fecha se han descrito como hospedadores definitivos, el perro (McAllister *et al.*, 1998), el coyote (Gondim *et al.*, 2004b), el dingo (King *et al.*, 2010) y el lobo (Dubey & Schares, 2011). Por su parte, como hospedadores intermediarios intervienen, principalmente, el ganado bovino y ovino (Thilsted & Dubey, 1989), siendo el hospedador intermediario principal el primero. No obstante, la presencia de *N. caninum* en pequeños rumiantes está cobrando cada vez más importancia como agente abortivo (Moreno *et al.*, 2012; González-Warleta *et al.*, 2014; Benavides *et al.*, 2014). Por otro lado, aunque la infección por *N. caninum* ha sido detectado por diversas técnicas diagnósticas en un amplio espectro de animales domésticos y silvestres, el aislamiento de parásitos viables solo ha sido posible en unas pocas especies hospedadoras (ganado bovino, bisonte europeo, oveja, ciervo de cola blanca, caballo y perro) (Dubey *et al.*, 2007a; Dubey & Schares, 2011). Por otro lado, aunque se ha logrado reproducir experimentalmente la infección en macacos (Barr *et al.*, 1994a), no existen a día de hoy evidencias de que *N. caninum* pueda infectar al ser humano (Dubey *et al.*, 2007a; McCann *et al.*, 2008).

La eliminación de ooquistes por el perro, como hospedador definitivo más importante, ha sido descrita por numerosos autores (McAllister *et al.*, 1998; Dubey *et al.*, 2007a; Dubey & Schares, 2011). Sin embargo, no ha sido hasta hace poco cuando se han descrito los estadios enteroepiteliales del parásito que culminan con la formación de los ooquistes (esquizontes y gamontes), habiéndose demostrado estas fases en un cachorro infectado de forma natural (Kul *et al.*, 2015). Una vez en el ambiente, los ooquistes deben sufrir una esporulación para resultar infectantes. Al igual que en otros coccidios, aparentemente los ooquistes tienen una resistencia ambiental muy elevada (Uzeda *et al.*, 2007; Alves Neto *et al.*, 2011).

La esquizogonia del parásito se lleva a cabo en el hospedador intermediario. Tras la ingestión de ooquistes esporulados presentes en los alimentos o agua contaminados, los esporozoítos se liberan en el intestino e infectan las células del epitelio intestinal, donde se transforman en taquizoítos (zoítos de multiplicación rápida). Posteriormente, alcanzan el torrente circulatorio a través de los linfonódulos mesentéricos, produciéndose la diseminación intraorgánica del parásito. Los taquizoítos pueden invadir una amplia variedad de órganos y tejidos tales como el corazón, pulmón, hígado, músculo esquelético, placenta, cerebro o piel (Dubey & Lindsay, 1996; Maley *et al.*, 2003; Dubey *et al.*, 2006). Además, también puede infectar células endoteliales y fibroblastos, entre otros (Lindsay *et al.*, 1999b; Dubey *et al.*, 2002; 2006). Con el tiempo, el hospedador desarrolla una respuesta inmunitaria capaz de eliminar la mayor parte de los taquizoítos, si bien algunos de ellos logran evadir dicha respuesta mediante la conversión al estado latente de bradizoíto, principalmente en el SNC y tejido muscular esquelético, iniciándose así la fase crónica de la infección (Peters *et al.*, 2001; Buxton *et al.*, 2002). De esta forma, el parásito permanece en el hospedador durante periodos prolongados de tiempo sin mostrar signos clínicos (Peters *et al.*, 2001; Buxton *et al.*, 2002).

La depredación de tejidos infectados con quistes de bradizoítos se presenta como la única vía de transmisión de la infección desde el hospedador intermediario al definitivo, cerrando de esta forma el ciclo biológico (Dubey & Schares, 2011). Además, en el caso del hospedador intermediario debe tenerse en cuenta que también se produce la infección de forma vertical por la vía transplacentaria (detallado en el epígrafe 1.3) (Dubey, 2003). Finalmente, se ha podido establecer la existencia de un ciclo silvestre además del ciclo doméstico ya descrito (Gondim, 2006). El parásito es capaz de circular entre ambos, siendo posible, por tanto, la transmisión del parásito de animales silvestres al perro y, posteriormente, de éste al ganado bovino, así como del ganado bovino a cánidos silvestres, y de éstos a los rumiantes silvestres (Gondim *et al.*, 2004d).

Figura 4 - Ciclo biológico de *N. caninum*.



1.2.4. Aislados y variabilidad intraespecífica

Desde el primer aislamiento de *N. caninum* en 1988 (aislado Nc-1) (Dubey *et al.*, 1988b), el número total de aislados obtenidos ha sido relativamente bajo (cerca de 100). Hasta el momento, se ha logrado la obtención de aislados de *N. caninum* procedentes de animales domésticos (vaca, oveja, perro y caballo) y silvestres (ciervo, búfalo, bisonte y lobo) (Dubey & Schares, 2011; Dubey *et al.*, 2014). En España, el grupo de investigación SALUVET ha obtenido un número elevado de aislados (10), principalmente a partir de terneros congénitamente infectados y clínicamente sanos (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2008; Rojo-Montejo *et al.*, 2009b). Cabe destacar las dificultades que existen en la obtención *in vitro* debido a la baja carga del parásito en los tejidos y la pérdida de viabilidad en fetos abortados, lo que hace necesario, en la mayoría de los casos, el pase por ratones inmunodeficientes previamente a su aislamiento y adaptación a cultivo celular (Dubey *et al.*, 2007a; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2008).

Diversos autores han demostrado en ensayos *in vitro* que existen diferencias en la capacidad de invasión y proliferación (Schock *et al.*, 2001; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2011; Dellarupe *et al.*, 2014a), así como en la capacidad de diseminación y transmigración (Collantes-Fernández *et al.*, 2012). De igual forma, estudios realizados en modelos experimentales murinos han revelado variaciones en el grado de virulencia entre los diferentes aislados, que se manifiestan en la carga parasitaria, morbilidad, transmisión

vertical o mortalidad neonatal, entre otros parámetros (Lindsay *et al.*, 1995a; Atkinson *et al.*, 1999; Collantes-Fernández *et al.*, 2006b; Rojo-Montejo *et al.*, 2009b; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2010; Dellarupe *et al.*, 2014b). Además, existe una elevada correlación entre aquellos aislados que presentan una mayor invasión y multiplicación *in vitro* y la patogenia en el ratón (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2011; Dellarupe *et al.*, 2014a), e incluso entre las observaciones descritas en el modelo murino y en el modelo bovino, al menos con los aislados Nc-1, Nc-Spain1H y Nc-Spain7 (Rojo-Montejo *et al.*, 2009a; Caspe *et al.*, 2012; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014). En conjunto, estos trabajos han permitido clasificar algunos aislados en función de su grado de virulencia. Así, para aquellos aislados empleados en diversos estudios experimentales, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, se ha confirmado, por ejemplo, una alta virulencia de los aislados Nc-Liverpool o Nc-Spain7 y una baja virulencia del aislado Nc-Spain1H (Rojo-Montejo *et al.*, 2009b; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2010; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2011; Dellarupe *et al.*, 2014a; 2014b).

Por otro lado, se desconocen las bases moleculares que puedan explicar posibles diferencias fenotípicas en los distintos aislados. Se dispone, eso sí, de la reciente comparación entre el genoma de *T. gondii* y *N. caninum* (Reid *et al.*, 2012). En este estudio se concluyó que el contenido genético de ambos parásitos está muy conservado, mostrando un alto grado de sintenia, sobre todo en aquellos genes que regulan el metabolismo. Sin embargo, *N. caninum* mostró una expansión de los genes que codifican las proteínas de superficie SRS, implicadas en la adhesión a la célula durante la invasión, así como una pseudogenización o fallo en la transcripción de genes implicados en los mecanismos de patogenicidad de *T. gondii* en el ratón, o factores de virulencia (NcROP18, NcROP16, NcROP5, NcSUB2). Sin embargo, los estudios genómicos realizados en *N. caninum*, aunque escasos, coinciden en mostrar la existencia de una variabilidad genética entre aislados, lo que podría explicar las diferencias de virulencia observadas (Schock *et al.*, 2001; Gondim *et al.*, 2004a; Beck *et al.*, 2009; Pereira García-Melo *et al.*, 2010; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2010). En este sentido, los primeros estudios de variabilidad genética se basaron en el análisis del ARNr 18S, así como de la región ITS1 y de los RAPD. Debido a la elevada conservación de las secuencias de los marcadores analizados, estos abordajes indicaban una menor variabilidad genética que la descrita para *T. gondii* (Beck *et al.*, 2009). Posteriormente, el análisis de secuencias de microsatélites permitió evidenciar una elevada diversidad genética entre los aislados del parásito obtenidos *in vitro* (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2006; Pedraza-Díaz *et al.*, 2009) y a partir de muestras de animales con infección natural (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2008; Basso *et al.*, 2009; 2010). Gracias al análisis multilocus, ha sido posible definir una estructuración parcial de *N. caninum* en la que ciertos perfiles genéticos de cada aislado se han asociado a su origen geográfico (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2013). No obstante, utilizando esta técnica no parece existir una relación entre el genotipo y la virulencia de los aislados de *N. caninum*.

Asimismo, también se han realizado comparaciones entre aislados de *N. caninum* que mostraron distinta patogenicidad, detectándose variaciones a nivel proteómico (Shin *et al.*, 2005; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2012). Sin embargo, se ha observado que esta variación entre aislados de diferente virulencia está más relacionada con la abundancia de determinadas proteínas, algunas de las cuales están directamente involucradas en procesos de motilidad y

ciclo lítico del parásito (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2012). Por último, el estudio de la diversidad antigénica entre aislados de *N. caninum* ha revelado una escasa variabilidad intraespecífica, ya que el análisis de diferentes aislados mediante técnicas de Western blotting (WB) mostró perfiles similares entre los aislados comparados (Schock *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 2002). Además, en un estudio reciente se ha sugerido que puede existir una diferente respuesta inmunitaria del hospedador frente a diferentes aislados (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2015). En este estudio, se comparó el inmunoma de aislados virulentos (Nc-Liverpool, Nc-Spain7) y poco virulentos (Nc-Spain1H), enfrentando los extractos proteicos con sueros de ratones infectados con dichos aislados. Las únicas diferencias encontradas dependieron del suero y no del extracto analizado, sugiriendo que las diferencias en el inmunoma se deben a la respuesta inmunitaria inducida por cada aislado.

La clasificación de los aislados de *N. caninum* en base a su virulencia abre nuevas vías de investigación, puesto que su comparación permitiría identificar posibles factores de virulencia cuyo conocimiento resulta esencial para el desarrollo de herramientas farmacológicas e inmunoproliféricas capaces de bloquear procesos esenciales para el parásito.

1.3. Transmisión

Se conocen dos formas de transmisión de *N. caninum* en el ganado bovino: horizontal y vertical. La transmisión horizontal, también denominada postnatal, tiene lugar mediante la ingestión de agua o alimento contaminado con ooquistes eliminados por el hospedador definitivo. Por su parte, la transmisión vertical o transplacentaria se produce cuando en una hembra gestante los taquizoítos atraviesan la placenta e invaden el feto (Figura 5). La transmisión transplacentaria o congénita es la vía de transmisión más eficiente del parásito, ya que se han descrito porcentajes de transmisión que oscilan entre el 40 y el 95% (Dubey *et al.*, 2007a), jugando un papel fundamental en la propagación y mantenimiento de la enfermedad en un rebaño. Además, una hembra congénitamente infectada puede transmitir la infección a su prole, repetidamente, en diferentes gestaciones (Boulton *et al.*, 1995; Wouda *et al.*, 1998b; Guy *et al.*, 2001; Fioretti *et al.*, 2003).

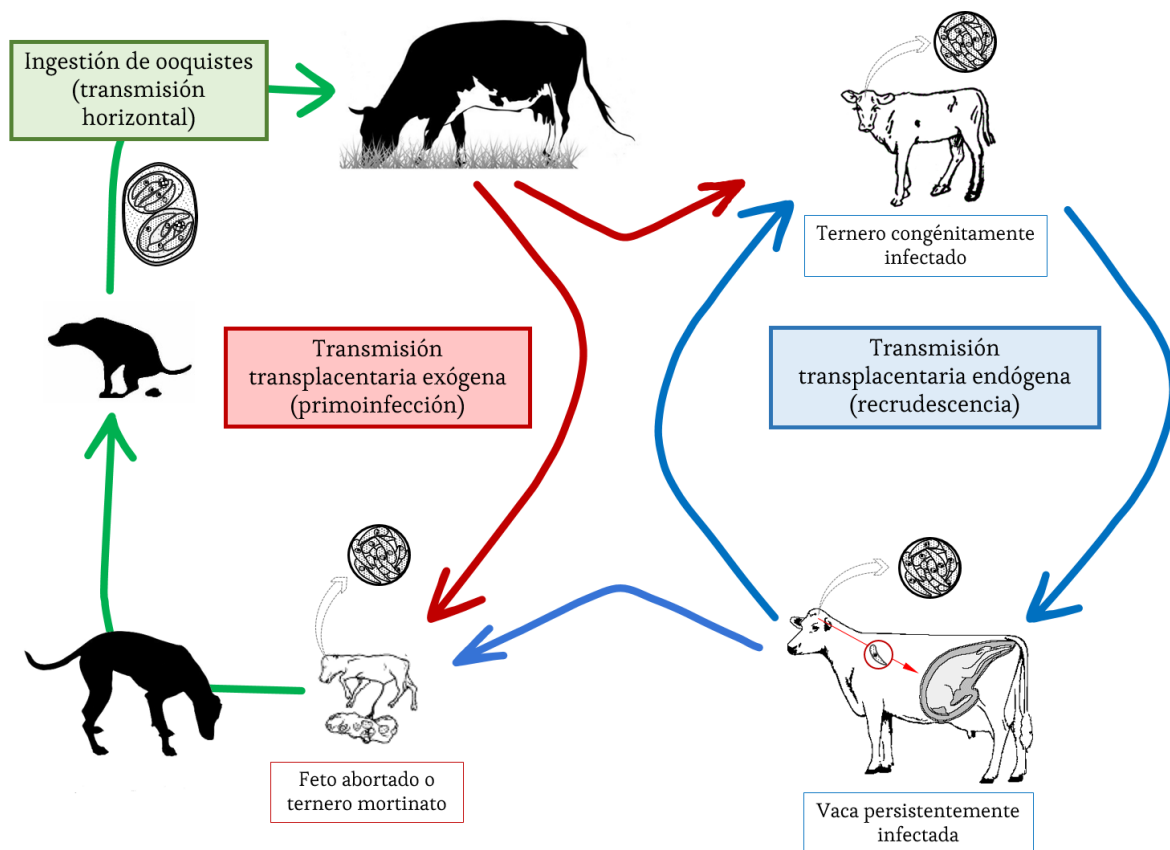
Desde el punto de vista del origen de la infección transplacentaria, se han descrito dos modos de transmisión, la exógena y la endógena (Trees & Williams, 2005). Ambos modos presentan consecuencias patogénicas y epidemiológicas diferentes, por lo que sus medidas de control también lo son. La transmisión transplacentaria endógena ocurre tras la recrudescencia de una infección crónica durante la gestación en una hembra persistentemente infectada. En cambio, la transmisión transplacentaria exógena se presenta en vacas que adquieren la infección por primera vez por el consumo de ooquistes esporulados durante la gestación, transmitiendo la infección a su descendencia. Las granjas infectadas crónicamente presentan abortos de manera endémica, como consecuencia de una transmisión transplacentaria endógena. Por el contrario, las granjas que sufren una primera exposición a la infección por el contacto con ooquistes esporulados presentan un brote de abortos (30-57%) que son debidos a una transmisión transplacentaria exógena (Trees &

Williams, 2005; Dubey *et al.*, 2007a). En este sentido, la transmisión transplacentaria endógena aparece como el modo de transmisión predominante en muchos rebaños, mientras que existe controversia en cuanto a la relevancia de la transmisión transplacentaria exógena para dar lugar a una infección crónica (McCann *et al.*, 2007; Dijkstra *et al.*, 2008). Hasta la fecha, sólo se ha logrado reproducir a nivel experimental la transmisión transplacentaria exógena en vacas gestantes tras la infección con taquizoítos u oocistos, y no la endógena (Williams *et al.*, 2000; Innes *et al.*, 2001b; McCann *et al.*, 2007). Los experimentos llevados a cabo para evaluar la transmisión endógena han fallado debido a que algunos animales parecen capaces de eliminar el parásito tras la infección experimental. Sin embargo, en infecciones naturales se ha observado la transmisión transplacentaria endógena en animales infectados postnatalmente (Dijkstra *et al.*, 2008).

A pesar de todo lo expuesto, las tasas de transmisión vertical disminuyen con la edad. Esto, sumado a que la transmisión transplacentaria no ocurre en el 100% de los casos, se traduce en que, sin una fuente externa de infección (transmisión horizontal), la enfermedad tendería a desaparecer con el paso de las generaciones sucesivas (Dubey *et al.*, 2007a; Eiras *et al.*, 2011). Por tanto, la transmisión transplacentaria exógena y endógena parecen complementarse para evitar este fenómeno. De hecho, en España se han descrito diferentes escenarios epidemiológicos en los que la transmisión transplacentaria exógena y endógena pueden presentarse de forma independiente o combinada (Rojo-Montejo *et al.*, 2009c).

Por último, otras formas de transmisión como la venérea y la galactófora se han postulado como posibles modos de infección, aunque han demostrado ser epidemiológicamente poco importantes (Davison *et al.*, 2001; Serrano-Martínez *et al.*, 2007; Dubey *et al.*, 2007a). Otras, como la ingestión de placentas procedentes de madres infectadas por otra vacas del rebaño, no han podido ser demostradas experimentalmente, a pesar de que los taquizoítos albergados en la placenta podrían servir teóricamente como fuente de infección para otra vaca que la ingiriera (Shivaprasad *et al.*, 1989; Davison *et al.*, 2001). Existen, además, otras potenciales fuentes de infección relacionadas con los cánidos y hospedadores intermediarios silvestres tales como roedores, que podrían actuar como reservorio y cuya interacción con el ciclo doméstico debe tenerse en cuenta, aunque su importancia epidemiológica está aún por determinar (Gondim, 2006).

Figura 5 - Representación gráfica de la transmisión transplacentaria de *N. caninum*.



1.4. Signos clínicos y lesiones

La infección por *N. caninum* en el ganado bovino no gestante es, generalmente, asintomática, mientras que en animales gestantes tiene como signo clínico más relevante el aborto (Dubey, 2005). Éste puede ocurrir a partir del tercer mes de gestación, aunque suele observarse con más frecuencia entre los 5 y 7 meses (Dubey *et al.*, 2007a; Almería & López-Gatius, 2013). Si la infección ocurre en el primer tercio de la gestación, el feto suele ser reabsorbido y lo que se observa, clínicamente, es una repetición del celo. No obstante, no se ha encontrado una asociación entre la infección por *N. caninum* y el fallo reproductivo temprano (Almería & López-Gatius, 2013). Por otra parte, si la muerte fetal se produce entre los meses 3 y 8 de gestación, el feto suele ser eliminado presentando una autólisis moderada. Sin embargo, algunos fetos que mueren antes del quinto mes podrían momificarse y quedar retenidos en el útero durante meses (Dubey, 2005). Si la infección ocurre en etapas de la gestación más avanzadas, a partir del quinto mes, disminuye el riesgo de muerte fetal y el signo más frecuente será el nacimiento de terneros sanos pero congénitamente infectados que, generalmente, presentarán anticuerpos precalostrales (Quintanilla-Gozalo *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2000).

En un número muy reducido de casos pueden nacer terneros infectados muy débiles con signos clínicos neurológicos, que van desde una ligera incoordinación hasta una parálisis completa. En los casos más graves, se puede observar malformaciones en la espina dorsal, hidrocefalia o neumonía (Dubey *et al.*, 1992a; Bryan *et al.*, 1994; Gunning *et al.*, 1994). Estos signos suelen aparecer en la primera semana después del parto, aunque pueden retrasarse hasta transcurridas dos semanas del nacimiento (Dubey & de Lahunta, 1993; Duivenvoorden & Lusi, 1995) y evolucionar hasta la total parálisis y muerte del animal durante el primer mes de vida (Dubey *et al.*, 1992a; 2006; Gunning *et al.*, 1994).

Las lesiones asociadas a la infección se pueden observar en diversos órganos, dependiendo de la etapa y gravedad de la misma, siendo, en general, de naturaleza inflamatoria no supurativa. En la placenta se suelen observar focos de necrosis y zonas de intensa inflamación con infiltración de células mononucleares que, en procesos avanzados, pueden progresar hacia la regeneración conjuntiva con hiperplasia, fibrosis e incluso calcificación de los focos necróticos (Barr *et al.*, 1994b; Maley *et al.*, 2003). Estas infiltraciones comienzan primero en las carúnculas maternas y luego se extienden al cotiledón fetal, con aparición de áreas de hemorragia y necrosis. Con frecuencia se observa separación de la carúncula y el cotiledón con liberación de suero en el septo materno-fetal. Las lesiones placentarias son más graves y la necrosis más amplia cuando se ha producido muerte fetal que cuando el feto sobrevive (Gibney *et al.*, 2008).

Por su parte, las lesiones en el feto y en el ternero congénitamente infectado se encuentran mayoritariamente en el SNC. Éstas consisten en áreas multifocales de infiltración linfocitaria, con frecuencia alrededor de vasos sanguíneos (manguitos perivasculares), microgliosis y presencia de astrocitos, pudiendo existir zonas centrales de necrosis e, incluso, mineralización (Barr *et al.*, 1991b; Dubey & Lindsay, 1996). Este tipo de inflamación no supurativa también se observa en el corazón e hígado y con menor frecuencia en el riñón, músculo esquelético o pulmón (Dubey *et al.*, 2006). En los fetos inmunocompetentes, donde la multiplicación del parásito se encuentra más restringida, se observa una necrosis focal rodeada por un intenso infiltrado inflamatorio que puede llegar a calcificarse (Barr *et al.*, 1994b; Otter *et al.*, 1995; Wouda, 1997; Schock *et al.*, 2000). Las lesiones producidas por *N. caninum* son más graves en los fetos abortados en el primer y segundo tercio de gestación que en aquellos abortados al final de la misma (Collantes-Fernández *et al.*, 2006c), y en aquellos asociados a abortos con patrón epidémico que en los precedentes de abortos con patrón endémico (Wouda *et al.*, 1997; Collantes-Fernández *et al.*, 2006a). En los terneros congénitamente infectados sin signos clínicos y en animales adultos también es posible encontrar lesiones, aunque con menor frecuencia y magnitud, restringiéndose principalmente al SNC (Barr *et al.*, 1991b; Bryan *et al.*, 1994; Sawada *et al.*, 2000). Las lesiones pueden asociarse en la mayoría de casos a la presencia de taquizoítos o quistes tisulares en los tejidos, principalmente en el SNC (Dubey & Lindsay, 1996) y con menor frecuencia en el corazón, hígado y musculatura esquelética (Wouda *et al.*, 1997; Morales *et al.*, 2001; Peters *et al.*, 2001).

1.5. Patogenia

N. caninum se considera un patógeno primario en cuanto a la producción del aborto se refiere, aunque los mecanismos finales por los que el feto muere y se desencadena el aborto no han sido descifrados por completo. Durante la parasitemia, que puede tener su origen en una primoinfección o, más comúnmente, en una reactivación de una infección crónica durante la gestación, los taquizoítos se diseminan por el organismo e invaden diferentes tejidos, siendo capaces de atravesar la barrera placentaria y llegar al feto (Dubey *et al.*, 2006). Se han postulado varios mecanismos por los cuales tendría lugar la muerte del feto. En primer lugar, la acción directa del parásito debido a la invasión y multiplicación en los tejidos placentarios y fetales que originaría graves lesiones que afectarían a la supervivencia fetal. A su vez, las lesiones en la placenta podrían provocar el aborto por un insuficiente aporte de oxígeno y nutrientes al feto, ya sea directamente por la multiplicación de los taquizoítos en la misma o por la respuesta inmunitaria materna de tipo inflamatorio desencadenada como respuesta a la infección (Dubey *et al.*, 2006). Por otro lado, una vez que el parásito invade la placenta y el feto, las diferentes consecuencias de la infección (aborto, nacimiento de terneros con signos clínicos neuromusculares y, más frecuentemente, nacimiento de terneros sanos pero congénitamente infectados) van a depender de diversos factores relacionados tanto con el parásito como con el propio hospedador, siendo los más importantes el periodo de gestación en el cual se produce la infección, lo que está directamente relacionado con la inmunidad materna y fetal.

1.5.1. **Periodo de gestación y respuesta inmunitaria fetal**

La supervivencia del feto depende en gran medida del estado de madurez de su sistema inmunitario y de su capacidad para hacer frente a la infección. Por tanto, cuánto más temprano se produzca la infección durante la gestación, más graves serán las consecuencias (Innes *et al.*, 2002; Collantes-Fernández *et al.*, 2006c). Durante el primer trimestre de gestación el feto es altamente sensible a la infección, puesto que los órganos linfoides (timo, bazo y ganglios linfáticos periféricos) se encuentran aún en formación (Williams *et al.*, 2000; Innes *et al.*, 2001b). Estos órganos comienzan a reconocer y responder frente a los agentes patógenos durante el segundo tercio de la gestación (Osburn *et al.*, 1982; Buxton *et al.*, 2002). De esta forma, en el primer trimestre de gestación el feto es excepcionalmente vulnerable a la infección por *N. caninum* y con poca probabilidad sobrevivirá, mientras que en el segundo tercio de gestación el feto puede desarrollar una respuesta inmunitaria frente a la infección que puede o no ser suficiente para su control (Williams *et al.*, 2000; Andrianarivo *et al.*, 2001; Almería *et al.*, 2003; Bartley *et al.*, 2004; Innes *et al.*, 2005). En el tercer trimestre, el feto ya se considera inmunocompetente (Osburn *et al.*, 1982) y podría controlar la multiplicación del parásito y limitar el desarrollo de lesiones (Innes *et al.*, 2002; Dubey *et al.*, 2006), permitiendo su supervivencia (Barr *et al.*, 1994b; Williams *et al.*, 2000; Innes *et al.*, 2001b; Maley *et al.*, 2003).

De este modo, la infección experimental durante el primer tercio se asocia generalmente con una multiplicación o presencia del parásito en la placenta y el feto, produciéndose graves lesiones que provocan la muerte fetal, con reabsorción, autólisis o momificación (Dubey *et al.*, 1992b; Barr *et al.*, 1994b; Williams *et al.*, 2000; Macaldowie *et al.*, 2004; Rojo-Montejo *et al.*, 2009a; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014). Sin embargo, también se ha descrito en algunos casos el nacimiento de terneros sanos sin evidencias de la infección, mientras que otros animales infectados con la misma dosis y aislado abortaron (Barr *et al.*, 1994b; Williams *et al.*, 2000; Macaldowie *et al.*, 2004; Gondim *et al.*, 2004c; McCann *et al.*, 2007; Caspe *et al.*, 2012). No obstante, en la mayoría de estudios en los que se ha observado este resultado, las infecciones experimentales fueron realizadas vía subcutánea (SC), siendo esperable de esta forma una distribución del parásito más lenta y controlable por parte del hospedador, en este caso de la madre (Macaldowie *et al.*, 2004).

Las infecciones experimentales llevadas a cabo en el segundo tercio de gestación, aunque también pueden producir el aborto (Dubey *et al.*, 1992b; Almería *et al.*, 2015), generalmente dan lugar al nacimiento de terneros vivos pero congénitamente infectados. Éstos suelen nacer aparentemente sanos sin mostrar signos clínicos, aunque ocasionalmente se pueden observar signos neurológicos (Barr *et al.*, 1994b; Innes *et al.*, 2001b; Almería *et al.*, 2003; Gondim *et al.*, 2004c). Cuando se produce la muerte fetal, las lesiones descritas son menos graves que aquellas observadas tras la infección en la gestación temprana (Maley *et al.*, 2003).

Por su parte, la infección en el último tercio de gestación comúnmente da lugar al nacimiento de terneros sanos congénitamente infectados (Williams *et al.*, 2000; McCann *et al.*, 2007), siendo además las lesiones más leves y las cargas parasitarias más bajas en placenta y feto que las infecciones llevadas a cabo en el primer y segundo tercio de gestación (Gibney *et al.*, 2008; Benavides *et al.*, 2012).

A pesar de que existen numerosos estudios llevados a cabo en vacas gestantes infectadas experimentalmente, la información disponible en infecciones naturales es limitada. Sin embargo, cabe destacar que en las infecciones naturales se han descrito abortos a partir del tercer mes de gestación, aunque la mayoría se observan en el segundo tercio de gestación, entre los meses 5 y 7 (Dubey *et al.*, 2007a; Almería & López-Gatius, 2013; 2015). Además, el incremento en los niveles de anticuerpos en el segundo y tercer tercio de gestación se ha asociado con el aborto y el nacimiento de terneros congénitamente infectados, respectivamente (Dubey *et al.*, 2006). En función del estadio de desarrollo del feto en el momento de su muerte, éste puede ser reabsorbido, sufrir autólisis o momificación o llegar a ser expulsado muerto antes o durante el parto (Dubey, 2005). Sin embargo, en el ganado bovino infectado naturalmente el nacimiento de terneros infectados y clínicamente sanos es la consecuencia más frecuente de la infección. Esto sugiere que la transmisión ocurre fundamentalmente en periodos tardíos de la gestación (Quintanilla-Gozalo *et al.*, 2000; Innes *et al.*, 2005).

1.5.2. Periodo de gestación e inmunidad materna

La gestación conduce a una situación inmunológica diferente a la habitual en el animal, ya que se produce un cambio en la modulación de la respuesta inmunitaria de la madre, que tiende a ser de tipo Th2 o antiinflamatoria, principalmente a partir del segundo tercio (Lin *et al.*, 1993). Ésta se caracteriza por un incremento en la secreción de citoquinas antiinflamatorias (principalmente IL-4) y reguladoras (IL-10 o TGF- β , entre otras) que inhiben o regulan la respuesta de tipo inflamatoria mediada por IFN- γ e IL-12. Este hecho resulta de suma importancia para evitar un posible rechazo inmunológico del feto por parte de la madre (Innes *et al.*, 2005). A pesar de que la respuesta inmunitaria de tipo Th1 es necesaria para el control de la multiplicación del parásito en el hospedador, se ha sugerido que, en los animales gestantes, una respuesta de tipo Th1, principalmente a nivel de la interfase materno-fetal, podría comprometer la gestación y contribuir a la muerte del feto. Por otro lado, una respuesta del tipo Th2, necesaria para el mantenimiento de la gestación, podría permitir la transmisión del parásito al feto por incremento de la carga parasitaria en los tejidos maternos (Entrican, 2002; Innes *et al.*, 2002).

En el ganado bovino, la muerte fetal que tiene lugar tras la infección experimental en el primer tercio de la gestación está asociada con una amplia distribución del parásito junto con niveles muy elevados de citoquinas de tipo Th1 y Th2 en la interfase materno-fetal. Además, se ha descrito una intensa infiltración placentaria de linfocitos T CD4+, linfocitos T $\gamma\delta$, células NK y una gran producción de IFN- γ local, lo cual provoca una intensa inflamación y daño del tejido placentario (Maley *et al.*, 2006; Rosbottom *et al.*, 2008; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014; Cantón *et al.*, 2014a). Dicha respuesta inmunitaria local no se observa cuando el feto sobrevive (Maley *et al.*, 2006). A medida que avanza la gestación, las consecuencias de la infección pueden ser menos graves, indicando que la infección está siendo controlada, pudiendo no terminar en fallo reproductivo (Maley *et al.*, 2003). El balance entre la respuesta de tipo Th1 y Th2 en la interfase materno-fetal y a nivel periférico es similar, tanto en infecciones en fases tempranas como tardías de la gestación (Rosbottom *et al.*, 2007; 2008). Sin embargo, la magnitud de la expresión de las citoquinas es muy diferente entre ambos periodos, observándose un significativo aumento en aquellos animales en los que se produce la muerte fetal (Rosbottom *et al.*, 2008). Esto sugiere que la muerte fetal en el ganado bovino podría estar más relacionada con la intensidad de la respuesta inmunitaria que con un desequilibrio del balance Th1/Th2. No obstante, en un estudio reciente se ha observado una extensa respuesta inflamatoria tras la recrudescencia de una infección natural en el segundo tercio de gestación (Rosbottom *et al.*, 2011). Los autores sugieren que dicha respuesta producida en la placenta, caracterizada por un infiltrado inflamatorio de linfocitos T CD4+ y T CD8 + y elevados niveles de expresión de IFN- γ e IL-4, lejos de afectar a la supervivencia fetal, podría contribuir al control de la parasitosis. Por tanto, parece ser que las citoquinas podrían resultar tanto beneficiosas como perjudiciales para el hospedador en función de la concentración y localización de las mismas, así como del periodo de gestación. De este modo, podrían desempeñar un papel importante en la transmisión transplacentaria del parásito o mediar en el daño tisular, especialmente en la interfaz materno-fetal.

1.5.3. Aislado

Entre los factores relacionados directamente con el parásito, cabe destacar la variabilidad intraespecífica de los aislados de *N. caninum*, que ha sido ampliamente demostrada *in vivo* e *in vitro* (véase epígrafe 1.2.4). Los aislados estudiados hasta el momento presentan diferencias marcadas en su distribución orgánica, carga parasitaria, gravedad de las lesiones, tasa de transmisión vertical, mortalidad neonatal y capacidad de invasión y proliferación. Consecuentemente, la infección con uno u otro aislado determina la presentación o no de abortos en función de sus características biológicas (Benavides *et al.*, 2014). A nivel experimental, aunque pocos, existen algunos estudios en los que se compara la infección con diferentes aislados. Así, por ejemplo el aislado Nc-Spain7 ha mostrado una virulencia mayor al aislado Nc-1 en infecciones durante el primer tercio de gestación (Casper *et al.*, 2012), mientras que el aislado Nc-Spain1H mostró una marcada disminución de la virulencia, no produciéndose el aborto y observándose lesiones mucho más leves en el feto (Rojo-Montejo *et al.*, 2009a). Además, la comparación entre los aislados Nc-Spain7 y Nc-Spain8, que mostraron diferencias en el modelo murino, produjo un 100% de abortos cuando se infectaron los animales en el primer tercio de gestación. No obstante, los abortos se produjeron antes con el aislado Nc-Spain7, mostrando además una mayor distribución y carga parasitaria en el feto y la placenta (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014). Por otra parte, la vía de inoculación, el estadio del parásito y la dosis administrada también determinan las consecuencias de la infección por *N. caninum* (epígrafe 2.2.3.2.3).

1.6. Inmunidad

La infección por *N. caninum* en el ganado bovino desencadena una combinación de mecanismos de inmunidad innata y adquirida que intentan controlar conjuntamente la diseminación del parásito en el organismo (Innes *et al.*, 2001b; Almería *et al.*, 2003; Staska *et al.*, 2003; Andrianarivo *et al.*, 2005; Rosbottom *et al.*, 2008; Bartley *et al.*, 2013). Dichos mecanismos se ponen en funcionamiento en los primeros momentos tras la infección, activándose componentes de la inmunidad innata como células dendríticas, células NK y macrófagos. Estos tipos celulares actúan como primera línea de defensa, destruyendo las células infectadas por el parásito y liberando citoquinas del tipo IL-12 e IFN- γ (Boysen *et al.*, 2006; Klevar *et al.*, 2007; Strohbusch *et al.*, 2009b; Feng *et al.*, 2010; Dion *et al.*, 2011). El reconocimiento del parásito por parte de las células presentadoras de antígeno y la producción temprana de estas citoquinas es fundamental para el control de la proliferación de los taquizoítos en las primeras fases de la infección. Por otro lado, el papel de los receptores tipo *Toll* (*Toll-like* receptors, TLR) podría ser clave durante las fases iniciales de la infección, ya que estos receptores se encuentran presentes en las células presentadoras de antígeno, así como en las células dendríticas y los linfocitos B (Bartley *et al.*, 2013). Además, cabe destacar la importancia de esta primera respuesta innata e inespecífica como paso previo a la activación de los linfocitos y, por tanto, al consiguiente desarrollo de una respuesta inmunitaria específica con memoria inmunológica frente a *N. caninum*. La mayoría de los trabajos realizados en bovino se han centrado en el TLR2 y TLR4, ya que son los receptores

más estudiados en mamíferos por ser los responsables del reconocimiento de bacterias Gram positivas, Gram negativas y protozoos como *T. gondii* (Uematsu & Akira, 2008). Sin embargo, en la actualidad no se conoce con exactitud la importancia de los TLR en la respuesta inmunitaria innata frente a *Neospora*.

La localización intracelular de *N. caninum* sugiere que una respuesta mediada por células es el componente más importante para la protección (Hemphill, 1999; Innes *et al.*, 2000). Así, el control de la infección por este protozoo en el hospedador se ha asociado a una respuesta inmunitaria adquirida tipo Th1, donde están implicadas diferentes citoquinas proinflamatorias, principalmente IFN- γ , y poblaciones de células T (Khan *et al.*, 1997; Hemphill *et al.*, 2006). La importancia del IFN- γ se ha puesto de manifiesto en varios estudios *in vitro* e *in vivo*, donde se ha demostrado la inhibición de la multiplicación de *N. caninum* en cultivo celular por adición de IFN- γ al medio (Innes *et al.*, 1995; Yamane *et al.*, 2000), así como una mayor susceptibilidad a la infección en un modelo murino tras el tratamiento con anticuerpos anti-IFN- γ (Khan *et al.*, 1997; Baszler *et al.*, 1999).

A nivel celular, las células T CD4⁺ son activadas en presencia del IFN- γ en las primeras fases de la infección, orientando la respuesta inmunitaria hacia una de tipo Th1, activándose a su vez los linfocitos T CD8⁺. Estas células poseen actividad citotóxica y desempeñan un papel importante durante la fase aguda de la infección, ya que actúan limitando la diseminación del parásito y secretando IFN- γ (Correia *et al.*, 2013). Sin embargo, en fases más avanzadas, los linfocitos T CD4⁺ parecen tener un papel más importante en la protección frente a *N. caninum*, pudiendo mediar en la lisis directa de células infectadas (Maley *et al.*, 2006; Rosbottom *et al.*, 2007). Se ha demostrado que la depleción de estos linfocitos en ratones tratados con anticuerpos monoclonales anti-CD4⁺ condujo a una elevada morbilidad y mortalidad, mientras que en ratones tratados con anticuerpos anti-CD8⁺, sólo se observó una mortalidad del 30% (Tanaka *et al.*, 2000a). Por otro lado, los macrófagos infectados también pueden activar los linfocitos T CD4⁺ que expresarán IL-17, una citoquina proinflamatoria reguladora que actúa conjuntamente con el IFN- γ (Flynn & Marshall, 2011). En conjunto, la respuesta Th1 es capaz de destruir las células infectadas por el parásito, además de inhibir su proliferación por medio de la secreción de IFN- γ y TNF- α y bloquear la invasión de nuevas células a través de los anticuerpos generados frente a los taquizoítos (Innes *et al.*, 2007). Esta respuesta, si bien no elimina la infección por completo, provoca una reducción drástica del número de taquizoítos en el organismo y su conversión al estadio de bradizoíto en tejidos inmunoprivilegiados (cronificación).

Por el contrario, la sensibilidad a la infección, tal y como se ha estudiado en el modelo murino, parece estar relacionada con una respuesta de tipo Th2 y niveles elevados de IL-4. Los ratones C57BL/10ScCr deficientes en el receptor TLR4 y en el receptor funcional de la IL-12, sucumbieron a la infección por *N. caninum* a dosis bajas, demostrándose bajos niveles de IFN- γ y altos de IL-4, a diferencia de los ratones C57BL/10ScSn inmunocompetentes (Botelho *et al.*, 2007). Por otra parte, la inducción simultánea de IL-10 e IFN- γ es común en la respuesta inmunitaria frente a parásitos intracelulares dado que la producción de IL-10 es necesaria para prevenir los posibles efectos nocivos de una sobreproducción de citoquinas de tipo Th1,

aumentando así la supervivencia del parásito y la del propio hospedador (Kasper & Khan, 1998; Eperon *et al.*, 1999; Quinn *et al.*, 2004).

Por último, el papel de la respuesta inmunitaria humoral en el control de la neosporosis es todavía confuso y está por dilucidar. Es posible que los anticuerpos generados específicamente frente al parásito tengan varias funciones, como la opsonización de parásitos extracelulares con la consiguiente fagocitosis por parte de los macrófagos, tal y como ocurre en la toxoplasmosis (Sibley *et al.*, 1985). De hecho, los ratones μ MT defectivos en linfocitos B mostraron una mayor susceptibilidad a la infección (Eperon *et al.*, 1999). En cualquier caso, los niveles de anticuerpos frente al parásito sufren fluctuaciones a lo largo de la gestación (Stenlund *et al.*, 1999; Guy *et al.*, 2001; Andrianarivo *et al.*, 2005; Nogareda *et al.*, 2007), lo que puede tener relación con la propia actividad proliferativa del parásito (Weston *et al.*, 2005; Innes, 2007).

1.7. Prevalencia e impacto económico

En la actualidad, son relativamente numerosos los estudios de seroprevalencia de la infección por *N. caninum* en el ganado bovino, habiéndose descrito prevalencias de rebaño e individual muy variadas en función de la localización geográfica y de la aptitud del ganado (Dubey *et al.*, 2007a). No obstante, los datos registrados son difíciles de comparar, ya que han sido obtenidos mediante técnicas diferentes, con diseños experimentales y tamaños de muestra muy variables. Pese a ello, dentro de Europa los países nórdicos y Alemania presentan las seroprevalencias más bajas (0,7-12,8%), mientras que, en Sudamérica, Argentina y Brasil presentan las más altas (80,9-97,2%) (Dubey & Schares, 2011).

En España, los primeros estudios llevados a cabo mostraron prevalencias de rebaño muy elevadas, del 55% y 83% en granjas de carne y leche, respectivamente. Las prevalencias individuales descritas presentaron valores del 18% en animales de carne y hasta el 36% en ganado de leche (Mainar-Jaime *et al.*, 1999; Quintanilla-Gozalo *et al.*, 1999). Estos datos fueron similares a los encontrados posteriormente en la cabaña gallega, donde las seroprevalencias a nivel de rebaño alcanzaron el 88% en ganado de aptitud láctea y el 77% en ganado de aptitud cárnica. A nivel individual, las seroprevalencias variaron entre el 16% y 22% en los rebaños de aptitud láctea, y fueron del 25% en los de aptitud cárnica (González-Warleta *et al.*, 2008; Eiras *et al.*, 2011).

En relación a los fetos bovinos abortados, se estima que entre un 12% y un 40% de los mismos están infectados por *N. caninum* en todo el mundo (Dubey *et al.*, 2007a). En España, se detectó la infección en el 58% de los fetos analizados por diversas técnicas diagnósticas (González *et al.*, 1999). En otro estudio posterior, un 39% de los fetos analizados fue positivo, al menos, por una de las técnicas diagnósticas empleadas. Estos datos ponen de manifiesto la importancia de *N. caninum* como agente abortivo en nuestro país, por delante incluso del virus de la diarrea vírica bovina (Pereira-Bueno *et al.*, 2003).

La neosporosis bovina, por tanto, ha sido reconocida como una de las principales causas de fallo reproductivo a nivel mundial (Dubey & Schares, 2011; Reichel *et al.*, 2014),

ocasionando importantes pérdidas económicas tanto en la industria lechera como en el sector cárnico. Éstas se encuentran relacionadas con el aborto y la mortalidad neonatal, así como con otros efectos indirectos, como el incremento del periodo entre partos, reducción en la producción láctea, o pérdida de valor de los animales por la eliminación temprana de aquellos que presentan fallo reproductivo (Thurmond & Hietala, 1997; Trees *et al.*, 1999). Cabe destacar que las pérdidas económicas parecen ser más importantes en la industria de ganado lechero, donde el riesgo de aborto es mayor (Moore *et al.*, 2009). En una reciente revisión llevada a cabo por Reichel *et al.*, el impacto de la neosporosis bovina fue estimado en un billón de dólares anuales, si bien este estudio se restringe a algunas de las principales potencias ganaderas a nivel mundial (10 países), por lo que se cree que puede ser notablemente superior (Reichel *et al.*, 2013).

1.8. Diagnóstico

El diagnóstico de la neosporosis bovina no es fácil y debe abordarse de una forma adecuada y sistemática. Los datos clínicos y epidemiológicos pueden sugerir la infección por *N. caninum* y su participación en los abortos. Sin embargo, el diagnóstico final debe siempre confirmarse mediante el empleo de técnicas de diagnóstico en el laboratorio. La elección de la herramienta diagnóstica más apropiada para cada caso, así como su correcta interpretación, juegan un papel fundamental (Ortega-Mora *et al.*, 2006). En este sentido, se puede seguir un protocolo de diagnóstico individual para conocer la causa del aborto en una reproductora o la presencia de la infección en un animal de reposición. Asimismo, también se puede seguir un protocolo de diagnóstico de rebaño cuando se pretende conocer la situación de la infección en una explotación, la implicación de *N. caninum* en los problemas reproductivos de la misma o el principal modo de transmisión del parásito, con el fin de establecer las medidas de control apropiadas en cada caso.

Actualmente, existe una amplia batería de técnicas diagnósticas empleadas, aunque no todas ofrecen la misma información o tienen la misma fiabilidad. Sin embargo, y puesto que los animales mantienen la infección de por vida, las técnicas más útiles para el diagnóstico de la enfermedad en animales vivos están basadas en la detección de anticuerpos específicos frente al parásito en suero. Hasta la fecha, se han desarrollado diferentes técnicas de diagnóstico serológico, como la inmunofluorescencia indirecta (IFI), aglutinación o inmunoblot, siendo la más utilizada el ELISA (Álvarez-García *et al.*, 2013). Esta prueba es aplicable en animales adultos y recién nacidos, siempre y cuando se realice sobre sueros precalostrales. Además, existen ELISAs de avidez que son capaces de diferenciar infecciones recientes de crónicas (Schaes *et al.*, 2002; Aguado-Martínez *et al.*, 2005; Björkman *et al.*, 2006), y los ELISAs basados en las proteínas NcGRA7 y NcSAG4 (específicas de taquizoíto -fase aguda- y bradizoíto -fase crónica-, respectivamente), que permiten diferenciar entre primo-infección, recrudescencia e infección crónica (Aguado-Martínez *et al.*, 2008). Asimismo, se ha logrado la adaptación del ELISA en muestras de leche, mostrando resultados equiparables a los de suero, con las ventajas añadidas de tener menores costes y manejo del animal (Björkman *et al.*, 1997; Schaes *et al.*, 2004; 2005; Hall *et al.*, 2006).

La situación serológica de la explotación de la explotación y de las vacas abortadas permite determinar si el problema de abortos está asociado a la infección por *N. caninum* y la magnitud de éste. Este primer abordaje serológico, sobre todo en los casos de aparición de brotes inesperados de abortos, se debe acompañar de la aplicación de técnicas de detección del parásito (PCR) en los tejidos de fetos abortados (cerebro principalmente) y la determinación de la existencia de lesiones compatibles en dichos tejidos (Buxton, 1998; Ortega-Mora *et al.*, 2006; Dubey & Schares, 2006). Además, aunque el valor de la serología como herramienta diagnóstica en el caso de los fetos abortados es muy limitado, la detección de anticuerpos específicos en fluidos de fetos con más de 5 meses de edad puede complementar el diagnóstico, ya que en ganado bovino dichos anticuerpos no son transferidos por la madre vía transplacentaria y los anticuerpos detectados habrían sido producidos por el propio feto (Pereira-Bueno *et al.*, 2003; Dubey & Schares, 2006; Ortega-Mora *et al.*, 2006).

Una vez confirmada la infección por *N. caninum* y la situación serológica de la granja, y en vistas a la elección de las medidas de control más adecuadas, resulta importante conocer el patrón de abortos, así como la forma de transmisión predominante de la infección en la explotación. En este sentido, la relación entre la serología materna y precalostril, el cálculo de la *odds ratio* (OR), la determinación de la avidéz de los anticuerpos de las vacas que hayan sufrido aborto y la distribución de los animales seropositivos por edades, pueden orientar sobre el modo de transmisión predominante en esa granja. La OR mide el riesgo de aborto en las hembras seropositivas, mientras que los análisis de avidéz determinan la antigüedad de la infección de un rebaño. Así, los abortos epidémicos asociados a la transmisión horizontal se caracterizan por presentar una $OR > 2$, anticuerpos de baja avidéz, distribución heterogénea de los abortos por grupos de edad y una falta de asociación de seropositividad entre la madre y su descendencia. Por el contrario, los abortos endémicos, típicos de rebaños crónicamente infectados que sufren recrudescencia, presentan una $OR < 2$, anticuerpos de alta avidéz, distribución homogénea de los abortos por grupos de edad y asociación serológica entre la madre y su descendencia (Dubey *et al.*, 2007a).

1.9. Control

Como se ha señalado anteriormente, para la puesta en marcha de un programa de control en el rebaño es necesaria la realización de un protocolo diagnóstico que permita conocer la situación epidemiológica de la que se parte en cada caso. Además, se debe tener en cuenta la relación coste-beneficio de las medidas a implementar y la cuantía de las pérdidas económicas causadas por la infección (Dubey *et al.*, 2007a). En la actualidad, la única opción existente para el control de la infección en el ganado bovino se basa principalmente en la implementación de medidas de manejo, ya que la quimioterapia e inmunoprofilaxis se encuentran aún bajo estudio, aunque se presentan como alternativas potenciales para el futuro.

1.9.1. Control de la transmisión

La aplicación de medidas básicas de bioseguridad en las granjas libres de la enfermedad es clave para prevenir la introducción de la infección y poder mantener su estado sanitario. Estas incluirían, entre otras, la cuarentena y el estudio serológico de los animales adquiridos procedentes de otras explotaciones; el control del acceso de los perros y otros potenciales hospedadores definitivos (lobo, zorro) a la explotación o, al menos, a las zonas de almacenamiento de comida, comederos y bebederos; la eliminación segura de restos de abortos o tejidos de animales; y el control de roedores por su posible papel como reservorios de la enfermedad. Análogamente, estas prácticas deberían implementarse en aquellas granjas que hubieran sufrido un brote epidémico de abortos por una primo-infección.

En las explotaciones donde la infección está presente de forma endémica, las medidas de control pretenden frenar la transmisión transplacentaria endógena centrándose principalmente en la reposición y sacrificio selectivo de reproductoras. Tanto si la reposición es de origen externo como propio, se deben seleccionar animales libres de la infección mediante un análisis serológico previo, mientras que el sacrificio selectivo se llevará a cabo únicamente tras un análisis exhaustivo del coste-beneficio (Reichel & Ellis, 2006). Sólo cuando la seroprevalencia es muy baja puede ser factible la eliminación de todos los animales seropositivos. Cuando las tasas de prevalencia son intermedias o elevadas, el sacrificio selectivo resulta económicamente inviable. En tales casos se puede plantear una eliminación paulatina de las hembras infectadas que han abortado, que presentan repetición de celo, o de mayor edad, mientras que, a su vez, se puede realizar una reposición selectiva con hijas de vacas seronegativas y destinar las crías de las vacas seropositivas a la producción de carne (Hall *et al.*, 2005). En el caso de animales seropositivos de alto valor genético, se puede recurrir a la transferencia de embriones usando vacas seronegativas como receptoras, o bien, realizar inseminación artificial con razas cárnicas, lo cual se ha asociado con una reducción de la probabilidad de aborto (Almería & López-Gatius, 2015). En cualquier caso, el seguimiento serológico a nivel de rebaño sirve como un indicador de la eficacia de estos programas de control, que en ningún caso deben obviar las medidas de bioseguridad mencionadas previamente.

1.9.2. Quimioterapia

Con respecto a los fármacos frente a la neosporosis bovina, hasta la fecha no existen compuestos efectivos y seguros disponibles en el mercado. Además, aunque alguno de ellos ha mostrado recientemente resultados prometedores en ensayos *in vitro* y en modelos animales de laboratorio (Müller & Hemphill, 2011), muchos necesitan de largos periodos de administración, lo que probablemente produciría residuos en carne y leche o periodos de espera poco rentables para los ganaderos (Dubey *et al.*, 2007a). Entre estos fármacos destacan los derivados diamídicos (Debache *et al.*, 2011; Schorer *et al.*, 2012), la artemisina (Mazuz *et al.*, 2012), la miltefosina (Debache & Hemphill, 2012a), los complejos organometálicos de rutenio (Barna *et al.*, 2013), los inhibidores de la protein quinasa (Ojo *et al.*, 2014) o la buparvaquona (Müller *et al.*, 2015). No obstante, los mayores avances se han logrado con el

uso de algunas sulfadiazinas, como el toltrazuril y su derivado ponazuril (toltrazuril-sulfona), que presentan cierta eficacia en modelos experimentales. Estos compuestos han mostrado capacidad para disminuir la transmisión transplacentaria en infecciones experimentales en ratón (Gottstein *et al.*, 2005; Strohbusch *et al.*, 2009a). Además, la administración en terneros experimentalmente infectados produjo una disminución de la fiebre y de los niveles de anticuerpos en relación a los animales no tratados y no se logró detectar la presencia del parásito en los órganos de ninguno de los animales tratados (Kritzner *et al.*, 2002). A pesar de ello, existen dudas con respecto a su utilidad práctica en infecciones naturales y a la posible presencia de residuos tras el tratamiento en los productos destinados a consumo.

En los últimos años, los inhibidores de la proteína quinasa (BKIs) están cobrando cada vez más importancia y se postulan como compuestos prometedores para el futuro, no sólo frente a la neosporosis, si no frente a otras enfermedades causadas por parásitos apicomplejos (Ojo *et al.*, 2012; 2014; Doggett *et al.*, 2014; Lendner *et al.*, 2015). Éstos actúan inhibiendo las proteínas quinasa dependientes de calcio (CDPKs), unas proteínas esenciales para los procesos de señalización involucrados en la invasión de la célula y multiplicación del parásito, entre otros (Nagamune & Sibley, 2006). Un estudio reciente ha puesto de manifiesto la eficacia potencial de estos fármacos en modelos *in vitro* de *Neospora*, demostrado una inhibición de la viabilidad y proliferación del parásito (Ojo *et al.*, 2014). Este mismo autor describió una disminución considerable de la carga parasitaria en el cerebro de ratones infectados y tratados con un compuesto BKI. Desafortunadamente no existen a día de hoy otros experimentos en modelos animales que permitan corroborar estos resultados, por lo que serían necesarios más estudios en un futuro.

1.9.3. Vacunación

La inmunoprofilaxis se considera actualmente como la opción económicamente más viable para el control de la enfermedad en explotaciones con una elevada prevalencia (Reichel & Ellis, 2006; Reichel *et al.*, 2013). Durante varios años una vacuna muerta comercial frente a la neosporosis bovina basada en un lisado de taquizoítos (Bovilis NeoguardTM) estuvo disponible en algunos países (Barling *et al.*, 2003). Dicha vacuna mostró una protección moderada en pruebas de campo, con una reducción del aborto cercana al 50% (Romero *et al.*, 2004). Sin embargo, ensayos recientes han revelado grandes diferencias en la eficacia a nivel de granja, mostrando cierto grado de protección frente a la transmisión horizontal, pero no vertical, llegándose incluso a sugerir que la propia vacunación incrementaba el riesgo de muerte fetal temprana en las vacas inmunizadas (Weston *et al.*, 2011). Actualmente, esta vacuna se encuentra retirada del mercado y, por tanto, el esfuerzo de numerosos grupos investigadores se centra hoy en día en la búsqueda de nuevas dianas vacunales que permitan desarrollar vacunas eficaces y seguras frente a la neosporosis bovina.

Los resultados más prometedores se han obtenido con el empleo de vacunas vivas, debido a su capacidad de estimular una respuesta inmunitaria celular similar a la generada tras una infección natural (Innes & Vermeulen, 2006). De hecho, se ha descrito un elevado porcentaje de protección frente a la transmisión vertical tanto en ratones (Miller *et al.*, 2005;

Ellis *et al.*, 2008; Marugán-Hernández *et al.*, 2011; Rojo-Montejo *et al.*, 2012) como en bovinos (Williams *et al.*, 2007; Rojo-Montejo *et al.*, 2013; Hecker *et al.*, 2013; Weber *et al.*, 2013). Las vacunas vivas que se han probado incluyen, entre otros, el empleo de cepas atenuadas *in vitro* por irradiación (Ramamoorthy *et al.*, 2006) o pases sucesivos en cultivo celular (Bartley *et al.*, 2006; 2008), cepas modificadas genéticamente (Marugán-Hernández *et al.*, 2011) o aislados vivos de baja virulencia. Entre estos últimos destacan aquellos a partir de animales asintomáticos con infección congénita, como los aislados Nc-Nowra (Miller *et al.*, 2002) y Nc-Spain1H (Rojo-Montejo *et al.*, 2009b). Sin embargo, y pese a los buenos resultados en términos de eficacia asociados a su empleo (Rojo-Montejo *et al.*, 2013), aún no existen vacunas vivas comerciales debido a la dificultad de su producción a gran escala y a la falta de viabilidad a medio-largo plazo (Reichel *et al.*, 2015). Además, en este tipo de vacunas, especialmente aquellas que emplean parásitos atenuados, existe el riesgo de una posible reversión de virulencia, creando por ello un problema de seguridad en los animales inmunizados.

Por tanto, el empleo de otro tipo de vacunas como las inactivadas se presenta como alternativa a las vacunas vivas en términos de seguridad, coste y estabilidad del producto final. Para este tipo de vacunas se han empleado taquizoítos muertos o extractos antigénicos más o menos complejos de los taquizoítos de *N. caninum*. No obstante, la mayoría de estos estudios han arrojado resultados negativos o ambiguos en cuanto a protección frente a la neosporosis (Liddell *et al.*, 1999a; Cho *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2009; Innes *et al.*, 2011; Mansilla *et al.*, 2013). Este hecho puede ser debido a la menor estimulación de una respuesta inmunitaria protectora en el animal, puesto que no existe una multiplicación intracelular del parásito. Esta deficiencia se compensa generalmente con la administración de dosis sucesivas de recuerdo y la elección de adyuvantes adecuados (Babiuk, 2002).

Por último, el estudio de vacunas de nueva generación se presenta como otra alternativa a largo plazo. Dentro de éstas se incluyen las vacunas ADN (Liddell *et al.*, 2003; Cannas *et al.*, 2003a; Jenkins *et al.*, 2004a) o de proteínas expresadas en vectores (Nishikawa *et al.*, 2000; 2001b; Ramamoorthy *et al.*, 2007b), aunque la mayoría de estudios se focalizan en el desarrollo de vacunas de subunidades. Dentro de estas últimas, las proteínas involucradas en el ciclo lítico del taquizoíto, así como aquellas expresadas de forma específica durante el estadio de bradizoíto, se postulan como potenciales candidatos vacunales, ya que podrían ser capaces de bloquear procesos específicos en la biología del parásito al desencadenar una respuesta inmunitaria dirigida frente a dianas concretas (Monney & Hemphill, 2014). Además, estas vacunas podrían incorporar marcadores específicos que permitieran diferenciar entre animales vacunados y animales infectados (Hemphill *et al.*, 2013). Desafortunadamente, las vacunas recombinantes han mostrado una eficacia muy baja en comparación con las vacunas vivas, tanto en modelos murinos como bovinos (Monney & Hemphill, 2014). Algunos ejemplos significativos de estos tipos de vacunas incluyen la proteína de superficie NcSRS2 (Cannas *et al.*, 2003a; Vemulapalli *et al.*, 2007; Tuo *et al.*, 2011), las proteínas MIC (Cannas *et al.*, 2003b; Alaeddine *et al.*, 2005; Srinivasan *et al.*, 2007; Monney *et al.*, 2011), la proteína NcPDI (Debache & Hemphill, 2013) o las proteínas NcROP2 y NcROP40 (Debache *et al.*, 2008; 2009; 2010; Pastor-Fernández *et al.*, 2015).

2. MODELOS EXPERIMENTALES

Según el Consejo Nacional de Investigación de EE. UU. (NRC, “National Research Council”), los modelos experimentales son un componente crítico en la investigación biomédica destinados a la mejora de la salud e incluyen animales, células y cultivos de todo tipo, así como simulaciones computacionales y matemáticas. Estos modelos aportan un importante sustituto para las investigaciones experimentales que no se pueden llevar a cabo en la especie de destino y que ofrecen características especiales o ventajas que de otra forma no se podrían obtener. De esta forma, muchos estudios han tenido un valor incalculable para el esclarecimiento de aspectos importantes de muchas enfermedades, procesos y desarrollo de hipótesis en las especies de destino (NRC, 1998).

Por otra parte, el mundo científico está cada vez más concienciado con el bienestar y la ética en experimentación animal. En este sentido, las normas en las que se basan los principios éticos en la investigación con animales se establecen a partir del principio de *Las tres erres* (3 Rs). Este principio fue formulado a comienzos de la década de los 60 por dos biólogos ingleses, Russel y Burch, en su libro “*The Principle of Humane Experimental Technique*” (Russell & Burch, 1959). Las 3 Rs hacen referencia a *Reemplazar*, *Reducir* y *Refinar*. Las alternativas de reemplazo aluden a métodos que eviten o sustituyan el uso de animales. Los procedimientos *in vivo* deben ser reemplazados siempre que sea posible por métodos alternativos que no usen animales, como modelos matemáticos o sistemas biológicos *in vitro*. Por su parte, la reducción es referida a cualquier estrategia que tenga como resultado el uso de un menor número de animales que permitan obtener resultados científicamente válidos, o la maximización de la información obtenida por animal, para así limitar o evitar el uso posterior de otros animales. El perfeccionamiento del diseño de los experimentos y la selección del modelo más adecuado contribuyen al cumplimiento de este principio. Por último, las alternativas de refinamiento incluyen todos los procedimientos para minimizar o eliminar el dolor, así como todos los métodos de enriquecimiento para asegurar el bienestar animal.

En el caso de la neosporosis bovina, los modelos experimentales son esenciales para profundizar en el conocimiento de la enfermedad. En este sentido, se han desarrollado varios ensayos *in vitro* para estudiar los procesos esenciales en el ciclo lítico del parásito, mientras que los modelos *in vivo* representan la mejor alternativa para llevar a cabo ensayos vacunales o terapéuticos, así como para estudiar la patogenia, la respuesta inmunitaria y las consecuencias de la infección.

2.1. Modelos *in vitro*

En la actualidad, y como se ha comentado anteriormente, la investigación se encuadra dentro de estrictas políticas de bienestar animal fomentadas por la Unión Europea que pretenden disminuir al máximo el empleo de animales de laboratorio (principio de reducción de las 3 Rs). En este sentido, el empleo de modelos *in vitro* representa una excelente alternativa para el estudio de organismos intracelulares como es el caso de los

parásitos apicomplejos como *Neospora*. En efecto, los modelos *in vitro* han permitido estudiar principalmente la infección de los taquizoítos en la célula hospedadora, emulando la forma de propagación del parásito durante la fase aguda de la infección. Esto permite su aplicación en el estudio del ciclo lítico, de la capacidad infectiva del parásito en diversos tipos celulares, del proceso de conversión de taquizoíto a bradizoíto o la evaluación de fármacos y nuevas dianas vacunales, entre otros (Müller & Hemphill, 2013).

