

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal



## TESIS DOCTORAL

**Vacunas frente a la neosporosis: nuevos adyuvantes y dianas vacunales y mejora de los modelos murinos experimentales**

**Vaccines against neosporosis: new adjuvants and vaccine candidates and improvement of experimental mouse models**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Elena Jiménez Ruiz

Directores

Luis Miguel Ortega Mora  
Gema Álvarez García

Madrid, 2013



Facultad de Veterinaria  
Departamento de Sanidad Animal

# **Vacunas frente a la neosporosis: nuevos adyuvantes y dianas vacunales y mejora de los modelos murinos experimentales**



**Elena Jiménez Ruiz**  
**Tesis Doctoral**  
**2013**



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal



**VACUNAS FRENTE A LA NEOSPOROSIS: NUEVOS  
ADYUVANTES Y DIANAS VACUNALES Y MEJORA DE LOS  
MODELOS MURINOS EXPERIMENTALES**

**TESIS DOCTORAL**

Elena Jiménez Ruiz

Madrid, 2013



COMPLUTENSE UNIVERSITY OF MADRID  
VETERINARY SCIENCES FACULTY

Animal Health Department



**VACCINES AGAINST NEOSPOROSIS: NEW ADJUVANTS AND  
VACCINE CANDIDATES AND IMPROVEMENT OF  
EXPERIMENTAL MOUSE MODELS**

**DOCTORAL THESIS**

Elena Jiménez Ruiz

Madrid, 2013



Memoria presentada por Dña. Elena Jiménez  
Ruiz para optar al grado de Doctor por la  
Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, a 24 de Enero de 2013



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 y Dña. Gema Álvarez García, Doctora en Veterinaria y Profesora Titular adscrita al departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada: “**Vacunas frente a la neosporosis: nuevos adyuvantes y dianas vacunales y mejora de los modelos murinos experimentales**” que presenta la Licenciada en Biología Dña. Elena Jiménez Ruiz, para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid con Mención Europea, ha sido realizada en el grupo SALUVET, 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 24 de Enero de 2013

Fdo. Dr. Luis Miguel Ortega Mora

Fdo. Dra. Gema Álvarez García



A la memoria de mi padre



En el fondo, los científicos somos gente con suerte:  
podemos jugar a lo que queramos durante toda la vida.

Lee Smolin (1955-¿?)  
Físico teórico y cosmólogo

En ocasiones, el replanteamiento de un problema es más decisivo que el hallazgo de la solución, que puede ser un puro asunto de habilidad matemática o experimental. La capacidad de suscitar nuevas cuestiones, nuevas posibilidades de mirar viejos problemas, requiere una imaginación creativa y determina los avances científicos auténticos

*The mere formulation of a problem is far more essential than its solution, which may be merely a matter of mathematical or experimental skills. To raise new questions, new possibilities, to regard old problems from a new angle requires creative imagination and marks real advances in science.*

Albert Einstein (1879-1955)  
Físico alemán.



## **Agradecimientos**

Durante todos estos años, he tenido la oportunidad de conocer a mucha gente estupenda con la que he compartido la experiencia de la elaboración de una Tesis Doctoral. En estas líneas, seguramente las más leídas de toda la Tesis, quiero expresaros mi agradecimiento a todos vosotros.

En primer lugar, agradezco a Luis y a Gema la oportunidad que me dieron al escogermme para la realización de esta Tesis y dejarme formar parte de esta gran familia llamada SALUVET. Admiro vuestra capacidad de trabajo, gracias por luchar conmigo para sacar esta Tesis adelante y por estar siempre disponibles para todos nosotros.

Al resto de “jefes saluvetianos”, Mercedes, Chema, Isabel, Ignacio y Cinta, gracias por vuestros consejos y vuestro apoyo. Sin olvidar a Susana, Esther, Vane y Javier Regidor, gracias por estar ahí siempre que os he necesitado.

A Virginia, Adriana, Fran, Vero y Lydia, quiero agradecerles que me acogieran a mi llegada a SALUVET como a una más del grupo. Habéis sido mi gran apoyo durante todo este tiempo, tanto en el laboratorio como fuera de él. Y aunque ya no estáis con nosotros he podido contar siempre con vosotros si lo he necesitado. ¡Muchísimas gracias chicos!

A Silvia, Javi Moreno, Gregori y Claudia gracias por vuestra amistad y por todos esos debates que se producían durante la hora de la comida en la cafetería. Gracias por no ser “normales” (como dice Moreno). Quiero agradecer también a “nuestra argentina”, Andrea por su amistad, has pasado tanto tiempo aquí en España con nosotros que ya eres parte de la familia.

A Iván, Dani, David y Paula, los “pupis”, ya no tan “pupis”, porque siempre estáis ahí, animando y ayudando. Porque se puede contar con vosotros para lo que sea en el laboratorio y también fuera de él. ¡Muchas gracias chicos!

A la posible nueva generación de “saluvetianos”: Roberto, Espe, María, Laura y Alex, espero que podáis continuar con este grupo si es lo que deseáis.

A las chicas que tuvieron que marcharse del grupo, Inma, Ali, Alba, Laurita y Carmen, el laboratorio está muy vacío sin vosotras. Gracias, sobre todo, por toda la ayuda, pero también por las risas, por las “sesiones de terapia” en pre-necropsias (esto va por ti Laurita) y en definitiva por vuestra amistad.

Agradezco la oportunidad de haber conocido a toda la gente estupenda que ha pasado por el grupo SALUVET en algún momento: Vane “Brasil”, Eduardo, Hipólito, Lumi, Ignacio, Daniel, Alessia, Yanina. Quiero agradecer especialmente a Caroline toda la ayuda que me ha brindado y por ser tan alegre y paciente.