2.1.1. Ciclo lítico

Dado que *N. caninum* es un parásito intracelular obligado, es imprescindible que se produzca la invasión de la célula hospedadora, con el objeto de utilizar la maquinaria metabólica de ésta para su desarrollo, multiplicación y diseminación. A pesar de que el ciclo lítico ha sido estudiado *in vitro* en *N. caninum*, los estudios de este proceso a nivel molecular han sido mucho más investigados en *T. gondii* (Dowse & Soldati, 2004; Carruthers & Boothroyd, 2007; Lim *et al.*, 2012). Sin embargo, se asume que pueden ser similares entre ambos, debido a la existencia de proteínas conservadas y con un alto grado de homología (Hemphill *et al.*, 2006). Se ha descrito en numerosos estudios la capacidad de *Neospora* de invadir activamente una gran variedad de tipos celulares, mostrando una rápida multiplicación en los mismos (Hemphill *et al.*, 2004; 2006; Pérez-Zaballos *et al.*, 2005; Müller & Hemphill, 2013). En las primeras investigaciones, los taquizoítos de *N. caninum* se cultivaron en monocitos y células endoteliales de bovino (Lindsay & Dubey, 1989a). Más tarde, comenzaron a utilizarse líneas celulares estables, principalmente células renales bovinas, fibroblastos humanos (HFF) o células derivadas del riñón del mono verde africano (Vero, MARC-145), siendo éstas últimas las más empleadas (Hemphill *et al.*, 1999; Risco-Castillo *et al.*, 2004; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2011).

Independientemente del tipo celular, durante el ciclo lítico se van a producir eventos claramente diferenciados: la adhesión e invasión de la célula hospedadora, la maduración de la vacuola parasitófora y la multiplicación del parásito y, por último, la egresión de los taquizoítos de la vacuola provocando la lisis de la célula hospedadora (Figura 6). La liberación de los taquizoítos dará lugar a la invasión de nuevas células con la consiguiente propagación de la infección (Smith, 1995; Black & Boothroyd, 2000). El proceso de invasión se encuentra estrictamente regulado mediante la secreción seriada de las proteínas de los micronemas (MIC), cuello de roptrias (RON), cuerpo de roptrias (ROP) y gránulos densos (GRA). Éstas interactúan directamente con la célula hospedadora y modulan múltiples funciones de la misma en favor de la multiplicación intracelular del parásito.

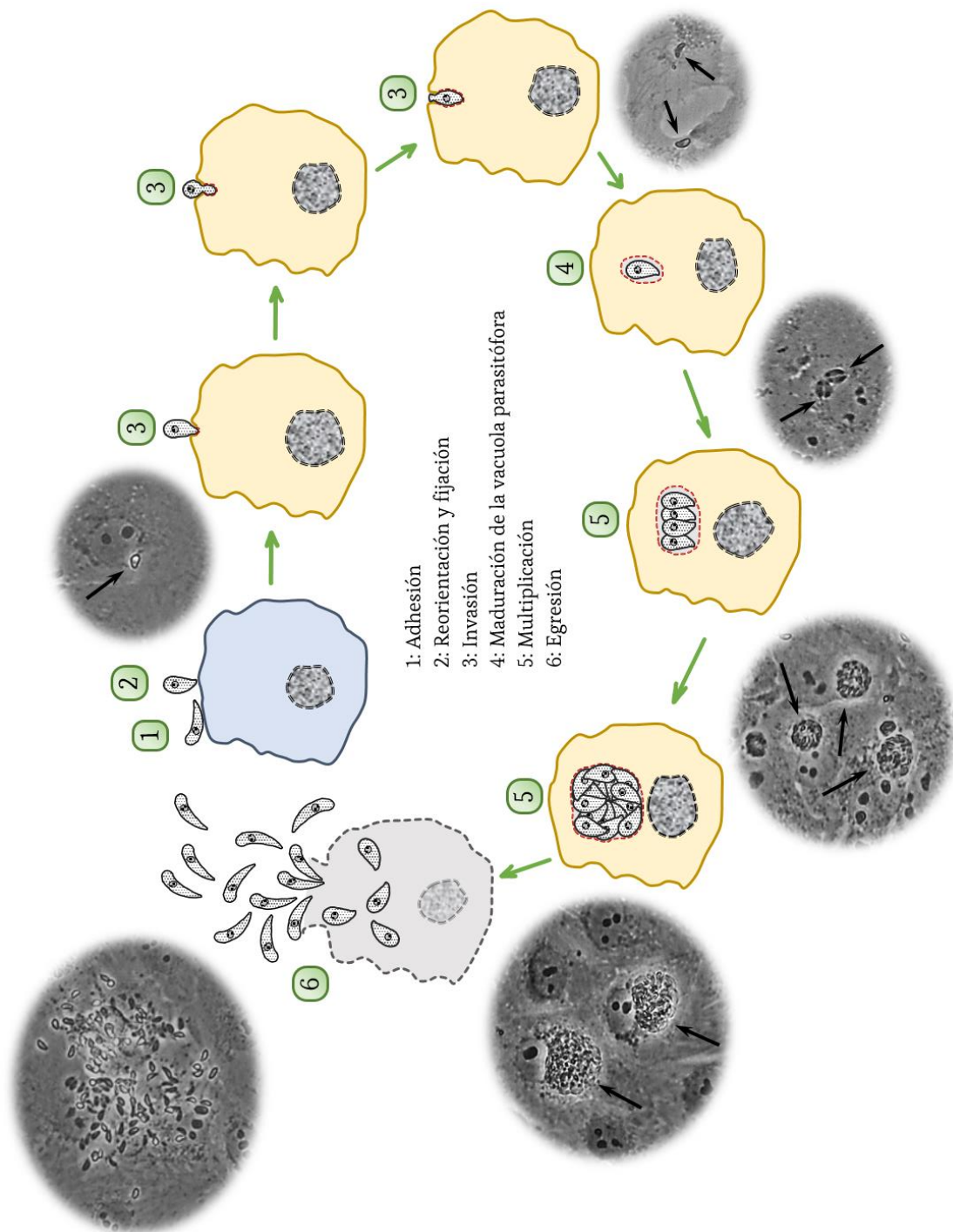
- **Adhesión, reorientación y fijación:** La adhesión a la célula hospedadora se inicia con un acercamiento del parásito hacia la misma a través de movimientos de flexión-extensión mediados por el motor actina-miosina del citoesqueleto del parásito, también denominado como “gliding motility” (Jewett & Sibley, 2003). Tras este acercamiento, tiene lugar la adhesión, un proceso mediado por proteínas de superficie del parásito (SAG y SRS, principalmente) (Naguleswaran *et al.*, 2005). Una vez adheridos a la célula hospedadora, los

taquizoítos se posicionan perpendicularmente a ésta (reorientación) y establecen un anclaje más fuerte mediante la secreción de proteínas MIC.

• **Invasión y maduración de la vacuola parasitófora:** Después de la adhesión y reorientación, comienza la invasión de la célula hospedadora. Se trata de un sofisticado mecanismo de secreción de proteínas por parte de las organelas del complejo apical del parásito, interviniendo de forma secuencial las proteínas MIC, ROP y GRA. En este sentido, el conoide aporta un soporte físico para la secreción de dichas proteínas, ya que es capaz de extruirse. Durante el proceso de invasión, los taquizoítos forman una estructura anular, denominada unión móvil (“moving junction”), entre las membranas plasmáticas de la célula hospedadora y del parásito. La invasión es un proceso activo en el que, una vez establecida la unión móvil, el taquizoíto se internaliza progresivamente hacia el citoplasma de la célula hospedadora, movido por el glideosoma (Boucher & Bosch, 2015). Al ir penetrando en la célula, el parásito va produciendo una invaginación de su membrana plasmática, arrastrada por los complejos transmembrana y la unión móvil. De esta forma, el taquizoíto va siendo progresivamente englobado en una vacuola formada a partir de la membrana de la célula hospedadora, constituyendo lo que se denomina como vacuola parasitófora. De forma paralela a la invasión se inicia la secreción de ciertas proteínas ROP y GRA en el interior de la vacuola parasitófora en formación, así como en la propia célula hospedadora (Carruthers & Boothroyd, 2007). Ambas participan en la formación y maduración de la membrana de dicha vacuola y en el establecimiento de una red túbulo-vesicular en el interior de la misma, permitiendo así una intercomunicación entre el parásito y la célula (Hemphill *et al.*, 2013). La célula hospedadora también sufre una serie de modificaciones ultraestructurales tras la invasión, como son la redistribución de filamentos intermedios y de microtúbulos del citoesqueleto, así como una reorganización de las mitocondrias y retículo endoplasmático, posibilitando así la transferencia de nutrientes del citosol al parásito.

• **Multiplificación y egresión:** Una vez dentro de la vacuola, el taquizoíto se multiplica asexualmente mediante endodiogenia, dando lugar a decenas de taquizoítos en pocos días. Una misma célula puede contener varias vacuolas parasitóforas, albergando cada una de ellas hasta 100 taquizoítos. Posteriormente, el taquizoíto es liberado de la vacuola parasitófora, produciendo la lisis de la célula hospedadora. Los mecanismos implicados en este proceso, denominado egresión, son aún desconocidos. Sin embargo, en *T. gondii* se ha observado que el desencadenamiento es debido principalmente a incrementos en los niveles de calcio intracelular (Arrizabalaga & Boothroyd, 2004; Millholland *et al.*, 2013). Los taquizoítos liberados deben invadir en un breve periodo de tiempo nuevas células para continuar con el ciclo lítico. Cabe destacar que el mantenimiento extracelular *in vitro* de los taquizoítos durante más de 4 h resulta en una rápida pérdida de infectividad, contrariamente a lo que sucede para *T. gondii*, pudiendo en este caso permanecer infectivos hasta 72 h (Hemphill *et al.*, 1996). Además, los taquizoítos pueden mantenerse indefinidamente en cultivo celular mediante pases continuados sin pérdida aparente de infectividad, aunque, se ha demostrado que cuando los taquizoítos se cultivan durante un prolongado número de pases su patogenicidad se ve disminuida en el modelo murino (Long *et al.*, 1998; Bartley *et al.*, 2006).

Figura 6 - Representación gráfica del ciclo lítico de *N. caninum* y seguimiento del mismo en cultivo celular.



2.1.2. Utilidades del modelo *in vitro*

El cultivo *in vitro* del parásito ha permitido la realización de numerosos experimentos de gran utilidad para el conocimiento de las características ultraestructurales del parásito y de los mecanismos de adhesión e invasión celular (Hemphill *et al.*, 1996; 2004). Dicho conocimiento ha permitido la aplicación práctica del modelo para su empleo en numerosos ensayos y valoraciones. Entre otros, se han estudiado las bases moleculares del ciclo lítico y de la relación parásito hospedador, profundizando en el conocimiento de los mecanismos del parásito que modulan la respuesta de la célula hospedadora (Hemphill *et al.*, 2006), así como en los mecanismos de patogenicidad y de inmunidad frente al parásito (Innes *et al.*, 1995; Yamane *et al.*, 2000; Jesus *et al.*, 2013). Además, gracias al cultivo *in vitro* se ha podido realizar la caracterización de los distintos aislados de *N. caninum* obtenidos de animales infectados (Schock *et al.*, 2001; Rojo-Montejo *et al.*, 2009b; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2011; Collantes-Fernández *et al.*, 2012; Dellarupe *et al.*, 2014a). Aunque no representan una alternativa sólida frente al uso de modelos animales, los modelos *in vitro* aportan una aproximación inicial, optimizando el empleo de animales de laboratorio.

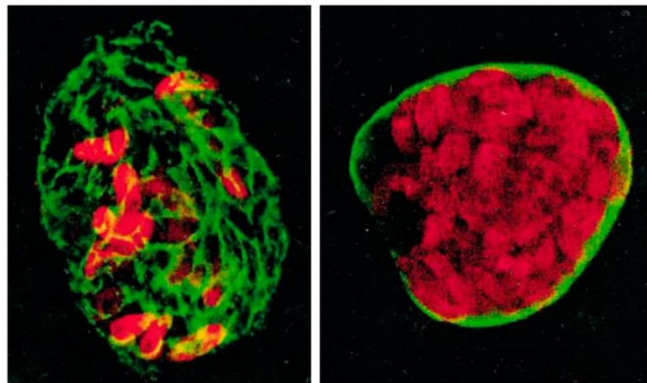
• **Caracterización de aislados:** Como ya se comentó en el apartado 1.1.4. (variabilidad intraespecífica), estos estudios han mostrado ser muy útiles para establecer ciertas características de comportamiento de cada aislado, permitiendo evaluar su virulencia, complementándose con la información obtenida de los modelos animales. Entre los parámetros evaluados destacan aquellos relativos a la capacidad de invasión y proliferación del parásito. Diversos estudios han puesto de manifiesto las diferencias con respecto a estos parámetros al realizar análisis comparativos entre diferentes aislados. Así, por ejemplo, se ha descrito que el aislado Nc-Liverpool tiene una tasa de multiplicación más rápida que el aislado Nc-1, mientras que para el aislado Nc-SweB1 esta tasa es mucho menor. Otros aislados presentaron tasas de multiplicación intermedias, como el Nc-LivB1, BPA-1 y JPA-2 (Schock *et al.*, 2001). Además, recientemente se han realizado estudios comparativos empleando aislados españoles de origen bovino (Nc-Spain 1H, 2H, 3H, 4H, 5H, 6, 7, 8, 9 y 10) y otros aislados de origen canino (Nc-Ger2, Ger3, Ger6, Nc-6Arg y Nc-Bahia), usando el aislado Nc-Liverpool como referencia para ambos estudios (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2011; Dellarupe *et al.*, 2014a). En general, se observaron diferencias en las tasas de invasión y multiplicación, mostrando una alta virulencia (mayor invasión y menor tiempo de multiplicación) los aislados Nc-Spain4H, 5H, 6, 7, 10, Nc-Ger3, Nc-Bahia y Nc-Liverpool. Por su parte, los aislados Nc-Spain 1H, 2H, 3H, 8, Nc-Ger2 y Ger6 mostraron una menor virulencia (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2011; Dellarupe *et al.*, 2014a).

Asimismo, también se han llevado a cabo estudios de transmigración y movilidad de los taquizoítos, con el objetivo de analizar las bases de los mecanismos de diseminación del parásito para cruzar barreras biológicas. En un estudio reciente llevado a cabo en líneas celulares de trofoblasto (BeWo) y en células dendríticas, se han observado diferencias en la frecuencia de transmigración entre diferentes aislados. Así, por ejemplo, las tasas más elevadas se detectaron en los taquizoítos libres de los aislados Nc-Liverpool, Nc-Spain6 y 9, y en los taquizoítos de los aislados Nc-Spain4H y Nc-Spain7 en el interior de las células dendríticas (Collantes-Fernández *et al.*, 2012).

• **Conversión taquizoíta-bradizoíta:** El desarrollo de métodos para la conversión *in vitro* de taquizoíta a bradizoíta aporta una excelente herramienta para estudiar la composición antigénica y proteica, el efecto de potenciales fármacos y la biología de ambas formas del parásito (Vonlaufen *et al.*, 2004; Risco-Castillo *et al.*, 2007; 2011; Marugán-Hernández *et al.*, 2010; Alkurashi *et al.*, 2011). En general, la conversión a bradizoíta parece ser un proceso muy conservado, puesto que *T. gondii* se comporta de forma similar. En *N. caninum* este proceso es rápido y asincrónico (Risco-Castillo *et al.*, 2004) y se acompaña de importantes cambios en el perfil de expresión proteico. El desarrollo de esta forma de latencia se ha asociado a diversas respuestas ante el estrés, de tal forma que se han probado diferentes métodos para inducir esta conversión *in vitro*. Entre ellas, la más eficaz ha mostrado ser la adición al medio de un donante exógeno de óxido nítrico (NO), como el nitroprusiato sódico (SNP), que es un inductor de la apoptosis (Vonlaufen *et al.*, 2002; 2004; Risco-Castillo *et al.*, 2004) (Figura 7).

Figura 7 – Imagen de quistes con bradizoítos de *N. caninum* en diferente grado de maduración.

Cultivo de células MARC-145 infectado con el aislado Nc-Liverpool tras 7 días de tratamiento con SNP. La expresión de la proteína específica de bradizoíta (NcBAG1) aparece en rojo y la proteína CC2 específica de pared de quiste aparece en verde (técnica de IFI) (Risco-Castillo *et al.*, 2004).



• **Evaluación de fármacos y dianas vacunales:** Los modelos *in vitro* están adquiriendo gran importancia en los últimos años por su utilidad para el cribado inicial de fármacos desarrollados frente a *N. caninum* (Mazuz *et al.*, 2012; Debache & Hemphill, 2012a; Barna *et al.*, 2013; Seo *et al.*, 2013; Ojo *et al.*, 2014; Müller *et al.*, 2015), así como para la evaluación de nuevas dianas vacunales (Staska *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2005; Alaeddine *et al.*, 2013; Lv *et al.*, 2015). Estos modelos permiten observar las consecuencias de la exposición del parásito a diferentes compuestos, de forma que se pueden determinar las alteraciones sufridas por el parásito y analizar las posibles modificaciones durante el ciclo lítico, como la inhibición o ralentización de la invasión, multiplicación o egresión. En conjunto, los datos aportados por este modelo permiten realizar una valoración inicial de la eficacia de los compuestos, de forma que los que presenten mejores resultados puedan ser probados en etapas posteriores en modelos animales.

• **Obtención de antígenos:** El cultivo *in vitro* también se ha empleado para obtener taquizoítos que se utilizan como fuente de antígeno en el desarrollo de pruebas diagnósticas y formulaciones vacunales (Wouda *et al.*, 1998a; Álvarez-García *et al.*, 2003; Aguado-Martínez *et al.*, 2008; Jiménez-Ruiz *et al.*, 2013c). Dentro de estas últimas destaca la producción de taquizoítos para la extracción de diferentes extractos antigénicos y la posterior expresión de determinadas proteínas en vectores para su purificación y caracterización (Monney & Hemphill, 2014).

2.2. Modelos animales de neosporosis

Los modelos animales son útiles cuando, por las peculiaridades de la especie de destino o del proceso a estudiar, no se tiene acceso, no es práctico o ético su uso, es inviable económicamente o no es posible adquirir y mantener un número adecuado de individuos de dicha especie. Un modelo animal, por tanto, es un organismo vivo en el cual se puede estudiar un fenómeno de interés y que se asemeja al producido en la especie de destino (Wall & Shani, 2008). La elección del modelo animal debería basarse en su adecuación como análogo a la especie de destino, la transferibilidad de información obtenida, uniformidad, conocimiento de las propiedades biológicas, generalización de los resultados y facilidad de manipulación, y consecuencias éticas. Obviamente, cuanto más cercano sea el modelo a la especie de destino, más precisión ofrecerá. No obstante, estos criterios con sentido desde el punto de vista teórico no siempre pueden ser considerados en la práctica, debido a las restricciones puntuales de cada modelo.

En el caso de la neosporosis, el desarrollo de modelos animales ha sido fundamental, permitiendo avanzar enormemente en su conocimiento. En efecto, poco después del descubrimiento de *Neospora*, comienzan a desarrollarse los primeros modelos experimentales de la enfermedad mediante inoculaciones del parásito en ratones y ratas (Lindsay & Dubey, 1989b; 1990a) y en ovejas (Dubey & Lindsay, 1990). Posteriormente, se profundizó en el conocimiento de la patogenia del parásito mediante el estudio de infecciones experimentales en el ratón y en el ganado bovino y ovino (Barr *et al.*, 1994b; Lindsay *et al.*, 1995a; McAllister *et al.*, 1996).

Obviamente, el modelo ideal para el estudio de la neosporosis sería el modelo bovino, ya que se trata de la principal especie de destino, tanto desde el punto de vista veterinario como económico. Sin embargo, debido a las restricciones económicas y logísticas, sólo unos pocos centros disponen de la capacidad y recursos necesarios para llevar a cabo dichos experimentos. Por tanto, los animales de laboratorio, principalmente el ratón, se han convertido en una alternativa muy empleada por diversos investigadores (Cole *et al.*, 1995; Lindsay *et al.*, 1995a; Long & Baszler, 1996; Collantes-Fernández *et al.*, 2006b; López-Pérez *et al.*, 2008). Además del ratón, otros animales de laboratorio han mostrado ser susceptibles a la infección experimental con *N. caninum*, como los gerbos (Dubey & Lindsay, 2000; Gondim *et al.*, 2001; Ramamoorthy *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2009), gallinas y palomas (Furuta *et al.*, 2007; Mineo *et al.*, 2009b) o ratas, aunque estas últimas presentan cierta resistencia natural y necesitan un tratamiento inmunosupresor para que se produzca la infección (Lindsay &

Dubey, 1990a). Los conejos se han empleado principalmente para la obtención de anticuerpos frente al parásito, aunque estos animales permanecen clínicamente sanos incluso con dosis de infección elevadas (Lindsay & Dubey, 1989c). Por último, aunque no muy numerosos, se han llevado a cabo infecciones experimentales en perros tratando de elucidar aspectos sobre el ciclo enteroepitelial (McAllister *et al.*, 1998; Lindsay *et al.*, 1999a; Cedillo *et al.*, 2008; Bandini *et al.*, 2011; Cavalcante *et al.*, 2012; Munhoz *et al.*, 2013). Por otra parte, el empleo de otros rumiantes como modelo alternativo aporta la ventaja de ser filogenéticamente más próximos al ganado bovino. Dentro de estos, se han empleado búfalos (Konrad *et al.*, 2012), cabras (Lindsay *et al.*, 1995b; Yin *et al.*, 2012) y ovejas, siendo este último modelo el más utilizado (detallado en el apartado 2.2.3.).

2.2.1. Ventajas e inconvenientes

Los modelos murino, bovino y ovino han sido los más empleados en las infecciones experimentales con *N. caninum*. No obstante, la elección de un determinado modelo animal va a depender fundamentalmente del objetivo que se persiga, presentando cada uno de ellos ventajas e inconvenientes intrínsecos principalmente relacionados con las características fisiológicas de la especie animal. Independientemente de la susceptibilidad natural de cada especie, y puesto que la principal repercusión de la neosporosis es el aborto, las diferencias fisiológicas relativas a la duración de la gestación y, sobre todo, el tipo de placentación cobran especial relevancia, ya que pueden jugar un papel crítico en la patogenia de la enfermedad.

De forma esquemática, la placenta se compone de la parte materna o mucosa uterina, más o menos modificada, y la parte fetal, provista de vellosidades. Los componentes fetales de la barrera placentaria (trofoblasto, tejido conectivo y endotelio fetal) se conocen con el nombre de corion. De acuerdo a la clasificación morfológica de Strahl (Carter & Mess, 2010), la placenta en los rumiantes es múltiple o cotiledonaria, en la cual se forman vellosidades agrupadas en pequeñas zonas del corion, constituyendo lo que se denominan cotiledones, de ahí su nombre. Éstos se corresponden con elevaciones de la mucosa uterina denominadas carúnculas. La unión de un cotiledón (parte fetal) con su carúncula (parte materna) conforman el placentoma. La morfología de estos placentomas es ligeramente diferente en los rumiantes (Figura 8). Mientras que en las vacas posee una forma convexa, en la oveja es cóncava y en la cabra se asemeja a una meseta plana. En el caso de los roedores (al igual que en primates y humanos), la placenta es discoidal, agrupándose las vellosidades en un área circular u ovalada. Por otra parte, siguiendo la clasificación histológica de Grosser basada en el grado de destrucción de los componentes maternos y fetales de la placenta (Grosser, 1927), podemos observar diferentes tipos en estos animales. Así, en los bóvidos la placenta es de tipo epiteliocorial, ya que no se observa destrucción de los tejidos maternos, al contactar el epitelio de la mucosa del útero con el corion. De hecho, el término *semiplacenta o indecidua* puede aplicarse para este tipo de placenta, ya que la mucosa uterina se conserva casi intacta durante el parto y por tanto no hay pérdida tisular (las vellosidades coriales están unidas a la mucosa por simple contacto y se desprenden en el parto por tracción). En las ovejas y cabras, aunque la placenta es muy similar a la de la vaca, presenta algunas diferencias. En este caso, se han observado algunas áreas en las cuales existe una relación sindesmocorial, es decir, se

produce una destrucción parcial del epitelio uterino al contactar con el trofoblasto, pudiendo decirse que constituye una *semiplacenta intermedia*. No obstante, estas áreas tienen escaso aporte vascular, por lo que desde el punto de vista funcional su importancia es menor. Por su parte, en los ratones la placenta es hemocorial, existiendo una extensa invasión fetal en los tejidos maternos, donde el epitelio del corion se baña directamente en la sangre materna (Figura 8), produciéndose de este modo una destrucción del endotelio vascular materno (Bainbridge, 2000).

Todos estos parámetros, sumados a las restricciones económicas, logísticas y de tiempo que deben ser tenidas en cuenta en el diseño de este tipo de experimentos, hacen que cada modelo presente sus ventajas e inconvenientes (Tabla 1), siendo cada uno más o menos apropiado para un determinado fin.

Figura 8 - Morfología y estructura de la placenta de los rumiantes y roedores.



Tabla 1 - Principales características de los modelos animales más frecuentemente utilizados en la experimentación animal con *N. caninum*.

	Ratón (<i>Mus musculus</i>)	Vaca (<i>Bos taurus</i>)	Oveja (<i>Ovis aries</i>)
Susceptibilidad natural a la neosporosis	Baja	Alta	Alta
Peso aproximado hembra adulta	0,02 kg	600 kg	60 kg
Duración media gestación	21 días	280 días	148 días
Tamaño camada	5-10	1	1-2
Placentación	Discoidal Hemocorial	Cotiledonaria Epiteliocorial	Cotiledonaria Epiteliocorial*
Manejo	Sencillo	Difícil	Complejidad moderada
Tamaño de la población experimental	Alto	Bajo	Moderado
Coste	Bajo	Alto	Moderado

*Parcialmente sindesmocorial.

• **Modelo murino.** Las principales ventajas del uso del ratón como modelo experimental son su pequeño tamaño, fácil manejo, bajo coste, la disponibilidad de numerosos reactivos inmunológicos y el acceso a especímenes genéticamente modificados. Todos estos parámetros, junto con el corto periodo de gestación y la elevada descendencia, facilitan enormemente la obtención de resultados valiosos en un corto periodo de tiempo. Por tanto, además de ser muy útiles para estudiar aspectos relacionados con la patogenia del parásito, van a suponer el modelo de elección para el cribado inicial de fármacos y candidatos vacunales. Sin embargo, además de que el ratón presenta una baja susceptibilidad al desarrollo de la neosporosis, la principal desventaja de este modelo son las evidentes diferencias fisiológicas que presenta con el hospedador de mayor interés, el ganado vacuno (Tabla 1). En este sentido, la respuesta inmunitaria y los diferentes parámetros en la gestación (sobre todo la duración de la gestación y la conformación de la placenta), hacen que los resultados obtenidos sean difícilmente extrapolables de forma directa a la especie de destino.

• **Modelo bovino.** Evidentemente, la mayor ventaja del empleo del modelo bovino es que los resultados obtenidos con estos animales son directamente aplicables y transferibles al conocimiento y control de la enfermedad. A pesar de ello, las exigencias que impone la experimentación con estos animales (elevado coste, prolongado tiempo de los experimentos, laborioso manejo de los animales, requerimiento de instalaciones adecuadas, etc.), hace inviable su utilización en pruebas iniciales como, por ejemplo, la elección de candidatos para desarrollar una vacuna o evaluar un tratamiento. Además, se dificulta en gran medida el análisis de diferentes condiciones dentro de un mismo experimento debido al restringido tamaño de la población experimental. Por tanto, el uso de este modelo está indicado principalmente para las últimas pruebas de evaluación y registro de diversos fármacos y vacunas, así como para el estudio de aspectos relacionados con la patogenia del parásito (Benavides *et al.*, 2014).

• **Modelo ovino.** Además de ser un hospedador natural del parásito, este modelo presenta ciertas ventajas sobre el modelo bovino, como son un tiempo de gestación inferior y una mayor facilidad de manejo. Además, permite el empleo de un mayor número de animales. Asimismo, la oveja presenta un tipo de placenta muy similar al ganado bovino (Tabla 1). Por todo ello, el modelo ovino se presenta como una buena alternativa al uso del costoso modelo bovino y al modelo murino. No obstante, a pesar de la estrecha relación filogenética, existen evidencias de que las infecciones en el ganado bovino y ovino no son exactamente iguales (Benavides *et al.*, 2014). Sin embargo, los resultados obtenidos en el modelo ovino son más extrapolables al resultado de la infección en el ganado bovino que en el caso del modelo murino. Por tanto, la aplicación de este modelo resultaría de especial utilidad para la evaluación de la eficacia de nuevas vacunas y fármacos.

A continuación se detallan los modelos animales de neosporosis más empleados en la actualidad: el modelo murino, bovino y ovino.

2.2.2. Modelo murino

En el caso de *Neospora*, aunque existen algunas evidencias de que los roedores pueden infectarse de forma natural, al haberse detectado el parásito por PCR en algunas especies de ratones y ratas (Huang *et al.*, 2004; Ferroglia *et al.*, 2007; Jenkins *et al.*, 2007; Medina-Esparza *et al.*, 2013), su papel como hospedadores en el ciclo biológico se desconoce. En cualquier caso, el ratón es el modelo animal más usado en la actualidad, habiéndose convertido en una herramienta muy valiosa para el estudio de la neosporosis (véase epígrafe 2.2.2.4). Existe una gran heterogeneidad de modelos murinos descritos en la literatura, habiéndose utilizado un gran número de estirpes diferentes (Monney & Hemphill, 2014). Entre ellas destacan, por su frecuencia de uso, los ratones BALB/c, C57BL6, Swiss Webster, Quakenbush (Qs) o CBA/Ca. Hasta el momento, los modelos más utilizados son el no gestante o de infección cerebral (Collantes-Fernández *et al.*, 2006b; Pereira García-Melo *et al.*, 2010) y el gestante o de infección congénita (López-Pérez *et al.*, 2006; 2008).

2.2.2.1. Modelo murino no gestante

La infección experimental en el modelo murino no gestante generalmente se lleva a cabo en hembras, por su mayor facilidad de manejo y a partir de las 6 semanas de vida, cuando ya han alcanzado la madurez sexual. Este modelo presenta su mayor utilidad en la fase crónica de la infección, de ahí su denominación como modelo de infección cerebral. En este sentido, y atendiendo a la distribución intraorgánica del parásito, desarrollo de respuesta inmunitaria y presencia y gravedad de signos clínicos, el curso de la infección por *N. caninum* puede ser dividido en dos fases:

- **Fase aguda:** durante la primera semana post-infección (pi), el parásito se disemina por vía linfohematógena multiplicándose en diferentes órganos (hígado, bazo, ganglios linfáticos y pulmón), sin una localización preferente. En esta fase de la infección, los ratones pueden empezar a mostrar signos inespecíficos como inactividad, anorexia, apatía, erizamiento de pelo o disnea en los casos más graves (Eperon *et al.*, 1999; Rettigner *et al.*, 2004b; Collantes-Fernández *et al.*, 2006b). Generalmente, salvo en ratones inmunodeficientes, no se observa mortalidad en esta fase de la infección.

- **Fase crónica (modelo cerebral):** En la segunda semana pi, se observa una disminución progresiva en el número de taquizoítos en el pulmón y empiezan a detectarse en mayor cantidad en el cerebro (Collantes-Fernández *et al.*, 2006b; Pereira García-Melo *et al.*, 2010). Los ratones pueden permanecer asintomáticos o desarrollar signos nerviosos como debilidad y parálisis del tercio posterior, encorvamiento, ladeo de la cabeza, ataxia, torneo o marcha en círculos (Eperon *et al.*, 1999; Rettigner *et al.*, 2004b; Collantes-Fernández *et al.*, 2006b). Estos signos clínicos empeoran progresivamente hasta la muerte del animal (Lindsay & Dubey, 1989b; Reichel & Ellis, 2009). La mayoría de las muertes ocurren en esta fase y están asociadas con la encefalitis, siendo característica una meningoencefalitis no supurativa multifocal de distribución variable (Lindsay & Dubey, 1990b; Lindsay *et al.*, 1995a; Long *et al.*, 1998; Eperon *et al.*, 1999; Collantes-Fernández *et al.*, 2004). Los parámetros evaluados en este modelo incluyen:

· Morbilidad y mortalidad: La presencia de los signos clínicos descritos anteriormente, principalmente nerviosos, va a ser un indicativo del establecimiento de la infección en el SNC y su gravedad. Además, también pueden presentarse signos inespecíficos como erizamiento de pelo, letargia o una marcada disminución del peso corporal. En este sentido, se puede realizar una gradación de los signos clínicos en función de su gravedad, aplicando una puntuación a cada animal (Pastor-Fernández *et al.*, 2015).

· Detección y carga parasitaria en el SNC: La determinación de la presencia y carga parasitaria en el cerebro mediante las técnicas de PCR permite obtener una estimación de la gravedad de la infección, ya que se encuentra estrechamente relacionada con la presencia e intensidad de los signos clínicos (Collantes-Fernández *et al.*, 2006b).

· Respuesta inmunitaria: El análisis de la respuesta humoral (IgG1 e IgG2a) y de citoquinas (principalmente IFN- γ e IL-4) ha sido ampliamente estudiado en los modelos murinos mediante el empleo de técnicas serológicas como el ELISA (Quinn *et al.*, 2002; Rettigner *et al.*, 2004b; Miller *et al.*, 2005; Hemphill *et al.*, 2006; Monney & Hemphill, 2014). Por su parte, otras técnicas han sido empleadas para analizar la respuesta inmunitaria celular asociada a la infección. Entre ellas destacan los ensayos de linfoproliferación o la cuantificación de la expresión de citoquinas mediante qPCR (Long *et al.*, 1998; Nishikawa *et al.*, 2002; Quinn *et al.*, 2004; Jiménez-Ruiz *et al.*, 2013a).

2.2.2.2. Modelo murino gestante

El modelo murino gestante ha resultado de gran utilidad en el estudio de la neosporosis congénita, cobrando especial importancia en la evaluación de la seguridad y eficacia de fármacos y vacunas. En efecto, el empleo del modelo murino gestante como prueba de concepto antes de su estudio en la especie de destino se presenta como una alternativa más adecuada que el modelo no gestante, puesto que el objetivo final de estos compuestos es evitar la transmisión del parásito a la descendencia (Aguado-Martínez *et al.*, 2009; Marugán-Hernández *et al.*, 2011; Rojo-Montejo *et al.*, 2011; Monney *et al.*, 2012; Debache & Hemphill, 2013). Además, a pesar de las diferencias fisiológicas existentes entre ambas especies, muchos de los resultados obtenidos en este modelo han mostrado un alto grado de similitud con aquellos obtenidos en el modelo bovino.

Al igual que en los rumiantes, en el modelo murino gestante es fundamental lograr una sincronización del celo de las hembras y un correcto diagnóstico de gestación. La sincronización del celo en los ratones se lleva a cabo mediante la utilización del denominado *efecto Whitten* (Whitten, 1957), basado en la capacidad de las feromonas androgénicas de los ratones machos de interferir el ciclo estral de las hembras. De esta forma, se ha observado que la presencia de un macho o el tratamiento de la cama en grupos de hembras con orina de machos produce el inicio de un nuevo ciclo estral y una sincronización de sus ciclos. Por su parte, para el diagnóstico de gestación, aunque otros métodos menos exactos incluyen la presencia del tapón vaginal (difícil de detectar) o la apreciación visual (muy subjetiva), se suele emplear el incremento de peso con respecto a los animales no gestantes a partir de la segunda semana tras el cruzamiento.

Hasta la fecha, la mayoría de modelos de neosporosis congénita en el ratón emulan la vía de transmisión transplacentaria exógena, produciéndose por tanto la primoinfección durante la gestación (Liddell *et al.*, 1999b; Quinn *et al.*, 2002; López-Pérez *et al.*, 2006; 2008). Por su parte, los intentos de reproducir la transmisión transplacentaria endógena no han resultado satisfactorios (Jiménez-Ruiz *et al.*, 2013b; 2013a).

2.2.2.2.1. Modelo gestante de primoinfección

En este modelo, también denominado de transmisión congénita, la infección se lleva a cabo en hembras gestantes durante la gestación. Sin embargo, al igual que en el modelo bovino, el día de gestación en el que tiene lugar la infección es un factor importante que determina tanto la mortalidad fetal como la transmisión vertical (López-Pérez *et al.*, 2006; 2008; 2010). Los parámetros evaluados en el modelo de primoinfección se llevan a cabo tanto en las madres como en las crías tras el parto:

- **Parámetros evaluados en las madres:** Los mismos parámetros descritos en el modelo de infección crónica o cerebral pueden aplicarse en el caso de las madres. No obstante, cabe destacar que en las hembras gestantes, tanto la gravedad de los signos clínicos como la carga parasitaria en el cerebro suelen ser mayores. Esto es debido al desequilibrio inmunológico que se produce en el animal durante la gestación, lo que provoca una mayor susceptibilidad a la infección (Aguado-Martínez *et al.*, 2009; Pastor-Fernández *et al.*, 2015). Además, respecto a la respuesta inmunitaria, en el modelo gestante también se pueden realizar análisis durante la gestación para evaluar la respuesta de citoquinas a nivel de placenta (López-Pérez *et al.*, 2010). Por último, el porcentaje de gestación obtenido en el modelo murino siguiendo el procedimiento descrito anteriormente es variable, pudiendo oscilar en condiciones normales entre 30 y el 50%. Sin embargo, una disminución de este porcentaje puede ser indicativa de que se ha producido pérdida fetal.

- **Parámetros evaluados en las crías:**

- **Muerte fetal:** En el ratón, el número de reabsorciones y la disminución del tamaño de camada se consideran como signos de pérdida fetal, siendo la forma más adecuada de medir este parámetro (Long & Baszler, 1996; Quinn *et al.*, 2002). Para evaluar las reabsorciones se puede medir el tamaño de los tejidos fetales en el útero, considerándose reabsorción si son inferiores a 3 mm, mientras que el tamaño de camada tras el parto es indicativo de la muerte fetal producida durante la gestación en periodos tempranos (Long & Baszler, 1996). El número de nacidos muertos está relacionado con la muerte fetal en periodos más tardíos, cuando no se produce la reabsorción debido al tamaño del feto en el momento de su muerte (López-Pérez *et al.*, 2008). Por otra parte, la muerte fetal en el modelo murino gestante es dependiente del periodo de gestación en el que ocurre la infección (López-Pérez *et al.*, 2006; 2008). Si la infección tiene lugar antes de la gestación no se observan pérdidas fetales (Long & Baszler, 1996; Omata *et al.*, 2004). Cuando la infección se realiza en el día 0 de gestación, no se observa un incremento en la tasa de mortalidad fetal ni neonatal (López-Pérez *et al.*, 2006). En ratones BALB/c, la infección en el día 5 de gestación produjo una tasa de reabsorciones casi tres veces más elevada que en las hembras no infectadas (Long & Baszler, 1996), mientras

que en ratones no consanguíneos de la estirpe Quakenbush (Qs) no se observaron diferencias con los animales control (Quinn *et al.*, 2002). Cuando la infección tiene lugar entre los días 5 y 8 de gestación, se ha observado un aumento en el número de reabsorciones en los animales infectados (Long & Baszler, 1996; Quinn *et al.*, 2002; López-Pérez *et al.*, 2010). Por otro lado, no se observan pérdidas fetales cuando la infección tiene lugar al final de la gestación (Long & Baszler, 1996; López-Pérez *et al.*, 2006).

· Morbilidad y mortalidad postnatal: En las especies múltiparas es habitual que las crías más débiles de la camada no sobrevivan más allá de dos días tras el parto. Por ello, la tasa de mortalidad neonatal en este periodo (denominada como mortalidad neonatal temprana) se considera de forma independiente a la mortalidad postnatal. La morbilidad y mortalidad postnatal se estudia generalmente desde el día 2 hasta el 30 pp. Durante este periodo, el parásito prosigue su multiplicación en los tejidos de las crías, de modo que aumenta la carga parasitaria paulatinamente y, con ello, los signos clínicos (López-Pérez *et al.*, 2008). De este modo, las crías supervivientes pueden presentar signos clínicos a partir de la primera semana de vida, como retraso del crecimiento, inactividad y signos nerviosos. Además de la observación directa de los signos clínicos, se puede evaluar el retraso en el crecimiento mediante la determinación de los pesos de las crías, preferiblemente a partir de la segunda semana pp, ya que la manipulación excesiva de las crías en etapas tempranas podría conllevar el rechazo por parte de la madre (López-Pérez *et al.*, 2008). Por otra parte, cabe destacar que se detecta una mayor frecuencia de morbilidad y mortalidad en las crías cuando la infección se produce durante el segundo tercio de gestación (López-Pérez *et al.*, 2008). Además, las tasas de mortalidad postnatal van a variar en función del aislado empleado, pudiendo llegar a ser incluso del 100% con los aislados más virulentos (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2010; Dellarupe *et al.*, 2014b). Por último, el periodo de monitorización de las crías se extiende hasta el día 50-60 pp en los casos en los que se pretenda valorar la respuesta inmunitaria humoral (López-Pérez *et al.*, 2008; Dellarupe *et al.*, 2014b).

· Transmisión vertical: La transmisión del parásito a la descendencia es otro parámetro indicativo de la infección, pudiendo evaluarse mediante técnicas que permiten la detección o cuantificación del parásito en los tejidos de las crías (principalmente en cerebro), como PCR o qPCR. La tasa de transmisión del parásito a la progenie también va a variar en función del día de gestación en el que tiene lugar la infección. Cuando la infección se produce en el día 0 de gestación, se observa transmisión en el 100% de las camadas (López-Pérez *et al.*, 2006), de forma similar a lo que ocurre cuando la infección tiene lugar entre los días 5 y 12 de gestación, donde el 100% de las madres transmitieron la infección a la progenie en el día 7 pp (Quinn *et al.*, 2002; Omata *et al.*, 2004; López-Pérez *et al.*, 2006). Por otro lado, cuando la infección experimental se realiza al final de la gestación, la presencia del parásito se detecta en un menor número de crías (Liddell *et al.*, 1999b; López-Pérez *et al.*, 2006), no observándose en algunos casos transmisión en las madres infectadas en los días 14-19 de gestación (Cole *et al.*, 1995; Omata *et al.*, 2004; López-Pérez *et al.*, 2006).

2.2.2.2.2. Modelo de recrudescencia

El modo de transmisión que acontece con más frecuencia en el ganado bovino es la transmisión transplacentaria endógena. Por tanto, el empleo de modelos que emulen dicha transmisión permitiría valorar de forma más apropiada la seguridad y eficacia de las formulaciones vacunales. Desafortunadamente, hasta la fecha no se han desarrollado modelos experimentales de *Neospora* en los que ocurra una transmisión transplacentaria endógena.

En el modelo experimental murino, algunos autores han descrito una disminución en el número de animales que transmiten la infección a la progenie en gestaciones sucesivas y, además, una disminución del número de crías infectadas dentro de una misma camada (Cole *et al.*, 1995; Rettigner *et al.*, 2004a). En un estudio reciente, los ratones fueron infectados 90 días antes de la gestación y, posteriormente, las crías supervivientes de la descendencia fueron cubiertas de nuevo para evaluar la transmisión a una segunda generación. Aunque se mostró cierto grado de reactivación en las hembras crónicamente infectadas, las tasas de transmisión vertical a la descendencia fueron muy bajas, llegando incluso a desaparecer en la segunda generación (Jiménez-Ruiz *et al.*, 2013b). En un estudio posterior, se partió de un número elevado de ratones congénitamente infectados. Sin embargo, tras la cubrición de estos animales se observó una alta tasa de recrudescencia en animales no gestantes, mientras que el número de animales gestantes que transmitieron el parásito a la descendencia fue muy bajo. Este hecho fue probablemente debido a que sólo las hembras sin signos clínicos y con bajas cargas del parásito quedan gestantes, lo que explicaría el posterior fallo en la inducción de la transmisión transplacentaria endógena en este modelo (Jiménez-Ruiz *et al.*, 2013a). Estos resultados contrastan con las altas tasas descritas en el ganado bovino naturalmente infectado (Dubey & Schares, 2011), por lo que este modelo no parece adecuado para inducir la transmisión transplacentaria endógena (Jiménez-Ruiz *et al.*, 2013a; 2013b).

2.2.2.3. Factores que influyen en el resultado de la infección

Las consecuencias de la neosporosis en el modelo murino son muy variables. Los ratones pueden desarrollar una infección subclínica o de curso mortal dependiendo de la estirpe de ratón, del aislado, dosis y vía de inoculación del parásito empleadas, y del tratamiento con agentes inmunodepresores en su caso. Además, en el modelo gestante, el periodo de gestación en el cual se produce la infección ejerce una influencia crucial en la transmisión a la descendencia y la afectación de las crías (véase epígrafe 2.2.2.2.1). La tabla 2 muestra un resumen de modelos murinos gestantes con las condiciones empleadas en cada experimento.

Tabla 2 - Modelos murinos gestantes de infección experimental por *N. caninum*.

Estirpe de ratón	Aislado, vía y dosis	Infección	Sacrificio	Parámetros evaluados (en madres y crías)	Referencias
	Nc-1; SC; 2x10 ⁶	-10, 5 y 10-12 dg	11-19 dg	Reabsorciones y fetos viables en útero. Lesiones en cerebro y pulmón de madres, placenta y fetos por IHQ	Long & Baszler, 1996
	Nc-1; SC; 10 ⁵	10, 15 y 8-13 dg	2-23 dpp	Fertilidad y tamaño de camada. Mortalidad en crías. Transmisión vertical mediante PCR	Liddell <i>et al.</i> , 1999b
	Nc-1; SC; 2x10 ⁶	0, 7 y 14 dg	14 dg y 1-7 dpp	Morbilidad y mortalidad en madres y crías. Fertilidad y tamaño de camada, reabsorción de fetos. Presencia de parásito en madres (cerebro, pulmón, sangre y leche) y transmisión vertical en crías (cerebro y pulmón), así como carga parasitaria en crías, mediante PCR	López-Pérez <i>et al.</i> , 2006
	Nc-7; IP; 2x10 ⁶	-28 a -100 y 7-19 dg	0-1 dpp	Gestación a 28-80 dpp. Tamaño de camada, transmisión vertical a crías y respuesta inmunitaria humoral y celular en madres	Omata <i>et al.</i> , 2004
	Nc-1; SC; 2x10 ⁶	0, 7, 14 dg	30 o 60 dpp	Reabsorciones y fetos viables. Morbilidad y mortalidad en crías. Lesiones en fetos (cerebro, corazón, hígado y pulmón) mediante histología. Transmisión vertical en crías (cerebro y pulmón) mediante PCR	López-Pérez <i>et al.</i> , 2008
BALB/c	Nc-Spaim1H y Nc-1; SC; 2x10 ⁶	7-11 dg	30 dpp	Fertilidad y tamaño de camada. Morbilidad, mortalidad y presencia del parásito en madres y crías (cerebro y pulmón). Respuesta inmunitaria humoral en madres	Rojo-Montejo <i>et al.</i> , 2009b
	Nc-1; SC; 2x10 ⁶	7 dg	10-14 dg	Reabsorciones y mortalidad fetal. Detección del parásito en placenta mediante PCR; Expresión de citoquinas mediante qPCR (IFN- γ , IL-4, IL-10, TNF- α). Lesiones en placenta.	López-Pérez <i>et al.</i> , 2010
	Nc-Spain2H, 3H, 4H, 5H, 6, 7, 8, 9 y 10; SC; 2x10 ⁶	7-11 dg	30 dpp	Fertilidad y tamaño de camada. Morbilidad, mortalidad y presencia del parásito (cerebro y pulmón) en madres y crías. Respuesta inmunitaria en madres.	Regidor-Cerrillo <i>et al.</i> , 2010
	Nc-1SAG4 ⁺ ; SC; 2x10 ⁶	7-11 dg	50 dpp	Morbilidad, mortalidad, respuesta inmunitaria humoral y presencia del parásito (cerebro y pulmón) en madres y crías.	Marugán-Hernández <i>et al.</i> , 2011
	Nc-Spain7; SC; 2x10 ⁶	6-10 dg	30 dpp	Tamaño de camada. Morbilidad y mortalidad en madres y crías. Presencia del parásito en crías (cerebro) mediante qPCR.	Collantes-Fernández <i>et al.</i> , 2012
	Nc-Liv, Nc-Bahia, Nc-Ger2, 3 y 6, Nc-6A ^{Arg} ; SC; 2x10 ⁶	7-11 dg	30 dpp	Fertilidad y tamaño de camada. Morbilidad, mortalidad y presencia del parásito (cerebro y pulmón) en madres y crías. Respuesta inmunitaria en madres.	Dellarupe <i>et al.</i> , 2014b
C57BL/6	Nc-1; IP; 2x10 ⁶	-14 dg y 12-14 dg	18-20 dg	Reabsorción de fetos. Presencia del parásito en fetos mediante PCR.	Ramamoorthy <i>et al.</i> , 2007a
CBA/Ca	Nc-1; SC; 5x10 ⁵	4-6 meses antes de la gestación o 8-10 dg	8 dg a 1 dpp	Estudio de infección durante la gestación o gestación de hembras crónicamente infectadas. Gestaciones sucesivas en el caso de infecciones crónicas. Morbilidad y mortalidad en madres. Respuesta inmune humoral y celular en madres [inmoproliferación y qPCR (IFN- γ , IL-10, IL-4)]. Detección de DNA del parásito por PCR	Rettigner <i>et al.</i> , 2004
Swiss Webster	Nc-1; SC; 4,3-9,6x10 ⁶	5-18 dg	16 dg a 7 dpp	Gestaciones sucesivas. Morbilidad en madres. Reabsorciones en placenta. Transmisión transplacentaria y galactófora en crías	Cole <i>et al.</i> , 1995
Quakenbush (Qs)	Nc-Liv y Nc-SweB1; SC o IP; 10 ⁴ , 10 ⁶ y 10 ⁷	8 dg	14 dg o 7 dpp	Morbilidad y mortalidad de madres. Tamaño de camada, y mortalidad en las crías. Lesiones en cerebro mediante histología. Detección del parásito mediante PCR	Quinn <i>et al.</i> , 2002
Quakenbush (Qs)	Nc-Nowra; SC; 10 ⁴ y 10 ⁶	6 dg	7 dpp	Reabsorción de fetos. Transmisión vertical mediante PCR.	Miller <i>et al.</i> , 2002

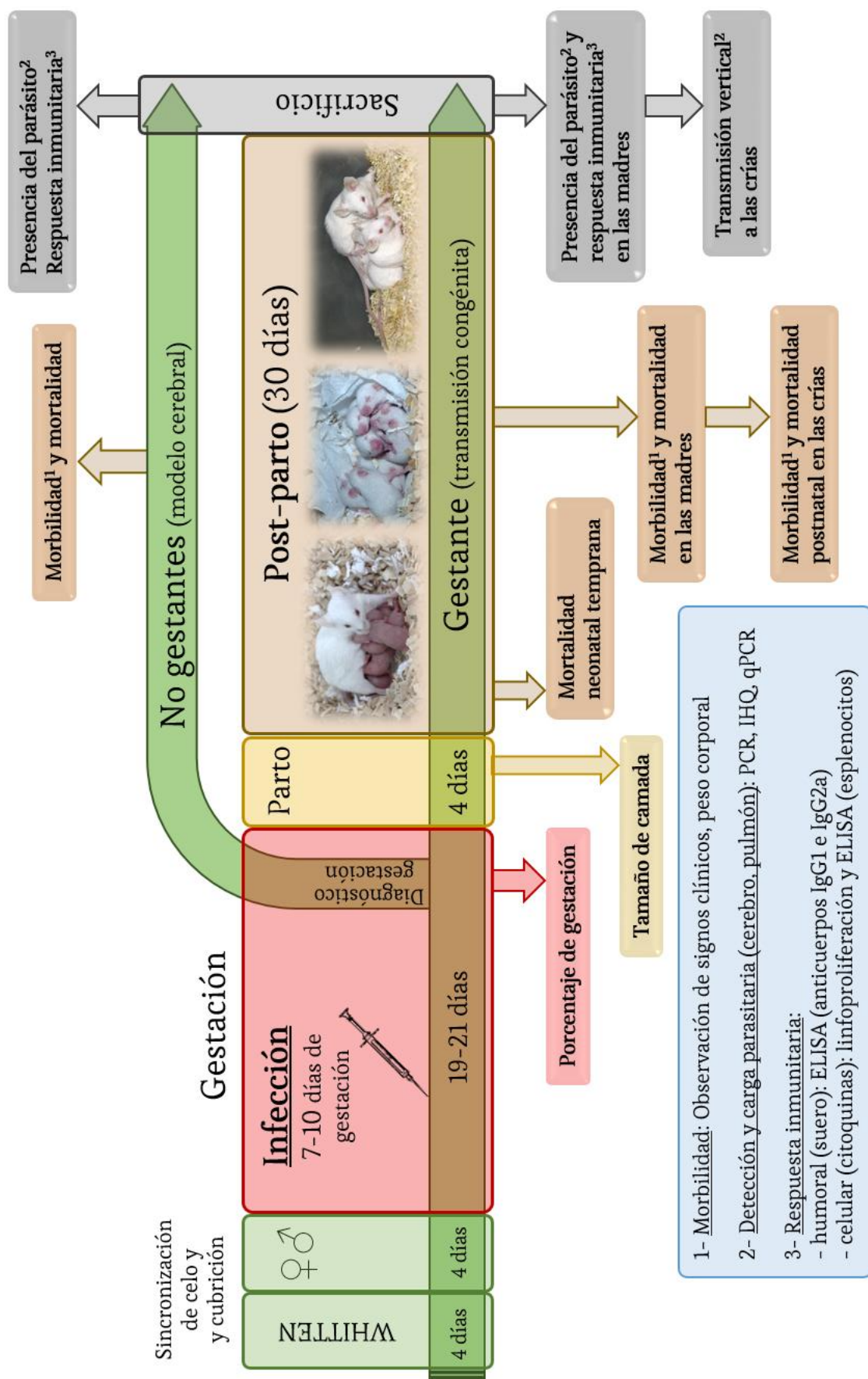
(SC) subcutáneo; (IP) intraperitoneal. (dg) días de gestación, (dpp) días postparto.

• **Estirpe:** En general, los ratones no consanguíneos (*outbred*) como los pertenecientes a las estirpes Swiss Webster (Lindsay & Dubey, 1989b), ICR (Lindsay *et al.*, 1995a) y Quackenbush (Qs) (Miller *et al.*, 2002) son poco susceptibles a la infección y no desarrollan signos clínicos. Sin embargo, la administración de fármacos inmunodepresores permite revertir la resistencia natural de estas estirpes y reproducir la enfermedad (Lindsay & Dubey, 1989b; Lindsay *et al.*, 1999c; Collantes-Fernández *et al.*, 2004). Por su parte, los ratones consanguíneos (*inbred*) como los de la estirpe BALB/c, presentan una mayor susceptibilidad a la infección, y pueden desarrollar signos clínicos dependiendo de la dosis y del aislado empleado (Nishikawa *et al.*, 2003; Rojo-Montejo *et al.*, 2009b; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2010; Jiménez-Ruiz *et al.*, 2013b; Dellarupe *et al.*, 2014b). No obstante, otras estirpes consanguíneas como C57BL/6, C57BL/10 ScCr, A/J y B10.D2 son relativamente resistentes a la infección (Khan *et al.*, 1997; Long *et al.*, 1998; Botelho *et al.*, 2007; Ramamoorthy *et al.*, 2007a).

• **Factores dependientes del parásito:** Las tasas de mortalidad, morbilidad y transmisión vertical debidas a la inoculación de *N. caninum* varían en función de la dosis (Quinn *et al.*, 2002) y el aislado utilizados (véase epígrafe 2.2.2.4). Además, existe una asociación evidente entre dosis elevadas y un incremento en el número y gravedad de lesiones, carga parasitaria, presencia de signos clínicos, mortalidad y, en el caso de modelos gestantes, transmisión a la descendencia o pérdidas fetales (Long *et al.*, 1998; Collantes-Fernández *et al.*, 2004; López-Pérez *et al.*, 2008). Por último, las infecciones experimentales llevadas a cabo en el modelo murino se han realizado casi exclusivamente mediante la inoculación de taquizoítos por vía intraperitoneal (IP) o subcutánea (SC). Aunque ambas vías han mostrado ser efectivas en producir la infección en los ratones, en la actualidad no hay un consenso claro sobre qué vía es la más adecuada. No obstante, en el caso de los modelos gestantes la vía SC es la más recomendable, puesto que con la vía IP se corre el riesgo de inocular el parásito en el útero. Hasta la fecha no hay estudios que hayan valorado la infección vía oral (VO) con ooquistes en ratón.

Como se ha comentado anteriormente, existe una gran heterogeneidad de modelos y diseños experimentales empleados por diferentes grupos de investigación. En este sentido, el grupo SALUVET ha realizado un gran esfuerzo para estandarizar un modelo murino gestante de primoinfección en el que se evalúan parámetros como la mortalidad fetal, la transmisión vertical y la morbilidad/mortalidad en los animales congénitamente infectados (López-Pérez *et al.*, 2006; 2010). En este modelo se utilizan ratones BALB/c infectados entre los días 7 y 10 de gestación por vía SC con una dosis de 2×10^6 taquizoítos. Numerosos estudios han empleado este modelo, principalmente como prueba de concepto para evaluar diferentes candidatos vacunales (Liddell *et al.*, 1999a; Nishikawa *et al.*, 2001b; Aguado-Martínez *et al.*, 2009; Debache *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010; Marugán-Hernández *et al.*, 2011; Monney *et al.*, 2012; Pastor-Fernández *et al.*, 2015). El diseño de dicho modelo se encuentra resumido en la Figura 9.

Figura 9 - Diseño experimental del modelo murino gestante desarrollado por el grupo SALUVET.



2.2.2.4. Utilidades

El empleo del ratón para la investigación de *N. caninum* ha mostrado ser de gran utilidad. Numerosos estudios han sido llevados a cabo con el objetivo de revelar aspectos relacionados con la patogenia de la enfermedad y de la respuesta inmunitaria del hospedador, así como para la evaluación de candidatos vacunales y farmacológicos. Entre las muchas utilidades del modelo murino destacan las siguientes:

- **Estudio de la respuesta inmunitaria:** Los ratones defectivos en algún componente del sistema inmunitario presentan una mayor susceptibilidad a la infección que su correspondiente cepa silvestre, por lo que se han utilizado mayoritariamente para el estudio de diferentes componentes de la respuesta inmunitaria frente a la infección. Así, por ejemplo, los ratones defectivos en linfocitos B mostraron ser más susceptibles durante la fase crónica (Eperon *et al.*, 1999), mientras que los defectivos en células B y T y parcialmente en células NK mueren durante la fase aguda (Dreier *et al.*, 1999). Del mismo modo, otros ratones defectivos para la IL-10 no mostraron una susceptibilidad mayor a la infección (Ritter *et al.*, 2002), mientras que los ratones defectivos en iNOS2 mostraron resultados dispares (Tanaka *et al.*, 2000b; Ritter *et al.*, 2002). Otros ejemplos de ratones defectivos incluyen el defecto en el TNFR2 y en el receptor beta 2 microglobulina ($\beta 2M$) (Tanaka *et al.*, 2000b; Ritter *et al.*, 2002). Por otra parte, algunos estudios realizan análisis en ratones tratados con anticuerpos frente a diferentes tipos celulares del sistema inmune. Así, por ejemplo, se han estudiado la infección en animales tratados con anticuerpos frente a linfocitos T CD4+ y CD8+. Estos estudios revelaron que los ratones tratados con un anticuerpo anti-CD4+ sufrían una elevada morbilidad y mortalidad después de la infección (Tanaka *et al.*, 2000a; Nishikawa *et al.*, 2001a), mientras que después del tratamiento con un anticuerpo anti-CD8+, la mortalidad fue mucho menor (Tanaka *et al.*, 2000a).

- **Obtención y caracterización de aislados:** Como ya se ha comentado en el epígrafe 1.2.4, el empleo de ratones inmunodeficientes ha resultado de gran utilidad para el aislamiento del parásito a partir de muestras biológicas procedentes de animales infectados. De este modo, por ejemplo, el uso de ratones defectivos en IFN- γ y atímicos (“nude mice”) se han utilizado para la obtención, de los aislados Nc-Nowra (Miller *et al.*, 2002) y Nc-9 (Dubey *et al.*, 2007b), así como los aislados españoles Nc-Spain1H, 2H, 3H, 4H, 5H, 6, 7, 8, 9 y 10 (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2008; Rojo-Montejo *et al.*, 2009b), entre otros. Asimismo, el modelo murino ha sido ampliamente utilizado para la caracterización patogénica de diferentes aislados. En estos estudios generalmente se emplea el modelo gestante, ya que permite evaluar la capacidad del parásito de transmitirse a la progenie (Tabla 3). Diversos autores han puesto de manifiesto que algunos aislados son más virulentos, como el Nc-Liverpool (Quinn *et al.*, 2002; Rojo-Montejo *et al.*, 2009b; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2010; Dellarupe *et al.*, 2014b), Nc-Spain4H, 5H, 7 (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2010) y Nc-Bahia (Dellarupe *et al.*, 2014b), mientras que otros han mostrado menor virulencia, como el Nc-SweB (Quinn *et al.*, 2002), Nc-Spain 1H, 2H, 8 y 9 (Rojo-Montejo *et al.*, 2009b; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2010) y Nc-Ger2, 3 y 6 (Dellarupe *et al.*, 2014b). Además, la virulencia de estos aislados en el modelo murino presenta una elevada correlación con las tasas de infección y proliferación en cultivo *in vitro* (epígrafe 2.1.2).

• **Evaluación de fármacos y vacunas:** Una de las aplicaciones más importantes del modelo murino es la evaluación inicial de candidatos vacunales y farmacológicos (Cannas *et al.*, 2003a; 2003b; Ramamoorthy *et al.*, 2006; Aguado-Martínez *et al.*, 2009; Marugán-Hernández *et al.*, 2011; Debache & Hemphill, 2012a; 2012b; Rojo-Montejo *et al.*, 2012; Pastor-Fernández *et al.*, 2015). En estos estudios se evalúa la capacidad de las distintas formulaciones para proteger frente a la infección. Para evaluar su eficacia, se analiza la inmunogenicidad de las vacunas, así como la presencia de signos clínicos y la detección y carga del parásito en el cerebro en los animales tratados. Además, el modelo gestante permite también evaluar la capacidad de estos compuestos para evitar la transmisión transplacentaria y mortalidad postnatal en las crías. La utilidad del modelo murino en este caso radica en su uso como prueba de concepto como cribado inicial, de forma que aquellos candidatos que muestren los resultados más prometedores puedan probarse en modelos de rumiantes, más cercanos a la especie de destino.

2.2.3. Modelo bovino

El modelo bovino, como especie de destino más importante desde el punto de vista veterinario y económico en la neosporosis, constituyen el modelo de elección para estudiar las consecuencias de la infección por el parásito (Benavides *et al.*, 2014). Este modelo presenta una gran utilidad para el estudio de aspectos importantes de la enfermedad, como la patogenia, la interacción parásito-hospedador o la respuesta inmunitaria, tanto a nivel local como sistémico. Además, el modelo bovino resulta fundamental para la evaluación final de posibles candidatos vacunales y farmacológicos, así como nuevas metodologías diagnósticas. En cualquier caso, se han desarrollado diferentes modelos en el ganado bovino, tanto gestantes como no gestantes (Benavides *et al.*, 2014).