Al Dr. Juan M. Irache, al Dr. Carlos Gamazo de la Universidad de Navarra y al Dr. Hesham Salman, gracias por vuestra ayuda y consejos para la encapsulación de mis proteínas. Aunque algunos momentos fueron duros, creo que aprendí mucho. Además, conocí mucha gente estupenda que forma parte de vuestro grupo: Maite, Sara, Esther, Sara Zalba, Judit, Ander, Patricia Ojeda, Patricia Calleja y Hugo. ¡Gracias por todo!

Prof. Andrew Hemphill, thank you for let me be part of your group during my stay in the University of Bern. I also want to thank Dr. Joachim Müller for all the advices he gave me. Thierry, Tati, Fabi and Karin, my little family there, thanks for your friendship. I want to thank also to all the people I met there: Dr. Norbert Müller, Michelle, Trix, Didier, Karim, etc. Gracias a Ana Hernández, mi “compi española” en Berna por tu amistad y compañía durante ese tiempo.

Y aunque directamente no han estado implicados en la Tesis, quiero agradecer a mis amigas, y a sus novios que ya forman parte del grupo: Elvi, Conchi, Tere, Laura, Mer, Marta y Jose, Diana y Torsten, Sandra y Jose, Olga y David, Ali y Fernando, Vicky y Edu. Gracias por todo el apoyo y esos momentos “vips” y, en definitiva, por haberme aguantado desde que nos conocimos al comenzar la carrera. ¡Muchas gracias!

Para finalizar, quiero agradecer a mi gran familia, sobre todo a mis abuelos. Y por supuesto, a mi madre, Tere y a mi hermano Alejandro. Aunque no figuréis en la primera página, esta Tesis también va dedicada a vosotros ya que sin vuestro apoyo no hubiera sido posible. Y por último, quiero agradecerle, Eduardo, que hayas estado a mi lado todo este tiempo.

# **Índice General**



<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>v</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>vii</b>
<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS / ABBREVIATION INDEX.....</b>	<b>ix</b>
<b>CAPÍTULO I. Antecedentes y objetivos.....</b>	<b>1</b>
1. Neosporosis bobina.....	3
1.1. Agente etiológico: <i>Neospora caninum</i> .....	3
1.1.1. Taxonomía.....	4
1.1.2. Aislados y variabilidad intra-específica.....	4
1.1.3. Ciclo biológico y espectro de hospedadores.....	6
1.1.3.1. Ciclo lítico.....	8
1.1.3.2. Persistencia y reactivación.....	9
1.1.4. Genoma y proteoma de <i>N. caninum</i> .....	10
1.2. Prevalencia.....	13
1.3. Transmisión.....	13
1.4. Patogenia.....	15
1.5. Respuesta inmunitaria.....	16
1.6. Diagnóstico.....	17
1.7. Medidas de control de la neosporosis bovina.....	18
1.7.1. Medidas de manejo.....	18
1.7.2. Quimioterapia y quimioprofilaxis.....	20
2. Desarrollo de vacunas frente a la neosporosis bovina.....	21
2.1. Consideraciones generales.....	21
2.2. Modelos animales experimentales para la evaluación de vacunas.....	22
2.2.1. Modelo murino experimental.....	22
2.2.1.1. Modelo murino no gestante.....	23
2.2.1.2. Modelo murino gestante.....	25
2.2.1.3. Respuesta inmunitaria en ratones.....	31
2.2.2. Modelo bovino experimental.....	33
2.2.3. Otros modelos experimentales de roedores y de rumiantes.....	34
2.3. Aproximaciones experimentales en el desarrollo de vacunas.....	35
2.3.1. Vacunas vivas.....	35
2.3.2. Vacunas inactivadas.....	36
2.3.3. Vacunas de nueva generación.....	37
2.4. Sistemas de adyuvantación.....	38
2.5. Uso de la nanotecnología para el desarrollo de adyuvantes de nueva generación.....	39
2.5.1. Nanopartículas en la elaboración de vacunas para la prevención de enfermedades parasitarias.....	43
2.6. Vías de administración.....	45
3. Justificación y objetivos.....	49
4. Justification and objectives.....	53

<b>CHAPTER II. Specific antibody responses against <i>Neospora caninum</i> recombinant rNcGRA7, rNcSAG4, rNcBSR4 and rNcSRS9 proteins are correlated with virulence in mice.....</b>	<b>57</b>
Abstract.....	59
1. Introduction.....	59
2. Materials and methods.....	60
2.1. Parasites.....	60
2.2. Mice and experimental design.....	60
2.3. Cloning and purification of recombinants proteins.....	61
2.4. Analysis of the humoral immune response.....	62
2.5. Statistical analysis.....	62
3. Results.....	64
3.1. Non- pregnant mouse model.....	64
3.2. Pregnant mouse model.....	67
4. Discussion.....	69
<b>CHAPTER III. Low efficacy of NcGRA7, NcSAG4, NcBSR4 and NcSRS9 formulated in poly-<math>\epsilon</math>-caprolactone against <i>Neospora caninum</i> infection in mice.....</b>	<b>75</b>
Abstract.....	77
1. Introduction.....	77
2. Materials and methods.....	79
2.1. Cloning and purification of recombinants proteins.....	79
2.2. Encapsulation of recombinant proteins.....	79
2.2.1. Preparation of nanoparticles.....	79
2.2.1. Characterisation of nanoparticles and quantification of antigen loading.....	80
2.2.3. Structural integrity and antigenicity.....	80
2.3. Soluble extract of parasites and tachyzoite.....	80
2.4. Vaccination assay in mice.....	81
2.4.1. Mice and immunizations.....	81
2.4.2. Analysis of humoral and cellular immune response.....	82
2.4.3. DNA extraction and PCR techniques for parasite detection.....	82
2.5. Statistical analysis.....	83
3. Results.....	83
3.1. Nanoparticle characteristics and the entrapment efficiency within particles.....	83
3.2. Humoral immune response.....	84
3.3. Cell-mediated immune response.....	85
3.4. Vaccine safety.....	87
3.5. Efficacy in dams.....	87
3.6. Efficacy in pups.....	87
3.7. Efficacy in non-pregnant mice.....	88
4. Discussion.....	89

<b>CHAPTER IV. Low rates of <i>Neospora caninum</i> infection reactivation during gestation are observed in both chronically and congenitally infected mice.....</b>	<b>95</b>
Abstract.....	97
1. Introduction.....	97
2. Materials and methods.....	98
2.1. Mice.....	98
2.2. Parasite and preparation of inocula.....	98
2.3. Experimental design and parameters evaluated.....	98
2.4. <i>N. caninum</i> detection by DNA extraction and PCR techniques.....	99
2.5. Analysis of the humoral immune response.....	99
2.6. Data analysis.....	100
3. Results.....	100
3.1. First generation.....	100
3.2. Second generation.....	101
3.3. Third generation.....	103
4. Discussion.....	103
<b>CHAPTER V. Mice congenitally infected with low- to- moderate virulence <i>Neospora caninum</i> isolates exhibited clinical reactivation during the mating period without transmission to the next generation.....</b>	<b>109</b>
Abstract.....	111
1. Introduction.....	111
2. Materials and methods.....	112
2.1. Experimental design.....	112
2.2. Parameters evaluated.....	112
2.3. Analysis of samples from dams and offspring.....	112
3. Results and discussion.....	113
<b>CAPÍTULO VI. Discusión general.....</b>	<b>119</b>
<b>CAPÍTULO VII. Conclusiones.....</b>	<b>133</b>
<b>CHAPTER VII. Conclusions.....</b>	<b>137</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>141</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>147</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA / REFERENCES.....</b>	<b>153</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

### CAPÍTULO I. Antecedentes y objetivos

<b>Tabla 1:</b> Clasificación taxonómica de <i>N. caninum</i> .....	4
<b>Tabla 2:</b> Modelos murinos gestantes de infección experimental con <i>N. caninum</i> .....	27
<b>Tabla 3:</b> Modelos murinos gestantes empleados en estudios de patogenicidad y/o caracterización de aislados de <i>N. caninum</i> .....	28
<b>Tabla 4:</b> Modelos murinos gestantes empleados en estudios de la eficacia de vacunas frente a la neosporosis.....	29
<b>Tabla 5:</b> Adyuvantes clásicos utilizados recientemente en vacunas frente a <i>N.caninum</i> .....	40
<b>Tabla 6:</b> Inmunoestimuladores utilizados recientemente en vacunas frente a <i>N. caninum</i> ...	41
<b>Tabla 7:</b> Tipos de polímeros y métodos de formulación de nanopartículas.....	44
<b>Tabla 8:</b> Nanopartículas utilizadas en vacunas frente a la neosporosis.....	46

### CHAPTER II. Specific antibody responses against *Neospora caninum* recombinant rNcGRA7, rNcSAG4, rNcBSR4 and rNcSRS9 proteins are correlated with virulence in mice

<b>Table 1:</b> <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> potential virulence-related parameters measured in 10 <i>Neospora caninum</i> isolates and their consensus classifications according to virulence.....	63
<b>Table 2:</b> Correlation analyses of specific antibody values against rNcGRA7, rNcSAG4, rNcBSR4 and rNcSRS9 with anti-IgG1 and IgG2a values and <i>in vivo</i> parameters measured in both the non-pregnant and pregnant mouse models.....	66
<b>Table 3:</b> Spearman correlation analyses of median values of specific antibodies against rNcGRA7 and the <i>in vitro</i> parameters for each isolate.....	67
<b>Supplementary Table 1:</b> Correlation analyses of specific antibody values against rNcGRA7, rNcSAG4, rNcBSR4 and rNcSRS9 with anti-IgG1 and IgG2a values and <i>in vivo</i> parameters measured in both the non-pregnant and pregnant mouse models.....	73
<b>Supplementary Table 2:</b> Spearman correlation analyses of median values of O.D. or R.I.C.P. of specific antibodies against rNcGRA7 and the <i>in vitro</i> parameters for each isolate.....	74

### CHAPTER III. Low efficacy of NcGRA7, NcSAG4, NcBSR4 and NcSRS9 formulated in poly- $\epsilon$ -caprolactone against *Neospora caninum* infection in mice

<b>Table 1:</b> Groups of mice employed in the vaccination assay.....	82
<b>Table 2:</b> Physico-chemical characteristics of the nanoparticles formulated with PCL with or without recombinant proteins.....	83

**Table 3:** Fertility rates, morbidity, mortality and parasite DNA presence in dams..... 87

**Table 4:** Litter size, hebdomadal mortality, neonatal mortality and vertical transmission in pups at day 30 p.p..... 88

**Table 5:** Morbidity, mortality and parasite presence in non-pregnant mice at day 30 p.i..... 90

**CHAPTER IV. Low rates of *Neospora caninum* infection reactivation during gestation are observed in both chronically and congenitally infected mice**