2.2.3.1. Modelo bovino no gestante

La mayoría de estudios llevados a cabo en modelos bovinos no gestantes se han realizado con el objetivo de estudiar el ciclo biológico del parásito o las vías de transmisión postnatal. En este sentido, se demostró el ciclo de transmisión oral (horizontal) entre el perro y el ganado vacuno (Gondim *et al.*, 2002). Por otro lado, aunque se ha demostrado que los taquizoítos presentes en el calostro podrían transmitir la infección, no se ha logrado reproducir la infección en terneros alimentados con leche procedente de animales infectados experimentalmente (Davison *et al.*, 2001). De forma similar, se han realizado algunos estudios tratando de reproducir la infección por vía venérea. Aunque se ha detectado el ADN del parásito en el semen de toros infectados (Ortega-Mora *et al.*, 2003), no se ha logrado demostrar la transmisión venérea (Ferre *et al.*, 2008; Osoro *et al.*, 2009).

2.2.3.2. Modelo bovino gestante

A pesar de que la transmisión transplacentaria endógena ha sido considerada como la vía más común para la transmisión y el mantenimiento de la neosporosis dentro del rebaño (Dubey *et al.*, 2007a), aún no ha sido posible su reproducción en modelos bovinos experimentales (McCann *et al.*, 2007; Benavides *et al.*, 2014). Por tanto, la mayoría de modelos gestantes disponibles en la actualidad son modelos de primoinfección, válidos para evaluar la transmisión transplacentaria exógena. En el modelo bovino de primoinfección, uno de los objetivos más importantes es la evaluación de las consecuencias de la infección más relevantes: el aborto y la transmisión transplacentaria. En la tabla 3 se encuentran resumidas las infecciones experimentales realizadas hasta la fecha en el ganado bovino durante la gestación.

2.2.3.2.1. Modelo de mortalidad fetal

La mortalidad fetal asociada a la infección por *N. caninum* se ha inducido de manera altamente eficaz y reproducible inoculando por vía IV un elevado número de taquizoítos (10^7 - 5×10^8) en el día 70 de gestación, siendo los aislados más empleados el Nc-1, Nc-Liverpool y, en los últimos años, Nc-Spain7 (Tabla 3). Para monitorizar de forma fiable la muerte fetal y la transmisión, se han empleado diferentes parámetros, incluyendo la observación clínica, detección de la presencia del parásito, lesiones y el estudio de la respuesta inmunitaria.

• **Observaciones clínicas:** La viabilidad fetal es el parámetro más significativo para determinar el aborto, pudiendo ser evaluado mediante ultrasonografía transrectal durante la gestación. Cuando se produce la muerte fetal, ésta generalmente se observa entre la tercera y la octava semana pi en los casos en los que se produce la inoculación de taquizoítos por vía IV (Tabla 3). Por otra parte, la temperatura corporal también se considera un parámetro asociado a la infección. Generalmente se detecta un incremento de la temperatura a partir del día 3-5 pi, que probablemente se corresponda con los primeros ciclos de replicación del parásito en los tejidos y órganos del animal (Williams *et al.*, 2000; Innes *et al.*, 2001b; Maley *et al.*, 2003; Macaldowie *et al.*, 2004; Caspe *et al.*, 2012; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014). En algunos casos, también se ha descrito un patrón bifásico con un segundo pico de menor intensidad a los 7 días pi (Maley *et al.*, 2003; Macaldowie *et al.*, 2004; Benavides *et al.*, 2012).

• **Diseminación del parásito:** La diseminación del parásito en diferentes órganos del animal inoculado y el feto es otro indicador ampliamente usado para monitorizar la infección. Existen diversas técnicas que permiten determinar esta diseminación, como es la detección de la presencia del parásito, mediante PCR o IHQ, la cuantificación de la carga parasitaria, mediante qPCR, o la presencia de lesiones, mediante técnicas histológicas. En los modelos donde se estudia el aborto, la presencia de lesiones compatibles en los tejidos diana del feto (cerebro, hígado y pulmón) y en la placenta, sumado a la detección y altas cargas del parásito, resultan muy significativos (Barr *et al.*, 1994b; Macaldowie *et al.*, 2004; Maley *et al.*, 2006; Gibney *et al.*, 2008; Rojo-Montejo *et al.*, 2009a; Rojo-Montejo *et al.*, 2013; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014).

Tabla 3 - Infecciones experimentales llevadas a cabo en modelos bovinos gestantes.

Referencia	Aislado	Dosis ¹	Vía ²	Día de gest. ³	Muerte fetal (dpi) ⁴
Dubey <i>et al.</i> , 1992b	Nc-1 + 2 + 3	2,7×10 ⁷	IM + SC	81	NA
				126, 129	1/1 (101), 1/1 (74)
Conrad <i>et al.</i> , 1993b	Nc-BPA1	3×10 ⁶ , 5×10 ⁶	IV, IM	120	0/2 (SS)
		0,5-1×10 ⁶	IM (feto)	118	2/2 (<17, SS)
Barr <i>et al.</i> , 1994b	Nc-BPA1	3×10 ⁶ + 5×10 ⁶	IV + IM	138, 161	0/2 (SS)
				80-95	1/1 (<67, SS)
				115-120	0/1 (SS)
Andrianarivo <i>et al.</i> , 2000	Nc-BPA1	2×10 ⁷ + 2×10 ⁷	IV + IM	91	7/7 (24-32)
Williams <i>et al.</i> , 2000	Nc-Liverpool	10 ⁷	IV	70	5/6 (-21)
				210	0/6
Andrianarivo <i>et al.</i> , 2001	Nc-BPA1	3×10 ⁷ + 5×10 ⁷	IV + IM	159-169	0/5 (SS)
Innes <i>et al.</i> , 2001b	Nc-1	5×10 ⁸	SC	140	0/6
Trees <i>et al.</i> , 2002	Nc-Liverpool	600 ooq	VO	70	0/3
Almería <i>et al.</i> , 2003	Nc-Illinois	10 ⁷	IV	110	0/4
Maley <i>et al.</i> , 2003	Nc-1	10 ⁷ , 5×10 ⁸	SC	140	0/17 (SS)
Williams <i>et al.</i> , 2003	Nc-Liverpool	10 ⁷	IV	70	4/4 (21-35)
			SC		
Macaldowie <i>et al.</i> , 2004	Nc-1	5×10 ⁸	IV	70	≥ 6/8 (28-56, SS)
			SC		≥ 3/8 (28-56, SS)
Gondim <i>et al.</i> , 2004c	Nc-2, Nc-Illinois, Nc-Beef	1,5×10 ³ - 1,15×10 ⁵ ooq	VO	70-176	1/19 (44)*
De Yaniz <i>et al.</i> , 2007	Nc-1	10 ⁸	IV, CO	150	0/19
				70	0/6
McCann <i>et al.</i> , 2007	Nc-Liverpool	4×10 ⁴ ooq	VO	120	1/6 (33)
				210	0/5
				70	0/5
Rosbottom <i>et al.</i> , 2007	Nc-Liverpool	10 ⁷	IV	70, 210	NA
Williams <i>et al.</i> , 2007	Nc-Liverpool	10 ⁷	IV	70	5/6 (21-30)
				70	6/6 (-23)
Gibney <i>et al.</i> , 2008	Nc-Liverpool	10 ⁷	IV	210	0/6 (SS)
				70	3/5 (26-34)
Rojo-Montejo <i>et al.</i> , 2009a	Nc-1	10 ⁷	IV	70	0/5
	Nc-Spain1H				
Almería <i>et al.</i> , 2010	Nc-Illinois	10 ⁷	IV	110	0/9 (SS)
Wiengcharoen <i>et al.</i> , 2011	Nc-K9WA	3×10 ⁸	SC	150	0/3
Benavides <i>et al.</i> , 2012	Nc-1	5×10 ⁸	SC	210	0/11 (SS)
	Nc-Spain7				
Caspé <i>et al.</i> , 2012	Nc-1	10 ⁸	IV	65	7/7 (28-35)
	Nc-1				≥ 2/4 (28-42, SS)
Weber <i>et al.</i> , 2013	Nc-S197	1,2×10 ⁶	IV	64-76	9/12 (NA)
Hecker <i>et al.</i> , 2013	Nc-1	4,7×10 ⁷	IV	70	0/4 (SS)
Bacigalupe <i>et al.</i> , 2013	Nc-6 Argentina	5×10 ⁷	IV	65	0/4 (SS)
				70	4/5 (26-83)
Rojo-Montejo <i>et al.</i> , 2013	Nc-1	10 ⁷ 4×10 ⁸	IV	135	1/4 (47)
				70	4/5 (26-83)
Pereira <i>et al.</i> , 2014	Nc-1	10 ⁶	IV	60	6/11 (<60, SS)
Moore <i>et al.</i> , 2014	Nc-1	2,5×10 ⁸	IV, CO	161	0/4 (SS)
Regidor-Cerrillo <i>et al.</i> , 2014	Nc-Spain7	10 ⁷	IV	70	6/6 (24-49)
	Nc-Spain8				6/6 (30-44)
Chryssafidis <i>et al.</i> , 2014	Nc-Bahia1	5×10 ⁸	IV	70	≥ 1/5 (42, SS)
	Nc-1				2/2 (35)
Cantón <i>et al.</i> , 2014a	Nc-1	5×10 ⁸	SC	70	≥ 6/8 (<42, SS)
				70	≥ 3/8 (28-56, SS)
				140	0/6 (SS)
				210	0/11 (SS)
Mansilla <i>et al.</i> , 2015	Nc-1	10 ⁸	IV	78	0/8

(1) Número de taquizoítos u ooquistes (ooq) inoculados.

(2) (IV) Intravenoso; (IM) intramuscular; (SC) subcutáneo; (VO) oral; (CO) conjuntival.

(3) Días de la gestación en el que se lleva a cabo el desafío (la gestación de la vaca dura aproximadamente 280 días).

(4) Proporción de hembras abortadas. dpi: días post-infección. SS: sacrificio seriado. NA: no aplicable.

*vacas infectadas con 41000 ooquistes del aislado Nc-beef en el día 120 de gestación.

• **Respuesta inmunitaria:** El estudio de la respuesta inmunitaria ha permitido obtener una mejor comprensión de la respuesta desarrollada por el hospedador para combatir la infección durante la gestación. El empleo de técnicas serológicas como el ELISA ha permitido el análisis de la respuesta humoral (Williams *et al.*, 2000; 2007; Bartley *et al.*, 2004; Macaldowie *et al.*, 2004; Rojo-Montejo *et al.*, 2009a; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014), mientras que otras técnicas han sido empleadas para analizar la respuesta celular asociada a la infección. Entre ellas destacan el análisis fenotípico de las poblaciones celulares mediante técnicas inmunohistoquímicas o citometría de flujo, ensayos de linfoproliferación, la medición de citoquinas por ELISA o la cuantificación de la expresión de citoquinas mediante qPCR (Almería *et al.*, 2003; 2011; Bartley *et al.*, 2004; 2012; 2013; Rosbottom *et al.*, 2007; 2008; Gibney *et al.*, 2008; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014).

Por último, cabe destacar que el modelo de mortalidad fetal podría no ser el más adecuado para representar la infección natural, puesto que los abortos asociados a *Neospora* a nivel de campo se han descrito mayoritariamente a mitad de gestación, entre los meses 5 y 7 (Dubey *et al.*, 2007a). Además, la infección IV en el día 70 con las dosis habitualmente empleadas podría resultar excesivamente agresiva para poder llevar a cabo una correcta evaluación de la eficacia de fármacos o vacunas, pudiendo llegar a subestimarse algunos productos potencialmente eficaces (Benavides *et al.*, 2014).

2.2.3.2.2. Modelo de transmisión vertical

Además del modelo de mortalidad fetal, el modelo de transmisión vertical también ha sido ampliamente utilizado. En este modelo, la infección se realiza a partir del segundo tercio de gestación, ya que es en este momento cuando el nacimiento de terneros vivos congénitamente infectados es más probable que se produzca (Williams *et al.*, 2000; Innes *et al.*, 2001b; Almería *et al.*, 2003; de Yaniz *et al.*, 2007; Rosbottom *et al.*, 2007; Wiengcharoen *et al.*, 2011; Rojo-Montejo *et al.*, 2013).

Para monitorizar las características y consecuencias de la infección se pueden emplear los mismos parámetros y técnicas descritas anteriormente para el modelo de muerte fetal. No obstante, en el caso del modelo de transmisión vertical cabe destacar que el parámetro más importante a evaluar es la diseminación del parásito al ternero, y, por tanto, si se ha producido o no la transmisión transplacentaria. En este sentido, generalmente se aplican técnicas para la detección de anticuerpos precalostrales específicos (ELISA, IFI), la presencia del parásito (PCR, IHQ) y lesiones compatibles en diversos tejidos (histología). Dentro de éstas, la serología precalostral presenta una gran validez para demostrar la exposición del feto a la infección, especialmente en los casos en los que se produce fallo en la detección del parásito por PCR en los tejidos de terneros recién nacidos, siendo además habitual que las lesiones sean leves y estén limitadas al SNC. Esto probablemente sea debido al hecho de que el ternero ha sido capaz de controlar parcialmente la infección gracias a un sistema inmune competente desarrollado a lo largo de la parte final de la gestación (Innes *et al.*, 2001b; Gibney *et al.*, 2008; Almería *et al.*, 2010; Rosbottom *et al.*, 2011; Benavides *et al.*, 2012; Bartley *et al.*, 2013; Rojo-Montejo *et al.*, 2013). Además, otros análisis pueden aportar información

adicional. Por ejemplo, en ensayos de vacunas vivas, el genotipado de *N. caninum* por el análisis de microsátélites en los tejidos fetales permite discriminar la infección por el aislado utilizado en la vacuna y aquel empleado en el desafío (Rojo-Montejo *et al.*, 2013).

2.2.3.2.3. Factores que influyen en el resultado de la infección

Al igual que ocurre en el modelo murino, no se ha establecido un modelo bovino estandarizado, ya que existe una gran diversidad de condiciones experimentales empleadas. Estas variables influyen en el resultado de la infección en cada experimento, resultando en un alto nivel de variabilidad entre ellos y haciendo muy difícil su comparación. Entre estos factores destacan el periodo de gestación, que ya ha sido discutido en el epígrafe 1.5.1, la raza y el aislado, estadio, dosis y vía de inoculación del parásito.

- **Raza:** Algunos estudios serológicos llevados a cabo en un alto número de animales naturalmente infectados han sugerido que ciertas razas de ganado vacuno, principalmente de aptitud láctea, son más susceptibles a la infección (López-Gatius *et al.*, 2005; Armengol *et al.*, 2007). De forma similar, también se ha descrito en condiciones naturales que las razas de aptitud cárnica y las razas cruzadas presentan un menor riesgo de aborto comparadas con la raza Holstein (García-Ispuerto *et al.*, 2015). Sin embargo, no hay evidencias experimentales de estos hechos, por lo que las diferencias observadas pueden ser atribuidas a los sistemas de producción utilizados para cada variedad de raza (Bartels *et al.*, 2006).

- **Estadio del parásito, vía y dosis de inoculación:** Por su facilidad de obtención *in vitro*, la mayoría de trabajos realizados han empleado taquizoítos a diferentes dosis para reproducir experimentalmente la enfermedad. No obstante, pese a que son difíciles de obtener, algunos autores han conseguido reproducir la infección mediante la administración oral de ooquistes esporulados (Trees *et al.*, 2002; Gondim *et al.*, 2004c; McCann *et al.*, 2007). Sin embargo, la proporción de abortos descrita en estos trabajos es significativamente menor que en aquellos donde se realizó mediante la inoculación parenteral de taquizoítos. Dentro de este último tipo, la gran mayoría de estudios utilizan las vías SC o IV (Tabla 3). La vía IM fue utilizada en los primeros estudios de infecciones experimentales en el ganado bovino (Dubey *et al.*, 1992b), siendo poco empleada desde entonces y sólo en combinación con otras vías (Conrad *et al.*, 1993b; Barr *et al.*, 1994b; Andrianarivo *et al.*, 2000; 2001). Otras vías como la conjuntival (CO) han sido esporádicamente empleadas (de Yaniz *et al.*, 2007; Moore *et al.*, 2014). Aunque todas ellas han mostrado ser eficaces en producir la infección, la vía IV está asociada a una presentación clínica más grave y reproducible en cuanto al episodio del aborto se refiere en comparación con la vía SC (Macaldowie *et al.*, 2004; Cantón *et al.*, 2014a). Aún así, algunos autores han sugerido que la inoculación SC podría representar una vía de infección más fiel a lo que sucedería en una infección natural que la vía IV, ya que permite que el parásito sea procesado a través de los nódulos linfáticos antes de distribuirse por la circulación sanguínea (Dubey *et al.*, 2006). Por otra parte, al igual que en el modelo murino, el empleo de dosis elevadas del parásito va asociado con consecuencias más graves, aunque este factor se encuentra íntimamente relacionado con la vía de administración, el aislado del parásito y el momento de gestación en el que se produce la infección. La gran mayoría de infecciones

experimentales se han realizado con dosis muy elevadas (Tabla 3), por lo que se desconoce el efecto que tendría una inoculación con dosis más bajas ($<10^6$ taquizoítos).

• **Aislado del parásito:** La diversidad biológica de *N. caninum* también ha sido descrita en el modelo bovino, donde se han demostrado diferencias entre aislados de distinta virulencia previamente caracterizados en el modelo murino. Sin embargo, hasta la fecha existen pocos estudios que hayan evaluado las diferencias entre aislados en el modelo gestante (Rojo-Montejo *et al.*, 2009a; Caspe *et al.*, 2012; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014). En estos trabajos, se compararon los aislados Nc-1 vs Nc-Spain1H (Rojo-Montejo *et al.*, 2009a) y Nc-1 vs Nc-Spain7 (Caspe *et al.*, 2012), mostrando marcadas diferencias de virulencia. Asimismo, los aislados españoles Nc-Spain7 y Nc-Spain8, que habían mostrado diferencias notables en el modelo murino gestante, mostraron un resultado similar, el aborto, en todos los animales inoculados (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014). No obstante, la muerte fetal se produjo significativamente más tarde en los animales infectados con el aislado Nc-Spain8, que fue el que mostró una virulencia más baja en el modelo murino.

2.2.3.3. Utilidades

El modelo bovino ha sido de gran utilidad para el estudio de la patogenia de la infección y la respuesta inmunitaria desarrollada, tanto periférica como local en la placenta y el feto. Numerosos estudios han investigado la distribución del parásito, las lesiones y el tipo de respuesta inmunitaria (innata y de memoria) que se produce tras la infección, tanto en modelos no gestantes como gestantes (Benavides *et al.*, 2014). De esta forma, se ha destacado, por ejemplo, el papel de los receptores TLR (*Toll-like receptors*) (Bartley *et al.*, 2013), así como la respuesta humoral (Williams *et al.*, 2000; Bartley *et al.*, 2004; Macaldowie *et al.*, 2004; Serrano *et al.*, 2006; Rojo-Montejo *et al.*, 2009a; 2013; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014) y celular, destacando los linfocitos T CD4+ y CD8+ (Marks *et al.*, 1998; Staska *et al.*, 2003; Tuo *et al.*, 2005; Rosbottom *et al.*, 2007; Rocchi *et al.*, 2011) y las citoquinas a nivel de placenta (Rosbottom *et al.*, 2008; 2011; Almería *et al.*, 2011; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014; Cantón *et al.*, 2014a). Estos aspectos podrían facilitar la comprensión del comportamiento del parásito y esclarecer la relación entre la intensidad y características de la respuesta inmunitaria del hospedador con la protección frente a la infección o, por el contrario, el aborto y transmisión vertical.

Por otra parte, los modelos bovinos han sido empleados para evaluar la eficacia y seguridad de diferentes tratamientos farmacológicos y vacunas en su fase final de desarrollo, para probar aquellos que mostraron buenos resultados en otros modelos o para realizar pruebas de campo requeridas para su registro. La evaluación de la eficacia de un fármaco es difícil, puesto que la infección exógena o la recrudescencia de una infección persistente no producen signos clínicos evidentes hasta la producción del aborto, cuando es tarde para el tratamiento (Benavides *et al.*, 2014). Además de la presencia del aborto en hembras gestantes (Vanleeuwen *et al.*, 2010), algunos estudios empleando el modelo bovino no gestante se han valido de las variaciones en la temperatura corporal, respuesta inmunitaria y presencia del parásito para valorar la eficacia de los fármacos (Kritzner *et al.*, 2002).

En cuanto a la utilidad del modelo para evaluar la eficacia de vacunas, diversos estudios sugieren que el ganado bovino puede desarrollar cierto grado de inmunidad protectora frente a la infección. Los parámetros estudiados para valorar la eficacia de una vacuna son principalmente la mortalidad fetal y la transmisión vertical (Williams *et al.*, 2007; Rojo-Montejo *et al.*, 2013; Hecker *et al.*, 2013; Weber *et al.*, 2013). En el primer caso, el desafío se realiza durante el primer tercio de gestación (modelo de mortalidad fetal, epígrafe 2.2.3.2.1), ya que es en ese momento cuando se producen los abortos. Por el contrario, si lo que se pretende es valorar la eficacia frente a la transmisión vertical, el desafío debería realizarse a mitad de gestación (modelo de transmisión vertical, epígrafe 2.2.3.2.2). Las vacunas que se quieren evaluar son administradas antes del desafío, habitualmente antes de la gestación (Miller *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2007; Hecker *et al.*, 2013; Rojo-Montejo *et al.*, 2013; Weber *et al.*, 2013), aunque en ocasiones se realiza durante las primeras etapas de la misma en el caso del modelo de transmisión vertical (Andrianarivo *et al.*, 2000). Además, también se han empleado modelos no gestantes para evaluar la inmunogenicidad de vacunas, analizando la respuesta humoral de anticuerpos, proliferación celular y expresión de citoquinas (Andrianarivo *et al.*, 1999; Baszler *et al.*, 2008; Moore *et al.*, 2011).

2.2.4. Modelo ovino

La infección natural por *N. caninum* en las ovejas fue descrita por primera vez en un cordero congénitamente infectado (Dubey *et al.*, 1990). Posteriormente, la neosporosis ovina se ha descrito en diversos casos en todo el mundo (Kobayashi *et al.*, 2001; Koyama *et al.*, 2001; Hassig *et al.*, 2003; Moore, 2005; West *et al.*, 2006; Howe *et al.*, 2012; Moreno *et al.*, 2012; González-Warleta *et al.*, 2014). Aun así, tradicionalmente se ha considerado *T. gondii* como la primera causa de origen parasitario del aborto en la oveja y en la cabra, teniendo *N. caninum* una relevancia epidemiológica, clínica y económica mucho menor comparado con el ganado bovino (Buxton, 1998; Givens & Marley, 2008; Dubey & Schares, 2011). Sin embargo, estudios recientes han mostrado que *N. caninum* podría ser una causa importante de aborto en pequeños rumiantes (Moreno *et al.*, 2012) e incluso de pérdidas asociadas a la reproducción en muchas explotaciones (West *et al.*, 2006; González-Warleta *et al.*, 2014). Varios estudios llevados a cabo en diversas partes del mundo han demostrado una seroprevalencia de *N. caninum* en el ganado ovino muy variable. Así, por ejemplo, se ha descrito que a nivel mundial la seroprevalencia podría variar entre el 2 y el 14% (Hassig *et al.*, 2003; Moore, 2005; Howe *et al.*, 2012). Sin embargo, en Jordania se ha observado una prevalencia del 92% (Abo-Shehada & Abu-Halaweh, 2010), mientras que en España se ha descrito una seroprevalencia del 34% en una explotación ovina con problemas reproductivos (González-Warleta *et al.*, 2014). Por otra parte, la detección del *N. caninum* en fetos abortados también ha sido analizada en varios estudios. Por ejemplo, el porcentaje de detección del parásito en fetos abortados fue del 20% en Suiza (Hassig *et al.*, 2003), 13% en Nueva Zelanda (Howe *et al.*, 2012) y 7% en España (Moreno *et al.*, 2012), observándose en este último caso un porcentaje similar de detección de *T. gondii*.

Desde el descubrimiento de *N. caninum*, se han realizado varios estudios con infecciones experimentales en ovejas, aunque en comparación con los modelos bovino y murino son

mucho más escasos (Benavides *et al.*, 2014). De todos ellos, la mayoría se centra en el estudio de la patogenia y respuesta inmunitaria de la neosporosis durante la gestación.

2.2.4.1. Modelo ovino no gestante

Al igual que ocurre en los modelos bovinos, la mayoría de estudios llevados a cabo en ovejas no gestantes buscan profundizar en el conocimiento del ciclo biológico del parásito (Benavides *et al.*, 2014). Así, por ejemplo, la transmisión horizontal en ovejas tras la administración VO con ooquistes obtenidos de perros infectados ha sido demostrada, al igual que la infección de perros alimentados con tejidos de estas ovejas (Schaes *et al.*, 2001). Asimismo, el modelo ovino ha sido empleado para estudiar la vía venérea de transmisión. En una infección experimental en moruecos se demostró que éstos eliminaban taquizoítos en el semen después de ser infectados de forma dosis-dependiente, aunque no se logró transmitir la infección a hembras sanas tras la cubrición, de forma similar a lo descrito en el modelo bovino (Syed-Hussain *et al.*, 2013).

2.2.4.2. Modelo ovino gestante

Las infecciones experimentales llevadas a cabo en ovejas gestantes han mostrado un patrón similar al de la neosporosis bovina, pudiendo observarse, en función del momento de la gestación en el que se produzca la infección, la presencia de abortos, corderos nacidos sanos pero congénitamente infectados o corderos nacidos débiles con signos nerviosos. La mayoría de las infecciones experimentales en ovejas gestantes se han llevado a cabo en el segundo tercio de gestación, mientras que aquellas realizadas en el primer y último tercio son escasas (Tabla 4). En estos estudios se observó que las infecciones durante etapas tempranas de la gestación dan lugar generalmente al aborto (Buxton *et al.*, 1998), mientras que infecciones en el último tercio de gestación no producen muerte fetal, naciendo corderos vivos, habitualmente sanos pero congénitamente infectados (McAllister *et al.*, 1996; Syed-Hussain *et al.*, 2015a). Sin embargo, la probabilidad de producirse el aborto tras la infección experimental en el segundo tercio gestación es mucho mayor que en el caso del ganado bovino (Dubey & Lindsay, 1990; McAllister *et al.*, 1996; Buxton *et al.*, 1998; 2001; Innes *et al.*, 2001a; Weston *et al.*, 2009). No obstante, en el caso de las ovejas también se ha descrito, aunque en menor medida, el nacimiento de corderos infectados tras infecciones experimentales en el segundo tercio de gestación (McAllister *et al.*, 1996; Buxton *et al.*, 1998; O'Handley *et al.*, 2003). Aunque algunos autores han realizado experimentos en diferentes momentos de gestación bajo las mismas condiciones (McAllister *et al.*, 1996; Buxton *et al.*, 1998), hasta la fecha no existen estudios en los que los tres tercios de gestación hayan sido comparados simultáneamente.

Además del periodo de gestación, algunos autores han puesto de manifiesto la importancia de la dosis de infección, observándose un mayor porcentaje de abortos con dosis elevadas (Dubey & Lindsay, 1990; Buxton *et al.*, 2001; Innes *et al.*, 2001a; Weston *et al.*, 2009), mientras que con dosis bajas el número de abortos se reduce o no ocurre, a pesar de

establecerse la infección (Weston *et al.*, 2009). En este sentido, cabe destacar que, a diferencia del modelo bovino, existe un estudio de titulación de dosis en el modelo ovino gestante. En este trabajo, diferentes dosis inoculadas por vía IV a mitad de gestación produjeron resultados distintos. Mientras que no se produjo aborto o transmisión vertical con las dosis más bajas (50 taquizoítos), las infecciones con 5×10^3 taquizoítos causaron el aborto en la mitad de los animales, y con 10^7 - 10^8 taquizoítos todos los animales abortaron (Weston *et al.*, 2009). A pesar de ello, existen algunas discrepancias entre estudios, ya que se han descrito resultados muy distintos incluso empleando las mismas dosis en el mismo tercio de gestación (Benavides *et al.*, 2014). De nuevo, esta circunstancia probablemente sea debida a las notables diferencias en el aislado, vía de inoculación y condiciones experimentales de cada estudio. En cuanto a la diversidad biológica del parásito, aunque se han empleado varios aislados para las infecciones experimentales en el ganado ovino, hasta ahora ningún estudio ha comparado, bajo las mismas condiciones, la influencia que tiene el aislado en la presentación de la enfermedad.

Por último, hasta la fecha no se ha desarrollado un modelo de recrudescencia en el ganado ovino. Aunque pocos estudios han analizado este hecho, uno de ellos demostró que existe una reactivación de la infección en ovejas gestantes, ya que se observaron abortos en hembras previamente infectadas tanto de forma natural como experimental (Jolley *et al.*, 1999). A pesar de ello, en otros estudios no se detectaron abortos en ovejas infectadas experimentalmente 3 y 8 semanas antes de la gestación (Buxton *et al.*, 2001; Syed-Hussain *et al.*, 2015b). No obstante, en este último estudio sí se observó transmisión vertical, puesto que se detectó la presencia del parásito en más del 50% de los corderos nacidos sanos (Syed-Hussain *et al.*, 2015b).

2.2.4.3. Utilidades

Además de lo expuesto anteriormente, el modelo experimental ovino también ha sido utilizado para la evaluación de la posible protección ejercida por una infección previa a la gestación, tanto natural como experimental, y posterior desafío durante la misma. Aunque escasos, estos estudios mostraron un grado de protección variable frente al aborto cuando se desafiaron en el segundo (Jolley *et al.*, 1999; Buxton *et al.*, 2001) o tercer (Syed-Hussain *et al.*, 2015b) tercio de gestación, aunque no evitaron por completo la transmisión transplacentaria a la descendencia. Asimismo, el modelo experimental ovino también ha servido para evaluar la eficacia de vacunas inactivadas. A pesar de que las formulaciones probadas antes de la gestación consiguieron alcanzar un cierto grado de protección frente al aborto tras el desafío en la gestación (segundo y tercer tercio), no fueron capaces de impedir la transmisión vertical del parásito (O'Handley *et al.*, 2003; Jenkins *et al.*, 2004b). Por último, Innes *et al.* describieron que la inmunización con la vacunas viva frente a *T. gondii* (Toxovac[®]) no protege frente al aborto en la neosporosis (Innes *et al.*, 2001a). En este estudio, todas las ovejas vacunadas antes de la gestación y desafiadas en el segundo tercio de la misma con *N. caninum* presentaron un 100% de abortos, mientras que aquellas infectadas con *Toxoplasma* mostraron un alto grado de protección.

Tabla 4 - Infecciones experimentales llevadas a cabo en modelos ovinos durante la gestación.

Referencia	Aislado	Dosis ¹	Vía ²	Día de gest. ³	Ovejas abortadas ⁴	Corderos nacidos vivos ⁵
Dubey & Lindsay, 1990	Nc-1	1,5×10 ⁷	IV	90	1/1 - 25 dpi	0/2
			IM		1/1 - 26 dpi	0/2
McAllister <i>et al.</i> , 1996	Nc-2 + Nc-Liverpool	1,7×10 ⁵	IV	65	6/6 - 53 dpi (36-69)	0/9
					6/6 - 45 dpi (41-51)	0/10
					4/6 - 49 dpi (41-59)	4/9 (2 débiles y 2 sanos)
					4/6 - 47 dpi (36-61)	3/8 (2 débiles y 1 sano)
					0/6	7/7
					0/6	6/6
Buxton <i>et al.</i> , 1997	Nc-Liverpool	10 ⁶	SC	90	0/12 (SS)	NA (SS)
					8/8 - (42-62 dpi)	0/10
Buxton <i>et al.</i> , 1998	Nc-1	10 ⁶	SC	45	7/8 - (35-78 dpi)	1/11
				65	6/8 - (35-44 dpi)	4/11
				90	12/12 - 41 dpi	0/14
Buxton <i>et al.</i> , 2001	Nc-1	10 ⁷	SC	90	12/12 - 41 dpi (31-59)	0/14
O'Handley <i>et al.</i> , 2003	Nc-Illinois	5×10 ⁶	SC	68-108	0/20	35/38 (3 mortinatos, 28 sanos, 7 mueren en 1 sem.)
Jenkins <i>et al.</i> , 2004b	Nc-Illinois	5×10 ⁶	SC	45-75	5/9	6
Weston <i>et al.</i> , 2009	Nc-NZ1 + Nc-NZ2 + Nc-NZ3	50 5000 10 ⁶	IV	73-90	0/10	10/10
					5/10 - 49 dpi (36-69)	5/10 (2 prematuros, 3 sanos)
					10/10 - 45 dpi (37-54)	0/10
Syed-Hussain <i>et al.</i> , 2015b	Nc-NZ1	10 ⁷	IV	120	10/10 - 38 dpi (26-56)	0/10
					0/12	17/17 (7 mueren antes de 1 semana)

(1) Número de taquizoitos inoculados.

(2) (IV) Intravenoso; (IM) intramuscular; (SC) subcutáneo.

(3) Días de la gestación en el que se lleva a cabo la infección (la gestación de la oveja dura aproximadamente 148 días).

(4) Las fracciones indican el número de ovejas que abortan con respecto al total de ovejas inoculadas. Los días post-infección (dpi) en los que se producen abortos corresponden a la media del grupo. Entre paréntesis se indica el rango. (SS) Sacrificio seriado.

(5) Las fracciones indican el número de corderos nacidos vivos con respecto al total del grupo. (NA) No aplicable.

2.2.5. Estandarización y refinamiento

Como ya se ha introducido en los diferentes modelos, se plantea una gran dificultad cuando se trata de comparar objetivamente los resultados obtenidos en los diferentes estudios llevados a cabo en un mismo modelo animal. Esto es debido a la gran variedad de condiciones experimentales bajo las cuales se realizan los ensayos, ya que son muy variables en los diferentes grupos de investigación. Éstos incluyen, entre otros, la raza o estirpe de los animales empleados, así como el aislamiento, vía de administración, dosis o condiciones de manejo del parásito y, en el caso de los modelos gestantes, el momento de la gestación en el cual se infecta a los animales. La mayoría de estos factores han sido tratados en los apartados correspondientes en cada modelo.

Uno de los factores críticos a la hora de llevar a cabo una infección experimental es el mantenimiento de la capacidad infectiva y viabilidad de las formas parasitarias que se van a inocular. En este sentido, el manejo del cultivo celular para la obtención de los taquizoítos determina dichas características, ya que se ha descrito una rápida pérdida de viabilidad e infectividad en los taquizoítos mantenidos extracelularmente en cultivo celular (Hemphill *et al.*, 1996). Además, el mantenimiento prolongado del parásito *in vitro* conlleva, tras un número de pases elevado, una atenuación de la patogenicidad, como se ha demostrado en estudios anteriores (Long *et al.*, 1998; Bartley *et al.*, 2006). Lamentablemente, en la mayoría de estudios no se especifica el número de pase del parásito inoculado ni las condiciones de manejo del cultivo hasta su inoculación, y aquellos estudios que lo hacen revelan una gran discrepancia, desde 10 hasta 100 pases (Benavides *et al.*, 2014). Por otra parte, dentro de la preparación del inóculo, deben tenerse en cuenta una serie de parámetros que pueden influir en el resultado de la infección. Así, por ejemplo, la cuantificación de las dosis o su conservación hasta su administración pueden ejercer una gran influencia en la viabilidad del parásito. Consecuentemente, la infectividad de los taquizoítos empleados en los diferentes estudios podría haber presentado una enorme variabilidad, haciendo su comparación aún más difícil.

En esta misma línea, también cobra especial importancia el aislamiento empleado en el desafío. Hasta la fecha, numerosos aislados han sido empleados con diferentes grados de virulencia. Sin embargo, sería de gran utilidad llegar a un consenso entre grupos de investigación para el empleo de determinados aislados que cumplan una serie de requisitos, de forma que permitan una comparación satisfactoria cuando sea empleada en diferentes experimentos. Así, por ejemplo, se podría plantear la creación de una base de datos centralizada en la que se incluyesen aislados completamente caracterizados. El conocimiento de estos aislados debería incluir su origen, historia de pases, datos de las secuencias genéticas y disponibilidad, entre otros (Steinhoff & Pneumococcal Vaccine Animal Model Consensus Group, 2007). Asimismo, los aislados incluidos deberían presentar una serie de características comunes que faciliten su comparación entre estudios, como el hecho de ser relevantes en el ganado bovino, mostrar datos y resultados repetibles en el tiempo tanto *in vitro* como en el modelo murino, o presentar un número limitado de pases. Así, por ejemplo, en los últimos años el aislamiento español de origen bovino Nc-Spain7 (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2008) ha sido utilizado por diversos autores (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2010; 2011; 2014; Caspe

et al., 2012; Collantes-Fernández *et al.*, 2012; Dellarupe *et al.*, 2014a; 2014b) y presenta todas las características anteriormente mencionadas.

Por último, el **diseño experimental** de cada ensayo se presenta como la última barrera para la comparación entre estudios. Entre los parámetros importantes destacan la selección de los animales y su punto final de sacrificio, la ruta de administración del parásito, o los parámetros evaluados, técnicas empleadas y análisis estadísticos llevados a cabo. De forma ideal, existe una necesidad de estandarizar los ensayos realizados, ya que son estos los que van dar validez a un experimento y van a reflejar la importancia del estudio. Por tanto, el empleo de técnicas estandarizadas, bien documentadas y ampliamente empleadas puede resultar de gran utilidad en el refinamiento de un modelo animal.

Todos los parámetros expuestos hasta el momento pueden interaccionar entre sí y ejercer por tanto una gran influencia en el desarrollo de la enfermedad y su interpretación. Por todo ello, se han sugerido algunas estrategias de armonización de los modelos animales en congresos de ámbito internacional que podrían permitir un desarrollo de normas generales compartidas entre laboratorios, siendo de gran utilidad para las investigaciones en este campo. Así, por ejemplo, se ha planteado la necesidad de estandarizar los modelos de *N. caninum* para estudiar la respuesta inmunitaria tanto a nivel local como periférico, así como para evaluar nuevas vacunas y quimioterápicos. De forma similar, se ha puesto de manifiesto la necesidad de establecer una serie de normas comunes para el diseño de las infecciones experimentales, referidas a aspectos relativos al parásito como el aislado, la dosis, preparación del inóculo o vía de inoculación, así como referidas al modelo animal. Con todo ello se planteó la necesidad de crear un consenso en estos aspectos que pudieran servir para realizar comparaciones mucho más robustas y reproducibles entre diferentes grupos de investigación para el estudio tanto de la biología del parásito, de la enfermedad que produce en el hospedador, así como para la evaluación de vacunas o tratamientos en modelos experimentales (Benavides *et al.*, 2014).

CAPÍTULO III

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

JUSTIFICATION AND OBJECTIVES

“Millones de personas vieron una manzana caer,
pero Newton fue el único que preguntó por qué”

Bernard M. Baruch (1870-1965)

Neospora caninum is an apicomplexan protozoan parasite considered to be the main cause of reproductive failure in cattle worldwide. Neosporosis is generally latent and asymptomatic in non-pregnant cattle, although the consequences of infection in a pregnant cow can be abortion, birth of a weak calf or birth of a clinically healthy but persistently infected calf (Innes *et al.*, 2002). This disease shows a high prevalence and produces important economic losses as a consequence of the reproductive failure triggered by infection during pregnancy or recrudescence (Dubey & Schares, 2011). To date, no drug or vaccine is available for the treatment or prevention of the disease (Reichel *et al.*, 2014). Therefore, the development of control measures is of paramount importance. Indeed, the efforts of several research groups are nowadays focused on the search for effective drugs and vaccines against bovine neosporosis.

In this sense, the employment of *in vitro* models has been of great help to the increase in the knowledge of ultrastructural features of the parasite and to gain deeper insight into the processes of the tachyzoite lytic cycle (Hemphill *et al.*, 1996; Hemphill *et al.*, 2004). This understanding has allowed the use of *in vitro* models for various assays and assessments. Among these, the obtainment and characterization of isolates, the evaluation of putative drugs and the tachyzoite-bradyzoite conversion studies stand out. Although this model does not pose a sound alternative to the employment of animal models, *in vitro* assays offer an initial approximation of many variables of interest in animals, thus reducing and optimising the usage of experimentation with animals. However, the use of animal models is essential for the study of several aspects of the disease, which cannot be analysed by *in vitro* means. In fact, *in vivo* models have increased and deepened the knowledge of neosporosis and have allowed testing of potential drugs and vaccine candidates.

Although cattle are the most important target species, the mouse has been widely used as an experimental model to study biological aspects of *N. caninum* infection. Despite the obvious limitations and physiological differences between mice and ruminants, the pregnant mouse model has also been applied extensively to provide initial results on the parasite virulence and efficacy of novel drugs or vaccines of *N. caninum* infection (Monney & Hemphill, 2014). Indeed, the use of laboratory mice is of advantage in terms of low cost, easy handling, short gestation period and litter size (López-Pérez *et al.*, 2006). Furthermore, when inoculation is performed during pregnancy, the parasite is efficiently transmitted from dam to foetus causing vertical transmission and clinical signs in the offspring (López-Pérez *et al.*, 2008). BALB/c mice are the most widely employed mouse strain for studies on *Neospora* infection biology (López-Pérez *et al.*, 2010; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2010; Dellarupe *et al.*, 2014b) and as proof-of-concept model for the assessment of drugs (Debache *et al.*, 2011; Schorer *et al.*, 2012; Debache & Hemphill, 2012a; Ojo *et al.*, 2014). Most notably, the pregnant BALB/c model has demonstrated various degrees of efficacy for a number of vaccine candidates, and has enabled researchers to assess the effects of parasite infection and respective vaccines on both progeny and dams (Aguado-Martínez *et al.*, 2009; Debache *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010; Marugán-Hernández *et al.*, 2011; Monney *et al.*, 2012; Rojo-Montejo *et al.*, 2012; Jiménez-Ruiz *et al.*, 2013b; Pastor-Fernández *et al.*, 2015).

Unfortunately, the large number of reported experimental infections conducted in mice differ with regard to different parameters such as the preparation of parasites used for infection, the route of administration, the isolate, dose or timing of infection and the mouse strains used. All of this results in a high degree of variability, rendering meaningful comparison of results from different laboratories a difficult task. In addition, there are clear indications that the infection dose usually employed (2×10^6) is much too high, since mice are infected with a similar number of parasites as normally employed in ruminant models (10^7 for cows and 10^6 for sheep), which is sufficient to cause foetal death when inoculated during the first term of gestation (Williams *et al.*, 2007; Caspe *et al.*, 2012; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014). Moreover, it becomes evident that in terms of body weight mice differ from cattle and sheep to a much higher degree. This could give rise to biased results in vaccine screenings, and might lead to a premature dismissal of potential active formulations, even more if a highly virulent isolate (Nc-Liverpool or Nc-Spain7) is used. Altogether, it seems clear that the standardisation of a *Neospora* mouse model would enable more robust comparisons of results among experiments and would optimise its use as proof-of-concept model for new vaccine and drug candidates (Benavides *et al.*, 2014; Monney & Hemphill, 2014).

Despite the mouse model being able to reproduce both cerebral and congenital neosporosis, and develop an immune response against the infection, it presents certain limitations that hinder data extrapolation to the target host. One of the main factors is the different structure of the placenta between murine and ruminant species (haemochorial *vs* syndesmochorial), which constitute the physical barrier that the parasite must cross to reach the foetus. On the other hand, gestation in mice last approximately 21 days, which accelerate the obtaining of results, but, in turn, may omit certain immunological mechanisms that could be triggered in the long term against the parasite during gestation. Hence, the interest of ruminant models has increased in the last years as a valid alternative to the costly bovine model and to the poorly comparable murine model.

In this sense, sheep provide several advantages over cattle as an experimental animal model, such as number of animals, ease of handling, length of the experiment and cost. Moreover, sheep are, likewise other ruminants, a natural intermediate host of *N. caninum* (Dubey *et al.*, 2007a). In fact, recent studies in small ruminants suggest that neosporosis may be a more important cause of reproductive disorders than it has traditionally been considered, at least in certain scenarios. Recent evidence has accumulated, which points towards *N. caninum* as a cause of natural abortion and reproductive failure in sheep and goats (West *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2012; González-Warleta *et al.*, 2014; Benavides *et al.*, 2014). In addition, previous experimental infections in pregnant ewes have shown that sheep are highly susceptible to infection, and display a similar pathogenesis and disease outcomes as reported for cattle (McAllister *et al.*, 1996; Buxton *et al.*, 1998; Weston *et al.*, 2009). However, it is complicated to compare the results from these studies, as they differ in experimental design, parasite isolate and infection dose, route of administration, and time point of infection. Moreover, there are no reports on the outcomes of infection during different pregnancy periods within the same study and under the same experimental conditions.

In this scenario, the general aim of the present Doctoral Thesis was to improve and develop new animal models for the study of *N. caninum* infection. To this end, in the first place, a dose titration of a BALB/c pregnant mouse model was carried out in order to assess the impact of the tachyzoite dose on this model. Secondly, experimental infections in pregnant ewes during the three periods of gestation were performed so as to characterise the pathogenesis of infection in sheep: the immune response profile against *N. caninum*, clinical consequences and parasite-host relationship during gestation, as well as to assess this model as a valuable alternative to cattle.

In both cases, the Spanish isolate Nc-Spain7 was used. This isolate was obtained from an asymptomatic calf (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2008) and has been thoroughly characterised in both *in vitro* and *in vivo* (murine and bovine) models (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2010; 2011; 2014; Caspe *et al.*, 2012; Collantes-Fernández *et al.*, 2012; Dellarupe *et al.*, 2014a; 2014b). In addition, the manipulation of the parasite during inocula preparation was performed under strict and controlled conditions in all experimental infections, in order to assure optimal invasion capacities and therefore reproducibility. These aspects include low and similar culture passage numbers, collection from culture flask when the great majority of tachyzoites were still intracellular and procedures conducted rapidly and at a low temperature, performing the inoculation soon after parasite isolation.

➤ **Objective 1. Normalization of the *N. caninum* infection mouse model in BALB/c pregnant mice by a dose-titration assay of the virulent Nc-Spain7 isolate.**

This study was conducted to evaluate the effects of various infectious doses of a virulent *N. caninum* isolate in pregnant and non-pregnant BALB/c mice, with the aim of optimising the handling of the parasite and the challenge dose, and thus to contribute to the refinement and standardisation of the BALB/c mouse model for its use in further studies.

➤ **Objective 2. Characterization of the *N. caninum* experimental infection in sheep in the three terms of gestation.**

The aim of this study was to investigate the outcome of experimental infection by *N. caninum* in ewes under standardized conditions at an early, mid-term and late period of gestation. This may allow further insight into ruminant neosporosis and assessment of the validity of experimental infection in sheep as a model for exogenous transplacental transmission.

- Sub-objective 2.1. Influence of the gestational stage on the clinical course, lesional development and parasite distribution in experimental ovine neosporosis.

This sub-objective included the evaluation of the effect that the gestation period exerts on the clinical course of disease, lesion development and parasite distribution in different organs after infection at early, mid and late gestation in pregnant ewes.

- Sub-objective 2.2. *Systemic and local immune responses in ewes after Neospora caninum experimental infection in the three periods of gestation.*

In order to gain further insight into the factors that trigger abortion in ruminant neosporosis, in this sub-objective we assessed both local and systemic immune responses induced as a consequence of the experimental infection in all the three thirds of gestation.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS (PUBLICACIONES)

RESULTS (PUBLICATIONS)

"Lo que sabemos es una gota de agua;
lo que ignoramos es el océano"

Isaac Newton (1642-1727)

Objetivo 1

Normalización del modelo murino de infección por *N. caninum* en ratones BALB/c gestantes mediante un ensayo de titulación de dosis con el aislado virulento Nc-Spain7

El modelo murino gestante es uno de los modelos animales más empleados para el estudio de la infección por *N. caninum* y como prueba de concepto en la evaluación de fármacos y vacunas frente a la neosporosis. Sin embargo, el empleo de diferentes aislados del parásito, vías de inoculación, diseños experimentales o métodos de preparación de las dosis de desafío han originado un importante grado de variabilidad entre los estudios realizados por los diferentes laboratorios, lo que dificulta en gran medida la comparación de los resultados obtenidos. Además, en la mayoría de estudios, los ratones son infectados con una dosis similar (por ejemplo 2×10^6 taquizoítos) a la empleada en los modelos de rumiantes (generalmente 10^7 en vacuno y 10^6 en ovino), lo que parece inapropiado considerando la enorme diferencia de peso y tamaño existente entre estas especies. De este modo, con el propósito de disponer de un modelo más adecuado para los experimentos de eficacia de fármacos y vacunas, se acometió la estandarización y refinamiento de este modelo experimental mediante la titulación de la dosis de desafío.

La infección se llevó a cabo con el aislado Nc-Spain7, un aislado ampliamente caracterizado, tanto *in vitro* como *in vivo*, y clasificado como virulento por su comportamiento *in vitro* e *in vivo*. Se inocularon ratones en el día 7-10 de gestación por vía subcutánea con dosis de 2×10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 y 10^2 taquizoítos. En cada grupo se estudiaron los parámetros más relevantes, incluyendo la morbilidad/mortalidad, la tasa de transmisión vertical, la distribución y carga parasitaria, y la respuesta inmunitaria humoral. Los resultados demuestran el establecimiento de la infección en todos los animales inoculados, independientemente de la dosis. No obstante, la respuesta inmunitaria humoral varió en función de la dosis, observándose mayores niveles de IgG1 en animales infectados con las dosis más altas, principalmente en los no gestantes. Por otra parte, la infección con una dosis de 10^5 taquizoítos (20 veces inferior a la dosis habitualmente empleada por otros grupos de investigación) es suficiente para producir la infección en la totalidad de los animales y un 100% de transmisión vertical y mortalidad postnatal. Además, incluso las infecciones con dosis más bajas (10^4 - 10^2 taquizoítos) causaron tasas de mortalidad postnatal muy elevadas (76-90%). Por tanto, estos resultados sugieren que en estudios anteriores las dosis de desafío fueron muy altas, originando unas condiciones excesivamente agresivas que podrían haber comprometido la evaluación de una vacuna o fármaco potencialmente eficaz. Con los resultados obtenidos, se plantea el uso de un modelo basado en la utilización de una dosis máxima de 10^5 taquizoítos, de forma que se puedan obtener conclusiones más precisas y realistas sobre la eficacia de estos productos.

Dose-dependent effects of experimental infection with the virulent *Neospora caninum* Nc-Spain7 isolate in a pregnant mouse model

David Arranz-Solís^a, Adriana Aguado-Martínez^b, Joachim Müller^b, Javier Regidor-Cerrillo^a, Luis Miguel Ortega-Mora^a, Andrew Hemphill^{b*}.

^a SALUVET, Animal Health Department, Faculty of Veterinary Sciences, Complutense University of Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain

^b Institute of Parasitology, Vetsuisse Faculty, University of Bern, CH-3012 Bern, Switzerland.

* Corresponding author: Andrew Hemphill (andrew.hemphill@vetsuisse.unibe.ch)

Running title: **Pregnant mouse model dose titration**



Published in *Veterinary Parasitology* (30 July 2015) Volume 211, Issues 3–4, Pages 133–140. DOI 10.1016/j.vetpar.2015.05.021.

Presented as poster in the *3rd Apicomplexa* international meeting, 2015 (30th June–3rd July, Edinburgh, UK).



Dose-dependent effects of experimental infection with the virulent *Neospora caninum* Nc-Spain7 isolate in a pregnant mouse model



David Arranz-Solís^a, Adriana Aguado-Martínez^b, Joachim Müller^b,
Javier Regidor-Cerrillo^a, Luis Miguel Ortega-Mora^a, Andrew Hemphill^{b,*}

^a SALUVET, Animal Health Department, Faculty of Veterinary Sciences, Complutense University of Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain

^b Institute of Parasitology, Vetsuisse Faculty, University of Bern, CH-3012 Bern, Switzerland

Highlights

- Several doses from 2×10^6 to 10^2 Nc-Spain7 tachyzoites were subcutaneously inoculated to BALB/c mice.
- No differences were observed after reduction of tachyzoite numbers from 2×10^6 to 10^5 .
- Infection with only 100 tachyzoites could induce high mortality in both dams and offspring.
- A lowered dose of 10^5 tachyzoites could be used in further proof-of-concept experiments.

Abstract

Pregnant BALB/c mice have been widely used as an *in vivo* model to study *Neospora caninum* infection biology and to provide proof-of-concept for assessments of drugs and vaccines against neosporosis. The fact that this model has been used with different isolates of variable virulence, varying infection routes and differing methods to prepare the parasites for infection, has rendered the comparison of results from different laboratories impossible. In most studies, mice were infected with similar number of parasites (2×10^6) as employed in ruminant models (10^7 for cows and 10^6 for sheep), which seems inappropriate considering the enormous differences in the weight of these species. Thus, for achieving meaningful results in vaccination and drug efficacy experiments, a refinement and standardization of this experimental model is necessary. Thus, 2×10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 and 10^2 tachyzoites of the highly virulent and well-characterised Nc-Spain7 isolate were subcutaneously inoculated into mice at day 7 of pregnancy, and clinical outcome, vertical transmission, parasite burden and antibody responses were compared. Dams from all infected groups presented nervous signs and the percentage of surviving pups at day 30 postpartum was surprisingly low (24%) in mice infected with only 10^2 tachyzoites. Importantly, infection with 10^5 tachyzoites resulted in antibody levels, cerebral parasite burden in dams and 100% mortality rate in pups, which was identical to infection with 2×10^6 tachyzoites. Considering these results, it is reasonable to lower the challenge dose to 10^5 tachyzoites in further experiments when assessing drugs or vaccine candidates.

Keywords

Neospora caninum; Neosporosis; Pregnant mouse model; Nc-spain7; Experimental infection; Dose titration.

1. Introduction

The obligate-intracellular protozoan parasite *Neospora caninum* (Apicomplexa: Sarcocystidae) is a major cause of reproductive failure in cattle which causes substantial economic losses (Dubey & Schares, 2011; Reichel *et al.*, 2013). *N. caninum* has a heteroxenous life cycle, in which dogs and other canids have been shown to act as definitive hosts, and cattle and other ungulates represent natural intermediate hosts (McAllister *et al.*, 1998; Dubey *et al.*, 2011; Dubey & Schares, 2011). Neosporosis is generally latent and asymptomatic in non-pregnant cattle, yet the outcome of either primo-infection or recrudescence in a pregnant cow can be abortion, birth of weak calves or of clinically healthy but congenitally infected calves (Dubey *et al.*, 2007a).

Although cattle is the most important target species, the mouse has been the most widely used experimental model to study biological aspects of *N. caninum* infection. Despite the obvious limitations and physiological differences between mice and ruminants, the pregnant mouse model has also been applied extensively to provide initial results on the efficacy of novel drugs or vaccines of *N. caninum* infection (Benavides *et al.*, 2014; Monney & Hemphill, 2014). Indeed, the use of laboratory mice is of advantage in terms of low cost, easy handling, short gestation period and litter size (López-Pérez *et al.*, 2006). Following experimental infection, mice exhibit acute-disease symptoms such as rough hair coat, inactivity, anorexia within 6–12 days after infection, or chronic neurological disease symptoms later on, such as head tilt, circular movements, ataxia, hind limb weakness or paralysis (Collantes-Fernández *et al.*, 2006b). Furthermore, when inoculation is performed during pregnancy, the parasite is efficiently transmitted from dam to foetus causing foetal loss and/or similar clinical signs in offspring mice (López-Pérez *et al.*, 2008). Unfortunately, the large number of reported experimental infections conducted in mice differ with regard

to different parameters such as the preparation of parasites used for infection, the route of administration, the isolate, dose or timing of infection and the mouse strains used. All of this results in a high degree of variability, rendering meaningful comparison of results from different laboratories an impossible task. Thus, the standardization of a *Neospora* mouse model would enable more robust comparisons of results among experiments (Benavides *et al.*, 2014; Monney & Hemphill, 2014).

One of the most commonly employed models for the preliminary assessment of intervention strategies are pregnant BALB/c mice experimentally infected at mid-gestation, typically with 2×10^6 tachyzoites of the Nc-Liv or Nc-1 isolate (e.g. Liddell *et al.*, 1999b; Nishikawa *et al.*, 2001b; López-Pérez *et al.*, 2008; Aguado-Martínez *et al.*, 2009; Debache *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010; Marugán-Hernández *et al.*, 2011; Monney *et al.*, 2012; Pastor-Fernández *et al.*, 2015). However, there are clear indications that this infection dose is much too high: (i) mice were infected with a similar number of parasites (2×10^6) as normally employed in ruminant models such as 10^7 for cows and 10^6 for sheep, which are sufficient to cause foetal death when inoculated during the first term of gestation (Williams *et al.*, 2007; Caspe *et al.*, 2012; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014; Arranz-Solís *et al.*, 2015); (ii) in terms of body weight mice differ from cattle and sheep to a much higher degree; (iii) in many of these mouse studies dams developed clinical signs of disease, something which does not occur in ruminants. This could give rise to biased results in vaccine screenings, and might lead to a premature dismissal of potential active formulations, even more if a highly virulent isolate, such as Nc-Liv, is used.

The aim of this study was to standardize and refine the pregnant BALB/c mouse model for *N. caninum* infection. For that purpose, pregnant BALB/c mice were experimentally infected with 2×10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 or 10^2 *N. caninum* tachyzoites. Challenge was carried out using the Nc-Spain7 isolate, which had been earlier

obtained from an asymptomatic calf (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2008). This isolate has a controlled low number of passages in cell culture and its high degree of virulence has been demonstrated *in vitro* (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2011) and *in vivo* (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2010; 2014; Caspe *et al.*, 2012; Collantes-Fernández *et al.*, 2012; Dellarupe *et al.*, 2014b; Arranz-Solís *et al.*, 2015). Our findings could provide the basis for a standardized pregnant mouse model for the evaluation of drug and vaccine candidates under unified experimental criteria.

2. Materials and methods

2.1. Parasite culture and dose preparation

N. caninum tachyzoites of the Nc-Spain7 isolate (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2008) were propagated by continuous passages in Vero cell culture maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 5% foetal calf serum (FCS), 2 mM l-glutamine, 50 U of penicillin/ml, and 50 µg of streptomycin/ml at 37 °C with 5% CO₂ in tissue culture flasks. For the challenge, tachyzoites (passage 15) were recovered from culture flasks when they were still largely intracellular (>90% of undisrupted parasitophorous vacuoles) and infected cells were repeatedly passed through a 25-gauge needle at 4 °C. The number of viable tachyzoites was estimated by Trypan blue exclusion (typically 95–99%) followed by counting the viable tachyzoites in a Neubauer chamber. Subsequently, viable tachyzoites were adjusted to the required dose (2×10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2) by dilution in culture medium, and were subcutaneously injected in a final volume of 200 µl per mouse. Infection took place within 30 min of harvesting from tissue culture.

2.2. Mice and ethics statement

Animal procedures were approved by the animal welfare committee of the Canton of Bern (approval No. BE 105/14) and followed the corresponding guidelines. 118 BALB/c females and 59 males were purchased from Charles

River Laboratories (Sulzheim, Germany) at the age of 6 weeks and were maintained in a common room under conventional day/night cycle housing conditions, according to the standards approved by the animal welfare legislation of the Swiss Veterinary Office. Animals were used for experimentation after 4 weeks of acclimatization.

2.3. Experimental design, sampling and data collection

Pregnancy was achieved after synchronization of oestrus by the Whitten effect (Whitten, 1957) followed by mating (1 male housed with 2 females) for three nights. Subsequently, female mice were randomly distributed in six groups and subcutaneously challenged with 2×10^6 (G1; n=20), 10^5 (G2; n=20), 10^4 (G3; n=19), 10^3 (G4; n=19) and 10^2 (G5; n=20) tachyzoites of the Nc-Spain7 isolate at mid-gestation (days 7–10 after mating), while mice from group 6 (G6; n=20) were left unchallenged and received a culture media inoculation. Pregnancy was confirmed by weighing at days 15–18 of gestation, and pregnant mice were then allocated separately to rear their pups. Dams and their offspring were evaluated twice a day from birth to day 30 postpartum (pp). Data on pregnancy rate (percentage of female mice housed with males that became pregnant), litter size (number of delivered pups per dam), early pup mortality (number of full-term dead pups from birth until day 2 pp), postnatal mortality (number of dead pups from day 3 to 30 pp) and clinical signs of dams and non-pregnant mice were recorded during this time. Clinical signs were scored according to the description made by Pastor-Fernández *et al.* (2015). Briefly, the general appearance of mice and the presence of clinical signs compatible with neosporosis were recorded and scores of 0 (no alterations), 1 (ruffled coat), 2 (rounded back), 3 (noticeable loss of body condition/severe weight loss) or 4 (nervous signs such as activity decrease, hind limb paralysis, walking in circles or head tilt) were given depending on the severity of the

clinical signs. Non-pregnant mice were weighed once a week after the challenge, whereas pregnant mice were weighed at days 15 and 30 pp and neonates every second day from day 15 pp onwards until the end of the experiment (day 30 pp). Day 15 pp was chosen as a starting point for weight monitoring in order to avoid excessive handling of the pups during the first 2 weeks after birth, which might result in rejection by the dams. As a humane endpoint, mice exhibiting evident loss of body condition (score of 3) or nervous signs (score of 4) were culled to limit unnecessary suffering. Surviving dams, non-pregnant mice and pups were euthanized in a CO₂ chamber at 30 days pp. Blood from dams and non-pregnant mice was recovered by cardiac puncture and sera were obtained to test humoral immune responses. Brains from dams, non-pregnant mice and surviving pups were also sampled for parasite detection and quantification by quantitative real time PCR. Samples were stored at -20 °C until further analysis.

2.4. Humoral immune responses

N. caninum-specific IgG1 and IgG2a serum isotypes were determined by ELISA in dams and non-pregnant mice as previously described (Marugán-Hernández *et al.*, 2011). Briefly, ELISA was performed in plates coated with a soluble *N. caninum* tachyzoite antigen (Álvarez-García *et al.*, 2002), using a 1:100 dilution of sera samples and an anti-mouse IgG1 or IgG2a peroxidase-conjugated as secondary antibody (1:5000, Southern biotechnology). Sera from mice experimentally infected with Nc-Liv and non-infected mice from previous experiments (Pastor-Fernández *et al.*, 2015) were used as positive and negative controls, respectively. For each plate, values of the optical density read at 405 nm wavelength (OD₄₀₅) were converted into a relative index percent (RIPC) using the following formula $RIPC = (OD_{405} \text{ sample} - OD_{405} \text{ negative control}) / (OD_{405} \text{ positive control} - OD_{405} \text{ negative control}) \times 100$.

2.5. Parasite detection and quantification in brains

DNA extraction from brain tissue was carried out as previously described (Monney *et al.*, 2011). DNA concentration was measured using the Quantifluor® dsDNA kit (Promega) following manufacturer's recommendations and was adjusted to 5 ng/μl. *Neospora*-specific quantitative real-time PCR was performed from 20 ng of DNA as described by Müller *et al.* (2002), using the Light Cycler™ Instrument (Roche Diagnostic, Basel, Switzerland). Parasite burden was calculated by interpolation from a standard curve with DNA equivalents from 1000, 100 and 10 tachyzoites included in each run. Parasite load was expressed as parasite number/μg host DNA.