**Table 1:** Fertility rates, litter size and mortality rates in mice..... 101

**Table 2:** Parasite presence in chronically and in congenitally infected dams and their pups..... 103

**CHAPTER V. Mice congenitally infected with low-to-moderate virulence *Neospora caninum* isolates exhibited clinical reactivation during the mating period without transmission to the next generation**

**Table 1:** Morbidity and mortality rates and parasite presence in mice..... 115

## ÍNDICE DE FIGURAS

### CAPÍTULO I. Antecedentes y objetivos

<b>Figura 1:</b> Ciclo biológico de <i>N. caninum</i> .....	7
<b>Figura 2:</b> Morfología del taquizoíto y del bradizoíto y proteínas específicas de estadio descritas en <i>N. caninum</i> .....	12
<b>Figura 3:</b> Modos de transmisión transplacentaria de <i>N. caninum</i> en el ganado bovino.....	15
<b>Figura 4:</b> Fotografía de nanopátulas poliméricas de poli- $\epsilon$ -caprolactona obtenidas por microscopía electrónica.....	42

### CHAPTER II. Specific antibody responses against *Neospora caninum* recombinant rNcGRA7, rNcSAG4, rNcBSR4 and rNcSRS9 proteins are correlated with virulence in mice

<b>Graphical abstract</b> .....	57
<b>Figure 1:</b> Box-plot graphs representing the optical density (O.D.) values obtained with rNcGRA7 and rNcSAG4 from mice sera at different days post-infection and at day 30 p.p.....	65
<b>Figure 2:</b> Box-plot graphs representing the optical density (O.D.) values obtained with rNcGRA7, rNcSAG4, rNcBSR4 and rNcSRS9 antigen-based ELISAs from serum samples of mice inoculated with different isolates.....	68

### CHAPTER III. Low efficacy of NcGRA7, NcSAG4, NcBSR4 and NcSRS9 formulated in poly- $\epsilon$ -caprolactone against *Neospora caninum* infection in mice

<b>Graphical abstract</b> .....	75
<b>Figure 1:</b> Immunogenicity of both free and encapsulated recombinant proteins.....	84
<b>Figure 2:</b> Recombinant protein antigen-based western blots with sera from vaccinated mice prior to challenge.....	85
<b>Figure 3:</b> Anti- <i>N. caninum</i> immunoglobulins generated by vaccinated and control groups during the post-challenge phase in mice.....	86
<b>Figure 4:</b> Secretion of IFN- $\gamma$ by splenocytes of vaccinated mice.....	86
<b>Figure 5:</b> Kaplan–Meier survival curves for pups.....	89
<b>Supplementary Figure 1:</b> SDS-PAGE with Coomassie blue stain of <i>N. caninum</i> recombinant proteins: rNcGRA7, rNcSAG4, rNcBSR4 and rNcSRS9.....	94

**CHAPTER IV. Low rates of *Neospora caninum* infection reactivation during gestation are observed in both chronically and congenitally infected mice**

<b>Graphical abstract</b> .....	95
<b>Figure 1:</b> Experimental design.....	100
<b>Figure 2:</b> Specific anti- <i>N. caninum</i> immunoglobulins and antibodies specific for the recombinant proteins rNcGRA7 and rNcSAG4 found in the three generations studied.....	102

**CHAPTER V. Mice congenitally infected with low-to-moderate virulence *Neospora caninum* isolates exhibited clinical reactivation during the mating period without transmission to the next generation**

<b>Graphical abstract</b> .....	109
<b>Figure 1:</b> Experimental design.....	113
<b>Figure 2:</b> Specific anti- <i>N. caninum</i> IgG1 and IgG2a and anti- rNcGRA7 and rNcSAG4 antibody levels in the three generations studied.....	114

## Índice de abreviaturas / Abbreviation index

<b>µg</b>	Microgramo	Microgram
<b>µl</b>	Microlitro	Microliter
<b>µm</b>	Micrómetro	Micrometer
<b>ADN/DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico	Desoxyribonucleic acid
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza	Analysis of variance
<b>ARN/RNA</b>	Ácido ribonucleico	Ribonucleic acid
<b>BAG</b>	Antígeno de bradizoíto	Bradyzoite antigen
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina	Bovine Serum Albumin
<b>BSR</b>	Proteína de superficie específica de bradizoíto	Bradyzoite-specific surface protein
<b>BZ</b>	Bradizoíto	Bradyzoite
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono	Carbon dioxide
<b>d.g.</b>	Días de gestación	Days of gestation
<b>DIVA</b>	Vacunas que diferencian animales infectados de animales vacunados	Differentiating infected from vaccinated animals
<b>ELISA</b>	Ensayo inmunoenzimático	Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>GRA</b>	Proteína de gránulos densos	Dense granule protein
<b>H.D.</b>	Hospedador definitivo	Definitive host
<b>H.I.</b>	Hospedador intermediario	Intermediate host
<b>i.m.</b>	Vía intramuscular	Intramuscular route
<b>i.n.</b>	Vía intranasal	Nasal route
<b>i.p.</b>	Vía intraperitoneal	Peritoneal route
<b>i.v.</b>	Vía intravenosa	Intravenous route
<b>IFI</b>	Inmunofluorescencia indirecta	Indirect immunofluorescence assay
<b>IFN - γ</b>	Interferón-gamma	Interferon-gamma cytokine
<b>IL</b>	Interleuquina	Interleukin
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G	Immunoglobulin G
<b>ISCOM</b>	Complejo estimulador de sistema inmune	Immune stimulating complex
<b>ITS1</b>	Espacio de transcripción interna-1	Internal transcribed spacer I
<b>kDa</b>	Kilodalton	Kilodalton
<b>MIC</b>	Proteína de micronemas	Microneme protein
<b>mg</b>	Miligramo	Milligram
<b>ml</b>	Mililitro	Milliliter

<b>Nc</b>	<i>Neospora caninum</i> (prefijo)	<i>Neospora caninum</i> (prefix)
<b>nm</b>	Nanómetro	Nanometer
<b>O.D.</b>	Densidad óptica	Optical density
<b>p.c.</b>	Post desafío	Post challenge
<b>p.i.</b>	Post inmunización	Post immunization
<b>p.p.</b>	Post parto	Post partum
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino	Phosphate buffered saline
<b>PCL</b>	Poli-épsilon-caprolactona	Poly-epsilon-caprolactone
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa	Polymerase chain reaction
<b>PdI</b>	Índice de polidispersión	Polydispersity index
<b>PDI</b>	Proteína disulfuro isomerasa	Protein disulfure isomerase
<b>Pf</b>	<i>Plasmodium falciparum</i> (prefijo)	<i>Plasmodium falciparum</i> (prefix)
<b>Pv</b>	<i>Plasmodium vivax</i> (prefijo)	<i>Plasmodium vivax</i> (prefix)
<b>r</b>	Proteína recombinante (prefijo)	Recombinant protein (prefix)
<b>RON</b>	Proteína de cuello de roptria	Rhoptry neck protein
<b>ROP</b>	Proteína de cuerpo de roptria	Rhoptry bulb protein
<b>s.c.</b>	Vía subcutánea	Subcutaneous route
<b>SAG</b>	Antígeno de superficie	Surface antigen
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico	Sodium dodecyl sulfate
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central	Central nervous system
<b>SNP</b>	Nitroprusiato sódico	Sodium nitroprusside
<b>SRS</b>	Familia de secuencias relacionadas con SAG1	SAG1 related sequences
<b>Tg</b>	<i>Toxoplasma gondii</i> (prefijo)	<i>Toxoplasma gondii</i> (prefix)
<b>TH</b>	Transmisión horizontal	Horizontal transmission
<b>TT</b>	Transmisión transplacentaria	Transplacental transmission
<b>TTEn/EnTT</b>	Transmisión transplacentaria endógena	Endogenous transplacental transmission
<b>TTEx/ExTT</b>	Transmisión transplacentaria exógena	Exogenous transplacental transmission
<b>TZ</b>	Taquizoíto	Tachyzoite
<b>v.o.</b>	Vía oral	Oral route
<b>WB</b>	Western blot	Western blot

# **Capítulo I**

## **Antecedentes y objetivos**



## **1. Neosporosis bovina**

La neosporosis bovina es una de las principales causas de fallo reproductivo en el ganado bovino a nivel mundial (Dubey & Schares, 2006; Dubey et al., 2007; Dubey & Schares, 2011). La enfermedad ocasiona importantes pérdidas económicas tanto en la industria lechera como en el sector cárnico, debidas al aborto y a la mortalidad neonatal que origina, manifestándose con un incremento del periodo entre partos, una reducción en la producción láctea, así como una pérdida del valor de los animales por la eliminación temprana de las vacas que presentan fallo reproductivo (Thurmond & Hietala, 1997b; Trees et al., 1999).

Hasta la fecha se ha progresado de forma notable en el conocimiento del ciclo biológico y los modos de transmisión del parásito, la epidemiología de la infección y la patogenia, así como en el desarrollo y validación de herramientas diagnósticas. Sin embargo quedan aún muchos aspectos importantes por esclarecer, sobre todo en relación a la interacción parásito-hospedador y la respuesta inmunitaria desarrollada por este último. En este sentido, los esfuerzos de la comunidad investigadora se han centrado, en los últimos años, en el estudio de la variabilidad intra-específica y en identificar posibles dianas terapéuticas y/o vacunales mediante abordajes genómicos y proteómicos. Así mismo en relación al estudio de las medidas de control de la infección, se han publicado varios estudios sobre la evaluación de fármacos y el desarrollo de vacunas frente a *N. caninum*, si bien el éxito de estas investigaciones hasta el momento ha sido escaso (Reichel & Ellis, 2009).

### **1.1. Agente etiológico: *Neospora caninum***

*Neospora caninum* es un protozoo apicomplejo identificado como el agente causal de la neosporosis. Esta enfermedad fue descrita por primera vez en perros como un síndrome neuromuscular originado por un protozoo intracelular en el año 1984 en Noruega por Bjerkås et al. (Bjerkås et al., 1984; Bjerkås & Presthus, 1989). Inicialmente, los signos clínicos fueron atribuidos a *Toxoplasma gondii* pero, posteriormente, Dubey et al. consideraron que el proceso patológico estaba ocasionado por una nueva especie a la que encuadraron en un nuevo taxón: el género *Neospora* (Dubey et al., 1988a). Poco después, dicho agente causal, al que denominaron *Neospora caninum*, se relacionó con la aparición de mortalidad perinatal en el ganado bovino, transmitiéndose verticalmente a las siguientes generaciones (Thilsted & Dubey, 1989) y asociándose con la disminución de la producción de carne y leche (Dubey, 2003).

Desde su descubrimiento en 1988 y aunque se han publicado numerosos estudios sobre la biología de *N. caninum* en los últimos 24 años, todavía quedan muchos aspectos por esclarecer, relativos tanto al agente etiológico como a la enfermedad que origina. De hecho, en la actualidad la neosporosis continúa siendo un problema de especial relevancia para el ganado bovino.