Tissues from pups that succumbed to infection from days 3 to 30 pp were not analyzed and considered as PCR-positive according to previous findings (Dellarupe *et al.*, 2014b).

2.6. Statistical analysis

Differences in pregnancy rates, early pup mortality, morbidity and parasite presence in brains were analyzed by Chi-square (χ^2) and Fisher F-tests. Postnatal mortality was analysed by the Kaplan–Meier survival method (Bland & Altman, 1998) to estimate the percentage of surviving animals at each time point. The Log-rank test was applied to compare the survival curves between different groups (Bland & Altman, 2004) and the median survival time, i.e., the day at which 50% of the pups died, was calculated. For pair-wise comparisons, a value of $P < 0.05/k$ was considered statistically significant, where k corresponded to the number of groups. One-way ANOVA followed by Tukey's multiple test were employed to compare anti-*N. caninum* antibody levels, litter size and body weights. In addition, unpaired two-tailed t-test was used for comparisons between IgG1 and IgG2a levels within each group. Parasite burdens were analyzed using the nonparametric Kruskal–Wallis test followed by Dunn's test for

comparisons between groups. To further comparisons of parasite loads and antibody levels between dams and non-pregnant mice, the U Mann-Whitney test and unpaired two-tailed t-test, respectively, was applied. Statistical significance for all analyses was established at $P < 0.05$. All statistical analyses were carried out using GraphPad Prism 6 (v.6.01) software.

3. Results

3.1. Evaluation of *N. caninum* infection in dams

Data on pregnancy rates, litter size, morbidity, mortality and parasite presence in dams are summarized in Table 1.

3.1.1. Pregnancy rate and litter size

For all groups, pregnancy rates ranged from 47 to 75%, with no significant differences among them. Similarly, no differences between the groups were found regarding the litter sizes (4.91-6.55 delivered pups), suggesting that pregnancy was not noticeably altered by infection with different doses.

3.1.2. Morbidity and mortality

Skin lesions at the site of parasite inoculation (interscapular region) were observed after 1–2 weeks post-infection (pi) in 4/11 dams from G1 (2×10^6), 5/15 from G2 (10^5) and 2/11 from G5 (10^2). These consisted of dermal nodules and small scabs that eventually resolved throughout the experiment. No other lesions were found in the remaining groups. On the other hand, dams from all infected groups exhibited clinical signs such as ruffled coat (score=1), rounded back (score=2) and severe weight loss (score=3) from the second week pi onwards. Moreover, 6/11 dams from G1 (2×10^6), 6/15 from G2 (10^5), 5/9 from G3 (10^4), 6/11 from G4 (10^3) and 2/11 from G5 (10^2) had to be culled prior to day 30 pp due to the severity of the clinical signs (Fig. 1A, Table 1). These dams were euthanized from day 11 pp (22–25 days pi) onwards (Table 1). For all of them, no surviving pups remained in their litter at the time of euthanasia. No clinical signs were observed in the unchallenged group (G6).

Table 1 - Summary of the effects of *Neospora Nc-Spain7* infection in pregnant mice.

Group ^a	Pregnancy rate ^b	Litter size ^c	Morbidity ^d	Mortality ^e	Time of sacrifice (days pp) ^f	Parasite detection ^g
G1 (2×10^6 tchz)	11/20 (55%)	4.91±2.43	10/11 (91%)	6/11 (54%)	11/12/17/17/24/25	11/11 (100%)
G2 (10^5 tchz)	15/20 (75%)	6.27±2.28	8/15 (53%)	6/15 (40%)	14/19/23/23/24/25	15/15 (100%)
G3 (10^4 tchz)	9/19 (47%)	5.78±2.05	8/9 (89%)	5/9 (56%)	17/18/24/28/29	9/9 (100%)
G4 (10^3 tchz)	11/19 (58%)	6.55±2.16	10/11 (91%)	6/11 (54%)	14/17/23/29/29/29	11/11 (100%)
G5 (10^2 tchz)	11/20 (55%)	5.45±1.69	4/11 (36.4%)	2/11 (18.2%)	15/19	9/11 (81.8%)
G6 (unchallenged)	12/20 (60%)	5.50±1.68	0/12 (0%)	0/12 (0%)		0/12 (0%)

^a Mice challenged with *Nc-Spain7* tachyzoites (tchz).

^b No. of pregnant mice/mice housed with males (percentage).

^c Average number of full-term delivered pups (\pm SD).

^d No. dams showing clinical signs (score \geq 1)/no. of dams in the group (percentage).

^e No. of dead or culled dams before day 30 pp/no. of dams in the group (percentage).

^f Days pp when sacrifice of dams that displayed clinical signs (score 3 and 4) were performed.

^g No. of brain PCR positive dams/no. of dams in the group (percentage).

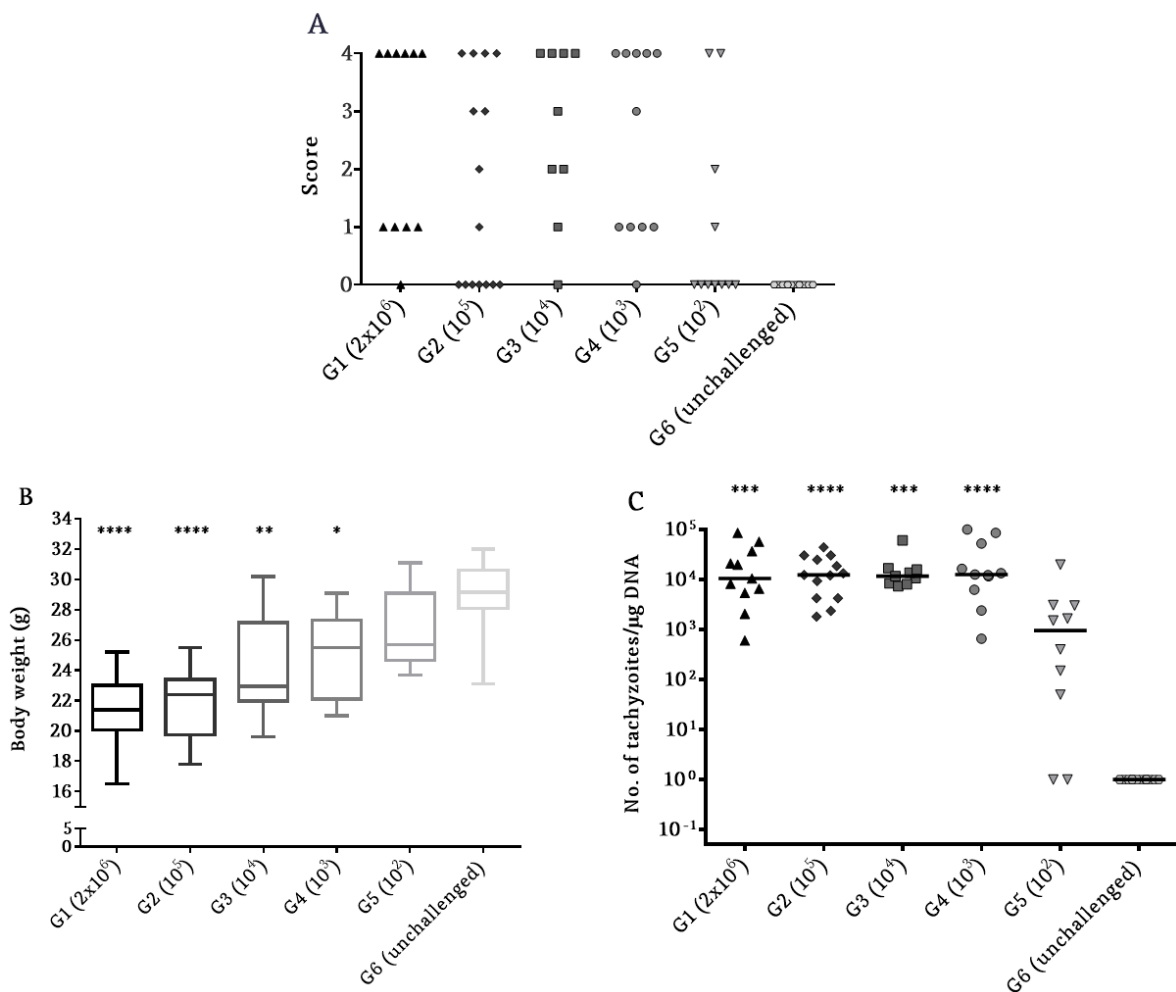
3.1.3. Body weight

Significantly lower body weights compared to the unchallenged group were found at day 15 pp in dams infected with 2×10^6 (G1), 10^5 (G2), 10^4 (G3) and 10^3 (G4) tachyzoites ($P < 0.05$), while infection with 10^2 tachyzoites did not have such an impact (Fig. 1B).

3.1.4. Quantification of cerebral parasite load

N. caninum DNA was detected in the brain of all dams from infected groups, with the exception of 2 mice in G5 (10^2). Moreover, when comparing parasite burden between groups, no significant differences were found among infected groups (G1-G5) (Fig. 1C).

Figure 1 - Effect of *N. caninum* Nc-Spain7 isolate inoculation in pregnant mice. (A) Morbidity in dams. Scores were based on the detection and severity of clinical signs after challenge (1, ruffled coat; 2, rounded back; 3, severe weight loss or 4, nervous signs). Each point represents a single animal. **(B)** Body weights in dams after 15 days pp. Box-plot graphs represent the median weight in grams, the lower and upper quartiles (boxes) and minimum and maximum values (whiskers). (****), (**) and (*) above box-plots indicate significant differences ($P < 0.0001$; $P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively) in comparison to the unchallenged group (G6). **(C)** Cerebral parasite burden in dams. Each dot represents individual values (numbers of parasites per μg of DNA), and medians are represented as horizontal lines. Taking into account that the *N. caninum* detection limit by real-time PCR is 10 parasites, negative samples (0 parasites) were represented on the log scale as < 10 (i.e., 100). (****) and (***) indicate $P < 0.0001$ and $P < 0.001$, respectively, significant higher levels in comparison to unchallenged group (G6).



3.1.5. Humoral immune responses

All infected dams developed *Neospora*-specific humoral immune responses at day 30 pp, with IgG1 and IgG2a antibody levels significantly increased in comparison to the unchallenged group ($P < 0.0001$). However, IgG1 levels from G5 (10^2) were significantly lower than those from the other infected groups (G1–G4) ($P < 0.01$). On the other hand, no differences were observed between infected groups regarding IgG2a levels other than a significantly higher production in dams infected with the highest dose (2×10^6 , G1) in comparison to those infected with the lowest

dose (10^2 , G5) ($P < 0.01$). Finally, comparisons between IgG1 and IgG2a levels within each group revealed an IgG2a biased immune response in the group infected with the lowest dose (10^2 , G5) ($P < 0.05$) (Fig. 2A), which was the only infected group showing an IgG1/IgG2a ratio < 0.9 .

3.2. *N. caninum* infection in offspring mice

Data on early pup mortality, postnatal mortality, vertical transmission and median survival time for each group are summarized in Table 2.

Figure 2 - Humoral immune responses in challenged mice. Anti-*N. caninum* immunoglobulins (IgG1 and IgG2a isotypes) generated in (A) dams and (B) non-pregnant mice after infection with 2×10^6 (G1), 10^5 (G2), 10^4 (G3), 10^3 (G4) and 10^2 (G5) tachyzoites of the Nc-Spain7 isolate. Bars represent the average RIPC (relative index percent) and error bars represent standard deviations for each group. (*) indicates $P < 0.05$ and (**) $P < 0.01$ significant differences between IgG1 and IgG2a within each group. Different letters (upper case for IgG1 and lower case for IgG2a) above each column indicate significant differences among groups ($P < 0.05$).

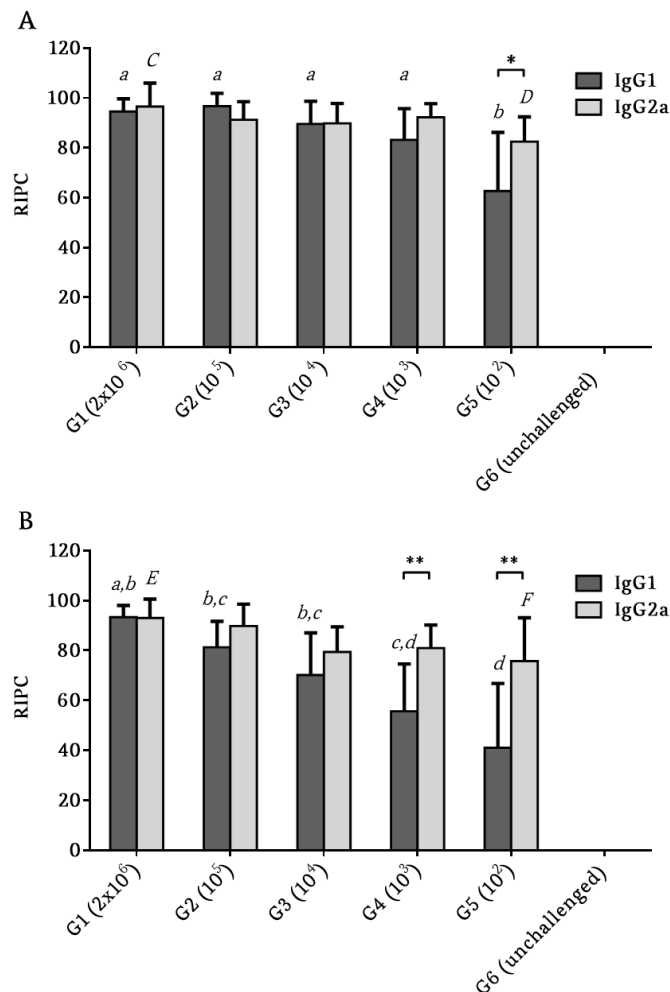


Table 2 - Summary of the effects of *Neospora* Nc-Spain7 infection in delivered pups.

Group ^a	Early pup mortality ^b		Postnatal mortality ^c		Litters with 100% postnatal mortality	Vertical transmission ^d	Median survival time ^e
	Per pup	Per litter	Per pup	Per litter			
G1 (2x10 ⁶ tchz)	7/54 (13%)	5/11 (45%)	44/47 (93.6%)	9/9 (100%)*	8/9 (88.9%)*	44/47 (93.6%)	11
G2 (10 ⁵ tchz)	10/94 (11%)	7/15 (47%)	84/84 (100%)	15/15 (100%)	15/15 (100%)	84/84 (100%)	13
G3 (10 ⁴ tchz)	2/52 (4%)	2/9 (22%)	45/50 (90%)	9/9 (100%)	7/9 (77.8%)	45/50 (90%)	15.5
G4 (10 ³ tchz)	3/72 (4%)	2/11 (18%)	59/69 (85.5%)	11/11 (100%)	7/11 (63.6%)	63/69 (91.3%)	15
G5 (10 ² tchz)	6/60 (10%)	3/11 (27%)	41/54 (75.9%)	11/11 (100%)	6/11 (54.5%)	44/54 (81.5%)	18
G6 (unchallenged)	3/66 (5%)	2/12 (17%)	0/63 (0%)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	0/63 (0%)	NA

* Number of litters were reduced since in two of them all pup died before day 3 pp.

^a Mice challenged with Nc-Spain7 tachyzoites (tchz).

^b Number of stillborn and dead pups until day 2 pp/total delivered pups (percentage).

^c Number of dead pups from day 3 PP onwards/no. of pups alive by day 2 pp (% pup mortality).

^d PCR-positive surviving pups plus those which succumbed to infection from day 3 pp/no. pups alive from day 3 pp (percentage).

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

3.2.1. Morbidity, weight analysis and mortality in pups

Early pup mortality rates, i.e., percentages of those pups that were born and died within 2 days pp, were similar among all groups (4–13%).

A high number of pups from all infected groups displayed a delay in growth and coat development, weight loss (Additional file 1) and exhibited nervous signs (ataxia, hind limb weakness, head tilt and walking in circles). In fact, high postnatal mortality rates were observed from days 3 to 30 pp in all infected groups, ranging from 76% in G5 (10²) to 100% in G2 (10⁵). Mortality in G2 (10⁵) was significantly higher in comparison to G3 (10⁴) ($P < 0.01$), G4 (10³) ($P < 0.001$) and G5 (10²) ($P < 0.0001$), and the mortality in G1 (2x10⁶) was significantly higher than in G5 (10²) ($P < 0.05$). No clinical signs nor death were detected in the offspring of the uninfected group (G6) throughout the experiment. Survival curves showed that in G5 (infected with 10² tachyzoites) survival was significantly higher than in all the other infected groups (G1-G4; $P < 0.01$) (Fig. 3A). In

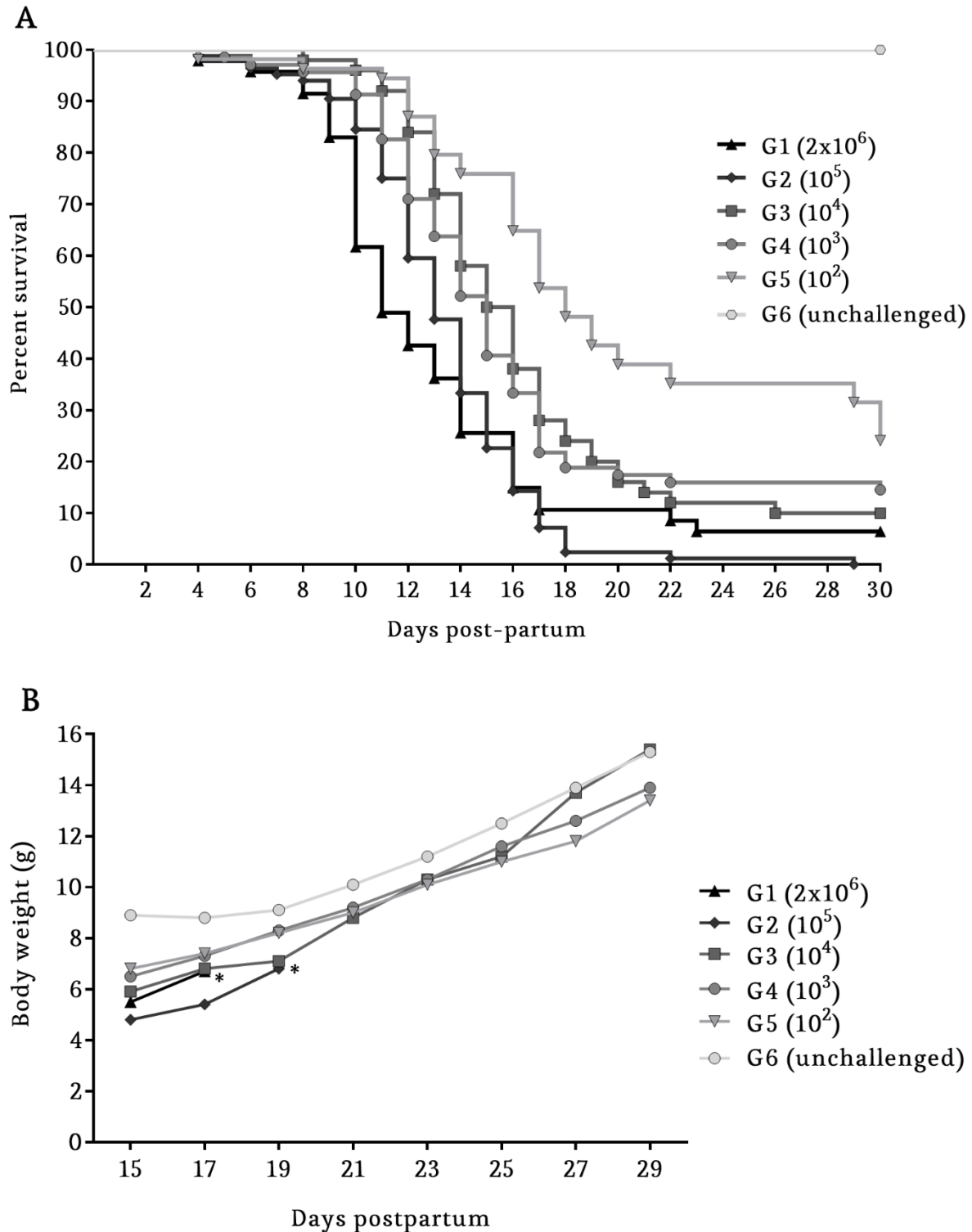
addition, groups infected with the highest doses (G1 -2x10⁶- and G2 -10⁵-) exhibited a significantly lower offspring survival rate compared to the remaining infected groups (G3-G5) ($P < 0.01$).

Data for monitoring the body weights of pups (starting at day 15 pp) in G1 (2x10⁶) and G2 (10⁵) came from only one litter from day 17 and 19 pp onwards, respectively, and therefore these groups were excluded from statistical analysis. Bearing this in mind, the offspring of the uninfected group (G6) showed significantly higher body weights than those from the infected groups G3 (10⁴) at days 15, 17 and 19 pp; G4 (10³) at day 15 and 17 pp; and G5 (10²) at days 15, 17, 19, 23, 25, 27 and 29 pp (Fig. 3B).

3.2.2. Vertical transmission

Detection of vertical transmission ran in parallel to postnatal mortality. *Neospora* DNA was only detected in 4/10 and 3/13 surviving pups from the groups inoculated with 10³ (G4) and 10² (G5) tachyzoites, respectively. All but one of these PCR-positive surviving pups exhibited clinical signs at 30 days pp.

Figure 3 - Effect of *N.caninum* Nc-Spain7 isolate inoculation in the offspring. (A) Kaplan–Meier survival curves for neonates born from dams infected on day 7–10 of pregnancy with 2×10^6 (G1), 10^5 (G2), 10^4 (G3), 10^3 (G4) and 10^2 (G5) tachyzoites from the *N. caninum* Nc-Spain7 isolate and the uninfected group. Each point represents the percentage of surviving animals at that day and downward steps correspond with observed deaths. **(B)** Body weight progression of neonates born from dams infected on day 7–10 of pregnancy with 2×10^6 (G1), 10^5 (G2), 10^4 (G3), 10^3 (G4) and 10^2 (G5) tachyzoites from the *N. caninum* Nc-Spain7 isolate and the uninfected group. Each point represents the average body weight of all animals per group (an asterisk denotes data obtained from a sole litter that had pup/s which did not succumb to infection. These data were therefore not considered for the statistical analyses).



3.3. Evaluation of *N. caninum* infection in non-pregnant mice

3.3.1. Morbidity and mortality

In contrast to pregnant mice, only non-pregnant mice infected with the highest doses (2×10^6 -G1- and 10^5 -G2-) displayed clinical signs. However, in general, these were more severe than those from pregnant mice, since all but one of the non-pregnant mice from G1 and G2 showed severe loss of body condition and nervous signs (mainly lethargy, walking in circles and head tilt). As a consequence, these mice had to be euthanized between days 28 and 35 pi (Additional file 2A). Moreover, significantly lower body weights were recorded 4 weeks pi in G1 (2×10^6) ($P < 0.0001$) and G2 (10^5) ($P < 0.01$) compared to the uninfected group (G6) (Additional file 2B). On the other hand, mice from the remaining groups showed no clinical signs throughout the experiment other than a small ulcerated skin lesion in the site of inoculation that eventually healed in 1/8 non-pregnant mice from G4 (10^3) and 2/9 from G5 (10^2).

3.3.2. Quantification of cerebral parasite load

Neospora DNA was detected in all infected non-pregnant mice except in 2/9 mice from G5 (10^2). Moreover, no differences were found when comparing parasite burden in the uninfected group (G6) and mice infected with 10^3 (G4) and 10^2 (G5) tachyzoites, nor among infected groups (G1-G5) (Additional file 2C).

Further analysis comparing the cerebral parasite burden in pregnant mice with the parasite load in non-pregnant mice revealed a significant higher number of tachyzoites in the CNS of dams from G3 (10^4) and G4 (10^3) in comparison to the respective groups in non-pregnant mice ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively).

3.3.3. *Neospora*-specific antibody levels in non-pregnant mice

Compared to the unchallenged group (G6), all infected non-pregnant mice elicited

significantly higher levels of both IgG1 and IgG2a, with the exception of one mouse from G5 (10^2) which did not produce IgG1 antibodies. IgG1 levels were found to be significantly lower in G5 (10^2) compared to G1 (2×10^6) ($P < 0.0001$), G2 (10^5) ($P < 0.01$) and G3 (10^4) ($P < 0.05$), and in G4 (10^3) compared to G1 (2×10^6) ($P < 0.001$). IgG2a levels in G5 (10^2) were significantly lower than in G1 (2×10^6) ($P < 0.05$). In addition, when comparing IgG1 and IgG2a levels within groups, mice from G4 (10^3) and G5 (10^2) showed significantly higher IgG2a levels than those of IgG1 ($P < 0.01$) (see Fig. 2B). Finally, IgG1/IgG2a ratio ranged from 1.01 in G1 (2×10^6) to 0.50 in G5 (10^2), being significantly lower in the latter compared to G1 ($P < 0.001$), G2 and G3 ($P < 0.05$).

Further analysis comparing antibody levels between pregnant and non-pregnant mice revealed significant higher IgG1 levels in dams from G2 (10^5), G3 (10^4) and G4 (10^3) ($P < 0.01$) and IgG2a levels in dams from G3 (10^4) and G4 (10^3) ($P < 0.05$) in comparison to those from non-pregnant mice.

4. Discussion

Mice are the most commonly employed *in vivo* experimental model in biomedical research, and this also holds true for studies on neosporosis despite the fact that the most economically relevant *N. caninum* infections occur in cattle. While considerable insights into *Neospora* host-parasite interactions have been gained in mice, results from different laboratories cannot be reliably compared due to variable parameters such as mouse breed, parasite isolates and *in vitro* culture conditions, timing and handling of parasite preparations, inoculation routes and timing of infection, and other experimental settings. In addition, very different outcomes have been observed between non-pregnant and pregnant mice (reviewed in Monney & Hemphill, 2014). BALB/c mice are the most widely employed mouse breed for studies on *Neospora* infection biology (López-Pérez *et al.*, 2010; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2010; Dellarupe *et al.*, 2014b) and as proof-of-concept model for the assessment

of drugs (e.g. Debache *et al.*, 2011; Schorer *et al.*, 2012; Debache & Hemphill, 2012a; Ojo *et al.*, 2014). Most notably, the pregnant BALB/c model has demonstrated various degrees of efficacy for a number of vaccine candidates (e.g. Aguado-Martínez *et al.*, 2009; Debache *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010; Marugán-Hernández *et al.*, 2011; Monney *et al.*, 2012; Rojo-Montejo *et al.*, 2012), and enabled researchers to assess the effects of parasite infection and respective vaccines on both progeny and dams (López-Pérez *et al.*, 2008). Nevertheless, the lack of standardization of this model in different laboratories remains a major obstacle and hinders more efficient research. Therefore, this study was conducted to evaluate the effects of various infectious doses of a virulent *N. caninum* isolate in pregnant and non-pregnant BALB/c mice, with the aim to optimize the handling of the parasite and the challenge dose, and thus to contribute to the refinement and standardization of the BALB/c mouse model for its use in further studies.

The Nc-Spain7 isolate was selected due to its biological traits, as it has been shown to be highly virulent *in vitro* (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2011) and *in vivo* (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2010; 2014; Caspe *et al.*, 2012; Collantes-Fernández *et al.*, 2012; Dellarupe *et al.*, 2014b; Arranz-Solis *et al.*, 2015). Moreover, the timing of parasite culture passage has been acknowledged to play an important role, since attenuation due to prolonged *in vitro* maintenance of *N. caninum* isolates has been previously described (Long *et al.*, 1998; Bartley *et al.*, 2006). In this study, parasites with a low number of passages (15) were employed, which ensured that no, or only minimal, loss of virulence occurred. Besides the “standard” dose for experimental infection of 2×10^6 tachyzoites, inoculations of 10^5 , 10^4 , 10^3 and 10^2 tachyzoites were also assessed, and the outcome of infection was evaluated by measuring morbidity, mortality, cerebral parasite load and humoral immune responses. Surprisingly, the differences between highest and lowest doses were much lower than expected, and we here demonstrate that

experimental infection with as little as 100 tachyzoites could induce high mortality in both dams and offspring.

An important aspect is the manipulation of parasites during inocula preparation. First, parasites were collected from cell cultures when the great majority of tachyzoites were still intracellular, thus assuring optimal invasion capacities (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2011). We have shown earlier that extracellular maintenance of *N. caninum* tachyzoites induces rapid loss of infectivity (Naguleswaran *et al.*, 2003). Thus, all procedures were undertaken rapidly and at low temperature, and mice were infected within 30 min of parasite isolation.

As expected, results obtained in mice inoculated with 2×10^6 tachyzoites showed high levels of morbidity, mortality and cerebral parasite load in both non-pregnant and pregnant mice, confirming the high capacity of the Nc-Spain7 isolate to spread widely, persist in dams, cross the placenta and infect the offspring. This mirrors findings reported in previous studies using the same pregnant mouse model and isolate (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2010; Collantes-Fernández *et al.*, 2012; Dellarupe *et al.*, 2014b), and those employing the virulent isolate Nc-Liv (Marugán-Hernández *et al.*, 2011; Dellarupe *et al.*, 2014b; Pastor-Fernández *et al.*, 2015). Importantly, reduction of tachyzoite numbers by a factor 20 (from 2×10^6 to 10^5) did not alter median survival time, parasite burden and immune responses in both pregnant and non-pregnant mice, and was still causing 100% of pup mortality until day 30 pp. Interestingly, even dams infected with lower numbers of tachyzoites were able to transmit the parasite to their offspring, as illustrated by pup mortality rates of 76-90% in the groups infected with 10^2 , 10^3 and 10^4 tachyzoites.

All infected dams and non-pregnant mice elicited a specific humoral immune response, as shown by ELISA. Nevertheless, IgG1 and IgG2a isotypes profiles varied in some groups. Those groups inoculated with lower tachyzoite

numbers (below 10^4 in non-pregnant and 10^2 in pregnant mice) had diminished IgG1 production compared to other groups, whereas IgG2a levels remained similar in all infected groups, which finally lead to an IgG2a biased immune response in those animals infected with a lower tachyzoite numbers. This dose-dependent modulation of the immune response is consistent with previous reports, in which mice administered with low number of parasites appears to degrade the IgG1 response (Lundén *et al.*, 2002; Rojo-Montejo *et al.*, 2012). As reported by Rojo-Montejo *et al.*, (2012), when a high parasite number is administered, a large number of tachyzoites may remain extracellular, eliciting a humoral immune response, while the inoculation of a low number of parasites might lead to the internalization of most of the tachyzoites inside the early antigen presenting cells, enhancing a cell-mediated immunity.

The cerebral parasite burden in infected mice was determined by real time PCR, in most cases at 4-6 week pi. Remarkably, all groups infected with 10^3 up to 10^6 tachyzoites exhibited similar parasite loads, irrespective of the infection dose. Only in the mice infected with 100 tachyzoites parasite loads were consistently lower. These data correlate with the nervous signs, which were more frequently observed in mice inoculated with 2×10^6 to 10^3 tachyzoites. Also in earlier studies increased infection in the brain was associated with the appearance of neurological symptoms (Long *et al.*, 1998; Collantes-Fernández *et al.*, 2006b; López-Pérez *et al.*, 2008). In the group infected with 100 tachyzoites, two dams were found to be PCR-negative, but vertical transmission also occurred in these two PCR-negative dams, since their pups died and parasites were detected in pup brain samples. These findings suggest that tachyzoites rapidly disseminate following infection, cross the placenta and reach foetal tissues, while crossing the blood brain barrier might be a more time-consuming undertaking, and could also be impaired by the low numbers of tachyzoites injected. The

IgG2a-dominated antibody profile is suggestive for a more Th1-biased cellular immune response, which could also prevent tachyzoite proliferation in dams and limit the number of tachyzoites reaching the brain. However, more investigations on cytokine expression profiles are needed to clarify this point.

Although non-pregnant mice infected with 2×10^6 and 10^5 tachyzoites displayed severe signs of neurological disease at an even higher number than dams, no clinical signs were noted and good body condition without significant weight loss was maintained in those animal infected with the lower doses. Thus, infection with a lower number of tachyzoites (10^4 – 10^2) renders non-pregnant mice clearly less susceptible to disease compared to pregnant mice. This was consistent with the data on cerebral parasite burden, which was higher in pregnant mice compared to non-pregnant mice inoculated with 10^3 and 10^4 tachyzoites. This is probably due to the immune modulation that occurs during pregnancy (Aguado-Martínez *et al.*, 2009; Pastor-Fernández *et al.*, 2015). Differences in antibody responses in pregnant versus non-pregnant mice were also detected: higher IgG2a and (more markedly) IgG1 levels in pregnant mice are indicative for a predominantly humoral immune response. This rather Th2-driven immune response in pregnant mice protects foetal viability, with the caveat of a less efficient immune response against an invading pathogen. However, upon infection with 2×10^6 and 10^5 tachyzoites, even non-pregnant mice suffered severe clinical signs and exhibited similar parasite burden in the brain.

In summary, we hereby describe the outcome of *Neospora* infection in a pregnant BALB/c mouse model by performing experimental infections using different numbers of tachyzoites of the virulent Nc-Spain7 isolate. We found that an infectious dose of 10^5 tachyzoites, cultured and isolated *in vitro* under defined conditions and administered subcutaneously, was sufficient to maintain 100% of infection in pregnant and non-

pregnant mice, vertical transmission and high mortality in non-pregnant mice, dams and pups. This infectious dose is 20 times lower than the 2×10^6 tachyzoites usually applied by most researchers in the field. In addition, experimental infection with only 100 tachyzoites is sufficient to cause significant rates (76%) of postnatal mortality in pups during the first 30 days after birth, but leaves dams relatively unaffected. This clearly mimics a more realistic scenario in terms what would happen in pregnant cattle infected with this parasite. In terms of use of this model for vaccine development and/or drug design, it becomes evident that most studies have been carried out with an exceedingly high challenge dose that no immune system could have controlled, hence the number of promising vaccine and drug candidates has remained consistently low. Future studies should be carried out using lower infection doses, which will then allow to obtain more accurate and realistic conclusions in such studies. This work may lay the foundations for the refinement of a standardized *Neospora* pregnant mouse model, which might be used widespread by different research groups for further assessments of drug or vaccine candidates against neosporosis.

Author contributions

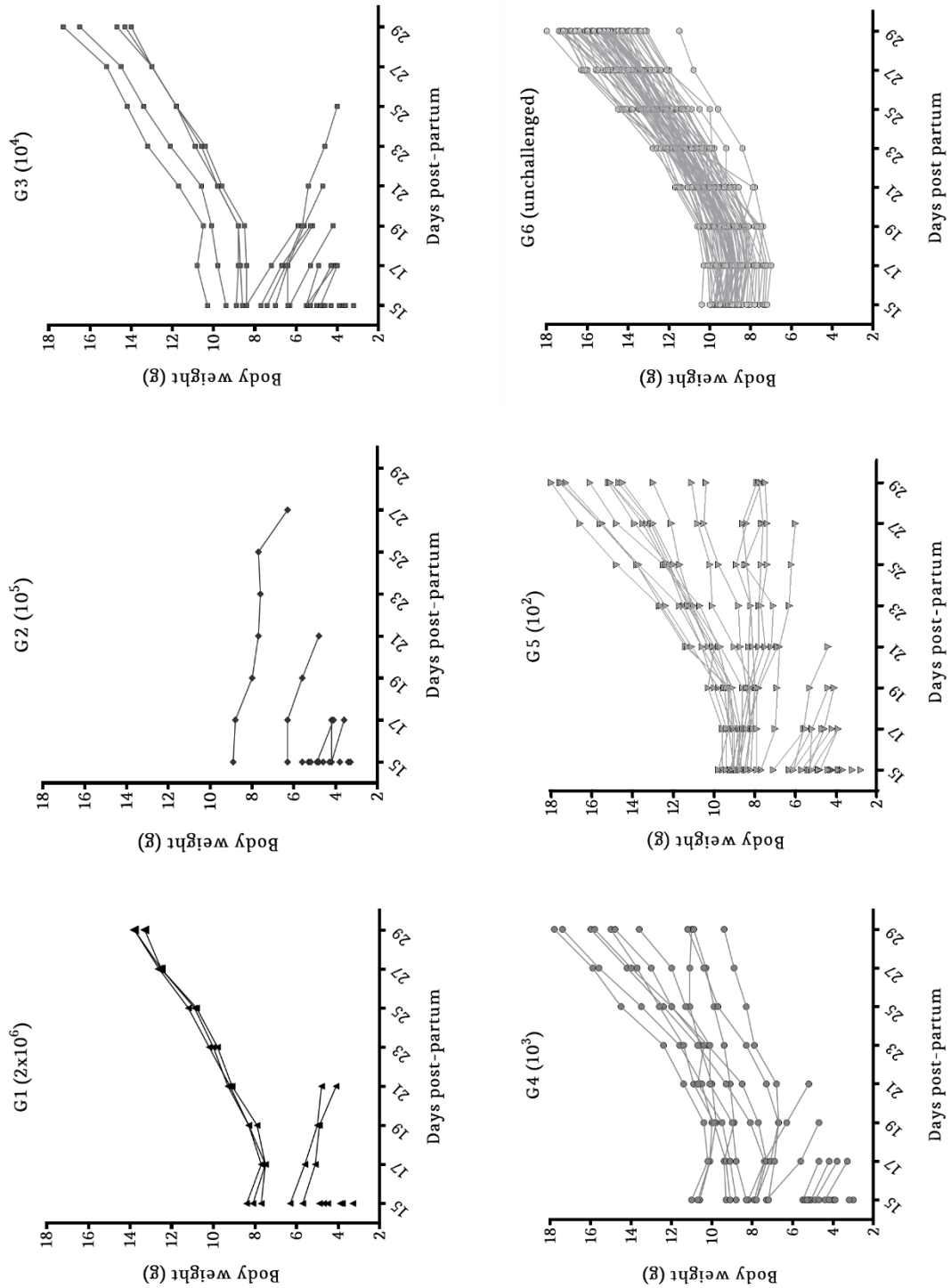
LMOM and AH conceived and designed the experiments. DAS and AAM prepared the inocula, carried out the infections and participated in clinical examination of the animals, necropsies and sampling. DAS and JM performed PCR. DAS performed serological assays, statistical analysis and interpreted the results. DAS wrote the paper, with results interpretation and discussion inputs from AAM, JRC, LMOM and AH. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge Myriam Siffert (Institute of Pathology, Vetsuisse Faculty, University of Bern) and Vreni Balmer (Institute of Parasitology) for their excellent technical

assistance. David Arranz Solís was supported by a fellowship from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO), as part of the training researcher staff programme (FPI, grant number BES-2011-043433) and a mobility grant for pre-doctoral short stays in R + D centres (EEBB-I-14-08002). This work was supported by the AGL2010-22191/GAN grant from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) and the Swiss National Science Foundation (SNSF; grant number 310030_146162).

Additional file 1 - Individual body weight progression of neonates. Each point represent individual body weights of surviving pups from day 15 pp onwards for G1-G6 (see legends).



Objetivo 2

Caracterización de la infección experimental por *N. caninum* en la oveja durante los tres tercios de gestación

N. caninum se considera como una de las principales causas de aborto en el ganado bovino, aunque estudios recientes han mostrado que este parásito representa un elevado riesgo de aborto también en pequeños ruminantes. En este segundo objetivo, se pretendió profundizar en el conocimiento de la patogenia y de la respuesta inmunitaria en la neosporosis ovina, así como desarrollar un nuevo modelo de neosporosis basado en esta especie como alternativa al modelo bovino. Para ello, se inocularon ovejas gestantes por vía intravenosa en los tres tercios de gestación (días 40, 90 y 120 de gestación) con 10^6 taquizoítos del aislado Nc-Spain7. Se estudiaron, tanto las consecuencias clínicas de la infección, lesiones y distribución del parásito (Sub-objetivo 2.1), como la respuesta inmunitaria local y periférica (Sub-objetivo 2.2) en esta especie doméstica.

La infección durante el primer tercio de gestación causó la muerte fetal en todos los animales inoculados entre los días 19 y 21 pi. El examen de los fetos y la placenta mostró principalmente lesiones necróticas en el hígado fetal y una alta detección y carga parasitarias tanto en la placenta como en los diversos órganos fetales. En la placenta, el análisis inmunohistoquímico demostró la presencia del parásito en la parte fetal de la misma, mientras que el escaso infiltrado de células inflamatorias se localizó, principalmente, en la parte materna. En el suero, existió una producción temprana de IFN- γ previa a la de anticuerpos IgG específicos. Por su parte, el análisis de la expresión de citoquinas en la placenta reveló una respuesta mixta de tipo Th1 y Th2, con una fuerte expresión de IFN- γ e IL-4 seguido de niveles más moderados de TNF- α e IL-10, mientras que la expresión de TGF- β estuvo disminuida.

Tras la infección en el día 90 de gestación, también se produjo muerte fetal en todos los animales, aunque ésta se detectó de forma más tardía (días 34-48 pi). En este grupo, las lesiones fueron, principalmente, de tipo inflamatorio, siendo el hígado fetal el que mostró la frecuencia más baja de lesiones, detección y carga parasitaria. En la placenta, el parásito fue detectado en menor cantidad y principalmente en forma de antígeno particulado, mientras que las lesiones fueron mucho mayores en extensión y gravedad, estando frecuentemente asociadas a un infiltrado inflamatorio. La respuesta periférica fue similar al primer tercio, aunque los niveles de IFN- γ fueron menores. La expresión de citoquinas en la placenta mostró un patrón muy similar al del primer tercio, aunque de menor intensidad y mostrando, además, un ligero aumento en los niveles de IL-12 e IL-6 que no se observaron en otro periodo.

Por su parte, todas las ovejas infectadas en el último tercio de gestación parieron corderos viables, aunque 3/9 nacieron antes del día 145 de gestación y mostraron signos de

debilidad y postración. Se produjo la transmisión vertical en todas las ovejas infectadas, siendo la carga parasitaria en los corderos similar a la observada en el grupo infectado en el segundo tercio de gestación. Sin embargo, las lesiones en este grupo mostraron un patrón inflamatorio más evidente y una frecuencia más alta en el cerebro y músculo fetal en comparación con los otros dos grupos. En la placenta, las lesiones fueron similares a las observadas en el segundo tercio, aunque el infiltrado de células inflamatorias fue mucho menor. El análisis serológico mostró una menor y más tardía producción de IFN- γ e IgG, lo que sugiere una menor estimulación producida por el parásito en este periodo. En la placenta, se observaron valores de IL-4 similares a los de IFN- γ , al contrario que en los otros dos grupos donde los niveles de ARNm de IFN- γ fueron más elevados. En este periodo, y al contrario que en los otros dos grupos, no se observó un incremento de la expresión de IL-10 ni una disminución de los niveles de TGF- β .

Por último, cabe destacar que no se observaron incrementos significativos en los niveles de IL-4 en suero ni de la expresión de TLR2 o TLR4 en la placenta de ningún grupo. Además, cuando se analizó la población de células inflamatorias en la placenta de los diferentes grupos, los linfocitos B (CD79+) fueron detectados en muy baja cantidad, sin mostrar diferencias entre animales infectados y no infectados. Además, aunque el infiltrado inflamatorio varió en intensidad entre los grupos, en todos ellos consistió principalmente en LT CD8+ y, en menor medida, LT CD4+ y macrófagos (CD163+).

Estos resultados ponen de manifiesto que las consecuencias de la infección dependen en gran medida del momento de la gestación en el que se produzca ésta, de forma similar a lo que ocurre en el ganado bovino. Además, parece que el aborto tras la infección en el primer tercio es debido principalmente a la multiplicación incontrolada del parásito en el feto, mientras que el aborto en el segundo tercio se produce probablemente como consecuencia de las graves lesiones desarrolladas en la placenta. Por otra parte, el corto espacio de tiempo transcurrido entre el momento de la infección en el tercer tercio hasta el nacimiento podría haber evitado la producción del aborto por la lesión de la placenta. Finalmente, aunque muy similares, existen diferencias puntuales entre el modelo ovino y los modelos bovinos de neosporosis estudiados hasta el momento. Éstas incluyen una mayor probabilidad de aborto en el segundo tercio de gestación, así como niveles más bajos de IL-12 y una mayor expresión de células CD8+ en placenta en el caso de la oveja. A pesar de ello, la oveja representa un modelo apropiado de transmisión transplacentaria exógena de la neosporosis en rumiantes, sirviendo como una buena alternativa al modelo bovino. En este sentido se propone un nuevo modelo ovino basado en la inoculación intravenosa de 10^6 taquizoítos del aislado Nc-Spain7 en el día 90 de gestación. En dicho modelo se produce el aborto en todos los animales inoculados, pero en un entorno menos agresivo para el feto en comparación con la inoculación en el día 40 de gestación, debido al desarrollo de la respuesta inmunitaria materno-fetal en este periodo. Por lo tanto, el modelo propuesto permitiría evaluar la eficacia de fármacos y vacunas frente a la transmisión transplacentaria y el aborto en un modelo de rumiante.

Sub-objective 2.1

Influence of the gestational stage on the clinical course, lesional development and parasite distribution in experimental ovine neosporosis

David Arranz-Solís^{1†}, Julio Benavides^{2†}, Javier Regidor-Cerrillo¹, Miguel Fuertes², Ignacio Ferre¹, Maria del Carmen Ferreras², Esther Collantes-Fernández¹, Andrew Hemphill³, Valentín Pérez² and Luis Miguel Ortega-Mora^{1*}

† Equal contributors

¹ SALUVET, Animal Health Department, Faculty of Veterinary Sciences, Complutense University of Madrid, Ciudad Universitaria s/n, Madrid, 28040, Spain

² Livestock Health and Production Institute (ULE-CSIC), León, 24346, Spain

³ Institute of Parasitology, Vetsuisse Faculty, University of Bern, Bern, CH-3012, Switzerland

* Corresponding author: Luis M Ortega-Mora (luis.ortega@ucm.es)

Running title: *N. caninum* experimental infection in pregnant ewes



Published in *Veterinary Research* (3 March 2015) 46:19. DOI 10.1186/s13567-014-0139-y.

Presented as oral communication in the *2nd Apicowplexa* international meeting, 2013 (25th-28th October, Kusadai, Turkey).

RESEARCH

Open Access

Influence of the gestational stage on the clinical course, lesional development and parasite distribution in experimental ovine neosporosis

David Arranz-Solís^{1†}, Julio Benavides^{2†}, Javier Regidor-Cerrillo¹, Miguel Fuertes², Ignacio Ferre¹, Maria del Carmen Ferreras², Esther Collantes-Fernández¹, Andrew Hemphill³, Valentín Pérez² and Luis Miguel Ortega-Mora^{1*}

Abstract

Neospora caninum is considered one of the main causes of abortion in cattle, yet recent studies have also emphasised its relevance as an abortifacient in small ruminants. In order to gain deeper insight into the pathogenesis of ovine neosporosis, pregnant ewes were intravenously inoculated with 10⁶ tachyzoites of the Nc-Spain7 isolate at days 40, 90 or 120 of gestation. Infection during the first term resulted in the death of all foetuses between days 19 and 21 post-infection, showing mainly necrotic lesions in foetal liver and the highest parasite DNA detection and burden in both placenta and foetal viscera. After infection at day 90, foetal death was also detected in all ewes, although later (34–48 days post-infection). In this group, lesions were mainly inflammatory. Foetal livers showed the lowest frequency of lesions, as well as the lowest parasite detection and burden. All ewes infected at day 120 delivered viable lambs, although 3 out of 9 showed weakness and recumbency. *Neospora* DNA was detected in all lambs but one, and parasite burden was similar to that observed in day 90 group. Lesions in this group showed more conspicuous infiltration of inflammatory cells and higher frequency in foetal brain and muscle when compared to both previous groups. These results highlight the crucial role that the stage of gestation plays on the course of ovine neosporosis, similar to that reported in bovine neosporosis, and open the doors to consider sheep as a valid model for exogenous transplacental transmission for ruminant neosporosis.

1. Introduction

Neospora caninum (Apicomplexa: Eimeriina: Sarcocystidae) is an obligate intracellular parasite, which is regarded as one of the most important infectious causes of abortion in cattle worldwide (Dubey & Schares, 2011). Since its discovery, *N. caninum* has been identified in various species of livestock, including cattle, sheep, goats, horses and deer (Dubey *et al.*, 2007a). Cattle can become infected by horizontal transmission via the ingestion of oocysts, or by vertical transmission (i.e. transplacentally) as a result of either a

primary infection of the dam by oocysts (exogenous transplacental transmission) or recrudescence of a chronic infection (endogenous transplacental transmission) during pregnancy, with different clinical and epidemiological consequences (Williams *et al.*, 2009).

Although cattle represent the most relevant and economically important target host, the presence of *Neospora* infection and transplacental transmission in small ruminants have been previously reported. In sheep, naturally occurring *N. caninum*

transmission was first described in a congenitally infected lamb (Dubey *et al.*, 1990). Subsequently *N. caninum* infections in sheep have been reported worldwide (Kobayashi *et al.*, 2001; West *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2012; González-Warleta *et al.*, 2014). Nevertheless, *Toxoplasma gondii* is regarded as the primary parasite cause for both sheep and goat abortion (Dubey & Schares, 2011; Moreno *et al.*, 2012; González-Warleta *et al.*, 2014), and the epidemiological, clinical and economic importance of neosporosis in small ruminants has been traditionally considered to be much less relevant compared to cattle (Buxton, 1998; Givens & Marley, 2008). However, recently acquired evidence suggests that *N. caninum* is an important abortifacient in small ruminants (Moreno *et al.*, 2012), or even the main cause of reproductive losses in some flocks (West *et al.*, 2006; González-Warleta *et al.*, 2014).

Despite the obvious significance of ruminant neosporosis, there are still many aspects that require further studies, such as host-pathogen interactions, pathogenicity and immunological control. Previous experimental infections in pregnant ewes have shown that sheep are highly susceptible to infection, and display a similar pathogenesis and disease outcomes as reported for cattle (McAllister *et al.*, 1996; Buxton *et al.*, 1998; Weston *et al.*, 2009). It has been suggested that the time point of infection during gestation plays a key role in the pathogenesis of the disease (Dubey & Lindsay, 1990; McAllister *et al.*, 1996; Buxton *et al.*, 1997; 1998; 2001; Jenkins *et al.*, 2004b; Weston *et al.*, 2009). However, it is complicated to compare the results from these studies, as they differ in experimental design, parasite isolate and infection dose, route of administration and time point of infection. Moreover, there are not reports on the outcomes of infection during different pregnancy periods within the same study and under the same experimental conditions. Clearly, the availability of well-defined ruminant infection models is a key factor for the evaluation of vaccine and drug candidates

(Benavides *et al.*, 2014). As an experimental animal model, sheep exhibit several advantages over cattle, including size, length of gestation and cost. Therefore, the aim of this study was to investigate the outcome of experimental infection by *N. caninum* in ewes under standardized conditions at an early, mid-term and late period of gestation. This allowed to evaluate the effect of the gestation period on the clinical course of disease, lesion development and parasite distribution in different organs, and to assess the validity of experimental infection in sheep as a model for exogenous transplacental transmission for ruminant neosporosis.

2. Material and methods

2.1. Ethics statement

All protocols involving animals were approved by the Animal Welfare Committee of the Livestock Health and Production Institute (IGM, ULE-CSIC), León, Spain, following proceedings described in Spanish and EU legislations (Law 32/2007, RD 1201/2005, and Council Directive 2010/63/EU). All animals used in this study were handled in strict accordance with good clinical practices and all efforts were made to minimize suffering.

2.2. Animals and experimental design

Animals used in this study came from the *Churra* sheep breed flock of ULE-CSIC, which is kept in dedicated animal facilities and free of *N. caninum* infection or any other abortifacient agent. Fifty pure *Churra* breed sheep aged 12 months were selected after checking by ELISA their seronegativity for *T. gondii*, *N. caninum*, Border disease virus (BDV), *Coxiella burnetii* and *Chlamydophila abortus*. These sheep were oestrus synchronized and mated with pure breed *Churra* tups for 2 days, after which the rams were removed from the ewes. Pregnancy and foetal viability were confirmed by ultrasound scanning (US) on day 40 after mating, and twenty-nine pregnant sheep were selected for the experiment.

Pregnant sheep (n=29) were randomly distributed into five experimental groups. Twenty ewes were allocated in groups 1 (G1; n=6), 2 (G2; n=7) and 3 (G3; n=7), which were inoculated intravenously (IV) with 10^6 culture-derived tachyzoites of the Nc-Spain7 bovine isolate (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2008) at day 40 (G1), 90 (G2) or 120 (G3) of gestation (dg), respectively. The nine remaining sheep were allocated in groups 4 (G4; n=6) and 5 (G5; n=3) as controls of infection and pregnancy, respectively. Two animals from G4 and one from G5 received an IV inoculum of phosphate buffered saline (PBS) at each time point of infection (day 40, 90 or 120), thus two negative controls animals and one sentinel control were available for each time point. Ewes from G4 were culled at the average time points when abortion took place in their respective group, providing a negative control for further analyses (see below), and ewes from G5 were kept alive until the end of the experiment (Table 1).

2.3. Parasites

Tachyzoites of the Nc-Spain7 isolate were routinely maintained in cultured MARC-145 cells as described previously (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2008). The experiment was carried out using similar parasite passage numbers in MARC-145 cells cultures for all three days of inoculation (passage No. 12 for G1, No. 8 for G2 and No. 11 for G3). Inocula were prepared as

described previously (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2010). Briefly, tachyzoites were recovered from culture flasks when they were still largely intracellular and at least 80% of the parasitophorous vacuoles were undisrupted. Tachyzoite numbers were determined by Trypan blue exclusion followed by counting in a Neubauer chamber, and parasites were resuspended in PBS at the required dose of 10^6 tachyzoites in a final volume of 2 ml. Tachyzoites were administered to ewes within 30 min of harvesting from tissue culture.

2.4. Clinical monitoring and collection of samples

Following experimental infection, ewes were observed daily throughout the entire experimental period. Foetal viability was assessed by the transabdominal ultrasonography (US) monitoring of foetal heartbeat and movements. All ewes were checked upon once weekly for the two first weeks post-infection (pi), and then twice weekly until detection of foetal death. When foetal death occurred, or immediately after parturition, dams and lambs were first sedated with xylazine -Rompun- (Bayer, Mannheim, Germany) and then immediately euthanized by an IV overdose of embutramide and mebezonium iodide -T61- (Intervet, Salamanca, Spain). Animals from G4 were culled at 20 days post-inoculation (dpi) for G1, 40 dpi for G2 and at parturition for G3.

Table 1 - Experimental design.

Group	Number of pregnant ewes	Number of fetuses/lambs	Days of gestation at the time of inoculation	Inoculum (IV)	Animal euthanasia ^a
G1	6	11	40	Nc-Spain7, 10^6 tachyzoites	Yes
G2	7	12	90	Nc-Spain7, 10^6 tachyzoites	Yes
G3	7	9	120	Nc-Spain7, 10^6 tachyzoites	Yes
G4	6	9	40-90-120 ^b	PBS	Yes ^b
G5	3	4	40-90-120 ^c	PBS	No ^c

IV: intravenous route.

^a animals were culled when foetal death was detected or immediately after parturition.

^b in G4, 2 ewes correspond to each period of inoculation (40, 90 and 120), and were culled at the average day of abortion of each group (i.e. 20 dpi for G1 and 40 dpi for G2) or at parturition (for G3).

^c in G5, 1 ewe corresponds to each period of inoculation (40, 90 and 120). All three ewes gave birth to healthy lambs and were kept alive until the end of the experiment.

Animals from G5 were examined once per month for pregnancy by US, from the sixth week until lambing, and ewes were kept alive.

Post-mortem examination of the ewes and lambs was carried out immediately after euthanasia, and foetuses were immediately separated from the placenta. Samples for serological, histological and molecular studies were collected as follows: blood samples were taken on the day of necropsy by jugular vein-puncture in Vacutainer tubes (Becton Dickinson and Company, Plymouth, UK) without anticoagulant and were allowed to clot. Serum was obtained by centrifugation and samples were stored at -80°C until analysis. After necropsy, five randomly selected placentomes were recovered from each placenta and were transversally cut in slices of 2-3 mm of thickness that were distributed for storage in 10% formalin for histopathological examinations, and the rest of the placentomes were stored at -80°C for further parasite DNA detection by PCR. Brain (one half at -80°C and one half in 10% formalin) and iliofemoral (uterine) and mesenteric lymph nodes from dams were collected for PCR and histopathological analysis. Foetal tissues (brain, heart, liver, lungs and a portion of semitendinosus skeletal muscle) were stored at -80°C for DNA extraction and fixation in 10% formalin. Foetal thoracic and abdominal fluids or precolostral serum were also collected and maintained at -80°C for serology. To prevent any transmission of colostral antibodies from dams, lambs were separated from their mothers immediately after birth, sampled for blood and euthanized. In order to avoid any accidental suckling from lambs born overnight, udders were covered with a piece of cloth one week before the expected date of delivery as a preventive measure.

2.5. Serological analyses: IFAT

Indirect fluorescent antibody test (IFAT) was used to detect specific IgG anti-*Neospora* antibodies in foetal fluids, precolostral sera, and sera from dams, according to the technique

previously described by Álvarez-García *et al.* (2003). Foetal fluids, precolostral sera and sera from dams were diluted at two-fold serial dilutions in PBS starting at 1:8 (for foetal fluids and precolostral sera) and 1:200 (for sera from dams), up to the end point titre. Unbroken tachyzoite membrane fluorescence at a titre ≥ 8 for foetal fluids or precolostral sera and ≥ 200 for sera from dams was considered a positive reaction.

2.6. Histopathology and lesion scoring

After fixation in formalin for five days, maternal and foetal brains were cut coronally, embedded in paraffin wax, and were processed, with the rest of the samples, by standard procedures for haematoxylin and eosin (HE) staining. Conventional histological evaluation was carried out on all the sections. To quantify the lesions in the foetal viscera and placenta, the number and size of necrotic foci, as well as the total area of lesion in the examined tissue were calculated in HE stained sections. Necrotic lesions were chosen over inflammatory ones because the former were found in all the foetuses and placentas examined while the latter were found mainly in G2 and G3. In addition, necrotic lesions are more clearly demarcated than inflammatory ones. The number of sections studied varied according to the stage of gestation. Older foetuses had larger organs (brain and liver) and therefore more samples were evaluated in these cases: in the placenta, one section from each one of the five placentomes per placenta was studied; in the foetal liver, one section from one or two different samples; and in the foetal brain, one section from one, two or three different samples. Although lesions were found in other organs (i.e. lung, heart or skeletal muscle), brain and liver were the only ones showing lesions simultaneously in all three periods studied and were therefore the only ones to be evaluated by lesional scoring. Firstly, necrotic foci in each section were counted under the microscope. Subsequently, in order to compare between organs and animals, the total number of foci per

square centimetre of studied tissue was calculated. The measurement of the total area studied (TAS) is explained in the next paragraph.

A computer-assisted morphometric analysis using imageJ software (Schneider *et al.*, 2012) was carried out to calculate the areas. Digital photomicrographs from each focus of necrosis at the placenta, liver and brain were taken at 10× magnification with a calibrated Motic 2 digital camera fitted to a BA310E Motic microscope. In the digital pictures, the perimeter of each necrotic focus was traced manually and measured automatically by the software, previously calibrated to the adequate magnification. Once every focus was measured, the average size of focus (ASF) for the placenta, liver and brain was calculated. The total area of lesion (TAL) in the placenta was calculated adding up the area of each focus found in the five placentomes studied per animal. TAL in the foetal brain and liver were similarly calculated, adding up the area of each individual lesion found in every section available from each organ.

For calculating the TAS, digital photographs of the whole section were taken with the same camera fitted to a macro tube and a focusable lens. TAS measurement was done through imageJ software as well. Instead of manually tracing the area, and in order to avoid the inclusion of empty areas into the measured area such as ventricles in the nervous organs or cutting artefacts, a thresholding detection procedure and automatic measurement was applied. Briefly, the colour picture was converted to 8-bit greyscale and the threshold was manually adjusted to detect any region containing tissue sections (grey to black in colour), excluding the empty areas (white). Then, the area of the threshold regions in the picture was automatically measured by the software, previously calibrated. When more than one section was available from the same organ (i.e. two or three samples of liver or brain from the same foetus), TAS was calculated adding up the TAS of each section.

Finally, the percentage of the section affected by lesions (%LES) resulted from the coefficient between TAL and TAS per organ. In order to compare groups, averages of these measurements (i.e. foci/cm², AF and %LES) obtained in the animals of each group were calculated.

2.7. DNA extraction and PCR for parasite detection and quantification in tissues

Genomic DNA was extracted from 50–100 mg of maternal and foetal tissue samples using the commercial Maxwell® 16 Mouse Tail DNA Purification Kit, developed for automated Maxwell® 16 System (Promega, Wisconsin, USA), following the manufacturer's recommendations. The concentration of DNA for all samples was determined by spectrophotometry and adjusted to 50–100 ng/μl.

Parasite DNA detection was carried out by a nested PCR adapted to a single tube from the internal transcribed spacer (ITS1) region of *N. caninum*, using the external primers TgNN1-TgNN2 and internal primers NP1-NP2 as previously described (Buxton *et al.*, 1998; Hurtado *et al.*, 2001; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014). Each reaction was performed in a final volume of 25 μl with 5 μl of sample DNA. PCR was carried out in five samples of the placentomes and three samples from the rest of tissues, except for the heart, lung and semitendinosus muscle from fetuses or lambs, in which either one, two or three samples were analysed. To avoid cross-contamination and false positive reactions, DNA extraction, PCR sample preparation and electrophoresis were performed in separate rooms employing different sets of instruments, aerosol barrier tips and disposable gloves. Moreover, both reactions without a template and DNA samples from the foetal-control group (G4) were included in each round of DNA extraction and PCR as negative controls. Positive PCR controls with *N. caninum* genomic DNA equivalent to 10, 1 and 0.1 tachyzoites in 100 ng of sheep DNA were also included in each batch of

amplifications. Ten μl aliquots of the PCR products were visualized under UV light in 1.5% agarose/ethidium bromide gel to detect the *N. caninum*-specific 247 bp amplification product.

Placenta and foetal brain and liver samples that had tested positive by nested-PCR were adjusted to 20 ng DNA/ μl and the parasite load was quantified using real-time PCR. Primer pairs from the *N. caninum* Nc-5 sequence (Collantes-Fernández *et al.*, 2002) were used for parasite quantification, and primers from the β -actin gene (Gutierrez *et al.*, 2012) were used for the quantification of host DNA. Amplification reactions were performed as described by Collantes-Fernández *et al.* (2002), in a final volume of 20 μl using Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 20 pmol of each primer and 100 ng of DNA in a ABI 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems). The *N. caninum* tachyzoite numbers were calculated by interpolating the average Ct values on two standard curves: 1) one curve equivalent to 5×10^5 to 5×10^{-1} tachyzoites with 10-fold serial dilutions in a solution of ovine genomic DNA; and 2) a curve of 320, 160, 80, 40, 20, 10, and 5 ng of genomic DNA for ovine DNA quantifications. Parasite numbers in tissue samples (parasite burden) was expressed as parasite number/mg ovine tissue. Standard curves for *N. caninum* and sheep DNAs showed an average slope of -3.38 and -3.34, respectively, and a $R^2 > 0.99$.