### 1.1.1. Taxonomía

La clasificación taxonómica de este parásito está basada en los resultados obtenidos en diversos estudios fundamentalmente morfológicos (Dubey et al., 1988a; Dubey & Lindsay, 1996) y moleculares. (Guo & Johnson, 1995; Marsh et al., 1995; Holmdahl & Mattsson, 1996; Homan et al., 1997). *N. caninum* es un protozoo intracelular obligado perteneciente al filo Apicomplexa y a la familia Sarcocystidae, que incluye otros géneros de parásitos heteroxenos formadores de quistes (*Toxoplasma*, *Hammondia*, *Besnoitia*, *Sarcocystis* y *Frenkelia*) (Tabla 1). Las diferencias biológicas, proteicas, antigénicas y moleculares entre *Neospora* y los otros géneros integrantes de la Familia Sarcocystidae son suficientemente significativas como para considerarlos géneros diferentes (Ellis et al., 1994; Dubey et al., 2002).

**Tabla 1:** Clasificación taxonómica de *N. caninum*

Clasificación	Características
<b>Reino Protozoa</b>	Organismos unicelulares eucariotas
<b>Filo Apicomplexa</b>	Formas invasivas con complejo apical
<b>Clase Sporozoea</b>	Locomoción de formas invasivas por flexión, ondulación y deslizamiento
<b>Subclase Coccidia</b>	Ciclo biológico con merogonia, gametogonia y esporogonia
<b>Orden Eucoccidia</b>	Merogonia en hospedadores vertebrados
<b>Suborden Eimeriina</b>	Desarrollo independiente de gametos masculinos y femeninos
<b>Familia Sarcocystidae</b>	Parásitos heteroxenos y formadores de quistes
<b>Subfamilia Toxoplasmatinae</b>	Incluye los géneros <i>Toxoplasma</i> , <i>Neospora</i> y <i>Besnoitia</i>
<b>Género <i>Neospora</i></b>	Espectro de hospedadores más limitado que en <i>T. gondii</i> , quistes con pared gruesa
<b>Especie <i>Neospora caninum</i></b>	

Dentro del género *Neospora* podemos encontrar otra especie: *N. hughesi*, descrita por primera vez en un équido (Marsh et al., 1998). Esta especie difiere de *N. caninum* pudiéndose realizar el diagnóstico diferencial tanto en muestras de tejido, utilizando técnicas de PCR (Spencer et al., 2000), como en suero mediante técnicas serológicas basadas en anticuerpos específicos frente a determinadas proteínas específicas de esta especie (Walsh et al., 2001; Hoane et al., 2005).

### 1.1.2. Aislados y variabilidad intra-específica

Debido a la dificultad del aislamiento de *N. caninum* a partir de tejidos o de heces de animales infectados -al contrario de lo que ocurre en *T. gondii*- hasta la fecha sólo se han descrito 86 aislados. Esta escasez de aislados se debe al bajo número y viabilidad de los parásitos presentes en los tejidos, lo que dificulta su obtención *in vitro*. Por otro lado, aunque *N. caninum* ha sido detectado por diversas técnicas diagnósticas en un amplio espectro de animales, 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., 2007; Dubey & Schares, 2011). La gran mayoría de aislados descritos hasta ahora han sido obtenidos a partir de tejidos bovinos (fetos, terneros congénitamente infectados con signos clínicos y terneros aparentemente sanos) y de perros (SNC de animales con signos clínicos y heces). En el resto de especies los aislados se han obtenido a partir de muestras de SNC.

Por otro lado, los estudios de patogenia comparada son bastante escasos y la mayoría incluye un número bajo de aislados en cada ensayo. No obstante, en el modelo murino se ha demostrado que el aislado Nc-Liverpool y el Nc-Spain 7 son más virulentos que otros aislados como Nc-Spain 1H, 2H, 3H, 6, 8, 9 y 10 (Pereira García-Melo et al., 2010; Regidor-Cerrillo et al., 2010), NcSweB1 (Atkinson et al., 1999), Nc-1 (Collantes-Fernández et al., 2006b) y Nc-Nowra (Miller et al., 2002). A su vez, el aislado Nc-1 es más virulento que el recientemente obtenido Nc-Spain 1H (Rojo-Montejo et al., 2009b). Además la variabilidad de algunos de estos aislados ha sido confirmada mediante estudios *in vitro* en los que se observaron diferencias en los índices de invasión y proliferación. En este estudio además se descubrió una correlación entre los parámetros *in vitro* estudiados y la virulencia observada en un ensayo *in vivo* en ratones (Regidor-Cerrillo et al., 2011).

Por otro lado, en el modelo bovino gestante, el aislado español Nc-Spain 1H no produjo muerte fetal y las lesiones fueron menores que con el aislado Nc-1 (Rojo-Montejo et al., 2009a). Además, en un estudio reciente con el aislado Nc-Spain 7, se observó un número elevado de abortos y una mayor detección del parásito en vacas infectadas con este aislado que en el caso del grupo infectado con el aislado Nc-1, corroborándose que Nc-Spain 7 es un aislado de alta virulencia (Caspé et al., 2012). Del mismo modo, los aislados de alta o moderada-alta virulencia como Nc-Liverpool o Nc-1 han sido empleados en infecciones experimentales (Williams et al., 2000; Macaldowie et al., 2004) induciendo una elevada mortalidad fetal y graves lesiones en la placenta.