2.8. Statistical analysis

Occurrence of foetal death was analysed by the Kaplan–Meier survival method. Foetal survival curves of the infected groups were then compared by the Log-rank (Mantel-Cox) test. When statistically significant differences were found, Tukey's Multiple Range test was applied to examine all possible pairwise comparisons at each sampling time. Differences in PCR detection of parasite DNA were evaluated using the χ^2 or Fisher exact *F*-test. Differences in parasite burdens and histological scoring were analysed using the

non-parametric Kruskal–Wallis test followed by Dunn's test for comparisons between groups, and the Mann–Whitney test for pairwise comparisons. Statistical significance for all analysis was established at $P < 0.05$. For statistical analysis, sentinel animals (G4) were mixed and considered as a unique control group. All statistical analyses were carried out using GraphPad Prism 5.0 software.

3. Results

3.1. Clinical observations

Foetal death was detected by US in all ewes (100%) from groups G1 (infection at 40 dg) and G2 (infection at 90 dg), although foetal death occurred significantly earlier in G1 (19–21 dpi) compared to G2 (34–48 dpi) ($P < 0.001$). In contrast, all ewes from G3 gave birth to a total of nine viable lambs between 142 and 155 dg. Three of 9 lambs were born prematurely prior to day 145, and exhibited weakness, recumbency and unresponsiveness to external stimuli. Foetal death was not detected in control groups; dams from the pregnancy control group (G5) gave birth to healthy lambs between 147 and 150 dg, and fetuses from the negative control group (G4) remained alive just before the euthanasia of their dams on day 20 pi (day 40 group), 40 pi (day 90 group) and at parturition (day 120 group).

3.2. *Neospora*-specific IgG responses

Neospora-specific IgG responses were analysed by IFAT in foetal fluids, precolostral sera and sera from dams collected immediately before necropsy and are summarized in Table 2. Individual values for each dam and foetus/lamb studied are detailed in Additional file 1. Seropositive titres were detected in all infected dams, ranging from 1:1600 to 1:3200 in G1, 1:3200 to 1:6400 in G2 and 1:200 to 1:1600 in G3 (Table 2). Foetal fluids from fetuses of G1 could not be collected due to the very low volume of liquid available. For G2, seropositive titres were detected in those fetuses dying from 42 dpi onwards, ranging from 1:16 to 1:64. Precolostral

sera collected from lambs born after infection at day 120 of gestation (G3), specifically those three born prior day 145 of pregnancy, yielded positive titres ranging from 1:16 to 1:128 (Table 2). Specific IgG responses against parasite antigen were not detected in animals and foetuses/lambs from the two control groups (G4 and G5).

3.3. Pathology and lesion quantification

3.3.1. Gross lesions

At the time of necropsy, detachment of the placenta from the uterus was evident in one animal from G1 and three animals from G2. In G3, placenta and uterus could only be recovered from three animals, while in the remaining four animals from this group placentas were too autolytic when recovered after lambing, rendering proper examination impossible.

In G1, all foetuses examined showed a variable degree of abdominal haemorrhage and subcutaneous oedema (Fig. 1A). One foetus from this group showed multifocal white spots in the lung (1-2 mm of diameter) and liver (of miliary size) (Fig. 1B). No gross lesions were visible in any placenta from this group. In groups G2 and G3 there were macroscopic lesions in the placenta. In two animals, one from each group, multifocal white foci in the cotyledons were visible (Fig. 1C). In three further animals from G2 and one from G3 there were focal aggregations of the cotyledonary villi (Fig. 1D). No macroscopic lesions in any of the foetuses from these two groups were found,

and no foetal lesions were detected in G4 and G5.

3.3.2. Microscopic lesions

The quantification of lesion size and number from placenta as well as foetal liver and brain is shown in Table 3 and Fig. 2. Individual values for each foetus or placental sample studied are detailed in Additional file 2.

3.3.3. Placenta

All the placentas studied from infected animals showed multifocal non-purulent necrotic placentitis characterized by randomly distributed foci of necrosis in the placentome. The only difference between groups was the size and number of necrotic foci. In G1, the foci were well delimited, small (0.05 mm² in average) and affected the caruncular septa of the placentome, causing flattening or loss of the adjacent trophoblasts. The foetal mesenchyme in the vicinity of these foci showed hypercellularity when compared with non-affected regions. Inflammation was not a prominent feature, although occasional accumulation of lymphocytes was found between caruncles and foetal villi. Placentas from G2 showed necrotic foci of similar characteristics but larger (an average of 0.1 mm²) than those in G1 ($P < 0.001$). They were almost exclusively located in the caruncular septa, although the largest could also affect the foetal mesenchyme. A number of these foci showed mineralization of the necrotic core area.

Table 2 - Serological results in dams and foetuses/lambs.

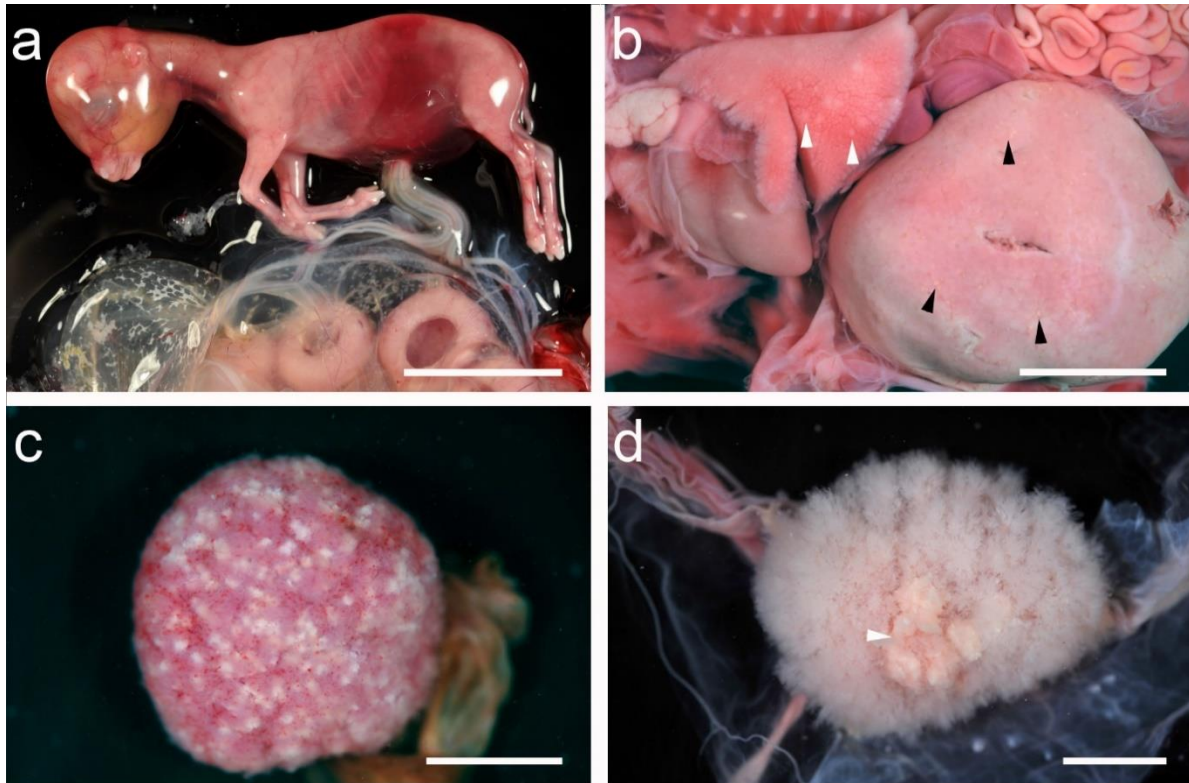
Group	Time of necropsy ^a	No. of dams with the stated sera titre					No. of foetuses/lambs with the stated FL/PCS titre							
		1/200	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	NA	-	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	
G1 (day 40)	19-21 dpi			4	2		11							
G2 (day 90)	34-48 dpi				4	3	3	1	1	1	3	3		
G3 (day 120)	142-155 dg	1	3	3			4	2*	1*		1	1		

^a necropsies were carried out when foetal dead was detected or immediately after parturition.

* lambs prematurely born showing weakness and unresponsiveness.

dpi: days post-infection; dg: days of gestation; NA: not available; FL: foetal liquid; PCS: precolostral serum.

Figure 1 - Macroscopic lesions in fetuses and placentas. (A) haemorrhage in the abdominal region of a non-viable fetus from G1 (infection at 40 dg). Note the absence of gross lesions in the placentomes at the lower part of the image. Bar 3 cm. (B) multiple minute white/yellowish foci of necrosis in the lung (white arrowheads) and liver (black arrowheads) in a non-viable fetus from G1 (infection at 40 dg). Bar: 1 cm. (C) Multiple white foci of necrosis scattered in the surface of a cotyledon from a G2 placenta. Bar: 1.5 cm. d: Aggregation of cotyledonary villi (white arrowhead) in a placenta from G2. Bar: 1.5 cm.



Lesions in G3 placentas were also similar, only larger than those in previous groups (0.3 mm² in average) ($P < 0.001$ for G1 and $P < 0.05$ for G2). Some of the larger foci were made by the coalescence of several, smaller ones. Similarly to the other groups, inflammatory cells were not frequently observed, but when present lymphocytes were mainly distributed along the periphery of the lesion in the foetal mesenchyme (Fig. 3).

When analysing the percentage of damaged area in relation to the whole tissue section, there was a significant difference between placentas from G1 (0.25%) and those from G2 (9.07%) and G3 (5.74%) ($P < 0.001$).

3.3.4. Liver

Lesions were characterized by the presence of multiple foci of coagulative necrosis randomly

distributed in the hepatic parenchyma (Fig. 3). Differences in lesion size and severity were observed between groups. While in fetuses from G1 lesions coalesced forming large areas of necrosis, in G2 and G3 the necrotic foci were individually well-demarcated. Inflammation was not seen in samples from G1, but there was a mild infiltration surrounding the necrotic areas formed mainly by lymphocytes. When comparing the number and size of lesions the groups, it should be highlighted that only two fetuses from G2 had necrotic foci in the liver, while liver lesions were found in all fetuses from G1 and all but 2 in G3. There were no significant differences in the size of lesions when they were present, but the amount increased drastically in G1, which exhibited the highest percentage of affected parenchyma ($P < 0.01$).

Table 3 - Lesion quantification and PCR detection and quantification of *N. caninum* in placenta and foetal liver and brain.

Group	Foetal death (dpi)	Placenta			Liver			Brain					
		No. foci/cm ² (mm ²)	ASF (mm ²)	%LES	PCR ^β	No. foci/cm ² (mm ²)	ASF (mm ²)	%LES	PCR ^β	No. foci/cm ² (mm ²)	ASF (mm ²)	%LES	PCR ^β
G1 (day 40)	19-21	8.2 ^d	0.053 ^d	0.25% ^d	6/6 (7888 ^c)	82.3 ^c	0.041	3.37% ^c	11/11 ^a (6318 ^c)	1.68	0.038	0.05%	11/11 (1697 ^f)
G2 (day 90)	34-48	73.0 ^c	0.113 ^d	9.07% ^c	7/7 (308.5 ^d)	0.2 ^d	0.044	0.02% ^d	5/12 ^b (0.01 ^d)	3.14	0.047	0.18%	10/12 (0.25 ^e)
G3 (day 120)	born*	18.7 ^d	0.304 ^c	5.74% ^c	7/7 (190.8 ^d)	4.2 ^d	0.047	0.16% ^d	4/9 ^b (0.01 ^d)	3.50	0.063	0.25%	6/9 (0.01 ^d)

* All lambs from this group gave birth to viable lambs between days 142 and 155 of gestation.

^a Average values of histological scoring for each group.

^β Fractions represent the number of positive animals/total number of animals checked by nested-ITS1 PCR, and figures within brackets represent the median values of parasite burden (tachyzoites/mg tissue).

^{a, b} Fractions determined for positive animals followed by unlike superscripts differ significantly by Fisher's exact test.

^{c, d} Values followed by unlike superscripts differ significantly by Dunn's test for pairwise comparisons.

dpi: days post infection when abortion occurred; ASF: Average size of focus; %LES: Percentage of section affected by lesions.

3.3.5. Brain

The common lesion in all the groups was multifocal nonpurulent necrotizing encephalitis characterized by the presence of randomly distributed glial foci. While in G1 necrosis was rarely observed, lesions in G2 and G3 were characterized by large necrotic foci surrounded by mononuclear cells, consistent with microglia and lymphocytes, forming a palisade. Besides the increase on the necrotic component, lesions in G2 and G3 were also larger than those found in G1, although differences in the total damaged area were not statistically significant (Fig. 3).

3.3.6. Other organs

Foetuses from G1 showed multiple areas of necrosis randomly distributed in the lung but also in the heart and skeletal muscle (Additional file 3A). Occasionally, and mainly in the heart, these foci showed central mineralization. There was no evident infiltration related to these lesions. However, in the foetuses from G2 and G3, lesions were mainly found in the skeletal muscle, characterized by a multifocal non-purulent myositis (Additional file 3B), although occasional neutrophils could be identified among the muscular fibres. The latter were seen as unaffected, healthy fibres or exhibited degenerative changes characterized by loss of striation, hypereosinophilic cytoplasm and rarely mineralization. No obvious signs of fibre regeneration were found. Milder lesions were occasionally found in the heart, mainly in G3. No evident lesion was found in the lungs of G2 or G3. No significant microscopic lesion was seen in the placenta or foetuses of G4 and G5.

Figure 2 - Box-plot graphs of histological scores. Number of lesions per centimetre square (A), size of focus (B) and lesions rates (C) in placenta (P), foetal liver (FL) and foetal brain (FB) from animals inoculated with 10^6 Nc-Spain7 tachyzoites at days 40 -G1- (D40), 90 -G2- (D90) and 120 -G3- (D120) of gestation. Box-plot graphs represent the median percentage, the lower and upper quartiles (boxes) and minimum and maximum values (whiskers). (*) indicates $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$ and (***) $P < 0.001$ significant differences between infected groups in each tissue.

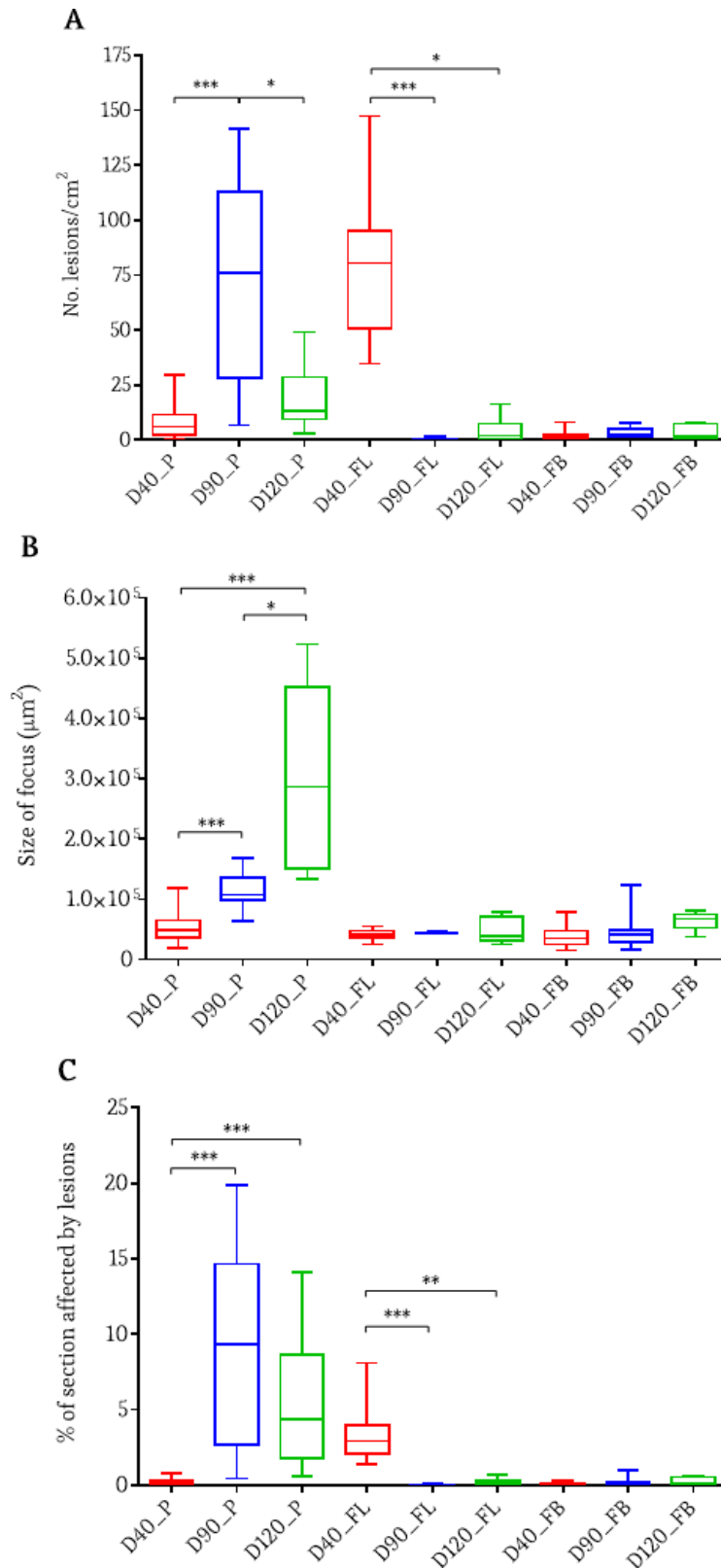
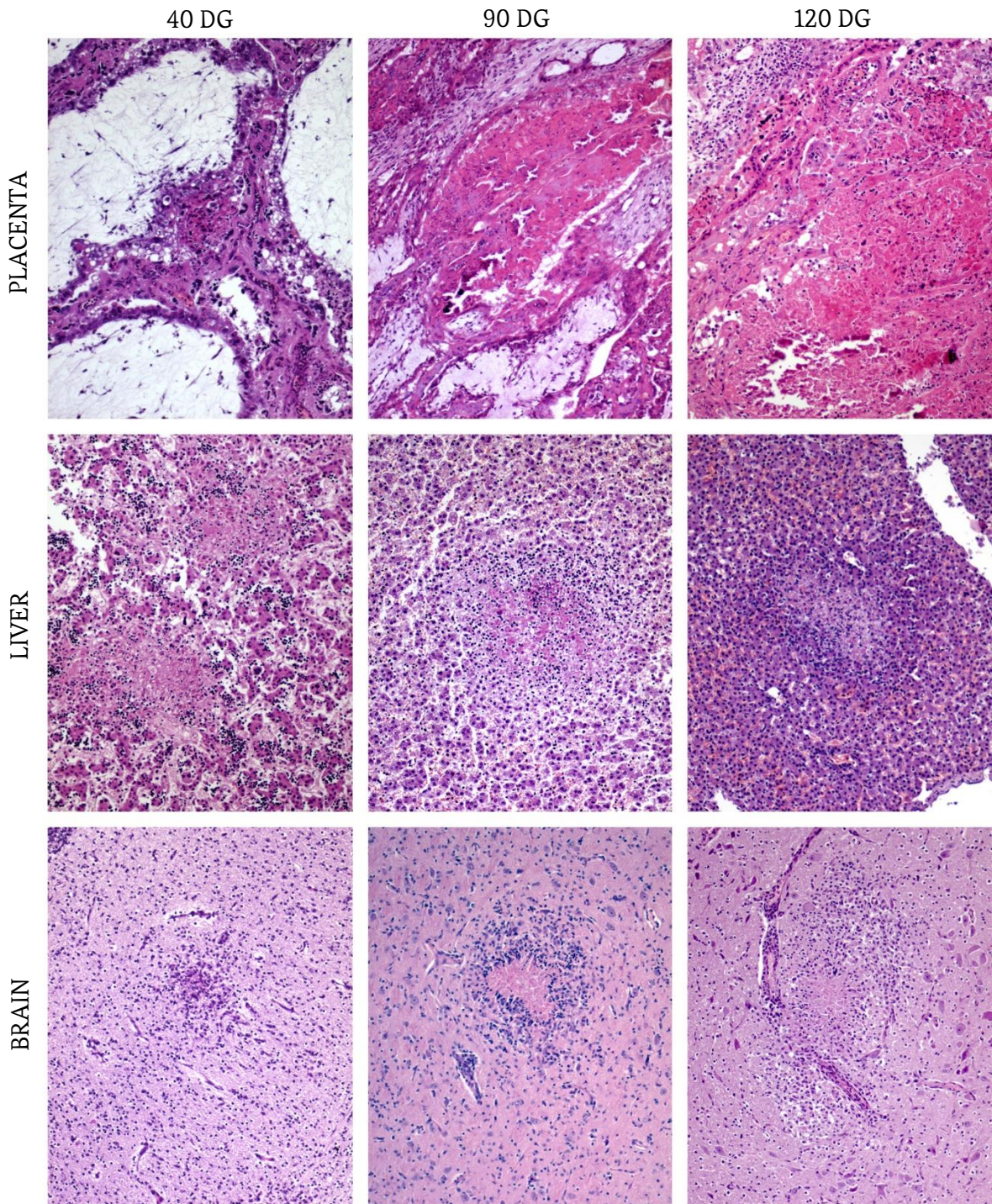


Figure 3 - Comparison of the characteristic microscopic lesions found in placenta and foetal liver and brain. Pictures show the histological changes measured for the quantification of lesions. When necrotic areas and infiltration of inflammatory cells coexisted, mainly at the liver and brain of G2 and G3, only the area showing necrosis was measured. All the pictures were taken at the same magnification. Bar 200 μ m.



3.4. Parasite distribution and burden in placental and foetal tissues

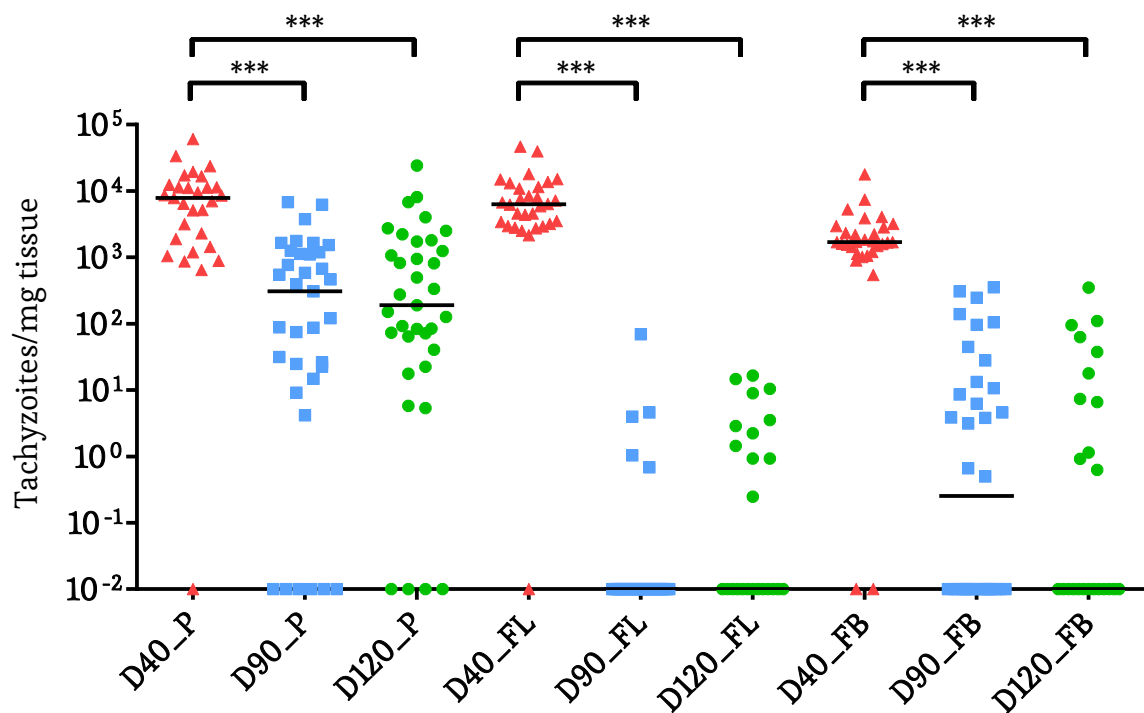
3.4.1. Maternal tissues

N. caninum DNA was detected in both mesenteric and iliofemoral lymph nodes of ewes from all three infected groups. Parasite DNA was more often detected in lymph node samples from G1 compared to G2 and G3 ($P < 0.05$). 5/6 mesenteric and 4/6 iliofemoral lymph nodes from G1 harboured parasite DNA, compared to G2 (1/7 and 2/7, respectively) and G3 (2/7), although significant differences were only found between mesenteric lymph nodes from G1 and G2 ($P < 0.05$). Parasite DNA was not detected in any brain sample of dams from any group.

3.4.2. Placental and foetal tissues

Neospora DNA was widely detected in placentomes from all ewes in the three infected groups (Additional file 4), with 97% of the placentome samples analysed being positive in G1 (29/30), 83% in G2 (29/35) and 89% in G3 (31/35), with no statistical significances between them. Nevertheless, the mean parasite burden, measured as number of tachyzoites per mg of tissue, was significantly higher in placentomes from G1 compared to both G2 and G3 ($P < 0.001$) (Fig. 4, Table 3). Regarding foetal tissues, the highest percentage of detection was observed in the brain, liver, heart and skeletal muscle of foetuses from G1 (100%, 11/11), whereas the lowest corresponded to the liver and heart of foetuses from G2 (41.6%, 5/12).

Figure 4 - Dot-plot graph of *N. caninum* burdens. Parasite burdens were quantified by real-time PCR in placenta (P) and foetal liver (FL) and brain (FB) from animals inoculated with 10^6 Nc-Spain7 tachyzoites at days 40 -G1- (D40), 90 -G2- (D90) and 120 -G3- (D120) of gestation. Each dot represents individual values of parasite burden (number of parasites per mg of host tissue), and medians are represented as horizontal lines. Taking into account that the *N. caninum* detection limit by real-time PCR is 0.1 parasites, negative samples (0 parasites) were represented on the log scale as < 0.1 (i.e. 10^{-2}). (***) indicates $P < 0.001$ significant differences between infected groups in each tissue.



In addition, significant differences were observed between G1 and G2 when comparing detection percentage in liver ($P<0.01$), heart ($P<0.01$) and skeletal muscle ($P<0.05$), and also between G1 and G3 for liver samples ($P<0.05$). Moreover, parasite burdens were significantly higher in brain and liver from G1 compared to G2 and G3 ($P<0.001$) (Fig. 4). When comparing parasite burdens in foetuses from G3, those which were prematurely born before day 145 showed a statistically higher parasite burden in both foetal brain and liver compared to the 6 remaining foetuses born after day 145 ($P<0.01$) (data not shown). As expected, all placental and foetal samples from G4 and G5 were negative.

4. Discussion

Whereas *N. caninum* is established as one of the most important infectious causes of abortion in cattle worldwide (Dubey & Schares, 2011), its epidemiological, clinical and economic relevance for reproductive failure in small ruminants has remained elusive. However recent studies in small ruminants suggest that neosporosis may be a more important cause of reproductive disorders than it has traditionally been considered, at least in certain scenarios. Recent serological surveys have shown high prevalences in asymptomatic sheep and goats from some flocks (Dubey & Schares, 2011) and evidence has accumulated that points towards *N. caninum* as a cause of natural abortion and reproductive failure in sheep and goats (West *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2012; Howe *et al.*, 2012; González-Warleta *et al.*, 2014).

The aim of this study was to characterize the clinical, parasitological and lesional parameters in experimental ovine neosporosis at early (40 dg), mid (90 dg) and late (120 dg) stages of pregnancy, to better understand the pathogenesis of *N. caninum* infection. To our knowledge, this is the first study in which all three periods of gestation have been tested within the same experiment under the same conditions (isolate, breed, dose and route of administration). In addition, and in the absence

of broadly accepted international guidelines on models for ruminant neosporosis (Benavides *et al.*, 2014), there is a need to establish a suitable and economically viable experimental model for the disease. With this in mind, sheep have been evaluated as suitable experimental model for neosporosis in this study.

Experimental infection was carried out using the *N. caninum* Nc-Spain7 isolate (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2008), which is a well-characterized highly virulent isolate.

Indeed, this isolate caused 100% foetal death upon experimental infection of pregnant cows during the first trimester of gestation (Caspé *et al.*, 2012; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014). The intravenous route of inoculation used in this study was chosen so as to mirror parasitaemia produced in natural infections (Dubey *et al.*, 2006). Finally, the inoculation dose, 10^6 tachyzoites, was a 1:10 dilution of that commonly used in cattle (i.e. 10^7 tachyzoites) (Williams *et al.*, 2007; Rosbottom *et al.*, 2007; Almería *et al.*, 2010; Rojo-Montejo *et al.*, 2013), considering the weight difference between cattle and sheep (aprox. 10:1).

Clinical observations revealed that infection during the first (G1) and second (G2) term of gestation produced foetal death in all ewes, although it happened significantly earlier in the G1. On the other hand, infection during the last term of gestation (G3) resulted in the birth of viable lambs, although some of them were born prematurely and showed evident weakness that, most probably, would have compromised their viability. Infection during the first period of gestation (G1) showed similar results to those reported in previous experiments carried out at early gestation in both cattle (Williams *et al.*, 2007; Caspé *et al.*, 2012; Rojo-Montejo *et al.*, 2013) and sheep (Buxton *et al.*, 1998), where foetal death and abortion were observed. In the current study, lesions and parasite burden found in both dams and foetuses confirm that the parasite readily disseminates in pregnant sheep, crosses the placenta and subsequently induces foetal damage. In this group, high parasite burdens were found in all studied

placentomes, but only mild lesions were observed, which might be attributed to the short period of time that occurred between infection and abortion (19–21 days), thus limiting the development of histological lesions. The only placenta studied in previous experimental infections at 45 dg also showed mild lesions (Buxton *et al.*, 1998). Interestingly, these findings are in clear contrast with the widespread necrosis and inflammation reported in placenta from cattle infected at 70 dg (Macaldowie *et al.*, 2004; Rosbottom *et al.*, 2008; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014), which suggests that there could be differences between cattle and sheep regarding the initial infection dynamics. It has already been suggested that the lack of mature immune response at this stage of foetal development would allow the parasite to cross the placenta and colonise foetal viscera and multiply with ease (Rosbottom *et al.*, 2008; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014). Indeed, the highest frequency of detection and parasite burden in the current study were detected in foetuses from this group (G1), where *N. caninum* was widely detected in the brain, liver, heart and semitendinosus muscle of all foetuses. There was a good correlation between parasite burden and frequency of lesions in the foetal liver, which most probably represents the gateway for the parasite to invade the foetus through the umbilical vein. This correlation did not occur in the brain, where there was a high parasite burden, though not as high as in the liver, but the histological lesions were much less frequent. While the reason for this difference is not clear, it is known that antigen levels required to produce lesions in the immune privileged brain are, at least, ten times higher than those needed in other organs, and inflammatory reactions require more time to develop (Matyszak, 1998). Thus, the low frequency of lesions in the brain at this stage may be caused by the short period of time since infection. The contrast between mild lesions in the placenta and severe multifocal necrosis in the foetal liver may suggest that the abortion at

this stage of gestation is consequence of the foetal lesions, similarly as suggested to occur in bovine neosporosis at early gestation (Rosbottom *et al.*, 2008; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014).

Previous studies addressing the infection in ewes during mid-gestation (mainly at day 90) have reported a variety of results, which could be attributed to the different time points chosen for infection as well as the isolate, dose, breed and the employed route of administration (McAllister *et al.*, 1996; Buxton *et al.*, 1998; Innes *et al.*, 2001a; Weston *et al.*, 2009). Nevertheless, all of them reported high rates, of even 100%, of abortion. Conversely, the most commonly reported outcome in cattle after experimental infection at mid-gestation is the delivery of live, although congenitally infected, calves (Barr *et al.*, 1994b; Almería *et al.*, 2003; Gondim *et al.*, 2004c). However, abortion has also been reported (Dubey *et al.*, 1992b; Almería *et al.*, 2010) and it is actually at this stage when most of the abortions in natural infection occur (Dubey *et al.*, 2007a; Benavides *et al.*, 2014). Considering the findings from the current study and previous experimental infections, it seems that infection of sheep at mid-gestation generally results in more dramatic consequences than in cattle, as most of the ewes aborted or, less frequently, produced weak lambs. Although these differences may be related to the species, similarly to the discrepancy between sheep and cattle regarding the placental damage at early gestation, it is also possible that the doses used in this and previous experiments (even up to 10^8) have been excessively aggressive for the infected sheep. This suggestion is supported by the fact that previous studies employing lower doses obtained more variable outcomes, ranging from few aborted foetuses to birth of weak or healthy lambs (McAllister *et al.*, 1996; Weston *et al.*, 2009). Nevertheless, information concerning parasite dose and isolate virulence is limited. Hence, in order to address the standardization of a pregnant model in sheep, further experiments would be desirable to

compare outcomes from different inoculation doses and various *N. caninum* isolates. Our study confirmed that around 90 dg the foetal immune system is undergoing development according to specific antibodies detected in foetal fluids, and the lower parasite burden found in this group compared to G1 (day 40). This suggests a partial, yet insufficient, control of the infection.

The finding of more severe lesions in the placenta found at G2 despite the lower parasite burden suggests that the inflammatory response developed in this organ has been effective in controlling the parasite, maybe because of the longer period of time elapsed since infection, but has also damaged the organ as a “bystander effect”. Indeed, the highest ewe serum titres were found in this group, probably due to the longer time before abortion occurred. In foetal samples, parasite detection (both frequency and burden) were lower in comparison to G1, but the frequency of lesions in the brain and skeletal muscles were higher. This, together with the shift from necrotic to inflammatory characteristic of the lesions, was most likely also a consequence of the maturation of foetal immune response. The dramatically smaller number of lesions in the liver compared to G1 may be consequence of the longer period of time elapsed since infection. The liver is probably the first foetal organ reached by the parasite through the umbilical vein, so the three additional weeks compared to G1 may have given the organ time to clear the lesions, as it has been previously observed (Buxton *et al.*, 1998).

With regard to infection at late pregnancy (G3), all ewes delivered live lambs, although three of them were born before day 145 and showed weakness and unresponsiveness. These results are in accordance with those previously described for both pregnant cattle (Williams *et al.*, 2000; Gibney *et al.*, 2008; Benavides *et al.*, 2012) and sheep (McAllister *et al.*, 1996), in which the delivery of live, but congenitally infected, calves or lambs with no obvious clinical signs is the most common consequence

of experimental infection during the third term of gestation. However, although infection of the placenta and foetuses (i.e. transplacental infection) occurred in all sheep from this group, the three lambs prematurely born showed both higher parasite burden and number of lesions in brain and liver compared to the other six lambs born after day 145. In addition, parasites could only be detected in the lymph nodes from the dams that delivered these three premature animals. In the remaining lambs, parasite detection was higher when compared to that observed in G2, except for one of the twin lambs delivered at day 155 of gestation, which was completely negative by PCR. This could be attributed to the difference in time at necropsy between the two groups, since lambs from G3 were studied two weeks earlier than those from G2, giving therefore less time to the immune response, already mature in both cases, to control the infection. Sera from G3 lambs collected before suckling showed a range of titres from negative to 1:128. Four of the 6 lambs born apparently healthy after day 145 of gestation were seronegative. Despite this, 3 of these 4 lambs were infected as proven by PCR. Moreover, as lambs were culled soon after birth, we do not know what would have happen thereafter, and can only hypothesise that those lambs with negative sera titres would have survived as persistently infected animals, whereas those prematurely born with high parasite detection and showing weakness and recumbency may have not survived long after delivery, as they were too weak to be nourished by the mother.

Finally, the quantification of histological lesions in the placenta and foetuses has shown to be very useful in adding to the interpretation of the results from this experiment. In a similar approach, Buxton *et al.* (1997) described how the number of necrotic foci in the placenta increased with the time post-infection up to a maximum, around 40 days pi, from where the organ recovered and the number of foci decreased sharply. These observations correlates with our results, suggesting that: a)

there is a relation between the time post-infection and the severity of the lesions and b) lesions may regress in the affected organs. The latter has been described to occur in the placenta (Buxton *et al.*, 1997) and, according to the present results, also in the foetal liver, but not in the foetal brain.

In the light of the results from this study, we suggest that the experimental infection of sheep had similar outcomes, in term of abortions and birth of weak or clinically healthy lambs, to those described in natural bovine or ovine neosporosis. Despite a number of differences, which trigger further investigations of ovine neosporosis, the use of an ovine model seems reasonably valid for assessments of both, vaccines and drug candidates for bovine neosporosis. In addition, this model is uniquely suited to investigate the pathogenesis of ovine neosporosis, a disease with increasing relevance. Further studies would be desirable in order to achieve a better and well established *N. caninum* infection model in sheep (Benavides *et al.*, 2014).

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

JB, JRC, IF, AH and LMO conceived the study and participated in its design; DAS and JB wrote the manuscript, with results interpretation and discussion inputs from JRC, ECF, VP, AH and LMO; DAS and IF prepared the inocula and carried out the infections; DAS and JRC performed PCR and qPCR analysis, serological assays, statistical analysis and interpreted the results. JB, MF, MFE and VP participated in inoculation and clinical examination of animals, performed necropsies and sampling of the animals, carried out histopathological analyses and interpreted the results. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge Esperanza Selva from the SALUVET group (Complutense University of Madrid, Spain), Mario Ferrero, Melchor Molero, Ivan Panero, Miguel Fernández and Carmen Espiniella from IGM (CSIC-ULE) and Idoia Badiola, from Agropal S. C. for their excellent technical assistance. David Arranz Solís is supported by a fellowship from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO), as part of the Program of Training of Researcher Staff (FPI, grant number BES-2011-043433). This work was supported by the Swiss National Foundation (SNF grant No. 310030_146162), research grant LE253U13 from Junta de Castilla y León (Spain) and Iberoamerican science and technology programme for development (CYTED).

Additional file 1 - Individual serological titres in dams and foetuses/lambs at the time of necropsy.

Group	Ewe ref.	Time of necropsy ^a	Dams sera titre	Foetus/Lamb s ref.	FL or PCS titre
G1 (day 40)	E412	19 dpi	3200	F412	NA
	E402	20 dpi	1600	F402-1	NA
				F402-2	NA
	E009	21 dpi	1600	F009-1	NA
				F009-2	NA
	E411	21 dpi	1600	F411	NA
	E533	21 dpi	3200	F533-1	NA
				F533-2	NA
	E537	21 dpi	1600	F537-1	NA
			F537-2	NA	
			F537-3	NA	
G2 (day 90)	E023	34 dpi	3200	F023	-
	E010	36 dpi	6400	FE010-1	NA
				FE010-2	-
	E011	42 dpi	6400	F011-1	32
				F011-2	32
	E016	42 dpi	3200	F016-1	32
				F016-2	64
	E021	42 dpi	6400	F021	64
	E002	48 dpi	3200	F002-1	64
			F002-2	16	
			F026-1	8	
			F026-2	NA	
G3 (day 120)	E382	142 dg	1600	L382*	8
	E522	143 dg	800	L522*	8
	E030	144 dg	800	L030*	16
	E380	145 dg	1600	L380-1	-
				L380-2	64
	E014	149 dg	1600	L014	128
	E441	155 dg	200	L441-1	-
				L441-2	-
	E523	155 dg	800	L523	-

(a): necropsies were carried out when foetal dead was detected or immediately after parturition.

(*): lamb prematurely born showing weakness and unresponsiveness.

dpi: days post-infection; dg: days of gestation; NA: not available; FL: foetal liquid; PCS: precolostral serum.

Additional file 2 - Individual quantification of lesions in the placenta, foetal liver and brain.

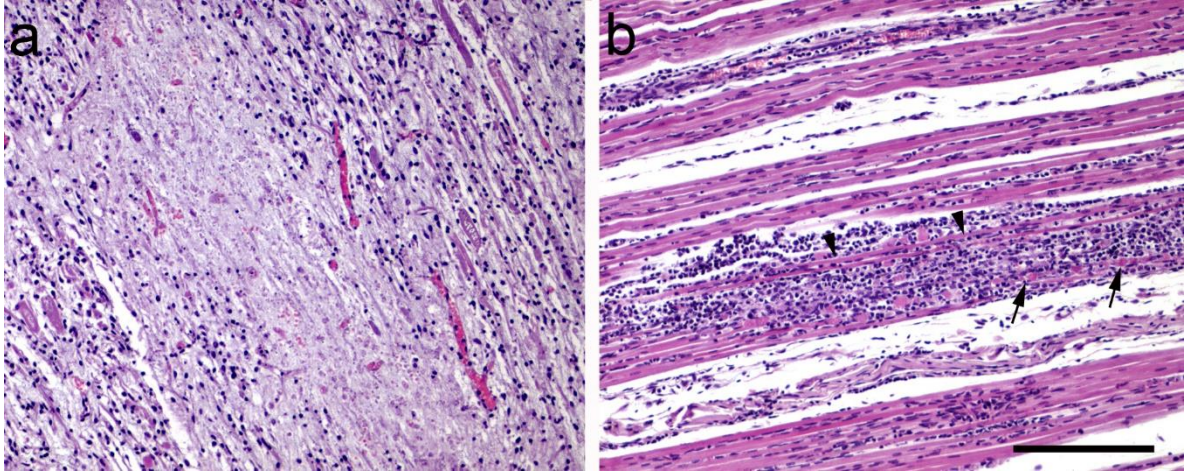
Group	Foetus or lamb reference	Time of necropsy ^a	Placentome			Foetal liver			Foetal brain		
			No. foci per cm ²	Size (10 ³ μm ²)	Tissue affected (‰)	No. foci per cm ²	Size (10 ³ μm ²)	Tissue affected (‰)	No. foci per cm ²	Size (10 ³ μm ²)	Tissue affected (‰)
G1 (day 40)	F412	19 dpi	4.38	61.685	2.88	147.22	54.854	80.755	0.60	43.567	0.259
	F402-1	20 dpi	NA	NA	NA	46.93	43.821	20.563	-	-	-
	F402-2	20 dpi				67.64	41.063	27.774	-	-	-
	F009-1	21 dpi	6.91	54.904	2.82	78.69	46.317	36.448	0.52	26.825	0.140
	F009-2	21 dpi				86.52	50.082	43.332	-	-	-
	F411	21 dpi	10.29	40.579	2.38	34.82	39.906	13.895	2.17	24.676	0.535
	F533-1	21 dpi	17.86	44.904	3.90	86.15	33.718	29.049	1.64	48.959	0.804
	F533-2	21 dpi				108.79	35.997	39.162	1.08	15.056	0.163
	F537-1	21 dpi	1.45	27.794	0.51	95.17	24.571	23.383	8.21	29.132	1.314
	F537-2	21 dpi				50.64	38.060	19.273	0.80	40.909	0.327
	F537-3	21 dpi				80.42	47.028	37.819	3.51	78.777	2.764
	G2 (day 90)	F023	34 dpi	NA	NA	NA	-	-	-	5.13	42.068
FE010-1		36 dpi	61.43	102.478	64.01	-	-	-	5.61	28.237	1.584
FE010-2		36 dpi				NA	NA	NA	1.31	16.048	0.281
F011-1		42 dpi	NA	NA	NA	-	-	-	2.28	39.655	0.905
F011-2		42 dpi				0.50	45.948	0.463	2.74	47.658	1.307
F016-1		42 dpi	102.39	144.984	149.58	NA	NA	NA	2.04	41.021	0.836
F016-2		42 dpi				NA	NA	NA	2.57	25.760	0.663
F021		42 dpi	109.43	122.719	133.09	-	-	-	2.45	81.897	2.009
F002-1		48 dpi	18.58	80.809	16.31	-	-	-	1.21	32.636	0.396
F002-2		48 dpi				1.67	42.564	1.419	1.67	124.171	9.485
F026-1		48 dpi	NA	NA	NA	-	-	-	1.56	46.987	0.731
F026-2		48 dpi				-	-	-	NA	NA	NA
G3 (day 120)	L382*	142 dg	NA	NA	NA	2.39	34.022	0.813	6.01	74.708	4.493
	L522*	143 dg	NA	NA	NA	16.22	40.784	6.614	7.99	79.973	6.387
	L030*	144 dg	NA	NA	NA	8.13	38.292	3.113	7.90	68.132	5.382
	L380-1	145 dg	10.16	139.443	14.78	5.07	24.580	1.245	2.49	67.187	1.671
	L380-2	145 dg				NA	NA	NA	NA	NA	NA
	L014	149 dg	10.98	415.904	53.96	0.54	79.163	0.430	1.03	60.615	0.627
	L441-1	155 dg	NA	NA	NA	-	-	-	-	-	-
	L441-2	155 dg				-	-	-	0.90	52.187	0.471
	L523	155 dg	43.07	290.912	119.78	1.68	67.918	1.143	1.67	37.633	0.626

(a): necropsies were carried out when foetal dead was detected or immediately after parturition.

(*): lamb prematurely born showing weakness and unresponsiveness.

dpi: days post-infection; dg: days of gestation; NA: not available.

Additional file 3 - Sections of skeletal muscle from non-viable fetuses. (A) large area of coagulative necrosis in the skeletal muscle of a foetus from G1. Note the scarcity of inflammatory cells related to this lesion. **(B)** diffuse infiltration of mixed inflammatory cells among muscular fibres. With this lesions, note the coexistence of degenerated (arrows) and preserved (arrowheads) fibres. Both pictures were taken at the same magnification. Bar: 200 μ m.



Additional file 4 - Individual frequency of parasite DNA detection.

Group	Foetus or Lamb reference	Time of necropsy ^a	Maternal tissues			Foetal tissues				
			Placent.	MLN	ULN	Brain	Liver	Heart	Lung	STM
G1 (day 40)	F412	19 dpi	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	F402-1	20 dpi	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++
	F402-2	20 dpi				+++	+++	+++	+++	+++
	F009-1	21 dpi	+++	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
	F009-2	21 dpi				+++	+++	+++	-	+++
	F411	21 dpi	+++	++	+	+++	++	+++	+++	+++
	F533-1	21 dpi	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	F533-2	21 dpi				+	+++	+++	-	+++
	F537-1	21 dpi	+++	++	+++	+++	+++	+++	-	+++
	F537-2	21 dpi				+++	+++	+++	-	+++
	F537-3	21 dpi				+++	+++	+++	++	+++
G2 (day 90)	F023	34 dpi	+++	+	++	+++	+	++	-	+
	FE010-1	36 dpi	+++	-	-	++	+	-	+	+
	FE010-2	36 dpi				+++	-	-	+	-
	F011-1	42 dpi	+++	-	-	+	-	-	-	++
	F011-2	42 dpi				+	+	+	++	-
	F016-1	42 dpi	+++	-	-	++	-	-	-	++
	F016-2	42 dpi				+++	-	++	++	+
	F021	42 dpi	+++	-	++	+	-	-	-	-
	F002-1	48 dpi	+++	-	-	-	-	+	+++	-
	F002-2	48 dpi				+	+	+	+++	+
	F026-1	48 dpi	++	-	-	+	+	-	+++	-
F026-2	48 dpi				-	-	-	+++	-	
G3 (day 120)	L382*	142 dg	+++	-	+	+++	-	+	+	+
	L522*	143 dg	+++	++	-	+++	+++	+++	+++	+++
	L030*	144 dg	+++	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
	L380-1	145 dg	+++	-	-	-	++	+++	+++	+++
	L380-2	145 dg				+++	+++	++	+++	+++
	L014	149 dg	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++
	L441-1	155 dg	++	-	-	-	-	-	-	-
	L441-2	155 dg				+	-	++	+++	++
	L523	155 dg	+++	-	-	++	-	-	-	+

(a): necropsies were carried out when foetal dead was detected or immediately after parturition.

(*): lamb prematurely born showing weakness and unresponsiveness.

dpi: days post-infection; dg: days of gestation; MLN: mesenteric lymph node; ULN: uterine lymph node; FL: foetal liquid; PCS: precolostral serum; STM semitendinosus muscle; plus (+++, ++, +) and minus (-) signs represent PCR detection in >67%, 66-34%, <33% and 0% of samples analysed, respectively.

Sub-objective 2.2

Systemic and local immune responses in sheep after *Neospora caninum* experimental infection at early, mid and late gestation

David Arranz-Solís¹, Julio Benavides², Javier Regidor-Cerrillo¹, Pablo Castaño², Maria del Carmen Ferreras², Pilar Horcajo¹, Laura Jiménez-Pelayo¹, Esther Collantes-Fernández¹, Ignacio Ferre¹, Andrew Hemphill³, Valentín Pérez², Luis Miguel Ortega-Mora^{1*}.

¹ SALUVET, Animal Health Department, Faculty of Veterinary Sciences, Complutense University of Madrid, Ciudad Universitaria s/n, Madrid, 28040, Spain

² Livestock Health and Production Institute (ULE-CSIC), León, 24346, Spain

³ Institute of Parasitology, Vetsuisse Faculty, University of Bern, Bern, CH-3012, Switzerland

* Corresponding author: Luis M Ortega-Mora (luis.ortega@ucm.es)

Running title: **Immune response in sheep infected in the three periods of gestation**



Submitted to *Veterinary Research*

Presented as poster presentation in the 3rd Apicowplexa international meeting, 2015 (30th June-3rd July, Edinburgh, UK).

Abstract

Besides its importance in cattle, *Neospora caninum* may also pose a high risk as abortifacient for small ruminants. We have recently demonstrated that the outcome of experimental infection of pregnant sheep with 10^6 Nc-Spain7 tachyzoites is strongly dependent on the time of gestation. In the current study, we assessed peripheral and local immune response in those animals. Serological analysis revealed earlier and higher IFN- γ and IgG responses in ewes infected at early (G1) and mid (G2) gestation, when abortion occurred. IL-4 was not detected in sera from any sheep. Inflammatory infiltrates in the placenta mainly consisted of CD8+ and, to a lesser extent, CD4+ T cells and macrophages (CD163+). The infiltrate was more intense in sheep infected at mid-gestation. In the foetal mesenchyme, mostly free tachyzoites were found in animals infected at G1, while those infected in G2 displayed predominantly particulate antigen, and parasitophorous vacuoles were detected in sheep infected at G3. A similar pattern of placental cytokine mRNA expression was found in all groups, displaying a strengthened upregulation of IFN- γ and IL-4 and milder increases of TNF- α and IL-10, reminiscent of a mixed Th1 and Th2 response. IL-12 and IL-6 were only slightly upregulated in G2, whereas TGF- β was downregulated in G1 and G2, suggestive of limited T regulatory (Treg) cell activity. No significant expression of TLR2 or TLR4 could be detected. Results from this and our previous work provide new insights into the pathogenesis and mechanisms of abortion in ruminant neosporosis.

Keywords

N. caninum infection, sheep, gestation, immune responses, Nc-Spain7, placenta.

1. Introduction

Neospora caninum is an obligate intracellular protozoan parasite considered as one of the leading infectious causes of abortion in cattle worldwide (Dubey *et al.*, 2007a; Reichel *et al.*, 2013). Neosporosis is generally asymptomatic in non-pregnant cows; however, the consequences of either primo infection or recrudescence in pregnant cattle may be foetal death or the delivery of a still-born calf or a congenitally infected calf, either healthy or exhibiting nervous clinical signs (Dubey & Schares, 2011). It has been agreed that these outcomes depend greatly on the period of gestation in which infection occurs (Dubey *et al.*, 2006). Several mechanisms have been proposed to lead to foetal death, such as damage directly caused by parasite proliferation in placental and foetal tissues or the immunological imbalance in the placenta (Innes, 2007; Dubey *et al.*, 2007a).

Several reports have shown that a Th1-biased immune response against *N. caninum* is required to control tachyzoite proliferation

involving IFN- γ and IL-12. However, an excess of IFN- γ in the placenta may have detrimental effects for gestation and jeopardise foetal viability (Entrican, 2002; Innes, 2007). In addition, a Th2-biased cytokine response at the materno-foetal interface may counteract the effects of pro-inflammatory cytokines in order to safeguard foetal viability and hence the maintenance of gestation, yet it may also facilitate parasite proliferation in placental tissues (Entrican, 2002; Innes, 2007). In addition, the role that the innate immune response plays on intracellular pathogens such as *Neospora* could be sizeable. In fact, activation of *Toll-like* receptors (TLR) 2 and 4 leads to the maturation of antigen-presenting cells (APC) and natural killer (NK) cells and pro-inflammatory cytokine production, thus contributing to successful host defence (Mineo *et al.*, 2010; Bartley *et al.*, 2013). Nevertheless, relatively little is known in this regard for neosporosis, especially for ovine neosporosis.

On the other hand, although cattle represent the most relevant and economically important

target host, recent studies consider *N. caninum* as an important abortifacient also in small ruminants (Moreno *et al.*, 2012), and even the main cause of reproductive losses in some flocks (West *et al.*, 2006; González-Warleta *et al.*, 2014). Moreover, it would be desirable to have a well-established *in vivo* model for ruminant neosporosis in order to improve the knowledge of the disease, as well as to carry out vaccine or drugs efficacy assays (Benavides *et al.*, 2014). In this regard, the ovine experimental model of infection provides several advantages over cattle in terms of costs, space, required infrastructure, ease of handling of the animals, the duration of gestation and hence the entire experiment.

In a recent study we conducted intravenous experimental infections in pregnant ewes under controlled conditions at three different time points of gestation (Arranz-Solís *et al.*, 2015). The results showed that, in analogy to cattle, the outcome of the infection relied heavily on the time point of gestation that was chosen for infection. Parasitological and pathological findings of these infected ewes and foetuses were also reported (Arranz-Solís *et al.*, 2015). In order to gain further insight into the role that immune responses play in *N. caninum* infected pregnant sheep, our objective in this work was to assess the development of both local and peripheral immune responses after the experimental infections mentioned above.

2. Material and methods

2.1. Experimental design

A full description of the sheep, inocula and experimental design has already been reported in Arranz-Solís *et al.* (2015), which is based on the same animals. Briefly, *Churra* breed ewes seronegative for *N. caninum* and other abortifacient agents were oestrus synchronized and mated with pure breed *Churra* tups for 2 days. Pregnancy and foetal viability were confirmed by ultrasound scanning (US) on day 40 after mating. Pregnant sheep (n=29) were

selected and randomly distributed into five experimental groups. Groups 1 (G1; n=6), 2 (G2; n=7) and 3 (G3; n=7) were intravenously (IV) inoculated with 10^6 culture-derived tachyzoites of the Nc-Spain7 isolate (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2008) at days 40 (G1), 90 (G2) or 120 (G3) of gestation (dg), respectively. The nine remaining sheep were allocated in groups 4 (G4; n=6) and 5 (G5; n=3) as controls of infection and pregnancy, respectively. Two animals from G4 and one from G5 received an IV inoculum of phosphate-buffered saline (PBS) at each time point of infection. Ewes from G4 were culled at the average time points when abortion took place in their respective group, providing a negative control for further analyses (see below), and ewes from G5 were kept alive until the end of the experiment. Experimental infections were conducted according to the Animal Welfare Committee of the ULE-CSIC, following proceedings described in Spanish and EU legislations at that time (Law 32/2007, R.D. 1201/2005, and Council Directive 2010/63/EU).

2.2. Clinical monitoring and collection of samples

Transabdominal US was used to determine foetal viability by monitoring the heartbeat. Blood samples were collected by puncture of the jugular vein in a 10 ml non-heparinised vacutainer tube at days -3, 1, 5, 8, 12, 15, 21 post-infection (pi) and every two weeks thereafter until the detection of foetal death or parturition. Serum samples were recovered after centrifugation at $1000\times g$ for 10 min and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for serological analysis. When foetal death was detected, or immediately after parturition, dams and lambs were previously sedated with xylazine (Rompun[®]; Bayer, Mannheim, Germany) and then immediately euthanized by an IV overdose of embutramide and mebezonium iodide (T61[®]; Intervet, Salamanca, Spain). Post-mortem examination of the ewes and lambs was carried out immediately after euthanasia, and foetuses were immediately separated from the placenta. A total of 10 randomly selected placentomes

were recovered from each placenta and were transversally cut in slices of 2-3 mm of thickness that were distributed for storage in 10% formalin and quick-frozen in cold isopentane for immunohistochemical examinations, and in RNAlater (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) for cytokine and *Toll-like* receptors (TLR) mRNA expression analysis.

2.3. Serological analysis: IgG responses

N. caninum-specific IgG antibody levels were measured using an *in-house* indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Soluble antigen prepared according to Álvarez-García *et al.* (2003) at 1.5 µg/ml diluted in carbonate buffer (100 mM, pH 9.6), was used to coat 96-well microtitre plates. Subsequently, non-specific binding was blocked by adding bovine serum albumin diluted 3% in PBS (pH 7.4) containing 0.05% Tween 20 (PBS-T). After 2 h incubation at room temperature (RT), plates were washed with PBS-T. Sera samples were diluted 1:100 in block solution and incubated for 1 h at 37 °C. In each plate, samples of the same positive and negative control sera were included. After washing, horseradish peroxidase conjugate protein G (Biorad, Hercules, USA) diluted 1:5000 in PBS-T was added and incubated for 1 h at 37 °C. Plates were washed before the addition of ABTS substrate (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). The reaction was stopped after 15 min at RT by the addition of a solution of 0.3 M oxalic acid, and the optical density (OD) was read at 405 nm (OD₄₀₅). For each plate, values of the OD were converted into a relative index percent (RIPC) using the following formula $RIPC = \frac{(OD_{405} \text{ sample} - OD_{405} \text{ negative control})}{(OD_{405} \text{ positive control} - OD_{405} \text{ negative control})} \times 100$. A RIPC value ≥ 10 indicates a positive result.

2.4. *N. caninum*-specific IFN- γ and IL-4 responses

IFN- γ and IL-4 levels in sera from dams were measured by the Bovine IFN- γ and IL-4 ELISA development kits (Mabtech AB, Sweden), following manufacturer's recommendations.

Colour reaction was developed by the addition of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine substrate (TMB, Sigma-Aldrich, Spain) and incubated for 5-10 min in the dark. Reactions were stopped by adding 2N H₂SO₄. Then, plates were read at 450 nm. The cytokine concentrations were calculated by interpolation from a standard curve generated with recombinant cytokines provided with the kits.

2.5. Immunohistochemistry

For immunohistochemical labeling of parasite antigen, T (CD3 antigen), B (CD79 antigen) and macrophages cells (CD163 antigen), sections were cut from three placentomes per case, infected and control, and placed onto poly-L-Lysine coated slides. Endogenous peroxidase activity was blocked in deparaffinized sections by incubation with 3% hydrogen peroxide for 30 minutes in darkness at RT. Rehydrated slides were rinsed twice in PBS. To optimize the immunoreaction, the antigen retrieval was performed using enzymatic or heat-based methods (Additional file 1). Sections were incubated with the primary antibodies diluted in PBS overnight at 4 °C in a humidified chamber. After extensive washing with PBS, sections were incubated for 40 min at RT with EnVision[®]+ /HRP solution (Dako North America Inc, Carpinteria, USA). After washing in PBS, antibody localization was determined using 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma-Aldrich Corp.) as chromogenic substrate for peroxidase. Sections were counterstained with haematoxylin for 30 s.

For the characterization of T cell subpopulations of the inflammatory infiltrate found in infected sheep, CD4 and CD8 antigens were immunolabelled on cryostat sections from frozen samples. Steps followed for the immunohistochemical labeling were the same as those for paraffin sections except deparaffination and antigen retrieval, which are not necessary in cryostat sections. Sections of three placentomes from each control ewe and those three that showed the best histological architecture within each infected

group (G1, G2 and G3) were selected for CD4 and CD8 characterization. Lymphocyte (T and B cells and also CD4+ and CD8+ populations) and macrophage quantification was performed under a light microscope with final magnification of 400× in the three placentomes examined per animal. The number of labelled cells was counted in 10 random fields within the endometrial chorioallantoic interdigitation area of the placentome. Distribution of *N. caninum* antigen was subjectively evaluated in the same placentomes per animal.

2.6. RNA extraction and reverse transcription

Total RNA was extracted from approximately 10 mg of 5 placentomes using the commercial Maxwell® 16 LEV simplyRNA Purification Kit, developed for automated Maxwell® 16 System (Promega, Wisconsin, USA), following the manufacturer's recommendations. It included a DNase treatment step to avoid genomic DNA contamination of the RNA samples. For all samples, RNA concentrations were determined by spectrophotometry (Nanophotometer, Implen), and the integrity of the RNA was checked by the 260/280 absorbance ratio (close to 2.0) and the visualization of the 18S and 28S ribosomal subunits after electrophoresis on a 1% agarose gel. Reverse transcription was carried out by the master mix SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Paisley, UK) in a 20 µl reaction using up to 2.5 µg of total RNA. Obtained cDNA reactions were diluted 1:10 and used in quantitative PCR (qPCR) assays.

2.7. Quantitative real-time PCR (qPCR)

In order to analyse cytokine and TLR mRNA expression, primers for ovine IFN-γ, IL-4, IL-10, IL-12p40, TNF-α, IL-6 and TGF-β1 cytokines, the *Toll-like* receptors (TLR) 2 and 4, and the housekeeping gene β-actin were used (Additional file 2). Primer3Plus software (Untergasser *et al.*, 2007) was used to design primers, which were checked with

chromosomal and mRNA sequences using the BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.1.3 (Tom Hall, Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA, USA). For all target genes, except for TLR2 and TLR4, at least one primer annealed at intron splice junctions or at largely separated exons (for IL-12p40) to prevent amplifications of genomic DNA. For TLR2 and TLR4, to ensure that cDNA samples were not contaminated with genomic DNA, reactions were set up using 500 ng of non-reverse transcribed RNA instead of cDNA. Failure to generate a detectable signal indicated the sample to be DNA free. Real-time PCR reactions were performed in 25 µl using 12.5 µl of the Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 10 pmol of each primer and 5 µl of diluted cDNA samples (1/10) in an ABI 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems), with the following amplification conditions: 95 °C for 10 min followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. In the case of TLR2 and TLR4, a higher concentration of primers was used (900 nM) with the following amplification conditions: 95 °C for 10 min followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s and 62 °C for 1 min, following methodology previously described by Menzies & Ingham (2006). For each target gene, a seven-point standard curve was included in each batch of amplifications based on 10-fold serial dilutions starting at 10 ng/µl of plasmid DNA in which the full-length cDNA containing the gene fragments used as templates in qPCR were cloned. Average Ct values were used to determine mRNA expression for each sample. For all groups, after checking RNA integrity and measuring β-actin mRNA levels (housekeeping), the three best placentomes were selected for each ewe and analysed for the rest of cytokines and TLRs. The cytokine mRNA expression level was calculated by the interpolation of the average Ct in plasmid standard curves and then adjusted to the number of fg per ng of total RNA/cDNA equivalent. The relative quantification of cytokine mRNA expression levels (x-fold change in expression) was carried out by the

comparative $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, as described previously (Schmittgen & Livak, 2008). Briefly, the ΔCt values were calculated by subtracting the Ct value of the β -actin gene (internal control) from the Ct value of each cytokine and sample. Then, the $\Delta\Delta Ct$ was calculated by subtracting the mean ΔCt values for uninfected groups (as baseline samples) from the ΔCt values determined for all *N. caninum* infected samples. Relative fold increases or decreases were then assessed as $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

2.8. Statistical analysis

In order to compare the analysis of local and peripheral immune response in infected ewes, data from both control groups (G4 and G5) were merged into one group. Antibody responses for each experimental group were analysed using the one-way ANOVA test. When statistically significant differences were found, a Tukey's Multiple Range test was applied to examine all possible pairwise comparisons at each sampling time. Variations in IFN- γ and IL-4 levels from sera were analysed by the repeated measures two-way ANOVA test until day 15 pi. Cytokine and TLR mRNA expression levels as well as the presence of each cell population in placenta were analysed using the non-parametric Kruskal-Wallis test, followed by a Dunn's multiple range test for all pairwise comparisons. In addition, to assess differences between each group with the control group, a Dunn's multiple comparison test was performed for each cytokine or TLR. Finally, additional differences between CD4+ and CD8+ considering all infected ewes together (G1+G2+G3) were assessed by a Mann-Whitney test. Statistical significance for all analysis was established with $P < 0.05$. All statistical analyses were carried out using GraphPad Prism 6.01 software (San Diego, CA, USA).