En cuanto a la variabilidad genética, los estudios realizados son escasos pero coinciden en mostrar la existencia de polimorfismo genético entre aislados de *N. caninum* 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). De hecho, recientemente, la utilización de marcadores microsatélites ha resultado ser una buena herramienta para detectar diferentes perfiles genéticos (Regidor-Cerrillo et al., 2006; Regidor-Cerrillo et al., 2008; Al-Qassab et al., 2009; Basso et al., 2009; Al-Qassab et al., 2010) siendo posible su utilización en muestras clínicas (Pedraza-Díaz et al., 2009). El perfil genético obtenido con el análisis de microsatélites es muy estable, no habiéndose detectado variaciones entre los perfiles obtenidos de los aislados en la muestra biológica de origen y los obtenidos tras

su aislamiento en animales de laboratorio o en cultivo celular (Regidor-Cerrillo et al., 2006; Basso et al., 2009). Este análisis de perfiles genéticos ha permitido realizar por primera vez un estudio de epidemiología molecular a gran escala, en el que se ha comparado un gran número de aislados de diferentes países y de varios continentes que podría dar luz sobre la filogenia del parásito (Regidor-Cerrillo et al., 2012b; Regidor-Cerrillo et al., enviado).

### ***1.1.3. Ciclo biológico y espectro de hospedadores***

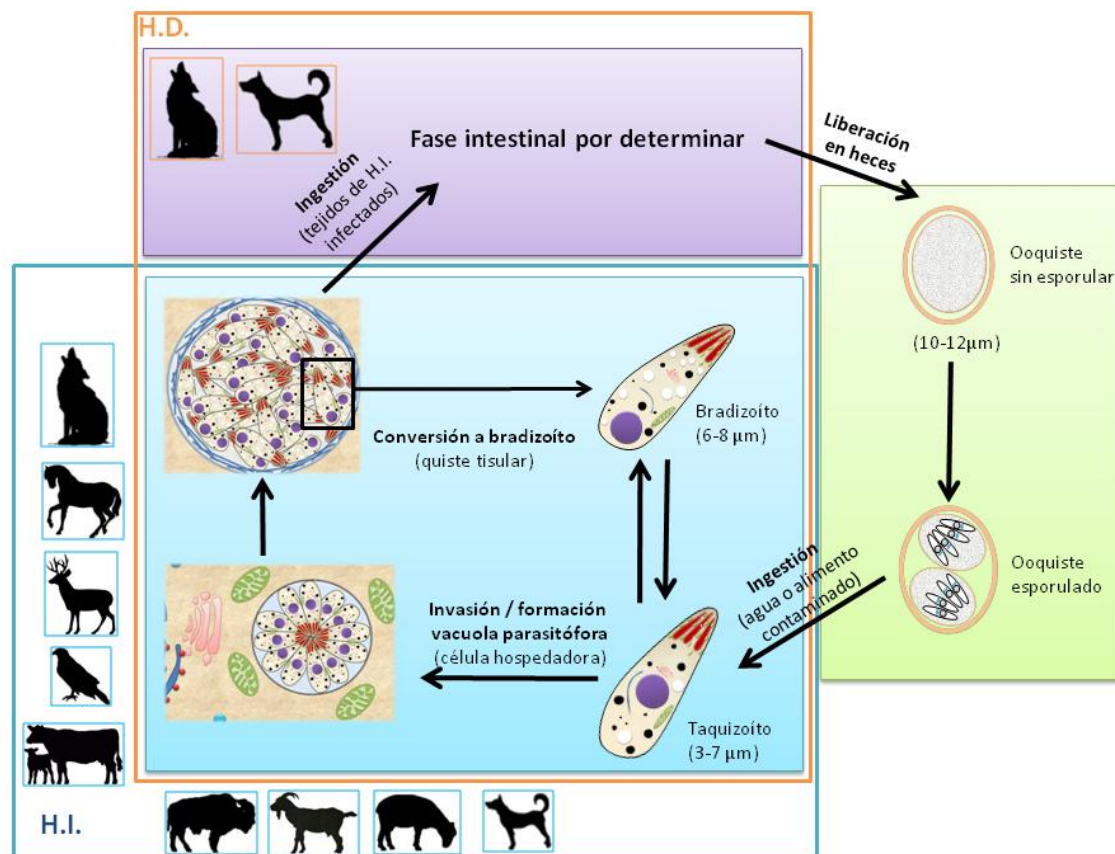
El ciclo biológico de *N. caninum* es heteroxeno facultativo. El perro actúa como hospedador definitivo (H.D.) en el que se realizaría la fase de multiplicación sexual o gametogonia que permanece sin describir hasta la fecha (McAllister et al., 1998). Además del perro, el coyote, el dingo y el lobo también han sido descritos como H.D. (Gondim et al., 2004c; King et al., 2010; Dubey et al., 2011). Por su parte, en el hospedador intermediario (H.I.) tienen lugar las fases de multiplicación asexual (taquizoíta y bradizoíta). En este sentido, un amplio espectro de animales tanto silvestres (ej. zorro rojo, lobo, lince ibérico, ciervo común, corzo, bisonte, urraca, ratonero) como domésticos (ej. ganado bovino, caprino y ovino, perro, caballo, gato, cerdo, dromedario, llama, alpaca), podrían actuar como H.I. ya que en ellos se han detectado anticuerpos específicos frente a *N. caninum* y/o DNA del parásito (Dubey & Schares, 2011; Darwich et al., 2012), confirmándose su papel como H.I. en algunas especies (ganado bovino y ovino, bisonte europeo, perro, etc.) al haberse aislado el parásito viable a partir de sus tejidos. Sin embargo este espectro de hospedadores es mucho más reducido que en el caso de *T. gondii*.