3. Results

A summary of the clinical course, lesional development and parasite distribution already reported in Arranz-Solís et al. (2015) is shown in Table 1.

3.1. Specific anti-Neospora IgG antibody responses

The results on *N. caninum* specific IgG antibody responses are shown in Fig. 1A. IgG levels increased significantly from day 12 pi in G1 ($P < 0.001$) and G2 ($P < 0.05$) compared to control groups (G4+G5), and continued rising until day 21 pi, whereas in G3, significant IgG levels were only detected from day 21 pi ($P < 0.01$). IgG levels remained high in all groups when foetal death/birth took place (data not shown). Comparison between infected groups showed significantly lower average values of IgG in ewes in G3 compared to G1 at days 12, 15 and 21 pi ($P < 0.001$), and compared to G2 at days 15 and 21 pi ($P < 0.001$). In addition, significant differences were also found between G1 and G2 on day 21 pi ($P < 0.01$), with increased IgG levels in the latter group. All control animals (G4 and G5) showed basal levels throughout the experimental study.

3.2. IFN- γ and IL-4 kinetics in sera

A significant increase of IFN- γ levels in sera was observed on days 5 and 8 pi for G1 and G2 ($P < 0.001$), and on day 8 pi for G3 ($P < 0.01$) compared to control groups (G4+G5). These levels decreased to basal values in all three infected groups from day 12 pi and maintained low levels onwards (Fig. 1B). Kinetics within each group also showed that maximum IFN- γ levels were reached earlier in G1 and G2 (5 dpi) than in G3 (8 dpi). In addition, average levels of IFN- γ were significantly higher in G1 compared to both G2 and G3 at days 5 ($P < 0.001$) and 8 ($P < 0.01$) pi, and in G2 compared to G3 at day 5 pi ($P < 0.001$). Regarding IL-4 responses, there were no changes in levels detected for any infected group (G1-G3) in comparison to basal levels (prior to infection and control animals) (data not shown). None of the control animals (G4 and G5) showed IFN- γ or IL-4 levels above basal levels recorded prior to inoculation throughout the experimental study.

Table 1 - Summary of lesion and PCR detection and quantification of *N. caninum* in placenta and foetal liver and brain.

Group	Foetal death (dpi)	Placenta		Liver		Brain	
		%LES ¹	PCR ²	%LES ¹	PCR ²	%LES ¹	PCR ²
G1 (day 40)	19-21	0.25% ^b	6/6 (7888 ^a)	3.37% ^a	11/11 ^c (6318 ^a)	0.05%	11/11 (1697 ^a)
G2 (day 90)	34-48	9.07% ^a	7/7 (308.5 ^b)	0.02% ^b	5/12 ^d (0.01 ^b)	0.18%	10/12 (0.25 ^b)
G3 (day 120)	born*	5.74% ^a	7/7 (190.8 ^b)	0.16% ^b	4/9 ^d (0.01 ^b)	0.25%	6/9 (0.01 ^b)

dpi: days post infection when abortion occurred; ASF: Average size of focus; %LES: Percentage of section affected by lesions.

(*): All lambs from this group gave birth to viable lambs between days 142 and 155 of gestation. Three of nine lambs were born prematurely prior to day 145, and exhibited weakness, recumbency and unresponsiveness to external stimuli.

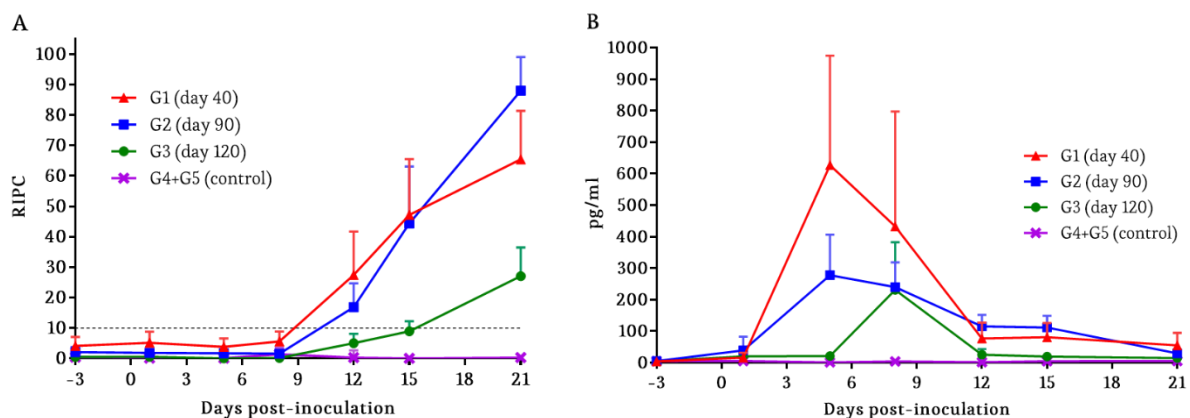
(1): Percentage of the section affected by lesions.

(2): Fractions represent the number of positive animals/total number of animals checked by nested-ITS1 PCR, and figures within brackets represent the median values of parasite burden (tachyzoites/mg tissue).

(a, b): Values followed by unlike superscripts differ significantly by Dunn's test for pairwise comparisons.

(c, d): Fractions determined for positive animals followed by unlike superscripts differ significantly by Fisher's exact test.

Figure 1 - Humoral and cellular immune responses in sera. Graphs representing (A) IgG and (B) IFN- γ levels in sera from ewes inoculated with 10^6 Nc-Spain7 tachyzoites at day 40 (G1), 90 (G2) and 120 (G3) of gestation, as well as control groups (G4+G5). Each point represents the mean + SD at the different sampling times for each group. Data beyond 21 dpi is not represented since several animals did not maintain pregnancy and were therefore sacrificed. Sera levels of total IgG antibodies against *N. caninum* are expressed as a relative index percent (RIPC), according to the formula: $RIPC = (OD_{405} \text{ sample} - OD_{405} \text{ negative control}) / (OD_{405} \text{ positive control} - OD_{405} \text{ negative control}) \times 100$. Concentrations of IFN- γ are expressed in pg/ml.



3.3. Characterization of inflammatory cell populations in placenta

3.3.1. T cells (CD3+, CD4+, CD8+)

CD3+ lymphocytes were found in all the placentas examined from animals in the three periods of gestation. Their number was significantly higher in those infected than those from the non-infected controls ($P < 0.001$), where they were scant. The infiltrate of T cells was more evident in the placentas from G2, where the count of positive cells was significantly higher than in G1 ($P < 0.001$) and G3 ($P < 0.01$) (Fig. 2). There were also differences in the distribution of the positive cells. In placentomes from G1, the group with a lower number of positive cells, these were found mainly in the maternal placenta at the endometrial stalk between the crypts, as a multifocal infiltrate in relation to lesions (focal areas of necrosis and infiltration of inflammatory cells). On the other hand, in G2 and G3, CD3+ cells were found to be abundant in the mesenchyme of the foetal villi as aggregates, but also as a diffuse infiltrate in both the foetal mesenchyme and, to a lesser extent, in the connective tissue of the maternal caruncle (Fig. 3). CD3+ cells were more frequent in the vicinity of lesions, occasionally forming aggregates, but, mostly, they did not infiltrate the necrotic foci.

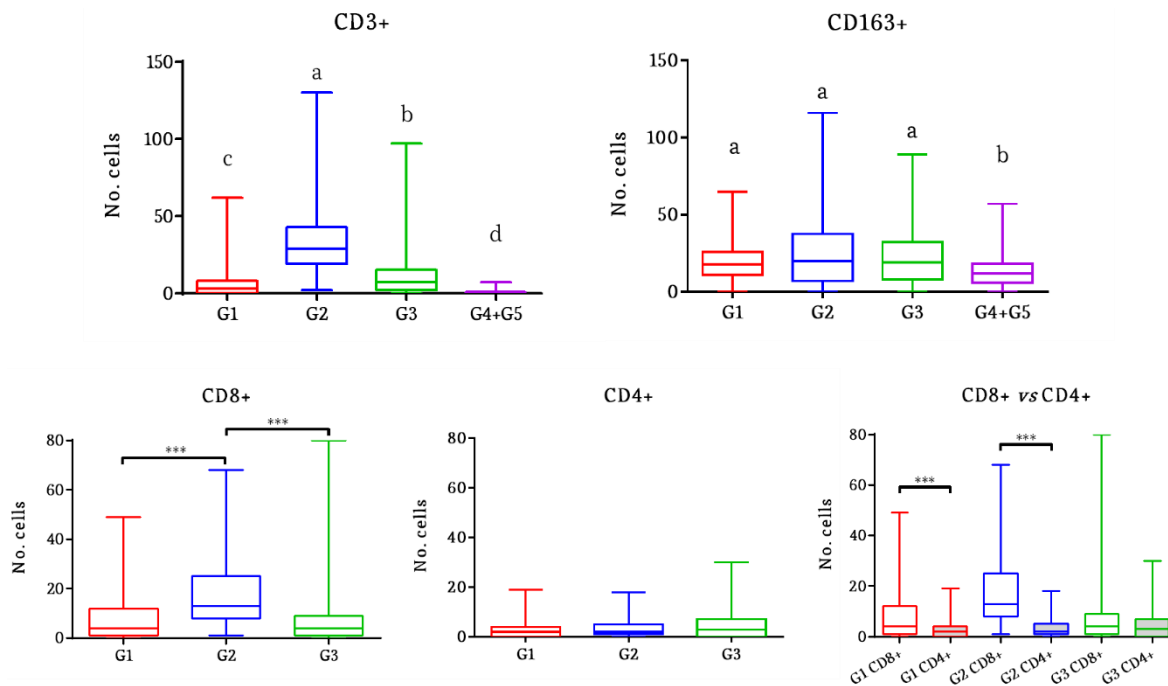
Regarding T cell subpopulations in infected groups, CD8+ cells were significantly more abundant in G2 than in the other two groups ($P < 0.001$), while there were no significant differences regarding CD4+ cells (Fig. 2). In G1, both populations of T lymphocytes appeared associated to lesions in the maternal placenta, while in G2 and G3 these lymphocytes were found mainly in the foetal mesenchyme. In these two groups, CD8+ T lymphocytes were found mainly as a diffuse infiltrate of scattered cells but also, occasionally, as multifocal aggregates related to lesions (Fig. 3). A similar distribution was observed for CD4+ cells, but they were fewer and more dispersed (Fig. 3). At

large, the number of CD8+ cells was higher than CD4+ cells when all infected animals were compared together ($P < 0.001$). Moreover, individual comparison among groups revealed a higher number of CD8+ than CD4+ in all infected groups, although these differences were only statistically significant for G1 and G2 ($P < 0.001$) (Fig. 2). CD4+ and CD8+ labelling in control animals showed very few cells randomly distributed in the maternal stalks of the placentome, mainly in relation to vessels. There were so few cells that only one or two random fields showed positive cells. Subjective evaluation of the entire slide suggested that the number of CD8+ cells was higher, although no statistical analysis was possible due to the scarcity of random fields with positively labelled cells.

3.3.2. Macrophages (CD163+)

Cells labelled for CD163 were found in the placentas of both infected and non-infected control animals at the three periods of gestation. While inoculated animals showed positive cells in both the interdigitate tissues and endometrial areas of the placentome, in the non-infected sheep CD163+ cells were mainly found at the base of the placentome in the maternal endometrium, where they were scattered. Inoculated animals showed a higher number of macrophages than non-infected ($P < 0.001$), although no significant differences were observed between infected groups (Fig. 2). In the placentomes from G1, positive cells were found in the foetal mesenchyme, in relation to parasites, and in the caruncular septae, where they were distributed around vessels. In G2 and G3 the distribution of macrophages was similar, being more numerous in the former, but not showing statistically significant differences (Fig. 2). They were scattered in the foetal mesenchyme and also forming aggregates associated to necrotic lesions in the foetal or maternal villi, while in the caruncular septa they were located around vessels.

Figure 2 - Quantification of immunohistochemically labelled T lymphocytes and macrophages in the placenta. Box-plot graphs representing the median number of cells, the lower and upper quartiles (boxes) and minimum and maximum values (whiskers) of CD3+, CD163+, CD8+ and CD4+ (see legends) cell populations in placentas after intravenous infection of ewes with 10^6 Nc-Spain7 *N. caninum* tachyzoites at day 40 (G1), 90 (G2) and 120 (G3) of gestation. Uninfected control groups (G4+G5) are also represented. Different letters (a to d) above each column indicate significant differences among groups ($P < 0.01$). (***) indicates $P < 0.001$ significant differences between groups.



3.3.3. B cells (CD79 α cy)

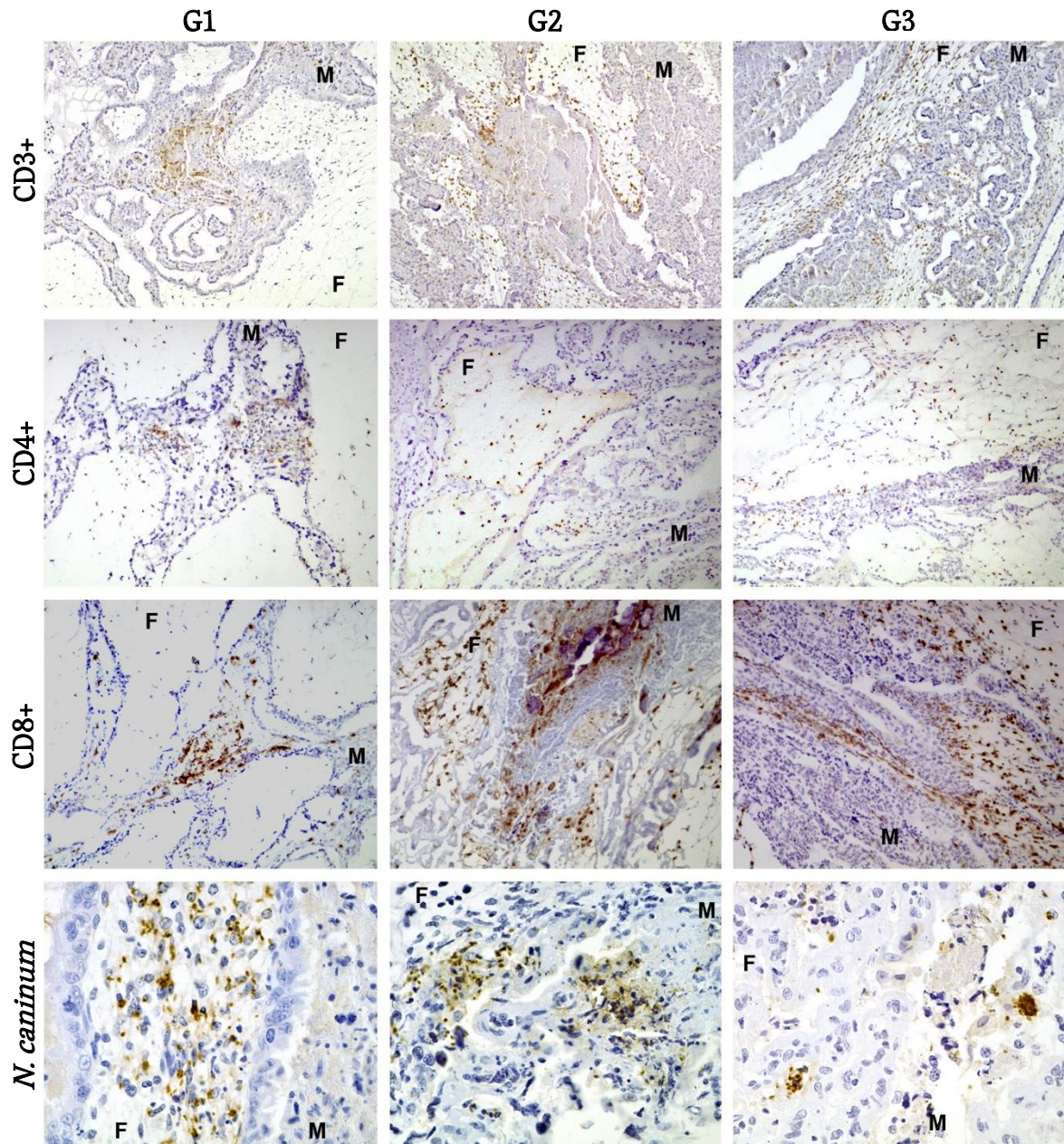
CD79+ cells were very rare in all the placentas studied and no differences were observed between animals, either infected or non-infected.

3.4. Parasite antigen distribution

Immunohistochemical labelling of *Neospora* antigen in placentomes from G1 revealed multifocal distribution of the parasite in the foetal villi. Each of these foci (3-6 per placentome examined) was formed by numerous 5-to-10 μ m wide parasitophorous vacuoles or tachyzoites-like structures localized in the mesenchyme (Fig. 3). In the areas where these parasite structures were found, there was also an increase in the number

of inflammatory cells, mainly in the adjacent maternal stalks but also, to a lesser extent, in the close foetal mesenchyme where the parasite was found. This infiltrate was mainly formed by T lymphocytes (CD3+) and macrophages (CD163+). In the trophoblast layer adjacent or close to these areas, the amount of parasite-like structures was lower. In G2, there were clearly less parasite-like structures than G1. Instead, particulate antigen (amorphous granular debris positively labelled) in relation to necrotic lesions was the main finding (Fig. 3). Finally, in G3, parasite-like structures were labelled in the areas adjacent to the lesion, in a similar amount than G2. There was no particulate antigen in this group (Fig. 3).

Figure 3 - Comparison of the immunohistochemical labelling of T inflammatory cells and parasite antigen in the placenta. This panel compares the distribution and frequency of T lymphocytes (CD3, CD4 and CD8 antigens) and parasite antigen immunohistochemically labelled in samples from the three groups. Pictures showing the labelling of T cells (first three rows) were taken at 75 \times and those of the parasite antigen (last row) were taken at 150 \times . F: foetal mesenchyme. M: Maternal endometrial stalk.



3.5. Cytokine and TLR mRNA expression levels in placental tissues

To characterize the immune response at the foeto-maternal interface after *Neospora* infection in all thirds of gestation, we measured mRNA expression in placentomes of IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-12p40, TNF- α , IL-6 and TGF- β 1 cytokines, as well as TLR2 and TLR4. The selected placentomes from both infected and uninfected ewes showed no differences regarding β -actin mRNA expression (Additional file 3). Those RNA samples with a significant decrease in the β -actin gene expression, suggestive of poor RNA quality by autolysis, were removed from the analysis (1 ewe of G1, 2 of G2 and 2 of G3).

In terms of fold-change (i.e. $2^{-\Delta\Delta Ct}$), a significant increase in the expression levels of all cytokines in the three infected groups was observed, except for IL-12 and IL-6 in G1 and IL-10, IL-12 and TGF- β in G3, which showed no significant differences with uninfected animals. By contrast, TGF- β expression levels in G1 and G2 were significantly downregulated ($P < 0.01$) (Fig. 4A, Additional file 4). Regarding TLR2 and TLR4 expression levels, no significant differences were observed when comparing infected and non-infected groups (Fig. 4B).

When comparing cytokine expression levels within each group, a similar pattern was observed. The most highly increased cytokines were IFN- γ (by 311-3622 fold for G1, 51.7-10460 for G2 and 0.7-783 for G3) and IL-4 (by 33-1764 fold for G1, 15.9-562 for G2 and 2-1393 for G3), followed by modest increases in TNF- α (by 3.9-18.7 fold in G1, 1.3-69.5 for G2 and 0.3-259 for G3). In addition, for all groups, IFN- γ levels were significantly higher than those from IL-12 and TGF- β ($P < 0.05$). Moreover, IFN- γ expression was also higher compared to IL-10 and IL-6 in G1 and G2 ($P < 0.05$), as well as compared to TNF- α in G2 ($P < 0.05$). Similarly, IL-4 levels were significantly higher than those from IL-6, IL-12 and TGF- β in all the three groups ($P < 0.05$), and higher than IL-10 in G3 ($P < 0.05$). Finally, TNF- α and IL-10 levels were

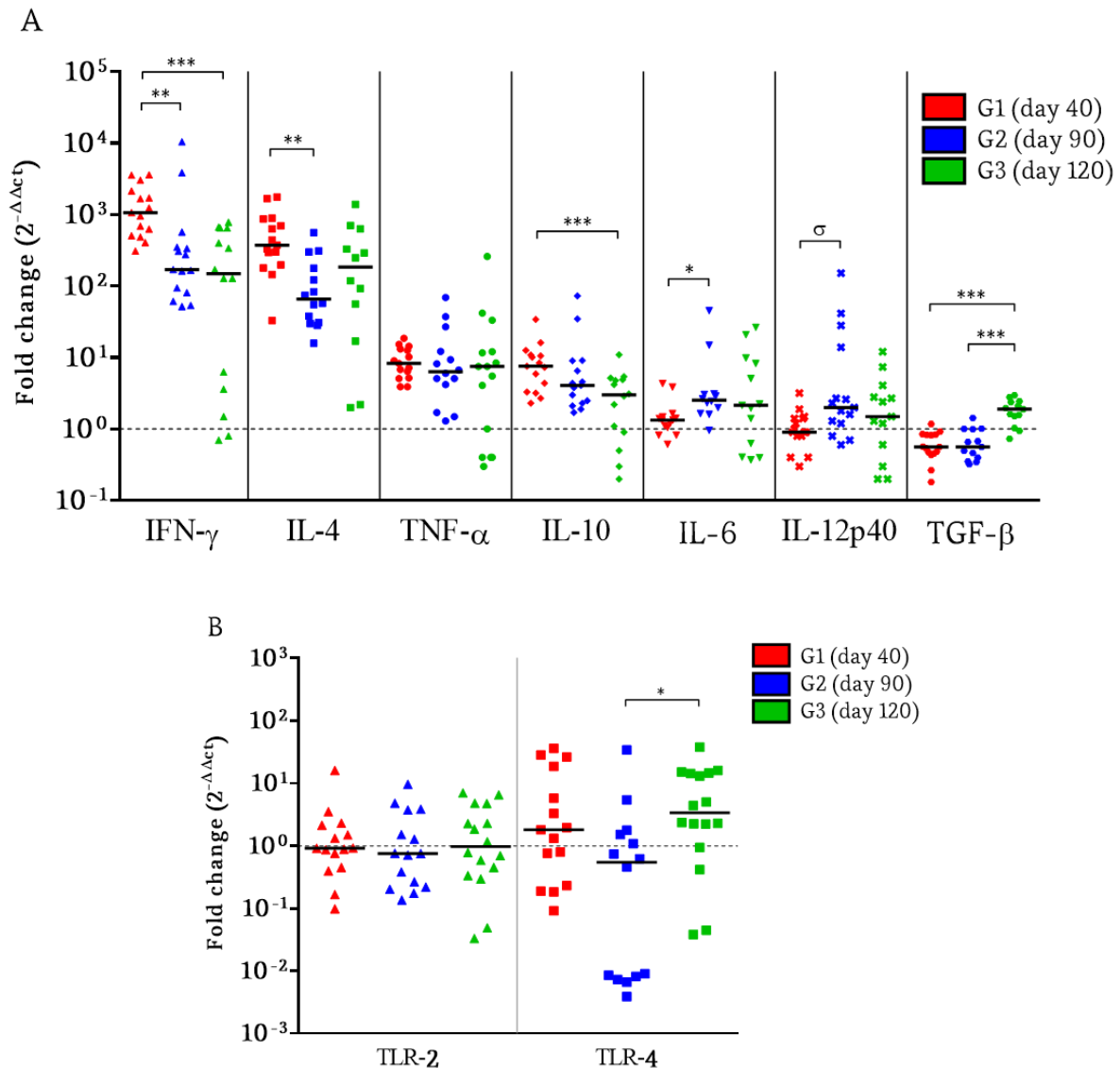
higher than TGF- β in G1 and G2 ($P < 0.05$) and than IL-12 in G1 ($P < 0.05$) (Additional file 4).

In order to study the influence of the period of gestation on the cytokine expression at the materno-foetal interface, further comparison of the cytokine mRNA levels revealed that G1 exhibited significantly higher levels of IFN- γ than G2 ($P < 0.01$) and G3 ($P < 0.001$), higher IL-4 levels than G2 ($P < 0.01$), and increased IL-10 levels than G3 ($P < 0.05$) (Fig. 4A). By contrast, IL-6 expression levels were significantly higher in G2 compared to G1 ($P < 0.05$), while TGF- β were significantly lower in G1 and G2 compared to G3 ($P < 0.001$). Finally, no differences were found in the expression levels of IL-12 and TNF- α between infected groups, except a tendency to significance between G1 and G2 for IL-12 ($P = 0.052$) (Fig. 4A). Similarly, no differences were detected in TLR2 and TLR4 mRNA levels other than slightly higher values of TLR4 in G3 compared to G2 ($P < 0.05$) (Fig. 4B).

4. Discussion

We have recently shown that the outcome of experimental infection in pregnant ewes was highly dependent on the timing of infection during gestation (Arranz-Solís *et al.*, 2015). In analogy to infection in cattle, infection during the first (G1) and second (G2) term produced abortion in all ewes, although foetal death occurred significantly earlier in G1 (19-21 dpi) compared to G2 (34-48 dpi) and infection during the last third of gestation (G3) resulted in the birth of viable, but infected, lambs (22-35 dpi), yet some of them were born prematurely. To gain further insight into ovine neosporosis, our objective in the present study was to study the immune response induced by these experimental infections in all the three groups G1, G2 and G3. As expected, our results demonstrated clear differences between pregnant ewes infected at early, mid and late gestation, supporting the hypothesis that the immune responses play a pivotal role in the possible outcomes scenarios of *N. caninum* infection during pregnancy.

Figure 4 - Placental cytokine and *Toll-like* receptor transcript expression. Scatter-plot graphs of relative mRNA expression levels (as x-fold change) of (A) IFN- γ , IL-4, TNF- α , IL-10, IL-6, IL12p40 and TGF- β cytokines and (B) *Toll-like* receptors (TLR) 2 and 4 in placenta after intravenous infection of ewes with 10^6 Nc-Spain7 *N. caninum* tachyzoites at day 40 (G1), day 90 (G2) and day 120 (G3) of gestation. Data are represented as individual points. Horizontal lines represent median values for each group. The horizontal discontinuous line set at 10^0 indicates uninfected animals baseline. (***) (**), (*) and (σ) symbols indicate $P < 0.001$, $P < 0.01$, $P < 0.05$ significant differences and a tendency to significance ($P = 0.052$), respectively.



The analysis of the peripheral immune response showed an early IFN- γ production in all dams infected early in gestation (G1). This IFN- γ production was not maintained over time and decreased to non-detectable levels from the second week pi, coinciding with a gradual increase of specific IgG levels. These results demonstrate a clear predominance of

IFN- γ levels during the innate immune response. Similar kinetics have been described in previous reports carried out in cattle infected with *Neospora*, where an early increase of IFN- γ production was detected upon stimulation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) between days 5 and 7 pi (Macaldowie *et al.*, 2004; Rosbottom *et al.*, 2007; Gibney *et al.*,

2008; Rojo-Montejo *et al.*, 2009a; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014). Although IL-4 was also detected in these studies in cattle, a noticeable predominance of IFN- γ was described. The absence of IL-4 detection in our study may be explained by the low, and thus undetectable, amounts present in sera, yet this difference could also be due to different responses between sheep and cattle. On the other hand, IgG levels increased from the second week pi onwards until foetal death took place (19-21 dpi). Identical humoral immune responses has been described to occur in both cattle and sheep experimental infections (O'Handley *et al.*, 2002; Bartley *et al.*, 2013; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014).

The analysis of placentas from ewes infected at early gestation in our previous work had demonstrated the highest parasite burdens but only mild lesions, which might be attributed to the short time frame between infection and abortion (Arranz-Solís *et al.*, 2015). Moreover, IHC analysis carried out in the current work confirmed the high amount of tachyzoite-like structures, mainly as free tachyzoites, and showed that the parasite was mostly located in the foetal part of the placenta. Likewise, in a recent study carried out in cattle infected with the same isolate as used here (Nc-Spain7), parasite burden was found to be significantly higher in the cotyledon (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014). This fact can be accounted for the still immature foetal immune system at this stage, which may allow the parasite to cross the placental barrier before the maternal immune response is established, and freely multiply in foetal tissues without restriction (Arranz-Solís *et al.*, 2015). Indeed, the lowest amount of inflammatory cells were found in this group and, interestingly, these were located almost exclusively in the maternal part of the placentome. It seems clear that the immune response elicited in the placenta somewhat controlled parasite multiplication in the maternal area, but not in the foetal one, as observed by IHC. Altogether, these facts point to the parasite uncontrolled multiplication in foetal tissues, and probably the damage caused

by this, as the cause of abortion in ewes infected at early gestation (Arranz-Solís *et al.*, 2015). On the other hand, severe lesions and diffuse infiltration of inflammatory cells in the placenta have been described in cattle upon infection at early gestation (Macaldowie *et al.*, 2004; Gibney *et al.*, 2008; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014; Cantón *et al.*, 2014b). This fact may indicate that, in addition to foetal tissue damage, there could be also a local immune-mediated component in the placenta participating in the pathogenesis of ovine abortion, since very few and only mild lesions were observed in ovine placentas, contrarily to bovine placentas.

In this respect, the cytokine transcript expression profile at the materno-foetal interface in ewes infected at early gestation showed a strong upregulation of IFN- γ and IL-4 mRNA, and milder increases of TNF- α and IL-10, confirming that a mixed Th1- and Th2-type immune response took place. By contrast, no significant expression of IL-6 and IL-12 transcripts could be detected. Comparison with similar studies carried out in cattle, since none have been done in sheep, showed a similar upregulation of IFN- γ , IL-4, TNF- α and IL-10, but also an increase in IL-12 expression levels (Rosbottom *et al.*, 2008; 2011; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014). In these studies, the expression of IL-12 mRNA was reported to be even higher than TNF- α or IL-10, but this was not the case in the current study in sheep. Although several parameters other than host species could also be implicated, it is conceivable that IL-12 may have a less important role for the placental immune response in sheep compared to cattle, or, most probably, that its expression may rapidly decrease following an early peak of expression just after infection. Indeed, it has been demonstrated that IFN- γ production is dependent on a mechanism triggered by IL-12 (Mineo *et al.*, 2009a). Thus, it is possible that IL-12 could decline rapidly once IFN- γ production has set in. Furthermore, although all infected ewes from the three infected groups showed high IFN- γ upregulation at the materno-foetal

interface, the highest levels were found in ewes from G1. This fact has been already described in studies comparing cattle infected at days 70 and 210 of gestation (Rosbottom *et al.*, 2008; Cantón *et al.*, 2014a). As argued above, the high expression levels of IFN- γ transcripts could be due to the high parasite burden found in placentas of ewes from G1, which efficiently stimulates a Th1-biased immune response. In addition, the uncontrolled tachyzoite proliferation in the foetal part of the placentome could have been continuously stimulating the immune response in the maternal area.

On the other hand, the expression of regulatory cytokines transcripts in dams from G1 displayed a contrasting behaviour, with IL-10 being upregulated and TGF- β downregulated. The increment of IL-10 has been previously described in bovine infections, suggesting that it could be secreted as a response to the high IFN- γ levels and, to a lesser extent, TNF- α Th1-type cytokines (Rosbottom *et al.*, 2008; 2011; Almería *et al.*, 2011; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014). Similarly, a relation between parasite burden and IL-10 induction in placenta have been postulated in the pregnant mouse model, as a means of regulation of the Th1 immune response (López-Pérez *et al.*, 2010). By contrast, TGF- β is considered a signature cytokine for the activity of regulatory T cells, acting as a growth inhibitor (Zenclussen, 2006). Therefore, this downregulation may be consequence of low suppressive functions of Tregs at the materno-foetal interface, which can potentially facilitate an IFN- γ biased Th1/Th2 balance with detrimental effects on pregnancy (Entrican, 2002; Innes *et al.*, 2002).

Regarding the infection at mid-gestation (G2), similar kinetics in the peripheral immune responses were observed. The *N. caninum*-specific IgG antibody responses displayed similar levels, and maintained high until foetal death occurred (34-48 dpi). Nevertheless, IFN- γ production showed lower levels compared to ewes from G1, indicating a weaker initial

immune response stimulation in G2. This fact might have led to a lower initial control of parasitaemia at the peripheral level, allowing higher number of parasites to reach the placenta (Entrican, 2002; Innes *et al.*, 2005). This, in turn, may have resulted in a higher initial stimulation of the immune response at the materno-foetal interface in an attempt to control parasite dissemination to the foetus. As we pointed out in our previous work, the more severe lesions together with the lower parasite burden found in placentas from G2 suggests that the inflammatory response developed in this organ has been effective in controlling tachyzoite proliferation, maybe because of the longer time frame between infection and abortion, but it has also damaged placental tissues (Arranz-Solís *et al.*, 2015). In accordance to this, the lower parasite burden found in the placenta corresponds with the scarce labelling of parasite antigen found by IHC in the current study. Parasite antigen was mainly found as particulate antigen, instead of intact tachyzoites. This particulate antigen most likely originated from tachyzoites that were degraded by immune effectors. Moreover, placentas from G2 harboured the highest numbers of inflammatory cells, mainly formed by T lymphocytes. In addition, the development of the foetal immune system at this stage could also have aided the maternal immune response to partially control the transplacental transmission, yet not to a protective degree. This correlates with the parasite burden and lesions found in foetal organs from this group, especially in the liver, which showed to be much lower compared to those from G1 (Arranz-Solís *et al.*, 2015). Taken together, our results suggest that in ewes infected at mid-gestation (G2) foetal death was most likely a consequence of the severe lesions elicited in the placenta.

On the other hand, when the cell population involved in the inflammatory response was analysed, one striking finding of this study was the predominance of CD8+ over CD4+ cells. Previous studies in cattle and buffaloes found

the opposite (Maley *et al.*, 2006; Rosbottom *et al.*, 2011; Cantón *et al.*, 2013; 2014c). Moreover, CD4+ cells have been shown to be more relevant in the protection against neosporosis (Tanaka *et al.*, 2000a). The reason for the high number of CD8+ cells in sheep is not clear. It has been found that CD8+ cells could predominate over CD4+ as early responders to *N. caninum* (48 hours pi) (Correia *et al.*, 2013). However, in the present study the infection was not in an early stage. Why CD8+ cells are more abundant than CD4+ in the ovine placenta when abortion due to neosporosis occurs deserves further investigations.

The cytokine profile observed in placentas of ewes infected at mid-gestation showed to be very similar to that of G1, yet, by and large, it was less intense in G2. The only difference in this regard was the slight upregulation of IL-6 and IL-12 found in this group, which was not observed neither in G1 nor G3. Previous studies in bovine neosporosis and murine toxoplasmosis also revealed an upregulation of IL-6 in placentas at mid-gestation (Almería *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012). In fact, IL-6 has been considered a pleiotropic and regulatory cytokine that could play a relevant role in the host defence against *N. caninum* (Pinheiro *et al.*, 2010). On the other hand, the important role of IL-12 in the control of neosporosis has been widely discussed elsewhere (Hemphill *et al.*, 2006). Previous studies in cattle have described much higher increases of IL-12 in dams after *N. caninum* infection, as mentioned earlier. However, the predominance of a Th1-biased response, described to be the most efficacious to control intracellular parasites such as *Neospora*, was apparently ineffective to control the parasite proliferation in placentas of G1 and G2. Nevertheless, in contrast to G1, ewes from G2 displayed lower cytokine expression levels, which, in addition to the upregulation of regulatory IL-6 mentioned before, may be a consequence of the partial control of the parasite achieved at the materno-foetal interface.

As for infection at late gestation (G3), the IgG response was less pronounced and was elicited in ewes at a later time point compared to G1 and G2. Likewise, the IFN- γ response was slightly delayed (day 7 pi), but was at a similar level as the G2 IFN- γ response. On the other hand, the parasite burden was lower and the placental lesions were less frequently observed (Arranz-Solís *et al.*, 2015). However, IHC demonstrated that only few parasites were associated to lesions and, similarly, only few inflammatory cells were found, mainly located in the foetal part of the placenta. This differences in comparison to G2 may be accounted for the higher capacity of the foetus to control the parasite since its immune system is more mature at this stage, but also to the shorter time window between infection and delivery of lambs. Therefore it is tempting to hypothesise that the triggering of birth avoided the occurrence of abortion in this group, as implied by the premature delivery of the three weak lambs that exhibited higher parasite burdens and lesions compared to the other six lambs of the group (Arranz-Solís *et al.*, 2015).

Under this scenario, the immune response at the materno-foetal interface, as assessed by quantification of cytokine transcripts, revealed a different pattern when compared to the other groups with respect to the IFN- γ /IL-4 ratio, IL-10 and TGF- β . The IFN- γ /IL-4 ratio, biased towards IFN- γ in G1 and G2 (when foetal death occurred), was reduced in the last term (G3), as both cytokines were transcribed at similar levels. This fact has not been described to happen in experimental infections in cattle, where a similar IFN- γ /IL-4 mRNA ratio, biased towards IFN- γ , is present in the placenta after *N. caninum* infection at both early and late gestation (Rosbottom *et al.*, 2008). The balance between Th1 and Th2 cytokines expression has been suggested to be of paramount importance in determining the severity and outcome of the disease following *N. caninum* infection (Long *et al.*, 1998; Gibney *et al.*, 2008). Since no other reports in this regard are available in sheep, further studies are needed to elucidate the

importance of the IFN- γ /IL-4 ratio in the control of the parasite and its detrimental effects to the foetus. On the other hand, the decreased IL-10 levels, in addition to the fact that TGF- β mRNA levels remained stable (in contrast to G1 and G2), may be suggestive of a lower regulatory functions in the placenta, which is in accordance to the balanced IFN- γ /IL-4. Notably, this more balanced ratio in sheep from G3 did not limit lesions, or only to a little extent, observed in placenta, but avoided the occurrence of abortion (Arranz-Solís *et al.*, 2015). Finally, the analysis of TLR2 and TLR4 mRNA in the placenta showed no significant expression in any infected sheep. These receptors recognize bacteria and protozoa (Uematsu & Akira, 2008), and have been suggested to play an important role in innate immune response in human placenta (Hayati *et al.*, 2010). Moreover, an increase in TLR2 expression has been found in maternal lymph nodes 56 days after *N. caninum* infection in cattle at late gestation (Bartley *et al.*, 2013). The lack of expression in the ovine experimental model could suggest that these receptors do not possess an important role in the recognition of *N. caninum* in the placenta or in sheep, or more likely, that their activation takes place at a time frame that is different from the one studied here.

In conclusion, this is the first work in sheep comparing the immune responses that are elicited after *N. caninum* infection during the three trimesters of gestation under the same standardized conditions. Our results suggest that while abortion in G1 may be mainly caused by the uncontrolled parasite multiplication in the foetus, abortion in G2 is more likely to be triggered by immune mediated responses leading to severe lesions in placenta. The fact that no abortions occurred in G3 could be due to the short time span between infection and birth of lambs. In addition, very similar antibody responses and cytokine and cell population profiles have been previously described in cattle. However, a number of

differences between sheep and cattle are evident, such as the much lower IL-12 secretion and the inverted balance of the CD4+/CD8+ population ratio in ovine placenta. These results shed new light into the pathogenesis of ruminant neosporosis and pose interesting questions that certainly warrant further research.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

JB, JRC, IF AH and LMO conceived the study and participated in its design; DAS and JB wrote the manuscript, with results interpretation and discussion inputs from JRC, ECF, VP, AH and LMO; DAS, JRC, PH and LJP designed and performed RT-qPCR analysis. JB, PC, MCF and VP conducted immunohistochemical analyses and interpreted the results. DAS carried out serological assays, statistical analysis and interpreted the results. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge Esperanza Selva from the SALUVET group (Complutense University of Madrid, Spain), Mario Ferrero, Melchor Molero, Ivan Panero, Miguel Fernández and Carmen Espiniella from IGM (CSIC-ULE) and Idoia Badiola, from Agropal S. C. for their excellent technical assistance. D. Arranz is supported by a fellowship from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO), as part of the Program of Training of Researcher Staff (FPI, grant number BES-2011-043433). This work was supported by the Swiss National Foundation (SNF grant No. 310030_146162), research grant LE253U13 from Junta de Castilla y León (Spain) and the Iberoamerican science and technology programme for development (CYTED; 113rt0469).

Additional file 1 – Primary antibodies used in the immunohistochemical labelling of antigens in the placentas.

Antigen	Target	mAb information	Dilution
CD163	Monocytes/macrophages	MCA1853 ^{5, b}	1:200
CD3	Total T lymphocytes	Polyclonal ^{1, b}	1:200
CD4	CD4 T lymphocytes	CC30 ^{3, c}	1:250
CD8	CD8 T lymphocytes	CC38.65 ^{3, c}	1:500
CD79 _{acy}	Total B cells	HM57 ^{1, b}	1:25
<i>N. caninum</i>	Parasite	In house ^a	1:3000

(1) Dako Cytomation, Glostrup, Denmark.

(2) VMRD Inc, Washington, USA.

(3) AbD Serotec, Oxford, UK.

(4) Sigma Aldrich. Spain.

(5) Bio-Rad Laboratories, Inc. USA.

(a) Trypsin incubation, (b) Heat Induced Epitope Retrieval (c) late gestation experiments.

Additional file 2 - Sequences of primers used for cytokine real-time PCR (qPCR) and standard curve data.

Target ^a	Primer	Primer sequences (5'-3')	Product size (bp)	R ² ^b	Slope ^c	CV (%) ^d
IFN-γ (X52640.1)	QIFN-UP ^{*1}	GATCAAATCCGGTGGATG	110	0.996	(-3.40)-(-3.20)	2.26 ₍₋₆₎ -1.68 ₍₋₂₎
	QIFN-RP ¹	TTCTCTCCGCTTCTGAGG				
IL-4 (XM_004008636.1)	QIL4ov-UP [*]	CTGCCCAAAGAACGCAACT	154	0.996	(-3.62)-(-3.48)	7.24 ₍₋₁₎ -0.95 ₍₋₆₎
	QIL4-RP ^{*2}	TCATTCACAGAACAGGTCTTGCTT				
IL-10 (NM_001009327.1)	QIL10-UP ^{*2}	TGCTGGATGACTTTAAGGGTTACC	60	0.997	(-3.23)-(-3.22)	7.22 ₍₋₁₎ -2.33 ₍₋₇₎
	QIL10-RP ¹	AAAACCTGGATCATTCCGACAAG				
IL-12p40 (NM_001009438.1)	QIL12-UP ²	ATGGAATTTGGTCCACTGATATT	95	0.997	(-3.33)-(-3.20)	4.22 ₍₋₂₎ -1.10 ₍₋₅₎
	QIL12-RP ²	GTGAAGTGTCCAGAATAATCCTTT				
TNF-α (NM_001024860.1)	QTNF-UP ^{*1}	CCAGAGGGAAGAGCAGTCC	126	0.996	(-3.24)-(-3.19)	6.69 ₍₋₂₎ -2.28 ₍₋₇₎
	QTNFov-RP [*]	GGAGCGCTGATGTTGGCTAC				
IL-6 (X68723.1)	QIL-6-UP [*]	CTGGGTTCATCAGGCGATT	150	0.998	(-3.38)-(-3.33)	3.31 ₍₋₁₎ -0.04 ₍₋₄₎
	QIL-6-RP	GGATCTGGATCAGTGTCTGA				
TGF-β1 (NM_001009400.1)	QTGF-UP [*]	GGTGAATACGGCAACAAAA	117	0.998	(-3.47)-(-3.36)	2.06 ₍₋₁₎ -0.35 ₍₋₆₎
	QTGF-RP	CGAGAGAGCAACACAGTTTC				
TLR-2 (NM_001048231.1)	QTLR2-UP ³	ACGACGCCTTTGTGTCCTAC	192	0.997	(-3.74)-(-3.47)	2.95 ₍₋₆₎ -0.84 ₍₋₂₎
	QTLR2-RP ³	CCGAAAGCACAAAGATGGTT				
TLR-4 (NM_001135930.1)	QTLR4-UP ³	ACTGACGGGAAACCTATCC	208	0.997	(-3.41)-(-3.35)	1.03 ₍₋₆₎ -0.75 ₍₋₃₎
	QTLR4-RP ³	CAGGTTGGGAAGGTCAGAAA				
β-actin (NM_001009784.1)	BACTIN-UP ^{*1}	ACACCGCAACAGTTCGCCAT	216	0.992	(-3.63)-(-3.46)	2.23 ₍₋₁₎ -0.20 ₍₋₆₎
	QBACT216-RP ¹	GTCAGGATGCCTCTCTTGCT				

(a) NCBI accession numbers are for ovine cDNA sequences used in primer design. Primer annealing was also checked with the *Ovis aries* genomic DNA sequences of the chromosome 2 for TLR4, the chromosome 3 for IFN- γ , the chromosome 4 for IL-6, the chromosome 5 for IL-4 and IL12p40, the chromosome 12 for IL-10, the chromosome 14 for TGF- β 1, the chromosome 17 for TLR2, the chromosome 20 for TNF- α and the chromosomes 14 and 24 for β -actin in NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>).

(b) Minimal coefficient of regression (R^2) of standard curves for each PCR target in all batches of amplification, based on 10-fold dilutions (10^{-1} - 10^{-7}) of 10 ng/ μ l from plasmid stocks. Ct values increased linearly until the level of 10^{-7} dilution of all plasmids.

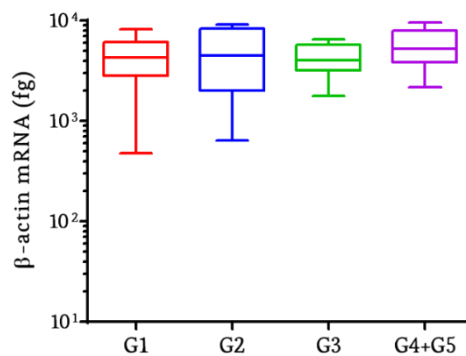
(c) Standard curve slopes. Minimal and maximal values for slopes for each PCR target in all batches of amplification.

(d) Inter-assay coefficient of variation. CV values indicate the maximum and minimum CVs of all points from standard curves for each PCR target run in this study. Subscript numbers indicate curve point for CV values.

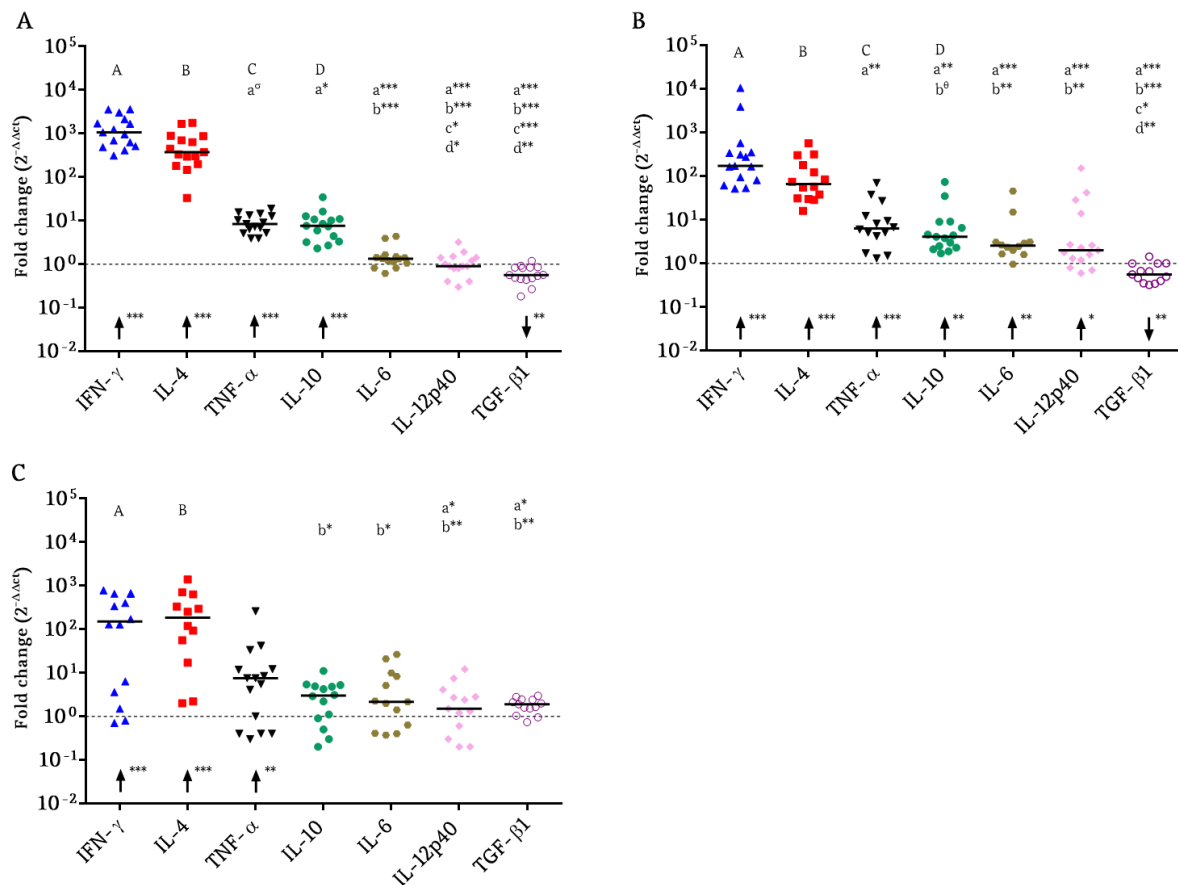
(*) Indicates primers annealing at intron splice junctions. No amplification products were detected when ovine genomic RNA free-DNA samples were tested with cytokine primers (data not shown).

(1, 2, 3) Primer first described by Regidor-Cerrillo *et al.* (2014), Rosbottom *et al.* (2008) and Menzies and Ingham (2006), respectively. No. number superscript indicates primers designed in this study.

Additional file 3 - Housekeeping gen β -actin mRNA expression levels in placentomes. Box-plot graph of the β -actin mRNA expression levels in placentomes from infected (G1, G2 and G3) and uninfected (G4 and G5) ewes, expressed as femtograms (fg). No significant differences were observed between groups.



Additional file 4 - Placental cytokine expression levels per group. Scatter-plot graphs of relative cytokine mRNA expression levels (as x-fold change) in placentas after intravenous infection of ewes with 10^6 Nc-Sp7 *N. caninum* tachyzoites at (A) day 40 (G1), (B) day 90 (G2) and (C) day 120 (G3) of gestation. Data are represented as individual points. Horizontal lines represent median values for each group. The horizontal discontinuous line set at 10^0 indicates threshold of uninfected animals. Upward and downward arrows above each cytokine name in the x axis indicate significant up or downregulation, respectively, for that cytokine. The same letter in upper and lower case placed above different cytokines indicate significant differences between them, being the higher one in uppercase. (***) (**), (*) and (σ) symbols following letters and arrows indicate $P < 0.001$, $P < 0.01$, $P < 0.05$ and $P = 0.06$ significant differences.



CAPÍTULO V

DISCUSIÓN GENERAL
GENERAL DISCUSSION

“El mejor científico está abierto a la experiencia, y esta empieza con un romance, es decir, la idea de que todo es posible.”

Ray Bradbury (1920-2012)

Bovine neosporosis is an important worldwide disease which causes abortion and neonatal mortality (Dubey & Schares, 2011), and thus entails economic losses associated with lengthened calving interval, reduced stock value and increased culling rate (Trees *et al.*, 1999; Reichel *et al.*, 2013). Control measures for bovine neosporosis include management, chemotherapy and vaccination (Dubey *et al.*, 2007a). To date, drugs and vaccination are considered the best control strategy in the case of high prevalence of the disease (Reichel & Ellis, 2006). Unfortunately, there are no current drugs or vaccines available on the market for neosporosis, and therefore there is an urgent need to develop control measures aimed at preventing its transmission and infection, as well as reducing severity of the disease. In this sense, a large amount of research focuses its efforts on the development of new candidates that may be effective in protecting against abortion and vertical transmission. For that purpose, both *in vitro* and *in vivo* models have served as different approaches. *In vitro* assays offer a reduction in the usage of animals for experimentation, and provide high throughput screening of drugs or antibodies directed against potential vaccine targets (Müller & Hemphill, 2013). However, *in vivo* models are essential for the study of several aspects that otherwise could not be assessed by means of *in vitro* culture. Apart from being of great utility for studies related to host-parasite relationship, immune response or pathogenesis, experimental animal models of infection are essential tools for an adequate evaluation of efficacy of vaccines or drugs developed against neosporosis (Reichel & Ellis, 2009).

Ideally, investigations related to neosporosis should be performed in cattle, since the cow is the most relevant and economically important target host. Nevertheless, due to economic constraints and space-limitations, many initial experiments have been performed in small laboratory animals, mostly in mice (Monney & Hemphill, 2014). In spite of the fact that rodents and cattle exhibit somewhat different immunological characteristics, considerable insights into *Neospora* host-parasite interactions have been gained in mice, being the BALB/c mice the most widely employed mouse breed for studies on the parasite infection biology (López-Pérez *et al.*, 2010, Regidor-Cerrillo *et al.*, 2010 and Dellarupe *et al.*, 2014b) and as proof-of-concept model for the assessment of drugs (Debache *et al.*, 2011; Schorer *et al.*, 2012; Debache & Hemphill, 2012a; Ojo *et al.*, 2014). Most notably, the pregnant BALB/c model has demonstrated various degrees of efficacy for a number of vaccine candidates (Aguado-Martínez *et al.*, 2009; Debache *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010; Marugán-Hernández *et al.*, 2011; Monney *et al.*, 2012; Rojo-Montejo *et al.*, 2012), and enabled researchers to assess the effects of parasite infection and respective vaccines on both progeny and dams.

On the other hand, despite the broad usage of the mice model for the study of neosporosis and for proof-of-concept assays of vaccine and drug candidates, the obvious physiological and size differences between rodents and ruminants render the results obtained in mice poorly reliable. In this sense, the employment of other animal models more proximate to cattle could serve as a good alternative. Besides being a natural host to *N. caninum*, sheep offer several advantages over cattle in terms of number and size of animals, handling, costs and timing of experiments. Therefore, it would seem suitable as a model for further research. Moreover, even though the epidemiological, clinical and economic

relevance of the parasite for reproductive failure in small ruminants has remained elusive, recent studies suggest that neosporosis may be a more important cause of reproductive disorders than it has traditionally been considered, at least in certain scenarios (West *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2012; Howe *et al.*, 2012; González-Warleta *et al.*, 2014).

Regardless, since different research groups employ different animal models and experimental conditions, it is difficult to directly compare the results, and a certain level of standardization would represent a great improvement. The necessity of consensus guidelines including isolates/strains of the parasite, challenge dose, time and route of challenge, preparation of inoculum, animal model (mice, cattle, sheep) and other parameters has been posed by several authors (Benavides *et al.*, 2014). It therefore seems clear that standardization is needed to advance research in a more collaborative, timely and efficient manner. Taking all this into consideration, the present Doctoral Thesis addresses two main objectives: the standardization of a well-defined pregnant mouse model of neosporosis (Objective 1) and the development of a sheep model by studying the effect of infection in the three periods of gestation (Objective 2).

In both cases, the Spanish isolate Nc-Spain7 was used. This isolate was obtained from an asymptomatic calf (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2008), possess a low and controlled number of culture passages and has been thoroughly characterised in both *in vitro* and *in vivo* models, showing a high repeatability. Moreover, results obtained with this isolate have shown a strong correlation between experimental models, since the high replication rates in *in vitro* culture (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2011) is in accordance with the high capacities for producing postnatal mortality in the mouse model (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2010; Collantes-Fernández *et al.*, 2012; Dellarupe *et al.*, 2014b) and foetal death in the bovine model (Casper *et al.*, 2012; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014). The timing of parasite culture passage has been acknowledged to play an important role, since attenuation due to prolonged *in vitro* maintenance of *N. caninum* isolates has been previously described (Long *et al.*, 1998; Bartley *et al.*, 2006). In these experiments, parasites with a low number of passages (8-15) were employed, which ensured that no, or only minimal, loss of virulence occurred. In addition, an important aspect to be taken into account is the manipulation of parasites during inocula preparation. Hence, parasites were collected from cell cultures when the great majority of tachyzoites were still intracellular, thus assuring optimal invasion capacities (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2011). Moreover, it has been shown earlier that extracellular maintenance of *N. caninum* tachyzoites induces rapid loss of infectivity (Naguleswaran *et al.*, 2003). Therefore, all procedures were undertaken rapidly and at low temperature, and animals were infected within 30 min of parasite isolation.

For the attainment of the first objective, a dose titration of the broadly used pregnant BALB/c mouse model for *N. caninum* infection was carried out, so as to standardize and refine this model for its use in further studies. Besides the most frequently used dose for experimental infection of 2×10^6 tachyzoites, inoculations of 10^5 , 10^4 , 10^3 and 10^2 tachyzoites were also assessed, and the outcome of infection was evaluated by measuring morbidity, mortality, cerebral parasite load and humoral immune responses. Surprisingly, the differences between highest and lowest doses were much lower than expected, since

experimental infection with as little as 100 tachyzoites could induce high mortality in both dams and offspring. As expected, results obtained in mice inoculated with 2×10^6 tachyzoites showed high levels of morbidity, mortality and cerebral parasite load in both non-pregnant and pregnant mice, confirming the high capacity of the Nc-Spain7 isolate to spread widely, persist in dams, cross the placenta and infect the offspring. This mirrors findings reported in previous studies using the same pregnant mouse model and isolate, confirming the reproducibility and robustness of the pregnant BALB/c mouse model based on inoculation with the Nc-Spain7 isolate (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2010, Collantes-Fernández *et al.*, 2012 and Dellarupe *et al.*, 2014b), and those employing the virulent isolate Nc-Liverpool (Marugán-Hernández *et al.*, 2011; Dellarupe *et al.*, 2014b; Pastor-Fernández *et al.*, 2015). Importantly, reduction of tachyzoite numbers by a factor 20 (from 2×10^6 to 10^5) did not alter median survival time, parasite burden and immune responses in both pregnant and non-pregnant mice, and was still capable of causing 100% pup mortality until day 30 pp. Interestingly, even dams infected with lower numbers of tachyzoites were able to transmit the parasite to their offspring, as illustrated by pup mortality rates of 76–90% in the groups infected with 10^2 , 10^3 and 10^4 tachyzoites.

All infected dams and non-pregnant mice elicited a specific humoral immune response, as shown by ELISA. Nevertheless, IgG1 and IgG2a isotype profiles varied in some groups. Those groups inoculated with lower tachyzoite numbers (below 10^4 in non-pregnant and 10^2 in pregnant mice) had diminished IgG1 production compared to other groups, whereas IgG2a levels remained similar in all infected groups, which finally lead to an IgG2a biased immune response in those animals infected with a lower tachyzoite numbers. This dose-dependent modulation of the immune response is consistent with previous reports, in which mice administered with low number of parasites appears to degrade the IgG1 response (Lundén *et al.*, 2002; Rojo-Montejo *et al.*, 2012). When a high parasite number is administered, a large number of tachyzoites may remain extracellular, eliciting a humoral immune response, while the inoculation of a low number of parasites might lead to the internalization of most of the tachyzoites inside the early antigen presenting cells, enhancing a cell-mediated immunity.

The cerebral parasite burden in infected mice was determined by real time PCR, in most cases at 4–6 week pi. Remarkably, all groups infected with 10^3 up to 10^6 tachyzoites exhibited similar parasite loads, irrespective of the infection dose. Only in the mice infected with 100 tachyzoites were consistently lower. These data correlate with the nervous signs, which were more frequently observed in mice inoculated with 2×10^6 to 10^3 tachyzoites. In earlier studies, increased infection in the brain was also associated with the appearance of neurological clinical signs (Long *et al.*, 1998; Collantes-Fernández *et al.*, 2006b; López-Pérez *et al.*, 2008). In the group infected with 100 tachyzoites, two dams were found to be PCR-negative, but vertical transmission also occurred in these two dams, since their pups died and parasites were detected in pup brain samples. These findings suggest that tachyzoites rapidly disseminate following infection, cross the placenta and reach foetal tissues, while crossing the blood brain barrier might be a more time-consuming undertaking, and could also be impaired by the low numbers of tachyzoites injected. The IgG2a-dominated antibody profile

is suggestive for a more Th1-biased cellular immune response, which could also prevent tachyzoite proliferation in dams and limit the number of tachyzoites reaching the brain. However, more investigations on cytokine expression profiles are needed to clarify this point.

Although non-pregnant mice infected with 2×10^6 and 10^5 tachyzoites displayed severe signs of neurological disease, similarly to dams, no clinical signs were noted and good body condition without significant weight loss was maintained in those animal infected with the lower doses. Thus, infection with a lower number of tachyzoites (10^4 – 10^2) renders non-pregnant mice clearly less susceptible to disease compared to pregnant mice. This was consistent with the data on cerebral parasite burden, which was higher in pregnant mice compared to non-pregnant mice inoculated with 10^3 and 10^4 tachyzoites. This is probably due to the immune modulation that occurs during pregnancy (Aguado-Martínez *et al.*, 2009; Pastor-Fernández *et al.*, 2015). Differences in antibody responses in pregnant *versus* non-pregnant mice were also detected: higher IgG2a and (more markedly) IgG1 levels in pregnant mice are indicative of a predominantly humoral immune response. This rather Th2-driven immune response in pregnant mice protects foetal viability, with the disadvantage of a less efficient immune response against an invading pathogen such as *N. caninum*. However, upon infection with 2×10^6 and 10^5 tachyzoites, even non-pregnant mice suffered severe clinical signs and exhibited similar parasite burden in the brain to pregnant mice.

Taken all results together, it seems clear that a maximum infectious dose of 10^5 tachyzoites allows more accurate and realistic results to be obtained. As for the use of this model for vaccine development and/or drug design, it becomes evident that most studies have been carried out with an excessively high challenge dose. This may have led to a premature dismissal of potential active formulations. Hence, future assays should be carried out using lower infection doses. These results may lay the foundations for the refinement of a standardized *Neospora* pregnant mouse model, which might be used widely by different research groups for further assessments of drug or vaccine candidates against neosporosis. Looking ahead, a dose titration assay should also be implemented in the bovine model, since the infection doses employed so far in this model have been high (usually 10^7) and the outcome of infection with lower number of tachyzoites is unknown. Besides, it has also been argued in previous studies that infection in the first term of gestation using such doses may bias for an early discard of drug or vaccine candidates. Therefore, a similar approach as given here with the mouse model would imply a considerable improvement to the bovine model for future assays.

Regarding the sheep model, previous experimental infections in pregnant ewes have shown that sheep are highly susceptible to infection, and display a similar pathogenesis and disease outcomes as reported for cattle (McAllister *et al.*, 1996; Buxton *et al.*, 1998; Weston *et al.*, 2009). However, there are no reports during different pregnancy periods within the same study and under the same experimental conditions. Clearly, the availability of well-defined ruminant infection models is a key factor for the evaluation of vaccine and drug candidates (Benavides *et al.*, 2014). Consequently, the second objective of the present Doctoral Thesis was to investigate the outcome of experimental infection by *N. caninum* in ewes under

standardized conditions at early (40 dg), mid (90 dg) and late (120 dg) stages of pregnancy. This allowed the evaluation of the effect of the gestation period on the clinical course, lesion development and parasite distribution in different organs (Sub-objective 2.1), as well as assessment of both local and peripheral immune responses (Sub-objective 2.2). In addition, the basis of the usefulness of sheep as a model for exogenous transplacental transmission for ruminant neosporosis was also established. To our knowledge, this is the first study in which all three periods of gestation have been tested within the same experiment under the same conditions (isolate, breed, dose and route of administration).

Similarly to the objective 1, the well characterized and highly virulent Nc-Spain7 isolate (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2008) was used for the experimental infection. This same isolate has been described to cause 100% foetal death upon experimental infection of pregnant cows during the first trimester of gestation (Caspé *et al.*, 2012; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014). The intravenous route of inoculation was chosen so as to mimic parasitaemia produced in natural infections (Dubey *et al.*, 2006). Finally, the inoculation dose, 10^6 tachyzoites, was a 1:10 dilution of that commonly used in cattle (i.e. 10^7 tachyzoites) (Williams *et al.*, 2007; Rosbottom *et al.*, 2007; Almería *et al.*, 2010; Rojo-Montejo *et al.*, 2013; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014), considering the weight difference between cattle and sheep (approx. 10:1).

Infection during the first period of gestation (G1) showed similar results to those reported in previous experiments carried out at early gestation in cattle (Williams *et al.*, 2007; Caspé *et al.*, 2012; Rojo-Montejo *et al.*, 2013) and sheep (Buxton *et al.*, 1998), in which foetal death and abortion were observed. The analysis of the peripheral immune response showed an early IFN- γ production in all dams. This IFN- γ production was not maintained over time and decreased to non-detectable levels from the second week pi, coinciding with a gradual increase of specific IgG levels. These results demonstrate a clear predominance of IFN- γ levels during the innate immune response. Similar kinetics have been described in previous reports carried out in cattle infected with *Neospora*, where an early increase of IFN- γ production was detected upon stimulation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) between days 5 and 7 pi (Macaldowie *et al.*, 2004; Rosbottom *et al.*, 2007; Gibney *et al.*, 2008; Rojo-Montejo *et al.*, 2009a; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014). Although IL-4 was also detected in these studies in cattle, a noticeable predominance of IFN- γ was described. The absence of IL-4 detection in our study may be explained by low, and thus undetectable, amounts present in sera, yet this difference could also be due to different responses between sheep and cattle. On the other hand, IgG levels increased from the second week pi onwards until foetal death took place (19-21 dpi). Identical humoral immune responses has been described to occur in both cattle and sheep experimental infections (O'Handley *et al.*, 2002; Bartley *et al.*, 2013; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014).

On the other hand, lesions and parasite burden found in both dams and fetuses from G1 confirm that the parasite readily disseminates in pregnant sheep, crosses the placenta and subsequently induces foetal damage. In fact, the highest parasite burdens were found in placentomes from this group, but only mild lesions were observed. This might be attributed to the short period of time that occurred between infection and abortion (19–21 days), thus limiting the development of histological lesions. Moreover, IHC analysis confirmed the high

amount of tachyzoite-like structures, mainly as free tachyzoites, and showed that the parasite was mostly located in the foetal part of the placenta. Likewise, in a recent study carried out in cattle infected with the same isolate as used here (Nc-Spain7), parasite burden was found to be significantly higher in the cotyledon (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014). It has already been suggested that the lack of mature immune response at this stage of foetal development would allow the parasite to cross the placenta and colonise foetal viscera and multiply with ease (Rosbottom *et al.*, 2008; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014). Indeed, the lowest amount of inflammatory cells was found in this group and, interestingly, these were located almost exclusively in the maternal part of the placentome. It seems clear that the immune response elicited in the placenta somewhat controlled parasite multiplication in the maternal area, but not in the foetal one, as observed by IHC. In accordance with this, the highest frequency of detection and parasite burden was detected in foetuses from this group (G1), where *N. caninum* was widely detected in the brain, liver, heart and semitendinosus muscle of all foetuses. There was a good correlation between parasite burden and frequency of lesions in the foetal liver, which most probably represents the gateway for the parasite to invade the foetus through the umbilical vein. This correlation did not occur in the brain, where there was a high parasite burden (though not as high as in the liver), but the histological lesions were much less frequent. While the reason for this difference is not clear, it is known that antigen levels required to produce lesions in the immune privileged brain are, at least, ten times higher than those needed in other organs, and inflammatory reactions require more time to develop (Matyszak, 1998). In addition, the contrast between mild lesions in the placenta and severe multifocal necrosis in the foetal liver may suggest that the abortion is a consequence of the foetal lesions, similarly suggested to occur in bovine neosporosis at early gestation (Rosbottom *et al.*, 2008; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014).

Altogether, these facts point to the uncontrolled parasite multiplication in foetal tissues, and probably the damage caused by this, as the cause of abortion in ewes infected at early gestation. Nevertheless, very few and only mild lesions were observed in placenta, contrary to descriptions from experimental infections in cattle at early gestation, where severe lesions and diffuse infiltration of inflammatory cells was a common finding (Macaldowie *et al.*, 2004; Gibney *et al.*, 2008; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014; Cantón *et al.*, 2014b). This may indicate that, in addition to foetal tissue damage, a local immune-mediated component in the placenta cannot be discarded as a feasible cause in the pathogenesis of ovine abortion.

In this respect, the cytokine transcript expression profile observed after the analysis of the immune response at the materno-foetal interface in ewes infected at early gestation showed a strong upregulation of IFN- γ and IL-4, and milder increases of TNF- α and IL-10, confirming that a mixed Th1 and Th2 type immune response took place. By contrast, no significant expression of IL-6 and IL-12 could be detected. Comparison with similar studies carried out in cattle, since none have been done in sheep, showed a similar upregulation of IFN- γ , IL-4, TNF- α and IL-10, but also an increase in IL-12 expression levels (Rosbottom *et al.*, 2008; 2011; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014). In these studies, the expression of IL-12 mRNA was reported to be even higher than TNF- α or IL-10, but this was not the case in the current study in sheep. Although several parameters other than host species could also be

implicated, it is conceivable that IL-12 may have a less important role for the placental immune response in sheep compared to cattle, or, most probably, that its expression may rapidly decrease following an early peak of expression just after infection. Indeed, it has been demonstrated that IFN- γ production is dependent on a mechanism triggered by IL-12 (Mineo *et al.*, 2009a). Thus, it is possible that IL-12 could decline rapidly once IFN- γ production has set in. Furthermore, although all infected ewes from the three infected groups showed high IFN- γ upregulation at the materno-foetal interface, the highest levels were found in ewes from G1. This fact has already been described in previous reports comparing cattle infected at days 70 and 210 of gestation (Rosbottom *et al.*, 2008; Cantón *et al.*, 2014a). As argued above, the high expression levels of IFN- γ transcripts could be due to the high parasite burden found in placentas of ewes from this group, which efficiently stimulates a Th1-biased immune response. In addition, the uncontrolled tachyzoite proliferation in the foetal part of the placentome could have been continuously stimulating the immune response in the maternal area.

On the other hand, the expression of regulatory cytokines transcripts in dams from G1 displayed a contrasting behaviour, with IL-10 being upregulated and TGF- β downregulated. The increment of IL-10 has been previously described in bovine infections, suggesting that it could be secreted as a response to the high IFN- γ levels and, to a lesser extent, TNF- α Th1-type cytokines (Rosbottom *et al.*, 2008; 2011; Almería *et al.*, 2011; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014). Similarly, a relation between parasite burden and IL-10 induction in placenta has been postulated in the pregnant mouse model, as a means of regulation of the Th1 immune response (López-Pérez *et al.*, 2010). By contrast, TGF- β is considered a signature cytokine for the activity of regulatory T cells, acting as a growth inhibitor (Zenclussen, 2006). Therefore, this downregulation may be consequence of low suppressive functions of Tregs at the materno-foetal interface, which can potentially facilitate an IFN- γ biased Th1/Th2 balance with detrimental effects on pregnancy (Entrican, 2002; Innes *et al.*, 2002).

Previous studies addressing the infection in ewes at mid-gestation (mainly at day 90) have reported a variety of results, which could be attributed to the different time points chosen for infection as well as the isolate, dose, breed and the employed route of administration (McAllister *et al.*, 1996; Buxton *et al.*, 1998; Innes *et al.*, 2001a; Weston *et al.*, 2009). Nevertheless, all of them reported high rates, of even 100%, of abortion. Conversely, the most commonly reported outcome in cattle after experimental infection at mid-gestation is the delivery of live, although congenitally infected, calves (Barr *et al.*, 1994b; Almería *et al.*, 2003; Gondim *et al.*, 2004c). However, abortion has also been reported (Dubey & Rommel, 1992; Almería *et al.*, 2010) and it is actually at this stage when most of the abortions in natural infection occur (Dubey *et al.*, 2007a; Benavides *et al.*, 2014). Considering our findings and those from former experimental infections, it seems that infection of sheep at mid-gestation generally results in more dramatic consequences than in cattle, as most of the ewes aborted or, less frequently, produced weak lambs. Although these differences may be related to the species, similarly to the discrepancy between sheep and cattle regarding the placental damage at early gestation, it is also possible that the doses used in this and previous experiments (even up to 10^8) have been excessively aggressive for the ovine model. This

suggestion is supported by the fact that previous studies employing lower doses obtained more variable outcomes, ranging from few aborted foetuses to birth of weak or healthy lambs (McAllister *et al.*, 1996; Weston *et al.*, 2009). Nevertheless, information concerning parasite dose and isolate virulence is limited. Hence, in order to address the standardization of a pregnant model in sheep, further experiments would be desirable to compare outcomes from different inoculation doses and various *N. caninum* isolates.

On the other hand, the kinetics observed in the peripheral immune responses was similar to that from G1. The *N. caninum*-specific IgG antibody responses displayed similar levels, and maintained this high level until foetal death occurred (34–48 dpi). Nevertheless, IFN- γ production in sera showed lower levels compared to ewes from G1, indicating a weaker initial immune response stimulation in G2. This fact might have led to a lower initial control of the parasitaemia at the peripheral level, allowing a higher number of parasites to reach the placenta (Entrican, 2002; Innes *et al.*, 2005). This, in turn, may have resulted in a higher initial stimulation of the immune response at the materno-foetal interface in an attempt to control parasite dissemination to the foetus. Despite the lower parasite burden found in the placenta compared to G1, more severe lesions were observed in this organ. This fact suggests that the inflammatory response developed has been effective in controlling the parasite, maybe because of the longer period of time elapsed since infection, but has also damaged the organ as a “bystander effect”.

In addition, the specific antibodies detected in foetal fluids confirmed that the foetal immune system is undergoing development at this stage, which could also have aided the maternal immune response to partially control the transplacental transmission, yet not to a protective degree. This correlates with the parasite burden and lesions found in foetal organs from this group, especially in the liver, which showed to be much lower compared to those from G1. The liver is probably the first foetal organ reached by the parasite through the umbilical vein, so the three additional weeks compared to G1 may have given the organ time to control parasite infection and clear the lesions, as it has been previously observed (Buxton *et al.*, 1998). This, together with the shift from necrotic to inflammatory characteristic of the lesions, was most likely also a consequence of the maturation of foetal immune response. Taken together, we can presume that in ewes infected at mid-gestation (G2) foetal death was most likely produced on account of the severe lesions elicited in the placenta. The lower parasite burden found in the placenta corresponds to the scarce labelling of parasite antigen detected by IHC, mainly found as particulate antigen instead of intact tachyzoites. This particulate antigen most likely originated from tachyzoites that were degraded by immune effectors. Moreover, placentas from G2 harboured the highest numbers of inflammatory cells, mainly formed by T lymphocytes.

The cytokine profile observed in placentas of ewes infected at mid-gestation showed to be very similar to that of G1, yet, by and large, it was less intense in G2. The only difference in this regard was the slight upregulation of IL-6 and IL-12 found in this group, which was not observed neither in G1 nor G3. Previous studies in bovine neosporosis and murine toxoplasmosis also revealed an upregulation of IL-6 in placentas at mid-gestation (Almería *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012). In fact, IL-6 has been considered a pleiotropic and regulatory

cytokine that could play a relevant role in the host defence against *N. caninum* (Pineiro *et al.*, 2010). On the other hand, the important role of IL-12 in the control of neosporosis has been widely discussed elsewhere (Hemphill *et al.*, 2006). Previous studies in cattle have described much higher increases of IL-12 in dams after *N. caninum* infection, as mentioned earlier. However, the predominance of a Th1-biased response, described to be the most efficacious to control intracellular parasites such as *Neospora*, was apparently ineffective in controlling the parasite proliferation in placentas of G1 and G2. Nevertheless, in contrast to G1, ewes from G2 displayed lower cytokine expression levels, which, in addition to the upregulation of regulatory IL-6 mentioned before, may be a consequence of the partial control of the parasite achieved at the materno-foetal interface.

As for infection at late gestation (G3), the IgG response in ewes was less pronounced and was elicited at a later time point compared to G1 and G2. Likewise, the IFN- γ response was slightly delayed (day 7 pi), but was at a similar level as the G2 IFN- γ response. Notwithstanding, all ewes from this group delivered live lambs, although 3/9 were born before day 145 and showed weakness and unresponsiveness. These results are in accordance with those previously described for both pregnant cattle (Williams *et al.*, 2000; Gibney *et al.*, 2008; Benavides *et al.*, 2012) and sheep (McAllister *et al.*, 1996), in which the delivery of live, but congenitally infected, calves or lambs with no obvious clinical signs is the most common consequence of experimental infection during the third term of gestation. However, although infection of the placenta and fetuses (i.e. transplacental transmission) occurred in all sheep from this group, the three lambs prematurely born showed both higher parasite burden and number of lesions in brain and liver compared to the other six lambs born after day 145. Moreover, parasites could only be detected in the lymph nodes from the dams that delivered these three premature animals.

Sera from lambs collected before suckling showed a range of titres from negative to 1:128, being 4/6 lambs born apparently healthy after day 145 of gestation seronegative. Nevertheless, 3 of these 4 lambs were infected as proven by PCR. Therefore, as lambs were culled soon after birth, we do not know what would have happened thereafter, and can only hypothesise that the seronegative lambs would have survived as persistently infected animals. By contrast, those prematurely born with high parasite detection and showing weakness and recumbency may have not survived long after delivery, as they were too weak to be nourished by the mother. On the other hand, parasite burden and lesions found in placenta from this group, lower and less frequent still, were similar to those observed in G2. However, IHC demonstrated that only a small number of parasites were associated with lesions and, similarly, few inflammatory cells were found, mainly located in the foetal part of the placenta. These differences in comparison to G2 may be accounted for the higher capacity of the foetus to control the parasite, since its immune system is more mature at this stage, but also to the shorter time window between infection and delivery of lambs. Therefore it is tempting to hypothesise that the triggering of birth avoided the occurrence of abortion in this group, as implied also by the premature delivery of the three lambs exhibiting weakness.

The immune response at the materno-foetal interface revealed a different pattern when compared to the other groups with respect to the IFN- γ /IL-4 ratio, IL-10 and TGF- β . The IFN- γ /IL-4 ratio, biased towards IFN- γ in G1 and G2 (when foetal death occurred), was reduced in the last term (G3), as both cytokines were transcribed at similar levels. This fact has not been described in experimental infections in cattle, where a similar IFN- γ /IL-4 mRNA ratio, biased towards IFN- γ , is present in the placenta after *N. caninum* infection at both early and late gestation (Rosbottom *et al.*, 2008). The balance between Th1 and Th2 cytokine expression has been suggested to be of paramount importance in determining the severity and outcome of the disease following *N. caninum* infection (Long *et al.*, 1998; Gibney *et al.*, 2008). Since no other reports in this regard are available in sheep, further studies are needed to elucidate the importance of the IFN- γ /IL-4 ratio in the control of the parasite and its detrimental effects to the foetus. On the other hand, the decreased IL-10 levels, in addition to the fact that TGF- β mRNA levels remained stable (in contrast to G1 and G2), may be suggestive of a diminished regulatory function in the placenta, which is in accordance with the balanced IFN- γ /IL-4. Notably, this more balanced ratio in sheep from G3 did not limit lesions, or only to a slight extent, observed in placenta, but avoided the occurrence of abortion.

Finally is it worth mentioning that the quantification of histological lesions in the placenta and foetuses has shown to be very useful in addition to the interpretation of the results from this experiment, thus broadening the sheep model utility. In a similar approach, Buxton *et al.* (1997) described how the number of necrotic foci in the placenta increased with time post-infection up to a maximum, around 40 days pi, from which the organ recovered and the number of foci decreased sharply. These observations correlate with our results, suggesting that: a) there is a relationship between the time post-infection and the severity of the lesions and b) lesions may regress in the affected organs. The latter has been described to occur in the placenta (Buxton *et al.*, 1997) and, according to the present results, also in the foetal liver, but not in the foetal brain, maybe due to the limited regeneration capacity of this organ.

In addition, when the cell population involved in the inflammatory response at the materno-foetal interface was analysed, one striking finding of this study was the predominance of CD8+ over CD4+ cells in all groups. Previous studies in cattle and buffaloes found the opposite (Maley *et al.*, 2006; Rosbottom *et al.*, 2011; Cantón *et al.*, 2013; 2014c). Moreover, CD4+ cells have been shown to be more relevant in the protection against neosporosis (Tanaka *et al.*, 2000a). The reason for the high number of CD8+ cells in sheep is not clear, although it cannot be ruled out that this difference may be related to the isolate employed. It has been found that CD8+ cells could predominate over CD4+ as early responders to *N. caninum* (48 hours pi) (Correia *et al.*, 2013). However, in the present study, the infection was not in an early stage. Thus, why CD8+ cells are more abundant than CD4+ in the ovine placenta when abortion due to neosporosis occurs deserves further investigations.

Lastly, the analysis of TLR2 and TLR4 mRNA in the placenta showed no significant expression in any infected sheep. These receptors recognize bacteria and protozoa (Uematsu & Akira, 2008) and have been suggested to play an important role in innate immune

response in human placenta (Hayati *et al.*, 2010). Moreover, an increase in TLR2 expression has been found in maternal lymph nodes 56 days after *N. caninum* infection in cattle at late gestation (Bartley *et al.*, 2013). The lack of expression in the ovine experimental model could suggest that these receptors do not possess an important role in the recognition of *N. caninum* in the placenta or in sheep, or more likely, that their activation takes place at a time frame that is different from the one studied here.

In the light of these results, it seems that the experimental infection of sheep had similar outcomes, in terms of abortions and birth of weak or clinically healthy lambs, and shows very similar antibody responses, cytokine and cell population profiles to that described in cattle. However, a number of differences between sheep and cattle are evident, such as the higher likelihood of abortion at mid-gestation, the much lower IL-12 secretion and the inverted balance of the CD4+/CD8+ population ratio in placenta for ewes.

Although more studies would be necessary, the ovine model represents an appropriate model of exogenous transplacental transmission as a valuable alternative to cattle. In this sense, a new sheep model based on an intravenous dose of 10^6 tachyzoites of the Nc-Spain7 isolate inoculated at day 90 of gestation is proposed. With this model, foetal death is induced in all infected animals, yet under less aggressive conditions for the foetus in comparison to the infection at day 40 of gestation, on account of the development of the materno-foetal immune response at this stage. This would allow the assessment of vaccines and drug candidates against transplacental transmission and abortion in a ruminant model. In addition, as mentioned above, it would be interesting to perform a dose titration assay also in the ovine model, so as to establish the most appropriate dose for this species in future studies

To summarise, in this doctoral thesis a standardisation of pregnant mouse and sheep *Neospora* models has been performed. These experimental models represent a cost-effective alternative to the bovine model depending on the purpose of the study. While mice are ideally suited for a low time-and-resource consuming screening of new drug or vaccine candidates, sheep stand as a much more reliable and robust extrapolation to the most relevant host, cattle. Regardless, standardisation of the experimental bovine model remains a prime objective for the better study of neosporosis and, especially, for a more accurate testing of vaccine or drug candidates. Several authors have pointed out the urgent need for this in order to develop a consensus for internationally accepted standard guidelines that would be helpful for researchers in this field worldwide. In this sense, a similar approach as given here could be implemented. Besides the accurate definition and standardization of all the parameters already discussed, it is worth mentioning that a recrudescence model would be desirable, since under field conditions endogenous transplacental transmission is the major transmission route. This model would allow to study the recrudescence processes of *N. caninum* infection during pregnancy, and thus to gain further insight into the host-parasite relationship and control strategies.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

Objetivo 1. Normalización del modelo murino de infección por *N. caninum* en ratones BALB/c gestantes mediante un ensayo de titulación de dosis con el aislado virulento Nc-Spain7.

Primera. La inoculación del aislado virulento Nc-Spain7 en el modelo murino gestante, utilizando dosis decrecientes desde 2×10^6 hasta 10^2 taquizoítos, causa la infección en los ratones inoculados, presentando unas tasas elevadas de transmisión transplacentaria y mortalidad en la descendencia.

Segunda. El incremento en la dosis infectante da lugar a un aumento en la producción de anticuerpos IgG1 específicos, lo que podría estar asociado con una menor internalización de los taquizoítos y una mayor presencia de parásitos extracelulares en el hospedador, favoreciendo una respuesta inmunitaria Th2. Por el contrario, la inoculación de dosis bajas del parásito induce una respuesta Th1 con una producción predominante de IgG2a específica.

Tercera. Se propone un modelo murino BALB/c gestante de primoinfección basado en la inoculación subcutánea de una dosis máxima de 10^5 taquizoítos del aislado Nc-Spain7 entre los días 7 y 10 de gestación. Con esta dosis se infectan la totalidad de los animales inoculados, transmitiéndose el parásito a toda la progenie y dando lugar a un 100% de mortalidad postnatal. Este ajuste de dosis permitirá obtener resultados más precisos en los ensayos iniciales de evaluación de fármacos y vacunas.

Objetivo 2. Caracterización de la infección experimental por *N. caninum* en la oveja durante los tres tercios de gestación.

Primera. Las consecuencias de la infección por *N. caninum* en la oveja, la presencia y carga parasitarias, así como el cuadro lesional y la respuesta inmunitaria, dependen del momento de la gestación y del grado de desarrollo de la placenta y del sistema inmunitario del feto cuando se produce la infección.

Segunda. La infección durante el primer tercio de gestación origina el aborto a partir de la tercera semana post-infección. La muerte fetal podría estar relacionada con la amplia distribución del parásito en diversos tejidos, la alta carga parasitaria y la gravedad de las lesiones observadas en el feto, principalmente en el hígado. Como consecuencia de la infección se observa una exacerbada sobreexpresión de las citoquinas IFN- γ e IL-4 en la placenta. Los altos niveles de IFN- γ podrían comprometer el mantenimiento de la gestación por sus efectos perjudiciales en la placenta, mientras que la sobreexpresión de la citoquina IL-4, junto con la ausencia de inmunocompetencia fetal, favorecerían la transmisión transplacentaria de *N. caninum* y su multiplicación incontrolada en los órganos fetales en este periodo.

Tercera. La infección en el segundo tercio de gestación induce el aborto a partir de la quinta semana post-infección. La muerte fetal en este periodo se asocia al daño placentario, ya que se observa una fuerte reacción inflamatoria y extensas lesiones en la placenta de los animales abortados. La infección induce un aumento en la expresión de las citoquinas IFN- γ e IL-4 en la placenta, aunque de menor magnitud que en el primer tercio de gestación. Este

hecho podría estar relacionado con un menor estímulo antigénico producido como consecuencia del control parcial de la infección gracias al desarrollo de la inmunidad fetal, lo que concuerda con las menores cargas parasitarias observadas en la placenta y en el feto en este periodo.

Cuarta. La infección en el último tercio de gestación causa el nacimiento de corderos viables pero congénitamente infectados. Las cargas parasitarias y la gravedad de las lesiones son similares a las del segundo tercio, por lo que la ausencia de muerte fetal en este periodo podría estar relacionada con el equilibrio en la relación Th1/Th2 existente en la placenta, caracterizado por niveles similares de IFN- γ e IL-4 y la expresión de niveles normales de IL-10 y TGF- β , a diferencia de lo observado en el primer y segundo periodo de gestación.

Quinta. Se propone un nuevo modelo ovino de primoinfección basado en el uso de una dosis de 10^6 taquizoítos del aislado Nc-Spain7 inoculados por vía intravenosa en el día 90 de gestación. Este modelo permitiría evaluar la eficacia de fármacos y vacunas frente a la transmisión transplacentaria y el aborto en un modelo rumiante. Además, en comparación con la inoculación en el día 40 de gestación, este modelo permite la determinación de la protección en un entorno menos agresivo para el feto, debido al desarrollo de la respuesta inmunitaria materno-fetal en este periodo.

Objective 1. Normalization of the *N. caninum* infection mouse model in BALB/c pregnant mice by a dose-titration assay of the virulent Nc-Spain7 isolate.

First. Inoculation of the virulent Nc-Spain7 isolate in the pregnant mouse model, using decreasing doses from 2×10^6 to 10^2 tachyzoites, causes the infection in the mice inoculated, showing high transplacental transmission and postnatal mortality rates.

Second. The increase in the infection dose induces a higher production of specific IgG1 antibodies, which may be associated with a lower internalization of tachyzoites and a higher number of extracellular parasites in the host, contributing to a Th2-type immune response. By contrast, inoculation of lower doses of the parasite induces a Th1 response with a predominance of specific IgG2a.

Third. A new BALB/c pregnant mouse model of primoinfection based on a maximum dose of 10^5 tachyzoites of the Nc-Spain7 isolate subcutaneously inoculated at day 7-10 of gestation is proposed. With this dose, infection occurs in all mice inoculated, the parasite being transplacentally transmitted to all the progeny and causing 100% postnatal mortality. This adjustment will allow the obtainment of more accurate results in initial vaccine and drug assays.

Objective 2. Characterization of the *N. caninum* experimental infection in sheep in the three terms of gestation.

First. The consequences of *N. caninum* infection in sheep, the parasite detection and burden, as well as the lesions and immune responses, depend on the time of gestation and the degree of development of the placenta and foetal immune system when infection takes place.

Second. Infection during the first term of gestation produces abortion from the third week post-infection. Foetal death could be related with the broad parasite distribution in several tissues, the high parasite burden, as well as the severe lesions observed in the foetus, mainly in the liver. As a consequence of the infection, an exacerbated upregulation of IFN- γ and IL-4 cytokines is observed in placenta. The high levels of IFN- γ could jeopardise the maintenance of gestation on account of its detrimental effects in the placenta, while the upregulation of IL-4, together with the absence of foetal immunocompetence, would facilitate *N. caninum* transplacental transmission and its uncontrolled multiplication in foetal organs at this stage.

Third. Infection during the second third of gestation induces abortion from the fifth week post-infection. Foetal death in this term is associated with placental damage, since a strong inflammatory reaction and extensive lesions are observed in placenta from aborting animals. The infection induces an increment of IFN- γ and IL-4 cytokine expression in the placenta, although to a lesser extent than in the first term. This fact could be related to lower antigenic stimuli produced as a consequence of the partial control of infection due to the foetal immune system development, which is in accordance with the lower parasite burden observed in the placentas and foetuses in this period.

Fourth. Infection in the last term of gestation results in the birth of viable, although congenitally infected, lambs. Parasite burdens and severity of lesions are similar to those from the second term, hence the absence of foetal death at this stage could be related to the balanced Th1/Th2 relation in the placenta, characterised by similar levels of IFN- γ and IL-4 and the normal expression of IL-10 and TGF- β , in contrast to that observed in the first and second term of gestation.

Fifth. A new primoinfection ovine model based on the usage of an intravenous dose of 10^6 Nc-Spain7 tachyzoites at day 90 of gestation is proposed. This model would permit the assessment of the efficacy of drugs and vaccines against transplacental transmission and abortion in a ruminant model. Moreover, in comparison to infection at day 40 of gestation, this model allows the determination of protection in a less aggressive scenario for the foetus, due to the development of the materno-foetal immune response at this stage.

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFÍA/REFERENCES

- Abo-Shehada MN, Abu-Halaweh MM, **2010**. Flock-level seroprevalence of, and risk factors for *Neospora caninum* among sheep and goats in northern Jordan. *Preventive veterinary medicine* 93 (1), 25-32.
- Aguado-Martínez A, Álvarez-García G, Arnaiz-Seco I, Innes E, Ortega-Mora LM, **2005**. Use of avidity enzyme-linked immunosorbent assay and avidity Western blot to discriminate between acute and chronic *Neospora caninum* infection in cattle. *Journal of veterinary diagnostic investigation* 17 (5), 442-450.
- Aguado-Martínez A, Álvarez-García G, Fernández-García A, Risco-Castillo V, Arnaiz-Seco I, Rebordosa-Trigueros X, Navarro-Lozano V, Ortega-Mora LM, **2008**. Usefulness of rNcGRA7- and rNcSAG4-based ELISA tests for distinguishing primo-infection, recrudescence, and chronic bovine neosporosis. *Veterinary parasitology* 157 (3-4), 182-195.
- Aguado-Martínez A, Álvarez-García G, Fernández-García A, Risco-Castillo V, Marugán-Hernández V, Ortega-Mora LM, **2009**. Failure of a vaccine using immunogenic recombinant proteins rNcSAG4 and rNcGRA7 against neosporosis in mice. *Vaccine* 27 (52), 7331-7338.
- Alaeddine F, Keller N, Leepin A, Hemphill A, **2005**. Reduced infection and protection from clinical signs of cerebral neosporosis in C57BL/6 mice vaccinated with recombinant microneme antigen NcMIC1. *The Journal of parasitology* 91 (3), 657-665.
- Alaeddine F, Hemphill A, Debache K, Guionaud C, **2013**. Molecular cloning and characterization of NcROP2Fam-1, a member of the ROP2 family of rhopty proteins in *Neospora caninum* that is targeted by antibodies neutralizing host cell invasion *in vitro*. *Parasitology* 140 (8), 1033-1050.
- Alkurashi M, Eastick FA, Kuchipudi SV, Rauch C, Madouasse A, Zhu XQ, Elsheikha HM, **2011**. Influence of culture medium pH on internalization, growth and phenotypic plasticity of *Neospora caninum*. *Veterinary parasitology* 177 (3-4), 267-274.
- Almería S, De Marez T, Dawson H, Araujo R, Dubey JP, Gasbarre LC, **2003**. Cytokine gene expression in dams and foetuses after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. *Parasite immunology* 25 (7), 383-392.
- Almería S, Araujo R, Tuo W, López-Gatius F, Dubey JP, Gasbarre LC, **2010**. Fetal death in cows experimentally infected with *Neospora caninum* at 110 days of gestation. *Veterinary parasitology* 169 (3-4), 304-311.
- Almería S, Araujo RN, Darwich L, Dubey JP, Gasbarre LC, **2011**. Cytokine gene expression at the materno-foetal interface after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. *Parasite immunology* 33 (9), 517-523.
- Almería S, López-Gatius F, **2013**. Bovine neosporosis: clinical and practical aspects. *Research in veterinary science* 95 (2), 303-309.
- Almería S, Darwich L, Serrano B, Domingo M, Regidor-Cerrillo J, Cabezón O, Mur I, García-Isperto X, Fernández-Aguilar M, Puig M, Ortega-Mora LM, López-Gatius F, **2015**. Experimental infection of pregnant cattle with *Neospora caninum* Nc-Spain7 strain at 110 days of gestation. *3rd Apicowplexa meeting: Apicomplexa in farms animals* 30 Jun-3 Jul, Edinburgh.
- Almería S, López-Gatius F, **2015**. Markers related to the diagnosis and to the risk of abortion in bovine neosporosis. *Research in veterinary science* 100, 169-175.
- Álvarez-García G, Pereira-Bueno J, Gómez-Bautista M, Ortega-Mora LM, **2002**. Pattern of recognition of *Neospora caninum* tachyzoite antigens by naturally infected pregnant cattle and aborted foetuses. *Veterinary parasitology* 107 (1-2), 15-27.
- Álvarez-García G, Collantes-Fernández E, Costas E, Rebordosa X, Ortega-Mora LM, **2003**. Influence of age and purpose for testing on the cut-off selection of serological methods in bovine neosporosis. *Veterinary research* 34 (3), 341-352.
- Álvarez-García G, García-Culebras A, Gutiérrez-Expósito D, Navarro-Lozano V, Pastor-Fernández I, Ortega-Mora LM, **2013**. Serological diagnosis of bovine neosporosis: a comparative study of commercially available ELISA tests. *Veterinary parasitology* 198 (1-2), 85-95.

Alves Neto AF, Bandini LA, Nishi SM, Soares RM, Driemeier D, Antoniassi NA, Schares G, Gennari SM, **2011**. Viability of sporulated oocysts of *Neospora caninum* after exposure to different physical and chemical treatments. *The Journal of parasitology* 97 (1), 135-139.

Anderson ML, Blanchard PC, Barr BC, Dubey JP, Hoffman RL, Conrad PA, **1991**. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 198 (2), 241-244.

Andrianarivo AG, Choromanski L, McDonough SP, Packham AE, Conrad PA, **1999**. Immunogenicity of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite preparation formulated with different adjuvants. *International journal for parasitology* 29 (10), 1613-1625.

Andrianarivo AG, Rowe JD, Barr BC, Anderson ML, Packham AE, Sverlow KW, Choromanski L, Loui C, Grace A, Conrad PA, **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. *International journal for parasitology* 30 (9), 985-990.

Andrianarivo AG, Barr BC, Anderson ML, Rowe JD, Packham AE, Sverlow KW, Conrad PA, **2001**. Immune responses in pregnant cattle and bovine fetuses following experimental infection with *Neospora caninum*. *Parasitology research* 87 (10), 817-825.

Andrianarivo AG, Anderson ML, Rowe JD, Gardner IA, Reynolds JP, Choromanski L, Conrad PA, **2005**. Immune responses during pregnancy in heifers naturally infected with *Neospora caninum* with and without immunization. *Parasitology research* 96 (1), 24-31.

Armengol R, Pabon M, Santolaria P, Cabezón O, Adelantado C, Yaniz J, López-Gatius F, Almería S, **2007**. Low seroprevalence of *Neospora caninum* infection associated with the limousin breed in cow-calf herds in Andorra, Europe. *The Journal of parasitology* 93 (5), 1029-1032.

Arranz-Solís D, Benavides J, Regidor-Cerrillo J, Fuertes M, Ferre I, Ferreras M, Collantes-Fernández E, Hemphill A, Pérez V, Ortega-Mora LM, **2015**. Influence of the gestational stage on the clinical course, lesional development and parasite distribution in experimental ovine neosporosis. *Veterinary research* 46, 19-014-0139-y.

Arrizabalaga G, Boothroyd JC, **2004**. Role of calcium during *Toxoplasma gondii* invasion and egress. *International journal for parasitology* 34 (3), 361-368.

Atkinson R, Harper PA, Ryce C, Morrison DA, Ellis JT, **1999**. Comparison of the biological characteristics of two isolates of *Neospora caninum*. *Parasitology* 118 (Pt 4), 363-370.

Babiuk LA, **2002**. Vaccination: a management tool in veterinary medicine. *Veterinary journal (London, England: 1997)* 164 (3), 188-201.

Bainbridge DR, **2000**. Evolution of mammalian pregnancy in the presence of the maternal immune system. *Reviews of reproduction* 5 (2), 67-74.

Bandini LA, Neto AF, Pena HF, Cavalcante GT, Schares G, Nishi SM, Gennari SM, **2011**. Experimental infection of dogs (*Canis familiaris*) with sporulated oocysts of *Neospora caninum*. *Veterinary parasitology* 176 (2-3), 151-156.

Barling KS, Lunt DK, Graham SL, Choromanski LJ, **2003**. Evaluation of an inactivated *Neospora caninum* vaccine in beef feedlot steers. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 222 (5), 624-627.

Barna F, Debache K, Vock CA, Kuster T, Hemphill A, **2013**. *In vitro* effects of novel ruthenium complexes in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57 (11), 5747-5754.

Barr BC, Anderson ML, Dubey JP, Conrad PA, **1991a**. *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. *Veterinary pathology* 28 (2), 110-116.

- Barr BC, Conrad PA, Dubey JP, Anderson ML, **1991b**. *Neospora*-like encephalomyelitis in a calf: pathology, ultrastructure, and immunoreactivity. *Journal of veterinary diagnostic investigation* 3 (1), 39-46.
- Barr BC, Conrad PA, Sverlow KW, Tarantal AF, Hendrickx AG, **1994a**. Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. *Laboratory investigation* 71 (2), 236-242.
- Barr BC, Rowe JD, Sverlow KW, BonDurant RH, Ardans AA, Oliver MN, Conrad PA, **1994b**. Experimental reproduction of bovine fetal *Neospora* infection and death with a bovine *Neospora* isolate. *Journal of veterinary diagnostic investigation* 6 (2), 207-215.
- Bartels CJ, Arnaiz-Seco JI, Ruiz-Santa-Quitera A, Björkman C, Frossling J, von BD, Conraths FJ, Schares G, van MC, Wouda W, Ortega-Mora LM, **2006**. Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, The Netherlands, Spain and Sweden. *Veterinary parasitology* 137 (1-2), 17-27.
- Bartley PM, Kirvar E, Wright S, Swales C, Esteban-Redondo I, Buxton D, Maley SW, Schock A, Rae AG, Hamilton C, Innes EA, **2004**. Maternal and fetal immune responses of cattle inoculated with *Neospora caninum* at mid-gestation. *Journal of comparative pathology* 130 (2-3), 81-91.
- Bartley PM, Wright S, Sales J, Chianini F, Buxton D, Innes EA, **2006**. Long-term passage of tachyzoites in tissue culture can attenuate virulence of *Neospora caninum* in vivo. *Parasitology* 133, 421-432.
- Bartley PM, Wright S, Chianini F, Buxton D, Innes EA, **2008**. Inoculation of Balb/c mice with live attenuated tachyzoites protects against a lethal challenge of *Neospora caninum*. *Parasitology* 135 (Pt 1), 13-21.
- Bartley PM, Wright SE, Maley SW, Macaldowie CN, Nath M, Hamilton CM, Katzer F, Buxton D, Innes EA, **2012**. Maternal and foetal immune responses of cattle following an experimental challenge with *Neospora caninum* at day 70 of gestation. *Veterinary research* 43 (1), 38.
- Bartley PM, Katzer F, Rocchi MS, Maley SW, Benavides J, Nath M, Pang Y, Cantón G, Thomson J, Chianini F, Innes EA, **2013**. Development of maternal and foetal immune responses in cattle following experimental challenge with *Neospora caninum* at day 210 of gestation. *Veterinary research* 44, 91.
- Basso W, Schares S, Barwald A, Herrmann DC, Conraths FJ, Pantchev N, Vrhovec MG, Schares G, **2009**. Molecular comparison of *Neospora caninum* oocyst isolates from naturally infected dogs with cell culture-derived tachyzoites of the same isolates using nested polymerase chain reaction to amplify microsatellite markers. *Veterinary parasitology* 160 (1-2), 43-50.
- Basso W, Schares S, Minke L, Barwald A, Maksimov A, Peters M, Schulze C, Müller M, Conraths FJ, Schares G, **2010**. Microsatellite typing and avidity analysis suggest a common source of infection in herds with epidemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Veterinary parasitology* 173 (1-2), 24-31.
- Baszler TV, Long MT, McElwain TF, Mathison BA, **1999**. Interferon-gamma and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. *International journal for parasitology* 29 (10), 1635-1646.
- Baszler TV, Shkap V, Mwangi W, Davies CJ, Mathison BA, Mazuz M, Resnikov D, Fish L, Leibovitch B, Staska LM, Savitsky I, **2008**. Bovine immune response to inoculation with *Neospora caninum* surface antigen SRS2 lipopeptides mimics immune response to infection with live parasites. *Clin. Vaccine Immunol.* 15 (1556-679; 4), 659-667.
- Beck HP, Blake D, Darde ML, Felger I, Pedraza-Díaz S, Regidor-Cerrillo J, Gómez-Bautista M, Ortega-Mora LM, Putignani L, Shiels B, Tait A, Weir W, **2009**. Molecular approaches to diversity of populations of apicomplexan parasites. *International journal for parasitology* 39 (2), 175-189.
- Benavides J, Katzer F, Maley SW, Bartley PM, Cantón G, Palarea-Albaladejo J, Purslow CA, Pang Y, Rocchi MS, Chianini F, Buxton D, Innes EA, **2012**. High rate of transplacental infection and transmission of *Neospora caninum* following experimental challenge of cattle at day 210 of gestation. *Veterinary research* 43, 83-9716-43-83.
- Benavides J, Collantes-Fernández E, Ferre I, Pérez V, Campero C, Mota R, Innes E, Ortega-Mora LM, **2014**. Experimental ruminant models for bovine neosporosis: what is known and what is needed. *Parasitology* 141 (11), 1471-1488.

Bjerkås I, Mohn SF, Presthus J, **1984**. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Zeitschrift für Parasitenkunde (Berlin, Germany)* 70 (2), 271-274.

Björkman C, Holmdahl OJ, Uggla A, **1997**. An indirect enzyme-linked immunoassay (ELISA) for demonstration of antibodies to *Neospora caninum* in serum and milk of cattle. *Veterinary parasitology* 68 (3), 251-260.

Björkman C, Álvarez-García G, Conraths FJ, Mattsson JG, Ortega-Mora LM, Sager H, Schares G, **2006**. *Neospora caninum* IgG avidity tests: an interlaboratory comparison. *Veterinary parasitology* 140 (3-4), 273-280.

Black MW, Boothroyd JC, **2000**. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiology and molecular biology reviews* 64 (3), 607-623.

Bland JM, Altman DG, **1998**. Survival probabilities (the Kaplan-Meier method). *BMJ (Clinical research ed.)* 317 (7172), 1572.

Bland JM, Altman DG, **2004**. The logrank test. *BMJ (Clinical research ed.)* 328 (7447), 1073.

Botelho AS, Teixeira L, Correia-da-Costa JM, Faustino AM, Castro AG, Vilanova M, **2007**. *Neospora caninum*: high susceptibility to the parasite in C57BL/10ScCr mice. *Experimental parasitology* 115 (1), 68-75.

Boucher LE, Bosch J, **2015**. The apicomplexan glideosome and adhesins - Structures and function. *Journal of structural biology* 190 (2), 93-114.

Boulton JG, Gill PA, Cook RW, Fraser GC, Harper PA, Dubey JP, **1995**. Bovine *Neospora* abortion in north-eastern New South Wales. *Australian Veterinary Journal* 72 (3), 119-120.

Boysen P, Klevar S, Olsen I, Storset AK, **2006**. The protozoan *Neospora caninum* directly triggers bovine NK cells to produce gamma interferon and to kill infected fibroblasts. *Infection and immunity* 74 (2), 953-960.

Bryan LA, Gajadhar AA, Dubey JP, Haines DM, **1994**. Bovine neonatal encephalomyelitis associated with a *Neospora* sp. protozoan. *The Canadian veterinary journal* 35 (2), 111-113.

Buxton D, Maley SW, Thomson KM, Trees AJ, Innes EA, **1997**. Experimental infection of non-pregnant and pregnant sheep with *Neospora caninum*. *Journal of comparative pathology* 117 (1), 1-16.

Buxton D, **1998**. Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp.) in sheep and goats: recent advances. *Veterinary research* 29 (3-4), 289-310.

Buxton D, Maley SW, Wright S, Thomson KM, Rae AG, Innes EA, **1998**. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. *Journal of comparative pathology* 118 (4), 267-279.

Buxton D, Wright S, Maley SW, Rae AG, Lundén A, Innes EA, **2001**. Immunity to experimental neosporosis in pregnant sheep. *Parasite immunology* 23 (2), 85-91.

Buxton D, McAllister MM, Dubey JP, **2002**. The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends in parasitology* 18 (12), 546-552.

Cannas A, Naguleswaran A, Müller N, Eperon S, Gottstein B, Hemphill A, **2003a**. Vaccination of mice against experimental *Neospora caninum* infection using NcSAG1- and NcSRS2-based recombinant antigens and DNA vaccines. *Parasitology* 126 (Pt 4), 303-312.

Cannas A, Naguleswaran A, Müller N, Gottstein B, Hemphill A, **2003b**. Reduced cerebral infection of *Neospora caninum*-infected mice after vaccination with recombinant microneme protein NcMIC3 and ribi adjuvant. *The Journal of parasitology* 89 (1), 44-50.

Cantón GJ, Katzer F, Benavides-Silván J, Maley SW, Palarea-Albaladejo J, Pang Y, Smith S, Bartley PM, Rocchi M, Innes EA, Chianini F, **2013**. Phenotypic characterisation of the cellular immune infiltrate in placentas of cattle following experimental inoculation with *Neospora caninum* in late gestation. *Veterinary research* 44, 60-9716-44-60.

Cantón GJ, Katzer F, Maley SW, Bartley PM, Benavides-Silván J, Palarea-Albaladejo J, Pang Y, Smith SH, Rocchi M, Buxton D, Innes EA, Chianini F, **2014a**. Cytokine expression in the placenta of pregnant cattle after inoculation with *Neospora caninum*. *Veterinary immunology and immunopathology* 161 (1-2), 77-89.

- Cantón GJ, Katzer F, Maley SW, Bartley PM, Benavides-Silván J, Palarea-Albaladejo J, Pang Y, Smith SH, Rocchi MS, Buxton D, Innes EA, Chianini F, **2014b**. Inflammatory infiltration into placentas of *Neospora caninum* challenged cattle correlates with clinical outcome of pregnancy. *Veterinary research* 45, 11-9716-45-11.
- Cantón GJ, Konrad JL, Moore DP, Caspe SG, Palarea-Albaladejo J, Campero CM, Chianini F, **2014c**. Characterization of immune cell infiltration in the placentome of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) infected with *Neospora caninum* during pregnancy. *Journal of comparative pathology* 150 (4), 463-468.
- Carruthers V, Boothroyd JC, **2007**. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. *Current opinion in microbiology* 10 (1), 83-89.
- Carter AM, Mess A, **2010**. Hans Strahl's pioneering studies in comparative placentation. *Placenta* 31 (10), 848-852.
- Caspe SG, Moore DP, Leunda MR, Cano DB, Lischinsky L, Regidor-Cerrillo J, Álvarez-García G, Echaide IG, Bacigalupe D, Ortega Mora LM, Odeon AC, Campero CM, **2012**. The *Neospora caninum*-Spain 7 isolate induces placental damage, fetal death and abortion in cattle when inoculated in early gestation. *Veterinary parasitology* 189 (2-4), 171-181.
- Cavalcante GT, Soares RM, Nishi SM, Hagen SC, Vannucchi CI, Maiorka PC, Paixao AS, Gennari SM, **2012**. Experimental infection with *Neospora caninum* in pregnant bitches. *Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology: Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria* 21 (3), 232-236.
- Cedillo CJ, Martínez MJ, Santacruz AM, Banda RV, Morales SE, **2008**. Models for experimental infection of dogs fed with tissue from fetuses and neonatal cattle naturally infected with *Neospora caninum*. *Veterinary parasitology* 154 (1-2), 151-155.
- Cho JH, Chung WS, Song KJ, Na BK, Kang SW, Song CY, Kim TS, **2005**. Protective efficacy of vaccination with *Neospora caninum* multiple recombinant antigens against experimental *Neospora caninum* infection. *The Korean journal of parasitology* 43 (1), 19-25.
- Cole RA, Lindsay DS, Blagburn BL, Dubey JP, **1995**. Vertical transmission of *Neospora caninum* in mice. *The Journal of parasitology* 81 (5), 730-732.
- Collantes-Fernández E, Zaballos A, Álvarez-García G, Ortega-Mora LM, **2002**. Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. *Journal of clinical microbiology* 40 (4), 1194-1198.
- Collantes-Fernández E, Álvarez-García G, Pérez-Pérez V, Pereira-Bueno J, Ortega-Mora LM, **2004**. Characterization of pathology and parasite load in outbred and inbred mouse models of chronic *Neospora caninum* infection. *Journal of Parasitology* 90 (3), 579-583.
- Collantes-Fernández E, Arnaiz-Seco I, Burgos BM, Rodríguez-Bertos A, Aduriz G, Fernández-García A, Ortega-Mora LM, **2006a**. Comparison of *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions between epidemic and endemic bovine abortion cases. *Veterinary parasitology* 142 (1-2), 187-191.
- Collantes-Fernández E, López-Pérez I, Álvarez-García G, Ortega-Mora LM, **2006b**. Temporal distribution and parasite load kinetics in blood and tissues during *Neospora caninum* infection in mice. *Infection and immunity* 74 (4), 2491-2494.
- Collantes-Fernández E, Rodríguez-Bertos A, Arnaiz-Seco I, Moreno B, Aduriz G, Ortega-Mora LM, **2006c**. Influence of the stage of pregnancy on *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions in aborted bovine foetuses. *Theriogenology* 65 (3), 629-641.
- Collantes-Fernández E, Arrighi RB, Álvarez-García G, Weidner JM, Regidor-Cerrillo J, Boothroyd JC, Ortega-Mora LM, Barragán A, **2012**. Infected dendritic cells facilitate systemic dissemination and transplacental passage of the obligate intracellular parasite *Neospora caninum* in mice. *PloS one* 7 (3), e32123.
- Conrad PA, Barr BC, Sverlow KW, Anderson M, Daft B, Kinde H, Dubey JP, Munson L, Ardans A, **1993a**. *In vitro* isolation and characterization of a *Neospora* sp. from aborted bovine foetuses. *Parasitology* 106 (Pt 3), 239-249.

Conrad PA, Sverlow K, Anderson M, Rowe J, BonDurant R, Tuter G, Breitmeyer R, Palmer C, Thurmond M, Ardans A, **1993b**. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. *Journal of veterinary diagnostic investigation* 5 (4), 572-578.

Correia A, Ferreirinha P, Costa AA, Dias J, Melo J, Costa R, Ribeiro A, Faustino A, Teixeira L, Rocha A, Vilanova M, **2013**. Mucosal and systemic T cell response in mice intragastrically infected with *Neospora caninum* tachyzoites. *Veterinary research* 44, 69-9716-44-69.

Davison HC, Guy CS, McGarry JW, Guy F, Williams DJ, Kelly DF, Trees AJ, **2001**. Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. *Research in veterinary science* 70 (2), 163-168.

de Yaniz MG, Moore DP, Odeon AC, Cano A, Cano DB, Leunda MR, Campero CM, **2007**. Humoral immune response in pregnant heifers inoculated with *Neospora caninum* tachyzoites by conjunctival route. *Veterinary parasitology* 148 (3-4), 213-218.

Debache K, Guionaud C, Alaeddine F, Mevissen M, Hemphill A, **2008**. Vaccination of mice with recombinant NcROP2 antigen reduces mortality and cerebral infection in mice infected with *Neospora caninum* tachyzoites. *International journal for parasitology* 38 (12), 1455-1463.

Debache K, Alaeddine F, Guionaud C, Monney T, Müller J, Strohbusch M, Leib SL, Grandgirard D, Hemphill A, **2009**. Vaccination with recombinant NcROP2 combined with recombinant NcMIC1 and NcMIC3 reduces cerebral infection and vertical transmission in mice experimentally infected with *Neospora caninum* tachyzoites. *International journal for parasitology* 39 (12), 1373-1384.

Debache K, Guionaud C, Alaeddine F, Hemphill A, **2010**. Intraperitoneal and intra-nasal vaccination of mice with three distinct recombinant *Neospora caninum* antigens results in differential effects with regard to protection against experimental challenge with *Neospora caninum* tachyzoites. *Parasitology* 137 (2), 229-240.

Debache K, Guionaud C, Kropf C, Boykin D, Stephens CE, Hemphill A, **2011**. Experimental treatment of *Neospora caninum*-infected mice with the arylimidamide DB750 and the thiazolide nitazoxanide. *Experimental parasitology* 129 (2), 95-100.

Debache K, Hemphill A, **2012a**. Effects of miltefosine treatment in fibroblast cell cultures and in mice experimentally infected with *Neospora caninum* tachyzoites. *Parasitology* 139 (7), 934-944.

Debache K, Hemphill A, **2012b**. Intra-cisternal vaccination induces high-level protection against *Neospora caninum* infection in mice. *Vaccine* 13 (28), 4209-4215.

Debache K, Hemphill A, **2013**. Differential effects of intranasal vaccination with recombinant NcPDI in different mouse models of *Neospora caninum* infection. *Parasite immunology* 35 (1), 11-20.

Dellarupe A, Regidor-Cerrillo J, Jiménez-Ruiz E, Schares G, Unzaga JM, Venturini MC, Ortega-Mora LM, **2014a**. Comparison of host cell invasion and proliferation among *Neospora caninum* isolates obtained from oocysts and from clinical cases of naturally infected dogs. *Experimental parasitology* 145, 22-28.

Dellarupe A, Regidor-Cerrillo J, Jiménez-Ruiz E, Schares G, Unzaga JM, Venturini MC, Ortega-Mora LM, **2014b**. Clinical outcome and vertical transmission variability among canine *Neospora caninum* isolates in a pregnant mouse model of infection. *Parasitology* 141 (3), 356-366.

Dijkstra T, Lam TJ, Bartels CJ, Eysker M, Wouda W, **2008**. Natural postnatal *Neospora caninum* infection in cattle can persist and lead to endogenous transplacental infection. *Veterinary parasitology* 152 (3-4), 220-225.

Dion S, Germon S, Guiton R, Ducournau C, Dimier-Poisson I, **2011**. Functional activation of T cells by dendritic cells and macrophages exposed to the intracellular parasite *Neospora caninum*. *International journal for parasitology* 41 (6), 685-695.

Doggett JS, Ojo KK, Fan E, Maly DJ, Van Voorhis WC, **2014**. Bumped kinase inhibitor 1294 treats established *Toxoplasma gondii* infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (6), 3547-3549.

Dowse T, Soldati D, **2004**. Host cell invasion by the apicomplexans: the significance of microneme protein proteolysis. *Current opinion in microbiology* 7 (4), 388-396.

- Dreier KJ, Stewarter LW, Kerlin RL, Ritter DM, Brake DA, **1999**. Phenotypic characterisation of a *Neospora caninum* temperature-sensitive strain in normal and immunodeficient mice. *International journal for parasitology* 29 (10), 1627-1634.
- Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, Topper MJ, Uggla A, **1988a**. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 192 (9), 1269-1285.
- Dubey JP, Hattel AL, Lindsay DS, Topper MJ, **1988b**. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 193 (10), 1259-1263.
- Dubey JP, Hartley WJ, Lindsay DS, Topper MJ, **1990**. Fatal congenital *Neospora caninum* infection in a lamb. *The Journal of parasitology* 76 (1), 127-130.
- Dubey JP, Lindsay DS, **1990**. *Neospora caninum* induced abortion in sheep. *Journal of veterinary diagnostic investigation* 2 (3), 230-233.
- Dubey JP, Janovitz EB, Skowronek AJ, **1992a**. Clinical neosporosis in a 4-week-old Hereford calf. *Veterinary parasitology* 43 (1-2), 137-141.
- Dubey JP, Lindsay DS, Anderson ML, Davis SW, Shen SK, **1992b**. Induced transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 201 (5), 709-713.
- Dubey JP, Rommel M, **1992**. [Abortions caused by protozoa in agricultural animals]. *Deutsche tierärztliche Wochenschrift* 99 (9), 355-362.
- Dubey JP, de Lahunta A, **1993**. Neosporosis associated congenital limb deformities in a calf. *Applied Parasitology* 34, 229-233.
- Dubey JP, Lindsay DS, **1996**. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Veterinary parasitology* 67 (1-2), 1-59.
- Dubey JP, Lindsay DS, **2000**. Gerbils (*Meriones unguiculatus*) are highly susceptible to oral infection with *Neospora caninum* oocysts. *Parasitology research* 86 (2), 165-168.
- Dubey JP, Barr BC, Barta JR, Bjerkås I, Björkman C, Blagburn BL, Bowman DD, Buxton D, Ellis JT, Gottstein B, Hemphill A, Hill DE, Howe DK, Jenkins MC, Kobayashi Y, Koudela B, Marsh AE, Mattsson JG, McAllister MM, Modry D, Omata Y, Sibley LD, Speer CA, Trees AJ, Uggla A, Upton SJ, Williams DJ, Lindsay DS, **2002**. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *International journal for parasitology* 32 (8), 929-946.
- Dubey JP, **2003**. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *The Korean journal of parasitology* 41 (1), 1-16.
- Dubey JP, Sreekumar C, Knickman E, Miska KB, Vianna MC, Kwok OCH, Hill DE, Jenkins MC, Lindsay DS, Greiner EC, **2004**. Biologic, morphologic, and molecular characterisation of *Neospora caninum* isolates from littermate dogs. *International journal for parasitology* 34, 1157-1167.
- Dubey JP, **2005**. Neosporosis in cattle. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice* 21 (2), 473-483.
- Dubey JP, Buxton D, Wouda W, **2006**. Pathogenesis of bovine neosporosis. *Journal of comparative pathology* 134 (4), 267-289.
- Dubey JP, Schares G, **2006**. Diagnosis of bovine neosporosis. *Veterinary parasitology* 140 (1-2), 1-34.
- Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM, **2007a**. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clinical microbiology reviews* 20 (2), 323-367.
- Dubey JP, Vianna MC, Kwok OC, Hill DE, Miska KB, Tuo W, Velmurugan GV, Conors M, Jenkins MC, **2007b**. Neosporosis in Beagle dogs: clinical signs, diagnosis, treatment, isolation and genetic characterization of *Neospora caninum*. *Veterinary parasitology* 149 (3-4), 158-166.

Dubey JP, Jenkins MC, Rajendran C, Miska K, Ferreira LR, Martins J, Kwok OC, Choudhary S, **2011**. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary parasitology* 181 (2-4), 382-387.

Dubey JP, Schares G, **2011**. Neosporosis in animals--the last five years. *Veterinary parasitology* 180 (1-2), 90-108.

Dubey JP, Jenkins MC, Ferreira LR, Choudhary S, Verma SK, Kwok OC, Fetterer R, Butler E, Carstensen M, **2014**. Isolation of viable *Neospora caninum* from brains of wild gray wolves (*Canis lupus*). *Veterinary parasitology* 201 (1-2), 150-153.

Duivenvoorden J, Lusi P, **1995**. *Neospora* abortions in eastern Ontario dairy herds. *The Canadian veterinary journal* 36 (10), 623.

Eiras C, Arnaiz I, Álvarez-García G, Ortega-Mora LM, Sanjuan ML, Yus E, Dieguez FJ, **2011**. *Neospora caninum* seroprevalence in dairy and beef cattle from the northwest region of Spain, Galicia. *Preventive veterinary medicine* 98 (2-3), 128-132.

Ellis J, Luton K, Baverstock PR, Brindley PJ, Nimmo KA, Johnson AM, **1994**. The phylogeny of *Neospora caninum*. *Molecular and biochemical parasitology* 64 (2), 303-311.

Ellis J, Miller C, Quinn H, Ryce C, Reichel MP, **2008**. Evaluation of recombinant proteins of *Neospora caninum* as vaccine candidates (in a mouse model). *Vaccine* 6 (47), 5989-5996.

Entrican G, **2002**. Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. *Journal of comparative pathology* 126 (2-3), 79-94.

Eperon S, Bronnimann K, Hemphill A, Gottstein B, **1999**. Susceptibility of B-cell deficient C57BL/6 (microMT) mice to *Neospora caninum* infection. *Parasite immunology* 21 (5), 225-236.

Feng X, Zhang N, Tuo W, **2010**. *Neospora caninum* tachyzoite- and antigen-stimulated cytokine production by bone marrow-derived dendritic cells and spleen cells of naive BALB/c mice. *The Journal of parasitology* 96 (4), 717-723.

Ferre I, Serrano-Martínez E, Martínez A, Osoro K, Mateos-Sanz A, Del-Pozo I, Aduriz G, Tamargo C, Hidalgo CO, Ortega-Mora LM, **2008**. Effects of re-infection with *Neospora caninum* in bulls on parasite detection in semen and blood and immunological responses. *Theriogenology* 69 (7), 905-911.

Ferroglio E, Pasino M, Romano A, Grande D, Pregel P, Trisciuglio A, **2007**. Evidence of *Neospora caninum* DNA in wild rodents. *Veterinary parasitology* 148 (3-4), 346-349.

Fioretti DP, Pasquali P, Diaferia M, Mangili V, Rosignoli L, **2003**. *Neospora caninum* infection and congenital transmission: Serological and parasitological study of cows up to the fourth gestation. *Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 50 (8), 399-404.

Flynn RJ, Marshall ES, **2011**. Parasite limiting macrophages promote IL-17 secretion in naive bovine CD4(+) T-cells during *Neospora caninum* infection. *Veterinary immunology and immunopathology* 144 (3-4), 423-429.

Furuta PI, Mineo TW, Carrasco AO, Godoy GS, Pinto AA, Machado RZ, **2007**. *Neospora caninum* infection in birds: experimental infections in chicken and embryonated eggs. *Parasitology* 134 (14), 1931-1939.

García-Ispuerto I, Serrano-Pérez B, Almería S, Martínez-Bello D, Tchimbou AF, de Sousa NM, Beckers JF, López-Gatius F, **2015**. Effects of crossbreeding on endocrine patterns determined in pregnant beef/dairy cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Theriogenology* 83 (4), 491-496.

Gibney EH, Kipar A, Rosbottom A, Guy CS, Smith RF, Hetzel U, Trees AJ, Williams DJ, **2008**. The extent of parasite-associated necrosis in the placenta and foetal tissues of cattle following *Neospora caninum* infection in early and late gestation correlates with foetal death. *International journal for parasitology* 38 (5), 579-588.

Givens MD, Marley MS, **2008**. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. *Theriogenology* 70 (3), 270-285.

- Gondim LF, Pinheiro AM, Santos PO, Jesus EE, Ribeiro MB, Fernandes HS, Almeida MA, Freire SM, Meyer R, McAllister MM, **2001**. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. *Veterinary parasitology* 101 (1), 1-7.
- Gondim LF, Gao L, McAllister MM, **2002**. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and *in vitro* isolation from oocysts. *The Journal of parasitology* 88 (6), 1159-1163.
- Gondim LF, Laski P, Gao L, McAllister MM, **2004a**. Variation of the internal transcribed spacer 1 sequence within individual strains and among different strains of *Neospora caninum*. *The Journal of parasitology* 90 (1), 119-122.
- Gondim LF, McAllister MM, Pitt WC, Zemlicka DE, **2004b**. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International journal for parasitology* 34 (2), 159-161.
- Gondim LFP, McAllister MM, Anderson-Sprecher RC, Björkman C, Lock TF, Firkins LD, Gao L, Fischer WR, **2004c**. Transplacental transmission and abortion in cows administered *Neospora caninum* oocysts. *Journal of Parasitology* 90 (6), 1394-1400.
- Gondim LFP, McAllister MM, Mateus-Pinilla NE, Pitt WC, Mech LD, Nelson ME, **2004d**. Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. *Journal of Parasitology* 90 (6), 1361-1365.
- Gondim LFP, **2006**. *Neospora caninum* in wildlife. *Trends in parasitology* 22 (6), 247-252.
- González-Warleta M, Castro-Hermida JA, Carro-Corral C, Cortizo-Mella J, Mezo M, **2008**. Epidemiology of neosporosis in dairy cattle in Galicia (NW Spain). *Parasitology research* 102 (2), 243-249.
- González-Warleta M, Castro-Hermida JA, Regidor-Cerrillo J, Benavides J, Álvarez-García G, Fuertes M, Ortega-Mora LM, Mezo M, **2014**. *Neospora caninum* infection as a cause of reproductive failure in a sheep flock. *Veterinary research* 45, 88-014-0088-5.
- González L, Buxton D, Atxaerandio R, Aduriz G, Maley S, Marco JC, Cuervo LA, **1999**. Bovine abortion associated with *Neospora caninum* in northern Spain. *The Veterinary record* 144 (6), 145-150.
- Gottstein B, Razmi GR, Ammann P, Sager H, Müller N, **2005**. Toltrazuril treatment to control diaplacental *Neospora caninum* transmission in experimentally infected pregnant mice. *Parasitology* 130, 41-48.
- Grosser O, **1927**. Frühentwicklung, Eihautbildung und Placentation des Menschen und der Säugetiere. *J.F. Bergmann*, Bergmann, München
- Gunning RF, Gumbrell RC, Jeffrey M, **1994**. *Neospora* infection and congenital ataxia in calves. *The Veterinary record* 134 (21), 558.
- Gutierrez J, O'Donovan J, Proctor A, Brady C, Marques PX, Worrall S, Nally JE, McElroy M, Bassett H, Fagan J, Maley S, Buxton D, Sammin D, Markey BK, **2012**. Application of quantitative real-time polymerase chain reaction for the diagnosis of toxoplasmosis and enzootic abortion of ewes. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 24 (5), 846-854.
- Guy CS, Williams DJL, Kelly DF, McGarry JW, Guy F, Björkman C, Smith RF, Trees AJ, **2001**. *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows: spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody. *The Veterinary record* 149 (15), 443-449.
- Hall CA, Reichel MP, Ellis JT, **2005**. *Neospora* abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. *Veterinary parasitology* 128 (3-4), 231-241.
- Hall CA, Reichel MP, Ellis JT, **2006**. Performance characteristics and optimisation of cut-off values of two enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies to *Neospora caninum* in the serum of cattle. *Veterinary parasitology* 140 (1-2), 61-68.
- Hässig M, Sager H, Reitt K, Ziegler D, Strabel D, Gottstein B, **2003**. *Neospora caninum* in sheep: a herd case report. *Veterinary parasitology* 117 (3), 213-220.

Hayati AR, Mohamed AE, Tan GC, **2010**. An immunohistochemical study of Toll-like receptors 2 and 4 in placenta with and without infection. *The Malaysian journal of pathology* 32 (1), 13-19.

Hecker YP, Moore DP, Quattrocchi V, Regidor-Cerrillo J, Verna A, Leunda MR, Morrell E, Ortega-Mora LM, Zamorano P, Venturini MC, Campero CM, **2013**. Immune response and protection provided by live tachyzoites and native antigens from the NC-6 Argentina strain of *Neospora caninum* in pregnant heifers. *Veterinary parasitology* 197 (3-4), 436-446.

Hemphill A, Gottstein B, Kaufmann H, **1996**. Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by *Neospora caninum*. *Parasitology* 112 (Pt 2), 183-197.

Hemphill A, **1999**. The host-parasite relationship in neosporosis. *Advances in Parasitology* 43, 47-104.

Hemphill A, Fuchs N, Sonda S, Hehl A, **1999**. The antigenic composition of *Neospora caninum*. *International journal for parasitology* 29 (8), 1175-1188.

Hemphill A, Vonlaufen N, Naguleswaran A, Keller N, Riesen M, Guetg N, Srinivasan S, Alaeddine F, **2004**. Tissue culture and explant approaches to studying and visualizing *Neospora caninum* and its interactions with the host cell. *Microscopy and Microanalysis* 10 (5), 602-620.

Hemphill A, Vonlaufen N, Naguleswaran A, **2006**. Cellular and immunological basis of the host-parasite relationship during infection with *Neospora caninum*. *Parasitology* 133 (Pt 3), 261-278.

Hemphill A, Debache K, Monney T, Schorer M, Guionaud C, Alaeddine F, Mueller N, Mueller J, **2013**. Proteins mediating the *Neospora caninum*-host cell interaction as targets for vaccination. *Frontiers in bioscience (Elite edition)* 5, 23-36.

Howe L, Collett MG, Pattison RS, Marshall J, West DM, Pomroy WE, **2012**. Potential involvement of *Neospora caninum* in naturally occurring ovine abortions in New Zealand. *Veterinary parasitology* 185 (2-4), 64-71.

Huang CC, Yang CH, Watanabe Y, Liao YK, Ooi HK, **2004**. Finding of *Neospora caninum* in the wild brown rat (*Rattus norvegicus*). *Veterinary research* 35 (3), 283-290.

Hurtado A, Aduriz G, Moreno B, Barandika J, García-Pérez AL, **2001**. Single tube nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted ewes. *Veterinary parasitology* 102 (1-2), 17-27.

Innes EA, Panton WR, Marks J, Trees AJ, Holmdahl J, Buxton D, **1995**. Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum*, as shown by incorporation of 3H uracil. *Journal of comparative pathology* 113 (1), 95-100.

Innes EA, Buxton D, Maley S, Wright S, Marks J, Esteban I, Rae A, Schock A, Wastling J, **2000**. Neosporosis. Aspects of epidemiology and host immune response. *Annals of the New York Academy of Sciences* 916, 93-101.

Innes EA, Lundén A, Esteban I, Marks J, Maley S, Wright S, Rae A, Harkins D, Vermeulen A, McKendrick IJ, Buxton D, **2001a**. A previous infection with *Toxoplasma gondii* does not protect against a challenge with *Neospora caninum* in pregnant sheep. *Parasite immunology* 23 (3), 121-132.

Innes EA, Wright SE, Maley S, Rae A, Schock A, Kirvar E, Bartley P, Hamilton C, Carey IM, Buxton D, **2001b**. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *International journal for parasitology* 31 (13), 1523-1534.

Innes EA, Andrianarivo AG, Björkman C, Williams DJ, Conrad PA, **2002**. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends in parasitology* 18 (11), 497-504.

Innes EA, Wright S, Bartley P, Maley S, Macaldowie C, Esteban-Redondo I, Buxton D, **2005**. The host-parasite relationship in bovine neosporosis. *Veterinary immunology and immunopathology* 108 (1-2), 29-36.

Innes EA, Vermeulen AN, **2006**. Vaccination as a control strategy against the coccidial parasites *Eimeria*, *Toxoplasma* and *Neospora*. *Parasitology* 133 Suppl, S145-S168.

Innes EA, **2007**. The host-parasite relationship in pregnant cattle infected with *Neospora caninum*. *Parasitology* 134, 1903-1910.

- Innes EA, Bartley PM, Maley SW, Wright SE, Buxton D, **2007**. Comparative host-parasite relationships in ovine toxoplasmosis and bovine neosporosis and strategies for vaccination. *Vaccine* 25 (30), 5495-5503.
- Innes EA, Bartley PM, Rocchi M, Benavides-Silván J, Burrells A, Hotchkiss E, Chianini F, Cantón G, Katzer F, **2011**. Developing vaccines to control protozoan parasites in ruminants: dead or alive? *Veterinary parasitology* 180 (1-2), 155-163.
- Jacot D, Frenal K, Marq JB, Sharma P, Soldati-Favre D, **2014**. Assessment of phosphorylation in *Toxoplasma* glideosome assembly and function. *Cellular microbiology* 16 (10), 1518-1532.
- Jenkins M, Parker C, Tuo W, Vinyard B, Dubey JP, **2004a**. Inclusion of CpG Adjuvant with Plasmid DNA Coding for NcGRA7 Improves Protection against Congenital Neosporosis. *Infection and immunity* 72 (3), 1817-1819.
- Jenkins MC, Tuo WB, Dubey JP, **2004b**. Evaluation of vaccination with *Neospora caninum* protein for prevention of fetal loss associated with experimentally induced neosporosis in sheep. *American Journal of Veterinary Research* 65 (10), 1404-1408.
- Jenkins MC, Parker C, Hill D, Pinckney RD, Dyer R, Dubey JP, **2007**. *Neospora caninum* detected in feral rodents. *Veterinary parasitology* 143 (2), 161-165.
- Jesus EE, Pinheiro AM, Santos AB, Freire SM, Tardy MB, El-Bacha RS, Costa SL, Costa MF, **2013**. Effects of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta on *Neospora caninum* infection in rat glial cells. *Experimental parasitology* 133 (3), 269-274.
- Jewett TJ, Sibley LD, **2003**. Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in apicomplexan parasites. *Molecular cell* 11 (4), 885-894.
- Jiménez-Ruiz E, Álvarez-García G, Aguado-Martínez A, Ortega-Mora LM, **2013a**. Mice congenitally infected with low-to-moderate virulence *Neospora caninum* isolates exhibited clinical reactivation during the mating period without transmission to the next generation. *Experimental parasitology* 134 (2), 244-248.
- Jiménez-Ruiz E, Álvarez-García G, Aguado-Martínez A, Ortega-Mora LM, **2013b**. Low rates of *Neospora caninum* infection reactivation during gestation are observed in both chronically and congenitally infected mice. *Parasitology* 140 (2), 220-228.
- Jiménez-Ruiz E, Bech-Sàbat G, Álvarez-García G, Regidor-Cerrillo J, Hinojal-Campana L, Ortega-Mora LM, **2013c**. Specific antibody responses against *Neospora caninum* recombinant rNcGRA7, rNcSAG4, rNcBSR4 and rNcSRS9 proteins are correlated with virulence in mice. *Parasitology* 140 (5), 569-579.
- Jolley WR, McAllister MM, McGuire AM, Wills RA, **1999**. Repetitive abortion in *Neospora*-infected ewes. *Veterinary parasitology* 82 (3), 251-257.
- Kang SW, Park SS, Choe SE, Jean YH, Jung SC, Kim K, Van Quyen D, **2009**. Characterization of tissue distribution and histopathological lesions in *Neospora caninum* experimentally infected gerbils. *Parasitology research* 104 (6), 1261-1268.
- Kasper LH, Khan IA, **1998**. Antigen-specific CD8+ T cells protect against lethal toxoplasmosis in mice infected with *Neospora caninum*. *Infection and immunity* 66 (4), 1554-1560.
- Khan IA, Schwartzman JD, Fonseca S, Kasper LH, **1997**. *Neospora caninum*: role for immune cytokines in host immunity. *Experimental parasitology* 85 (1), 24-34.
- King JS, Šlapeta J, Jenkins DJ, Al-Qassab SE, Ellis JT, Windsor PA, **2010**. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International journal for parasitology* 40 (8), 945-950.
- Klevar S, Kulberg S, Boysen P, Storset AK, Moldal T, Björkman C, Olsen I, **2007**. Natural killer cells act as early responders in an experimental infection with *Neospora caninum* in calves. *International journal for parasitology* 37 (3-4), 329-339.
- Kobayashi Y, Yamada M, Omata Y, Koyama T, Saito A, Matsuda T, Okuyama K, Fujimoto S, Furuoka H, Matsui T, **2001**. Naturally-occurring *Neospora caninum* infection in an adult sheep and her twin fetuses. *The Journal of parasitology* 87 (2), 434-436.

Konrad JL, Moore DP, Crudeli G, Caspe SG, Cano DB, Leunda MR, Lischinsky L, Regidor-Cerrillo J, Odeon AC, Ortega-Mora LM, Echaide I, Campero CM, **2012**. Experimental inoculation of *Neospora caninum* in pregnant water buffalo. *Veterinary parasitology* 187 (1-2), 72-78.

Koyama T, Kobayashi Y, Omata Y, Yamada M, Furuoka H, Maeda R, Matsui T, Saito A, Mikami T, **2001**. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a pregnant sheep. *The Journal of parasitology* 87 (6), 1486-1488.

Kritzner S, Sager H, Blum J, Krebber R, Greif G, Gottstein B, **2002**. An explorative study to assess the efficacy of Toltrazuril-sulfone (Ponazuril) in calves experimentally infected with *Neospora caninum*. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials* 1 (1), 4.

Kul O, Atmaca HT, Antepioglu T, Ocal N, Canpolat S, **2015**. *Neospora caninum*: the First Demonstration of the Enteroepithelial Stages in the Intestines of a Naturally Infected Dog. *Journal of comparative pathology* 153 (1), 9-13.

Lendner M, Bottcher D, Delling C, Ojo KK, Van Voorhis WC, Dauschies A, **2015**. A novel CDPK1 inhibitor--a potential treatment for cryptosporidiosis in calves? *Parasitology research* 114 (1), 335-336.

Liddell S, Jenkins MC, Collica CM, Dubey JP, **1999a**. Prevention of vertical transfer of *Neospora caninum* in BALB/c mice by vaccination. *The Journal of parasitology* 85 (6), 1072-1075.

Liddell S, Jenkins MC, Dubey JP, **1999b**. Vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice determined by polymerase chain reaction detection. *The Journal of parasitology* 85 (3), 550-555.

Liddell S, Parker C, Vinyard B, Jenkins M, Dubey JP, **2003**. Immunization of mice with plasmid DNA coding for NcGRA7 or NcsHSP33 confers partial protection against vertical transmission of *Neospora caninum*. *The Journal of parasitology* 89 (3), 496-500.

Lim DC, Cooke BM, Doerig C, Saeij JP, **2012**. *Toxoplasma* and *Plasmodium* protein kinases: roles in invasion and host cell remodelling. *International journal for parasitology* 42 (1), 21-32.

Lin H, Mosmann TR, Guilbert L, Tuntipopipat S, Wegmann TG, **1993**. Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 151 (9), 4562-4573.

Lindsay DS, Dubey JP, **1989a**. *In vitro* development of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) from dogs. *The Journal of parasitology* 75 (1), 163-165.

Lindsay DS, Dubey JP, **1989b**. *Neospora caninum* (Protozoa: apicomplexa) infections in mice. *The Journal of parasitology* 75 (5), 772-779.

Lindsay DS, Dubey JP, **1989c**. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. *American Journal of Veterinary Research* 50 (11), 1981-1983.

Lindsay DS, Dubey JP, **1990a**. *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) infections in rats. *Canadian journal of zoology* 68, 1595-1599.

Lindsay DS, Dubey JP, **1990b**. Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa). *The Journal of parasitology* 76 (3), 410-413.

Lindsay DS, Speer CA, Toivio-Kinnucan MA, Dubey JP, Blagburn BL, **1993**. Use of infected cultured cells to compare ultrastructural features of *Neospora caninum* from dogs and *Toxoplasma gondii*. *American Journal of Veterinary Research* 54 (1), 103-106.

Lindsay DS, Lenz SD, Cole RA, Dubey JP, Blagburn BL, **1995a**. Mouse model for central nervous system *Neospora caninum* infections. *The Journal of parasitology* 81 (2), 313-315.

Lindsay DS, Rippey NS, Powe TA, Sartin EA, Dubey JP, Blagburn BL, **1995b**. Abortions, fetal death, and stillbirths in pregnant pygmy goats inoculated with tachyzoites of *Neospora caninum*. *American Journal of Veterinary Research* 56 (9), 1176-1180.

Lindsay DS, Dubey JP, Duncan RB, **1999a**. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary parasitology* 82 (4), 327-333.

- Lindsay DS, Dubey JP, McAllister M, **1999b**. *Neospora caninum* and the potential for parasite transmission. *Small animal/Exotics* 21 (4), 317-321.
- Lindsay DS, Lenz SD, Blagburn BL, Brake DA, **1999c**. Characterization of temperature-sensitive strains of *Neospora caninum* in mice. *The Journal of parasitology* 85 (1), 64-67.
- Long MT, Baszler TV, **1996**. Fetal loss in BALB/C mice infected with *Neospora caninum*. *The Journal of parasitology* 82 (4), 608-611.
- Long MT, Baszler TV, Mathison BA, **1998**. Comparison of intracerebral parasite load, lesion development, and systemic cytokines in mouse strains infected with *Neospora caninum*. *The Journal of parasitology* 84 (2), 316-320.
- López-Gatius F, Santolaria P, Yániz JL, Garbayo JM, Almería S, **2005**. The Use of Beef Bull Semen Reduced the Risk of Abortion in *Neospora*-seropositive Dairy Cows. *Journal of veterinary medicine.B, Infectious diseases and veterinary public health* 52 (2), 88-92.
- López-Pérez IC, Risco-Castillo V, Collantes-Fernández E, Ortega-Mora LM, **2006**. Comparative effect of *Neospora caninum* infection in BALB/c mice at three different gestation periods. *The Journal of parasitology* 92 (6), 1286-1291.
- López-Pérez IC, Collantes-Fernández E, Aguado-Martínez A, Rodríguez-Bertos A, Ortega-Mora LM, **2008**. Influence of *Neospora caninum* infection in BALB/c mice during pregnancy in post-natal development. *Veterinary parasitology* 155 (3-4), 175-183.
- López-Pérez IC, Collantes-Fernández E, Rojo-Montejo S, Navarro-Lozano V, Risco-Castillo V, Pérez-Pérez V, Pereira-Bueno J, Ortega-Mora LM, **2010**. Effects of *Neospora caninum* infection at mid-gestation on placenta in a pregnant mouse model. *The Journal of parasitology* 96 (5), 1017-1020.
- Lundén A, Wright S, Allen JE, Buxton D, **2002**. Immunisation of mice against neosporosis. *International journal for parasitology* 32 (7), 867-876.
- Lv Q, Xing S, Gong P, Chang L, Bian Z, Wang L, Zhang X, Li J, **2015**. A 78 kDa host cell invasion protein of *Neospora caninum* as a potential vaccine candidate. *Experimental parasitology* 148, 56-65.
- Macaldowie C, Maley SW, Wright S, Bartley P, Esteban-Redondo I, Buxton D, Innes EA, **2004**. Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. *Journal of comparative pathology* 131 (2-3), 142-156.
- Mainar-Jaime RC, Thurmond MC, Berzal-Herranz B, Hietala SK, **1999**. Seroprevalence of *Neospora caninum* and abortion in dairy cows in northern Spain. *The Veterinary record* 145 (3), 72-75.
- Maley SW, Buxton D, Rae AG, Wright SE, Schock A, Bartley PM, Esteban-Redondo I, Swales C, Hamilton CM, Sales J, Innes EA, **2003**. The pathogenesis of neosporosis in pregnant cattle: inoculation at mid-gestation. *Journal of comparative pathology* 129 (2-3), 186-195.
- Maley SW, Buxton D, Macaldowie CN, Anderson IE, Wright SE, Bartley PM, Esteban-Redondo I, Hamilton CM, Storset AK, Innes EA, **2006**. Characterization of the Immune Response in the Placenta of Cattle Experimentally Infected with *Neospora caninum* in Early Gestation. *Journal of comparative pathology* 135 (2-3), 130-141.
- Mansilla FC, Czepluch W, Malacari DA, Hecker YP, Bucafusco D, Franco-Mahecha OL, Moore DP, Capozzo AV, **2013**. Dose-dependent immunogenicity of a soluble *Neospora caninum* tachyzoite-extract vaccine formulated with a soy lecithin/beta-glucan adjuvant in cattle. *Veterinary parasitology* 197 (1-2), 13-21.
- Marks J, Lundén A, Harkins D, Innes E, **1998**. Identification of *Neospora* antigens recognized by CD4+ T cells and immune sera from experimentally infected cattle. *Parasite immunology* 20 (7), 303-309.
- Marsh AE, Barr BC, Madigan J, Lakritz J, Nordhausen R, Conrad PA, **1996**. Neosporosis as a cause of equine protozoal myeloencephalitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 209 (11), 1907-1913.
- Marsh AE, Barr BC, Packham AE, Conrad PA, **1998**. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). *The Journal of parasitology* 84 (5), 983-991.

Marugán-Hernández V, Álvarez-García G, Risco-Castillo V, Regidor-Cerrillo J, Ortega-Mora LM, **2010**. Identification of *Neospora caninum* proteins regulated during the differentiation process from tachyzoite to bradyzoite stage by DIGE. *Proteomics* 10 (9), 1740-1750.

Marugán-Hernández V, Ortega-Mora LM, Aguado-Martínez A, Jiménez-Ruiz E, Álvarez-García G, **2011**. Transgenic *Neospora caninum* strains constitutively expressing the bradyzoite NcSAG4 protein proved to be safe and conferred significant levels of protection against vertical transmission when used as live vaccines in mice. *Vaccine* 29 (44), 7867-7874.

Matyszak MK, **1998**. Inflammation in the CNS: balance between immunological privilege and immune responses. *Progress in neurobiology* 56 (1), 19-35.

Mazur ML, Haynes R, Shkap V, Fish L, Wollkomirsky R, Leibovich B, Molad T, Savitsky I, Golenser J, **2012**. *Neospora caninum*: In vivo and in vitro treatment with artemisone. *Veterinary parasitology* 187 (1-2), 99-104.

McAllister MM, McGuire AM, Jolley WR, Lindsay DS, Trees AJ, Stobart RH, **1996**. Experimental neosporosis in pregnant ewes and their offspring. *Veterinary pathology* 33 (6), 647-655.

McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WR, Wills RA, McGuire AM, **1998**. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International journal for parasitology* 28 (9), 1473-1478.

McCann CM, McAllister MM, Gondim LF, Smith RF, Cripps PJ, Kipar A, Williams DJ, Trees AJ, **2007**. *Neospora caninum* in cattle: Experimental infection with oocysts can result in exogenous transplacental infection, but not endogenous transplacental infection in the subsequent pregnancy. *International journal for parasitology* 37 (14), 1631-1639.

McCann CM, Vyse AJ, Salmon RL, Thomas D, Williams DJ, McGarry JW, Pebody R, Trees AJ, **2008**. Lack of serologic evidence of *Neospora caninum* in humans, England. *Emerging infectious diseases* 14 (6), 978-980.

Medina-Esparza L, Macias L, Ramos-Parra M, Morales-Salinas E, Quezada T, Cruz-Vázquez C, **2013**. Frequency of infection by *Neospora caninum* in wild rodents associated with dairy farms in Aguascalientes, Mexico. *Veterinary parasitology* 191 (1-2), 11-14.

Menzies M, Ingham A, **2006**. Identification and expression of Toll-like receptors 1-10 in selected bovine and ovine tissues. *Veterinary immunology and immunopathology* 109 (1-2), 23-30.

Miller C, Quinn H, Ryce C, Reichel MP, Ellis JT, **2005**. Reduction in transplacental transmission of *Neospora caninum* in outbred mice by vaccination. *International journal for parasitology* 35 (7), 821-828.

Miller CM, Quinn HE, Windsor PA, Ellis JT, **2002**. Characterisation of the first Australian isolate of *Neospora caninum* from cattle. *Australian Veterinary Journal* 80 (10), 620-625.

Millholland MG, Mishra S, Dupont CD, Love MS, Patel B, Shilling D, Kazanietz MG, Foskett JK, Hunter CA, Sinnis P, Greenbaum DC, **2013**. A host GPCR signaling network required for the cytolysis of infected cells facilitates release of apicomplexan parasites. *Cell host & microbe* 13 (1), 15-28.

Mineo TW, Benevides L, Silva NM, Silva JS, **2009a**. Myeloid differentiation factor 88 is required for resistance to *Neospora caninum* infection. *Veterinary research* 40 (4), 32.

Mineo TW, Carrasco AO, Marciano JA, Werther K, Pinto AA, Machado RZ, **2009b**. Pigeons (*Columba livia*) are a suitable experimental model for *Neospora caninum* infection in birds. *Veterinary parasitology* 159 (2), 149-153.

Mineo TW, Oliveira CJ, Gutiérrez FR, Silva JS, **2010**. Recognition by toll-like receptor 2 induces antigen-presenting cell activation and Th1 programming during infection by *Neospora caninum*. *Immunology and cell biology* 88 (8), 825-833.

Monney T, Rutti D, Schorer M, Debache K, Grandgirard D, Leib SL, Hemphill A, **2011**. RecNcMIC3-1-R is a microneme- and rhoptry-based chimeric antigen that protects against acute neosporosis and limits cerebral parasite load in the mouse model for *Neospora caninum* infection. *Vaccine* 29 (40), 6967-6975.

- Monney T, Debache K, Grandgirard D, Leib SL, Hemphill A, **2012**. Vaccination with the recombinant chimeric antigen recNcMIC3-1-R induces a non-protective Th2-type immune response in the pregnant mouse model for *N. caninum* infection. *Vaccine* 30 (46), 6588-6594.
- Monney T, Hemphill A, **2014**. Vaccines against neosporosis: what can we learn from the past studies? *Experimental parasitology* 140, 52-70.
- Moore DP, **2005**. Neosporosis in South America. *Veterinary parasitology* 127 (2), 87-97.
- Moore DP, Perez A, Agliano S, Brace M, Cantón G, Cano D, Leunda MR, Odeon AC, Odriozola E, Campero CM, **2009**. Risk factors associated with *Neospora caninum* infections in cattle in Argentina. *Veterinary parasitology* 161 (1-2), 122-125.
- Moore DP, Echaide I, Verna AE, Leunda MR, Cano A, Pereyra S, Zamorano PI, Odeon AC, Campero CM, **2011**. Immune response to *Neospora caninum* native antigens formulated with immune stimulating complexes in calves. *Veterinary parasitology* 175 (3-4), 245-251.
- Moore DP, Álvarez-García G, Chiapparrone ML, Regidor-Cerrillo J, Lischinsky LH, de Yaniz MG, Odeon AC, Ortega-Mora LM, Campero CM, **2014**. *Neospora caninum* tachyzoites inoculated by the conjunctival route are not vertically transmitted in pregnant cattle: a descriptive study. *Veterinary parasitology* 199 (1-2), 1-7.
- Morales E, Trigo FJ, Ibarra F, Puente E, Santacruz M, **2001**. Neosporosis in Mexican dairy herds: lesions and immunohistochemical detection of *Neospora caninum* in fetuses. *Journal of comparative pathology* 125 (1), 58-63.
- Moreno B, Collantes-Fernández E, Villa A, Navarro A, Regidor-Cerrillo J, Ortega-Mora LM, **2012**. Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions. *Veterinary parasitology* 187 (1-2), 312-318.
- Müller J, Hemphill A, **2011**. Identification of a host cell target for the thiazolide class of broad-spectrum anti-parasitic drugs. *Experimental parasitology* 128 (2), 145-150.
- Müller J, Hemphill A, **2013**. *In vitro* culture systems for the study of apicomplexan parasites in farm animals. *International journal for parasitology* 43 (2), 115-124.
- Müller J, Aguado-Martínez A, Manser V, Balmer V, Winzer P, Ritler D, Hostettler I, Arranz-Solís D, Ortega-Mora L, Hemphill A, **2015**. Buparvaquone is active against *Neospora caninum in vitro* and in experimentally infected mice. *International journal for parasitology. Drugs and drug resistance* 5 (1), 16-25.
- Munhoz AD, Mineo TW, Alessi AC, Lopes CW, Machado RZ, **2013**. Assessment of experimental infection for dogs using *Gallus gallus* chorioallantoic membranes inoculated with *Neospora caninum*. *Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology: Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria* 22 (4), 565-570.
- Nagamune K, Sibley LD, **2006**. Comparative genomic and phylogenetic analyses of calcium ATPases and calcium-regulated proteins in the apicomplexa. *Molecular biology and evolution* 23 (8), 1613-1627.
- Naguleswaran A, Müller N, Hemphill A, **2003**. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*: a novel adhesion/invasion assay reveals distinct differences in tachyzoite-host cell interactions. *Experimental parasitology* 104 (3-4), 149-158.
- Naguleswaran A, Alaeddine F, Guionaud C, Vonlaufen N, Sonda S, Jenoe P, Mevissen M, Hemphill A, **2005**. *Neospora caninum* protein disulfide isomerase is involved in tachyzoite-host cell interaction. *International journal for parasitology* 35 (13), 1459-1472.
- Nishikawa Y, Ikeda H, Fukumoto S, Xuan X, Nagasawa H, Otsuka H, Mikami T, **2000**. Immunization of dogs with a canine herpesvirus vector expressing *Neospora caninum* surface protein, NcSRS2. *International journal for parasitology* 30 (11), 1167-1171.

Nishikawa Y, Tragoolpua K, Inoue N, Makala L, Nagasawa H, Otsuka H, Mikami T, **2001a**. 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. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 8 (1071-412; 4), 811-816.

Nishikawa Y, Xuan X, Nagasawa H, Igarashi I, Fujisaki K, Otsuka H, Mikami T, **2001b**. Prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice by recombinant vaccinia virus carrying NcSRS2 gene. *Vaccine* 19 (13-14), 1710-1716.

Nishikawa Y, Makala L, Otsuka H, Mikami T, Nagasawa H, **2002**. Mechanisms of apoptosis in murine fibroblasts by two intracellular protozoan parasites, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. *Parasite immunology* 24 (7), 347-354.

Nishikawa Y, Inoue N, Makala L, Nagasawa H, **2003**. A role for balance of interferon-gamma and interleukin-4 production in protective immunity against *Neospora caninum* infection. *Veterinary parasitology* 116 (3), 175-184.

Nogareda C, López-Gatius F, Santolaria P, García-Ispuerto I, Bech-Sàbat G, Pabón M, Mezo M, González-Warleta M, Castro-Hermida JA, Yaniz J, Almería S, **2007**. Dynamics of anti-*Neospora caninum* antibodies during gestation in chronically infected dairy cows. *Veterinary parasitology* 148 (3-4), 193-199.

NRC, **1998**. Biomedical Models and Resources: Current Needs and Future Opportunities, 84 pp.

O'Handley R, Liddell S, Parker C, Jenkins MC, Dubey JP, **2002**. Experimental infection of sheep with *Neospora caninum* oocysts. *The Journal of parasitology* 88 (6), 1120-1123.

O'Handley RM, Morgan SA, Parker C, Jenkins MC, Dubey JP, **2003**. Vaccination of ewes for prevention of vertical transmission of *Neospora caninum*. *American Journal of Veterinary Research* 64 (4), 449-452.

O'Toole D, Jeffrey M, **1987**. Congenital sporozoan encephalomyelitis in a calf. *The Veterinary record* 121 (24), 563-566.

Ojo KK, Pfander C, Mueller NR, Burstroem C, Larson ET, Bryan CM, Fox AM, Reid MC, Johnson SM, Murphy RC, Kennedy M, Mann H, Leibly DJ, Hewitt SN, Verlinde CL, Kappe S, Merritt EA, Maly DJ, Billker O, Van Voorhis WC, **2012**. Transmission of malaria to mosquitoes blocked by bumped kinase inhibitors. *The Journal of clinical investigation* 122 (6), 2301-2305.

Ojo KK, Reid MC, Kallur Siddaramaiah L, Müller J, Winzer P, Zhang Z, Keyloun KR, Vidadala RS, Merritt EA, Hol WG, Maly DJ, Fan E, Van Voorhis WC, Hemphill A, **2014**. *Neospora caninum* calcium-dependent protein kinase 1 is an effective drug target for neosporosis therapy. *PLoS one* 9 (3), e92929.

Omata Y, Nidaira M, Kano R, Kobayashi Y, Koyama T, Furuoka H, Maeda R, Matsui T, Saito A, **2004**. Vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice in both acute and chronic infection. *Veterinary parasitology* 121 (3-4), 323-328.

Ortega-Mora LM, Ferre I, del Pozo I, Caetano-da-Silva A, Collantes-Fernández E, Regidor-Cerrillo J, Ugarte-Garagalza C, Aduriz G, **2003**. Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. *Veterinary parasitology* 117 (4), 301-308.

Ortega-Mora LM, Fernández-García A, Gómez-Bautista M, **2006**. Diagnosis of bovine neosporosis: Recent advances and perspectives. *Acta Parasitologica* 51 (1), 1-14.

Osburn BI, MacLachlan NJ, Terrell TG, **1982**. Ontogeny of the immune system. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 181 (10), 1049-1052.

Osoro K, Ortega-Mora LM, Martínez A, Serrano-Martínez E, Ferre I, **2009**. Natural breeding with bulls experimentally infected with *Neospora caninum* failed to induce seroconversion in dams. *Theriogenology* 71 (4), 639-642.

Otter A, Jeffrey M, Griffiths IB, Dubey JP, **1995**. A survey of the incidence of *Neospora caninum* infection in aborted and stillborn bovine fetuses in England and Wales. *The Veterinary record* 136 (24), 602-606.

- Ouologuem DT, Roos DS, **2014**. Dynamics of the *Toxoplasma gondii* inner membrane complex. *Journal of cell science* 127 (Pt 15), 3320-3330.
- Parish SM, Maag-Miller L, Besser TE, Weidner JP, McElwain T, Knowles DP, Leathers CW, **1987**. Myelitis associated with protozoal infection in newborn calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 191 (12), 1599-1600.
- Pastor-Fernández I, Arranz-Solís D, Regidor-Cerrillo J, Álvarez-García G, Hemphill A, García-Culebras A, Cuevas-Martín C, Ortega-Mora LM, **2015**. A vaccine formulation combining rhoptry proteins NcROP40 and NcROP2 improves pup survival in a pregnant mouse model of neosporosis. *Veterinary parasitology* 207 (3-4), 203-215.
- Pedraza-Díaz S, Marugán-Hernández V, Collantes-Fernández E, Regidor-Cerrillo J, Rojo-Montejo S, Gómez-Bautista M, Ortega-Mora LM, **2009**. Microsatellite markers for the molecular characterization of *Neospora caninum*: application to clinical samples. *Veterinary parasitology* 166 (1-2), 38-46.
- Pereira García-Melo D, Regidor-Cerrillo J, Collantes-Fernández E, Aguado-Martínez A, Del Pozo I, Minguíjon E, Gómez-Bautista M, Aduriz G, Ortega-Mora LM, **2010**. Pathogenic characterization in mice of *Neospora caninum* isolates obtained from asymptomatic calves. *Parasitology* 137 (7), 1057-1068.
- Pereira-Bueno J, Quintanilla-Gozaolo A, Pérez-Pérez V, Espi-Felgueroso A, Álvarez-García G, Collantes-Fernández E, Ortega-Mora LM, **2003**. Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. *Veterinary parasitology* 111 (2-3), 143-152.
- Pérez-Zaballos FJ, Ortega-Mora LM, Álvarez-García G, Collantes-Fernández E, Navarro-Lozano V, García-Villada L, Costas E, **2005**. Adaptation of *Neospora caninum* isolates to cell-culture changes: an argument in favor of its clonal population structure. *The Journal of parasitology* 91 (3), 507-510.
- Peters M, Lutkefels E, Heckerroth AR, Schares G, **2001**. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. *International journal for parasitology* 31 (10), 1144-1148.
- Pinheiro AM, Costa SL, Freire SM, Ribeiro CS, Tardy M, El-Bacha RS, Costa MF, **2010**. *Neospora caninum*: Early immune response of rat mixed glial cultures after tachyzoites infection. *Experimental parasitology* 124 (4), 442-447.
- Quinn HE, Miller CM, Ryce C, Windsor PA, Ellis JT, **2002**. Characterization of an outbred pregnant mouse model of *Neospora caninum* infection. *The Journal of parasitology* 88 (4), 691-696.
- Quinn HE, Miller CM, Ellis JT, **2004**. The cell-mediated immune response to *Neospora caninum* during pregnancy in the mouse is associated with a bias towards production of interleukin-4. *International journal for parasitology* 34 (6), 723-732.
- Quintanilla-Gozaolo A, Pereira-Bueno J, Tabares E, Innes EA, González-Paniello R, Ortega-Mora LM, **1999**. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Spain. *International journal for parasitology* 29 (8), 1201-1208.
- Quintanilla-Gozaolo A, Pereira-Bueno J, Seijas-Carballedo A, Costas E, Ortega Mora LM, **2000**. Observational studies in *Neospora caninum* infected dairy cattle: relationship infection-abortion and gestational antibody fluctuations. In: Hemphill A, Gottstein B. A European perspective on *Neospora caninum*. *International journal for parasitology* 30, 877-924.
- Ramamoorthy S, Sriranganathan N, Lindsay DS, **2005**. Gerbil model of acute neosporosis. *Veterinary parasitology* 127 (2), 111-114.
- Ramamoorthy S, Lindsay DS, Schurig GG, Boyle SM, Duncan RB, Vemulapalli R, Sriranganathan N, **2006**. Vaccination with gamma-Irradiated *Neospora caninum* Tachyzoites Protects Mice Against Acute Challenge with *N. caninum*. *The Journal of eukaryotic microbiology* 53 (2), 151-156.
- Ramamoorthy S, Duncan R, Lindsay DS, Sriranganathan N, **2007a**. Optimization of the use of C57BL/6 mice as a laboratory animal model for *Neospora caninum* vaccine studies. *Veterinary parasitology* 145 (3-4), 253-259.

Ramamoorthy S, Sanakkayala N, Vemulapalli R, Duncan RB, Lindsay DS, Schurig GS, Boyle SM, Kasimanickam R, Sriranganathan N, **2007b**. Prevention of lethal experimental infection of C57BL/6 mice by vaccination with *Brucella abortus* strain RB51 expressing *Neospora caninum* antigens 1. *International journal for parasitology* 37 (13), 1521-1529.

Regidor-Cerrillo J, Pedraza-Díaz S, Gómez-Bautista M, Ortega-Mora LM, **2006**. Multilocus microsatellite analysis reveals extensive genetic diversity in *Neospora caninum*. *Journal of Parasitology* 92 (3), 517-524.

Regidor-Cerrillo J, Gómez-Bautista M, Pereira-Bueno J, Aduriz G, Navarro-Lozano V, Risco-Castillo V, Fernández-García A, Pedraza-Díaz S, Ortega-Mora LM, **2008**. Isolation and genetic characterization of *Neospora caninum* from asymptomatic calves in Spain. *Parasitology* 135 (14), 1651-1659.

Regidor-Cerrillo J, Gómez-Bautista M, Del Pozo I, Jiménez-Ruiz E, Aduriz G, Ortega-Mora LM, **2010**. Influence of *Neospora caninum* intra-specific variability in the outcome of infection in a pregnant BALB/c mouse model. *Veterinary research* 41 (4), 52.

Regidor-Cerrillo J, Gómez-Bautista M, Sodupe I, Aduriz G, Álvarez-García G, Del Pozo I, Ortega-Mora LM, **2011**. *In vitro* invasion efficiency and intracellular proliferation rate comprise virulence-related phenotypic traits of *Neospora caninum*. *Veterinary research* 42 (1), 41.

Regidor-Cerrillo J, Álvarez-García G, Pastor-Fernández I, Marugán-Hernández V, Gómez-Bautista M, Ortega-Mora LM, **2012**. Proteome expression changes among virulent and attenuated *Neospora caninum* isolates. *Journal of proteomics* 75 (8), 2306-2318.

Regidor-Cerrillo J, Díez-Fuertes F, García-Culebras A, Moore DP, González-Warleta M, Cuevas C, Schares G, Katzer F, Pedraza-Díaz S, Mezo M, Ortega-Mora LM, **2013**. Genetic diversity and geographic population structure of bovine *Neospora caninum* determined by microsatellite genotyping analysis. *PLoS one* 8 (8), e72678.

Regidor-Cerrillo J, Arranz-Solís D, Benavides J, Gómez-Bautista M, Castro-Hermida JA, Mezo M, Perez V, Ortega-Mora LM, González-Warleta M, **2014**. *Neospora caninum* infection during early pregnancy in cattle: how the isolate influences infection dynamics, clinical outcome and peripheral and local immune responses. *Veterinary research* 45 (10), 9716.

Regidor-Cerrillo J, García-Lunar P, Pastor-Fernández I, Álvarez-García G, Collantes-Fernández E, Gómez-Bautista M, Ortega-Mora LM, **2015**. *Neospora caninum* tachyzoite immunome study reveals differences among three biologically different isolates. *Veterinary parasitology* 212 (3-4), 92-99.

Reichel MP, Ellis JT, **2006**. If control of *Neospora caninum* infection is technically feasible does it make economic sense? *Veterinary parasitology* 142 (1-2), 23-34.

Reichel MP, Ellis JT, **2009**. *Neospora caninum*--how close are we to development of an efficacious vaccine that prevents abortion in cattle? *International journal for parasitology* 39 (11), 1173-1187.

Reichel MP, Alejandra Ayanegui-Alcerreca M, Gondim LF, Ellis JT, **2013**. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - the billion dollar question. *International journal for parasitology* 43 (2), 133-142.

Reichel MP, McAllister MM, Pomroy WE, Campero C, Ortega-Mora LM, Ellis JT, **2014**. Control options for *Neospora caninum*--is there anything new or are we going backwards? *Parasitology* 141 (11), 1455-1470.

Reichel MP, Moore DP, Hemphill A, Ortega-Mora LM, Dubey JP, Ellis JT, **2015**. A live vaccine against *Neospora caninum* abortions in cattle. *Vaccine* 33 (11), 1299-1301.

Reid AJ, Vermont SJ, Cotton JA, Harris D, Hill-Cawthorne GA, Konen-Waisman S, Latham SM, Mourier T, Norton R, Quail MA, Sanders M, Shanmugam D, Sohal A, Wasmuth JD, Brunk B, Grigg ME, Howard JC, Parkinson J, Roos DS, Trees AJ, Berriman M, Pain A, Wastling JM, **2012**. Comparative genomics of the apicomplexan parasites *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*: Coccidia differing in host range and transmission strategy. *PLoS pathogens* 8 (3), e1002567.

Rettigner C, De Meerschman F, Focant C, Vanderplasschen A, Losson B, **2004a**. The vertical transmission following the reactivation of a *Neospora caninum* chronic infection does not seem to be due to an alteration of the systemic immune response in pregnant CBA/Ca mice. *Parasitology* 128, 149-160.

Rettigner C, Leclipteux T, De Meerschman F, Focant C, Losson B, **2004b**. Survival, immune responses and tissue cyst production in outbred (Swiss white) and inbred (CBA/Ca) strains of mice experimentally infected with *Neospora caninum* tachyzoites. *Veterinary research* 35 (2), 225-232.

Ribeiro DP, Freitas MM, Cardoso MR, Pajuaba AC, Silva NM, Mineo TW, Silva JS, Mineo JR, Silva DA, **2009**. CpG-ODN combined with *Neospora caninum* lysate, but not with excreted-secreted antigen, enhances protection against infection in mice. *Vaccine* 27 (19), 2570-2579.

Risco-Castillo V, Fernández-García A, Ortega-Mora LM, **2004**. Comparative analysis of stress agents in a simplified *in vitro* system of *Neospora caninum* bradyzoite production. *Journal of Parasitology* 90 (3), 466-470.

Risco-Castillo V, Fernández-García A, Zaballos A, Aguado-Martínez A, Hemphill A, Rodríguez-Bertos A, Álvarez-García G, Ortega-Mora LM, **2007**. Molecular characterisation of BSR4, a novel bradyzoite-specific gene from *Neospora caninum*. *International journal for parasitology* 37 (8-9), 887-896.

Risco-Castillo V, Marugán-Hernández V, Fernández-García A, Aguado-Martínez A, Jiménez-Ruiz E, Rodríguez-Marco S, Álvarez-García G, Ortega-Mora LM, **2011**. Identification of a gene cluster for cell-surface genes of the SRS superfamily in *Neospora caninum* and characterization of the novel SRS9 gene. *Parasitology* 138 (14), 1832-1842.

Ritter DM, Kerlin R, Sibert G, Brake D, **2002**. Immune factors influencing the course of infection with *Neospora caninum* in the murine host. *The Journal of parasitology* 88 (2), 271-280.

Rocchi MS, Bartley PM, Inglis NF, Collantes-Fernández E, Entrican G, Katzer F, Innes EA, **2011**. Selection of *Neospora caninum* antigens stimulating bovine CD4+ve T cell responses through immuno-potency screening and proteomic approaches. *Veterinary research* 42 (1), 91.

Rojo-Montejo S, Collantes-Fernández E, Blanco-Murcia J, Rodríguez-Bertos A, Risco-Castillo V, Ortega-Mora LM, **2009a**. Experimental infection with a low virulence isolate of *Neospora caninum* at 70 days gestation in cattle did not result in foetopathy. *Veterinary research* 40 (5), 49.

Rojo-Montejo S, Collantes-Fernández E, Regidor-Cerrillo J, Álvarez-García G, Marugán-Hernández V, Pedraza-Díaz S, Blanco-Murcia J, Prenafeta A, Ortega-Mora LM, **2009b**. Isolation and characterization of a bovine isolate of *Neospora caninum* with low virulence. *Veterinary parasitology* 159 (1), 7-16.

Rojo-Montejo S, Zabala-Martínez J, Vázquez-Moreno E, Collantes-Fernández E, Loste-Montoya JM, Ortega-Mora LM, **2009c**. Relevancia de la transmisión horizontal de *Neospora caninum* en rebaños bovinos españoles. *XIV Congreso Internacional ANEMBE de Medicina Bovina* 6-8 Mayo, La Coruña (España) (comunicación oral).

Rojo-Montejo S, Collantes-Fernández E, Regidor-Cerrillo J, Rodríguez-Bertos A, Prenafeta A, Gómez-Bautista M, Ortega-Mora LM, **2011**. Influence of adjuvant and antigen dose on protection induced by an inactivated whole vaccine against *Neospora caninum* infection in mice. *Veterinary parasitology* 175 (3-4), 220-229.

Rojo-Montejo S, Collantes-Fernández E, López-Pérez I, Risco-Castillo V, Prenafeta A, Ortega-Mora LM, **2012**. Evaluation of the protection conferred by a naturally attenuated *Neospora caninum* isolate against congenital and cerebral neosporosis in mice. *Veterinary research* 43, 62-9716-43-62.

Rojo-Montejo S, Collantes-Fernández E, Pérez-Zaballos F, Rodríguez-Marcos S, Blanco-Murcia J, Rodríguez-Bertos A, Prenafeta A, Ortega-Mora LM, **2013**. Effect of vaccination of cattle with the low virulence Nc-Spain 1H isolate of *Neospora caninum* against a heterologous challenge in early and mid-gestation. *Veterinary research* 44, 106-9716-44-106.

Romero JJ, Pérez E, Frankena K, **2004**. Effect of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite vaccine on the crude abortion rate of Costa Rican dairy cows under field conditions. *Veterinary parasitology* 123 (3-4), 149-159.

Rosbottom A, Guy CS, Gibney EH, Smith RF, Valarcher JF, Taylor G, Williams DJ, **2007**. Peripheral immune responses in pregnant cattle following *Neospora caninum* infection. *Parasite immunology* 29 (4), 219-228.

Rosbottom A, Gibney EH, Guy CS, Kipar A, Smith RF, Kaiser P, Trees AJ, Williams DJ, **2008**. Upregulation of cytokines is detected in the placentas of cattle infected with *Neospora caninum* and is more marked early in gestation when fetal death is observed. *Infection and immunity* 76 (6), 2352-2361.

Rosbottom A, Gibney H, Kaiser P, Hartley C, Smith RF, Robinson R, Kipar A, Williams DJ, **2011**. Up regulation of the maternal immune response in the placenta of cattle naturally infected with *Neospora caninum*. *PloS one* 6 (1), e15799.

Russell WMS, Burch RL, **1959**. The Principles of Humane Experimental Technique. *Methuen*, London

Sawada M, Kondo H, Tomioka Y, Park C, Morita T, Shimada A, Umemura T, **2000**. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected adult dairy cow. *Veterinary parasitology* 90 (3), 247-252.

Schares G, Heydorn AO, Cuppers A, Conraths FJ, Mehlhorn H, **2001**. Cyclic transmission of *Neospora caninum*: serological findings in dogs shedding oocysts. *Parasitology research* 87 (10), 873-877.

Schares G, Barwald A, Staubach C, Sondgen P, Rauser M, Schroder R, Peters M, Wurm R, Selhorst T, Conraths FJ, **2002**. p38-avidity-ELISA: examination of herds experiencing epidemic or endemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Veterinary parasitology* 106 (4), 293-305.

Schares G, Barwald A, Staubach C, Wurm R, Rauser M, Conraths FJ, Schroeder C, **2004**. Adaptation of a commercial ELISA for the detection of antibodies against *Neospora caninum* in bovine milk. *Veterinary parasitology* 120 (1-2), 55-63.

Schares G, Barwald A, Conraths FJ, **2005**. Adaptation of a surface antigen-based ELISA for the detection of antibodies against *Neospora caninum* in bovine milk. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health* 52 (1), 45-48.

Schmittgen TD, Livak KJ, **2008**. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols* 3 (6), 1101-1108.

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW, **2012**. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* 9 (7), 671-675.

Schock A, Buxton D, Spence JA, Low JC, Baird A, **2000**. Histopathological survey of aborted bovine fetuses in Scotland with special reference to *Neospora caninum*. *The Veterinary record* 147 (24), 687-688.

Schock A, Innes EA, Yamane I, Latham SM, Wastling JM, **2001**. Genetic and biological diversity among isolates of *Neospora caninum*. *Parasitology* 123, 13-23.

Schorer M, Debache K, Barna F, Monney T, Müller J, Boykin DW, Stephens CE, Hemphill A, **2012**. Di-cationic arylimidamides act against *Neospora caninum* tachyzoites by interference in membrane structure and nucleolar integrity and are active against challenge infection in mice. *International journal for parasitology. Drugs and drug resistance* 2, 109-120.

Seo HS, Kim KH, Kim DY, Park BK, Shin NS, Kim JH, Youn H, **2013**. GC/MS analysis of high-performance liquid chromatography fractions from *Sophora flavescens* and *Torilis japonica* extracts and their *in vitro* anti-neosporal effects on *Neospora caninum*. *Journal of veterinary science* 14 (3), 241-248.

Serrano-Martínez E, Ferre I, Osoro K, Aduriz G, Mota RA, Martínez A, Del-Pozo I, Hidalgo CO, Ortega-Mora LM, **2007**. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers and cows using contaminated semen with different numbers of tachyzoites. *Theriogenology* 67 (4), 729-737.

Serrano E, Ferre I, Osoro K, Aduriz G, Mateos-Sanz A, Martínez A, Atxaerandio R, Hidalgo CO, Ortega-Mora LM, **2006**. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers. *Veterinary parasitology* 135 (3-4), 197-203.

Shin YS, Lee EG, Jung TS, **2005**. Exploration of immunoblot profiles of *Neospora caninum* probed with different bovine immunoglobulin classes. *J Vet Sci.* 6 (2), 157-160.

Shivaprasad HL, Ely R, Dubey JP, **1989**. A *Neospora*-like protozoon found in an aborted bovine placenta. *Veterinary parasitology* 34 (1-2), 145-148.

Sibley LD, Weidner E, Krahenbuhl JL, **1985**. Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature* 315 (6018), 416-419.

Smith JE, **1995**. A ubiquitous intracellular parasite: the cellular biology of *Toxoplasma gondii*. *International journal for parasitology* 25 (11), 1301-1309.

- Speer CA, Dubey JP, **1989**. Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum*. *The Journal of protozoology* 36 (5), 458-463.
- Speer CA, Dubey JP, McAllister MM, Blixt JA, **1999**. Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *International journal for parasitology* 29 (10), 1509-1519.
- Srinivasan S, Mueller J, Suana A, Hemphill A, **2007**. Vaccination with microneme protein NcMIC4 increases mortality in mice inoculated with *Neospora caninum*. *The Journal of parasitology* 93 (5), 1046-1055.
- Staska LM, McGuire TC, Davies CJ, Lewin HA, Baszler TV, **2003**. *Neospora caninum*-infected cattle develop parasite-specific CD4+ cytotoxic T lymphocytes. *Infection and immunity* 71 (6), 3272-3279.
- Staska LM, Davies CJ, Brown WC, McGuire TC, Suarez CE, Park JY, Mathison BA, Abbott JR, Baszler TV, **2005**. Identification of vaccine candidate peptides in the NcSRS2 surface protein of *Neospora caninum* by using CD4+ cytotoxic T lymphocytes and gamma interferon-secreting T lymphocytes of infected holstein cattle. *Infection and immunity* 73 (3), 1321-1329.
- Steinhoff MC, Pneumococcal Vaccine Animal Model Consensus Group, **2007**. Animal models for protein pneumococcal vaccine evaluation: a summary. *Vaccine* 25 (13), 2465-2470.
- Stenlund S, Kindahl H, Magnusson U, Uggla A, Björkman C, **1999**. Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Veterinary parasitology* 85 (4), 227-234.
- Strohbusch M, Müller N, Hemphill A, Krebber R, Greif G, Gottstein B, **2009a**. Toltrazuril treatment of congenitally acquired *Neospora caninum* infection in newborn mice. *Parasitology research* 104 (6), 1335-1343.
- Strohbusch M, Müller N, Hemphill A, Margos M, Grandgirard D, Leib S, Greif G, Gottstein B, **2009b**. *Neospora caninum* and bone marrow-derived dendritic cells: parasite survival, proliferation, and induction of cytokine expression. *Parasite immunology* 31 (7), 366-372.
- Syed-Hussain SS, Howe L, Pomroy WE, West DM, Smith SL, Williamson NB, **2013**. Detection of *Neospora caninum* DNA in semen of experimental infected rams with no evidence of horizontal transmission in ewes. *Veterinary parasitology* 197 (3-4), 534-542.
- Syed-Hussain SS, Howe L, Pomroy WE, West DM, Hardcastle M, Williamson NB, **2015a**. Study on the use of toltrazuril to eliminate *Neospora caninum* in congenitally infected lambs born from experimentally infected ewes. *Veterinary parasitology* 210 (3-4), 141-144.
- Syed-Hussain SS, Howe L, Pomroy WE, West DM, Hardcastle M, Williamson NB, **2015b**. Vertical transmission in experimentally infected sheep despite previous inoculation with *Neospora caninum* NcNZ1 isolate. *Veterinary parasitology* 208 (3-4), 150-158.
- Tanaka T, Hamada T, Inoue N, Nagasawa H, Fujisaki K, Suzuki N, Mikami T, **2000a**. The role of CD4(+) or CD8(+) T cells in the protective immune response of BALB/c mice to *Neospora caninum* infection. *Veterinary parasitology* 90 (3), 183-191.
- Tanaka T, Nagasawa H, Fujisaki K, Suzuki N, Mikami T, **2000b**. Growth-inhibitory effects of interferon-gamma on *Neospora caninum* in murine macrophages by a nitric oxide mechanism. *Parasitology research* 86 (9), 768-771.
- Thilsted JP, Dubey JP, **1989**. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. *Journal of veterinary diagnostic investigation* 1 (3), 205-209.
- Thurmond MC, Hietala SK, **1997**. Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first-lactation dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 210 (5), 672-674.
- Trees AJ, Davison HC, Innes EA, Wastling JM, **1999**. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. *International journal for parasitology* 29 (8), 1195-1200.

Trees AJ, McAllister MM, Guy CS, McGarry JW, Smith RF, Williams DJ, **2002**. *Neospora caninum*: oocyst challenge of pregnant cows. *Veterinary parasitology* 109 (1-2), 147-154.

Trees AJ, Williams DJL, **2005**. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends in parasitology* 21 (12), 558-561.

Tuo W, Fetterer RH, Davis WC, Jenkins MC, Dubey JP, **2005**. *Neospora caninum* antigens defined by antigen-dependent bovine CD4+ T cells. *The Journal of parasitology* 91 (3), 564-568.

Tuo W, Zhao Y, Zhu D, Jenkins MC, **2011**. Immunization of female BALB/c mice with *Neospora* cyclophilin and/or NcSRS2 elicits specific antibody response and prevents against challenge infection by *Neospora caninum*. *Vaccine* 29 (13), 2392-2399.

Uematsu S, Akira S, **2008**. Toll-Like receptors (TLRs) and their ligands. *Handbook of Experimental Pharmacology* 183, 1-20.

Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JA, **2007**. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic acids research* 35 (Web Server issue), W71-4. <http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>.

Uzeda RS, Costa KS, Santos SL, Pinheiro AM, De Almeida MA, McAllister MM, Gondim LF, **2007**. Loss of infectivity of *Neospora caninum* oocysts maintained for a prolonged time. *The Korean journal of parasitology* 45 (4), 295-299.

Vanleeuwen JA, Haddad JP, Dohoo IR, Keefe GP, Tiwari A, Scott HM, **2010**. Risk factors associated with *Neospora caninum* seropositivity in randomly sampled Canadian dairy cows and herds. *Preventive veterinary medicine* 93 (2-3), 129-138.

Vemulapalli R, Sanakkayala N, Gulani J, Schurig GG, Boyle SM, Lindsay DS, Sriranganathan N, **2007**. Reduced cerebral infection of *Neospora caninum* in BALB/c mice vaccinated with recombinant *Brucella abortus* RB51 strains expressing *N. caninum* SRS2 and GRA7 proteins. *Veterinary parasitology* 148 (3-4), 219-230.

Vonlaufen N, Müller N, Keller N, Naguleswaran A, Bohne W, McAllister MM, Björkman C, Muller E, Caldelari R, Hemphill A, **2002**. Exogenous nitric oxide triggers *Neospora caninum* tachyzoite-to-bradyzoite stage conversion in murine epidermal keratinocyte cell cultures. *International journal for parasitology* 32 (10), 1253-1265.

Vonlaufen N, Guetg N, Naguleswaran A, Müller N, Björkman C, Schares G, von Blumroeder D, Ellis J, Hemphill A, **2004**. *In vitro* induction of *Neospora caninum* bradyzoites in vero cells reveals differential antigen expression, localization, and host-cell recognition of tachyzoites and bradyzoites. *Infection and immunity* 72 (1), 576-583.

Wall RJ, Shani M, **2008**. Are animal models as good as we think? *Theriogenology* 69 (1), 2-9.

Walsh CP, Vemulapalli R, Sriranganathan N, Zajac AM, Jenkins MC, Lindsay DS, **2001**. Molecular comparison of the dense granule proteins GRA6 and GRA7 of *Neospora hughesi* and *Neospora caninum*. *International journal for parasitology* 31 (3), 253-258.

Weber FH, Jackson JA, Sobocki B, Choromanski L, Olsen M, Meinert T, Frank R, Reichel MP, Ellis JT, **2013**. On the efficacy and safety of vaccination with live tachyzoites of *Neospora caninum* for prevention of neospora-associated fetal loss in cattle. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 20 (1), 99-105.

West DM, Pomroy WE, Collett MG, Hill FI, Ridler AL, Kenyon PR, Morris ST, Pattison RS, **2006**. A possible role for *Neospora caninum* in ovine abortion in New Zealand. *Small Ruminant Research* 62 (1-2), 135-138.

Weston JF, Williamson NB, Pomroy WE, **2005**. Associations between pregnancy outcome and serological response to *Neospora caninum* among a group of dairy heifers. *New Zealand veterinary journal* 53 (2), 142-148.

Weston JF, Howe L, Collett MG, Pattison RS, Williamson NB, West DM, Pomroy WE, Syed-Hussain SS, Morris ST, Kenyon PR, **2009**. Dose-titration challenge of young pregnant sheep with *Neospora caninum* tachyzoites. *Veterinary parasitology* 164 (2-4), 183-191.

- Weston JF, Heuer C, Williamson NB, **2011**. Efficacy of a *Neospora caninum* killed tachyzoite vaccine in preventing abortion and vertical transmission in dairy cattle. *Preventive veterinary medicine* 103 (2-3), 136-144.
- Whitten MK, **1957**. Effect of exteroceptive factors on the oestrous cycle of mice. *Nature* 180 (4599), 1436.
- Wiengcharoen J, Thompson RC, Nakthong C, Rattanakorn P, Sukthana Y, **2011**. Transplacental transmission in cattle: is *Toxoplasma gondii* less potent than *Neospora caninum*? *Parasitology research* 108 (5), 1235-1241.
- Williams DJ, Guy CS, McGarry JW, Guy F, Tasker L, Smith RF, MacEachern K, Cripps PJ, Kelly DF, Trees AJ, **2000**. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitology* 121 (Pt 4), 347-358.
- Williams DJ, Guy CS, Smith RF, Ellis J, Björkman C, Reichel MP, Trees AJ, **2007**. Immunization of cattle with live tachyzoites of *Neospora caninum* confers protection against fetal death. *Infection and immunity* 75 (3), 1343-1348.
- Williams DJ, Hartley CS, Björkman C, Trees AJ, **2009**. Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* - how the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease. *Parasitology* 136 (14), 1895-1900.
- Wouda W, **1997**. [*Neospora* abortion in cattle]. *Tijdschrift voor diergeneeskunde* 122 (16), 446-448.
- Wouda W, Moen AR, Visser IJ, van Knapen F, **1997**. Bovine fetal neosporosis: a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification of organisms in brain, heart, and liver. *Journal of veterinary diagnostic investigation* 9 (2), 180-185.
- Wouda W, Brinkhof J, van Maanen C, de Gee AL, Moen AR, **1998a**. Serodiagnosis of neosporosis in individual cows and dairy herds: A comparative study of three enzyme-linked immunosorbent assays. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 5 (1071-412; 5), 711-716.
- Wouda W, Moen AR, Schukken YH, **1998b**. Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. *Theriogenology* 49 (7), 1311-1316.
- Yamane I, Kitani H, Kokuho T, Shibahara T, Haritani M, Hamaoka T, Shimizu S, Koiwai M, Shimura K, Yokomizo Y, **2000**. The inhibitory effect of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha on intracellular multiplication of *Neospora caninum* in primary bovine brain cells. *The Journal of veterinary medical science* 62 (3), 347-351.
- Yin J, Qu G, Cao L, Li Q, Fetterer R, Feng X, Liu Q, Wang G, Qi D, Zhang X, Miramontes E, Jenkins M, Zhang N, Tuo W, **2012**. Characterization of *Neospora caninum* microneme protein 10 (NcMIC10) and its potential use as a diagnostic marker for neosporosis. *Veterinary parasitology* 187 (1-2), 28-35.
- Zenclussen AC, **2006**. Regulatory T cells in pregnancy. *Springer seminars in immunopathology* 28 (1), 31-39.
- Zhang H, Nishikawa Y, Yamagishi J, Zhou J, Ikehara Y, Kojima N, Yokoyama N, Xuan X, **2010**. *Neospora caninum*: application of apical membrane antigen 1 encapsulated in the oligomannose-coated liposomes for reduction of offspring mortality from infection in BALB/c mice. *Experimental parasitology* 125 (2), 130-136.
- Zhang H, Hu X, Liu X, Zhang R, Fu Q, Xu X, **2012**. The Treg/Th17 imbalance in *Toxoplasma gondii*-infected pregnant mice. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y.: 1989)* 67 (2), 112-121.

No importa cómo caes, sino cómo te levantas.
No importa el fracaso, sino volverlo a intentar.
No importa lo largo del camino, sino lo que está al final.
No importa el sudor que cueste sino lo que quieres lograr.

“El éxito consiste en obtener lo que se desea.
La felicidad, en disfrutar lo que se obtiene”.

Emerson (1803-1882)

“Dentro de veinte años estarás más decepcionado por las cosas que no hiciste que por las que hiciste, así que suelta las amarras, vela lejos del puerto seguro, captura los vientos alisios en tus velas. Explora, Sueña, Descubre.”

Mark Twain (1835-1910)