En el ciclo biológico de *N. caninum* se han descrito hasta la fecha tres estadios infectantes: el taquizoíta, el bradizoíta y el esporozoíta (Figura 1). Tanto los taquizoítas como los bradizoítas son estadios de proliferación asexual que se localizan intracelularmente en los tejidos de los H.I. infectados.

Los **esporozoítas** se localizan en el interior de los ooquistes (forma de resistencia ambiental). Estos últimos se eliminan al ambiente con las heces del H.D. y deben sufrir una esporogonia para ser infectantes, hecho que acontece tras aproximadamente 24h en las condiciones adecuadas de temperatura y humedad, dando lugar a ooquistes que contienen dos esporoquistes con cuatro esporozoítas cada uno (McAllister et al., 1998; Lindsay et al., 1999a). Tras ser ingeridos por el H.I. se liberan los esporozoítas transformándose en taquizoítas.

Los **taquizoítas** son formas invasivas que se multiplican rápidamente dando lugar a la fase de infección aguda en el hospedador. Posiblemente se multiplican en los ganglios linfáticos mesentéricos (Lindsay et al., 1999a; Dubey et al., 2006) y se diseminan a través del torrente circulatorio. Recientemente, se ha comprobado que son capaces de utilizar las células dendríticas durante su diseminación intra-orgánica a modo de “caballo de Troya”, facilitando su

paso a través de barreras biológicas como la placenta y la barrera hemato-encefálica (Collantes-Fernández et al., 2012). Además son capaces de invadir una gran variedad de tipos celulares, como células endoteliales, fibroblastos, miocitos, hepatocitos, macrófagos células neuronales, monocitos y células dendríticas (Dubey et al., 1988b; Bjerkås & Presthus, 1989; Speer & Dubey, 1989; Dubey & Lindsay, 1993; Collantes-Fernández et al., 2012).



**Figura 1:** Ciclo biológico de *Neospora caninum*

Tras el desarrollo de la respuesta inmunitaria en el hospedador los taquizoítos se transforman en **bradizoítos** como mecanismo de evasión. Este estadio se multiplica lentamente en el interior de quistes tisulares, estableciéndose así la fase crónica de la infección (Buxton et al., 1998; Buxton et al., 2002). Los quistes tisulares se observan, principalmente, en el tejido nervioso y en el tejido muscular esquelético (Dubey et al., 1988b; Barr et al., 1991; Peters et al., 2001).

Finalmente, aún no se ha dilucidado el ciclo enteroepitelial que tiene lugar en el hospedador definitivo y que culmina con el desarrollo de los ooquistes.

1.1.3.1. Ciclo lítico

Debido a que *N. caninum* es un parásito intracelular obligado, es imprescindible que se produzca la invasión de la célula hospedadora ya que necesita de la maquinaria metabólica de ésta para su desarrollo. La intervención de la célula hospedadora va a ser clave para que el parásito pueda multiplicarse y diseminarse. Esta fase se conoce como ciclo lítico del parásito y tiene lugar durante la fase aguda de la infección. Es en este momento cuando se produce fundamentalmente el daño tisular (Dubey & Lindsay, 1996).

Durante el ciclo lítico del parásito se van a producir tres eventos claramente diferenciados: la adhesión e invasión de la célula hospedadora, la formación de la vacuola parasitófora y la posterior egresión del parásito tras la ruptura de la vacuola y la lisis de la célula hospedadora. 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).

Los taquizoítos invaden una gran variedad de tipos celulares mediante un proceso de invasión activa durante la cual intervienen moléculas liberadas por las organelas de secreción de una forma ordenada y controlada en el tiempo. En un primer momento cuando el taquizoíto se aproxima a la célula hospedadora, mediante el movimiento conocido como “gliding motility”, se reorienta exponiendo el complejo apical hacia la superficie celular y, a continuación, se adhiere a la membrana de la célula hospedadora a través de uniones receptores- ligando. En esta fase intervienen diversos antígenos de superficie del parásito (SAGs y SRSs) así como proteínas secretadas por los micronemas (MIC) (Keller et al., 2002).

Tras la adhesión comienza la secreción de proteínas por parte de las organelas del complejo apical, iniciándose la invasión de la célula hospedadora. Al comienzo de la invasión se secretan proteínas de los micronemas (MICs), implicadas directamente en la adhesión, seguidas de las producidas por la región del cuello de las roptrias (RONs). A partir de aquí, comienza la internalización del parásito mediante la invaginación de la membrana plasmática gracias a la formación de la unión móvil (“moving junction”). Se produce un estrangulamiento del parásito favorecido probablemente por proteínas RON asociadas con la proteína de micronemas AMA 1 (Besteiro et al., 2009). Tras el comienzo de la invasión se produce la secreción de proteínas del cuerpo de roptrias (ROPs) en el interior de la vacuola parasitófora recién formada, así como en la propia célula hospedadora (Nichols et al., 1983). No es sorprendente que muchas de estas proteínas polimórficas de *T. gondii* (ej. Tg ROP5, TgROP16, TgROP18 y TgROP38) que se secretan, interactúen con la célula hospedadora. En los últimos años, se ha descrito que estas proteínas interfieren en los mecanismos de resistencia del hospedador en múltiples puntos a lo largo de la cascada de activación de la respuesta inflamatoria (Saeij et al., 2006; Taylor et al., 2006; Saeij et al., 2007; Melo et al., 2011). Sin embargo, en el caso de *N. caninum* aun no se

conocen los factores de virulencia. Posiblemente, estas proteínas no tengan funciones equivalentes en *N. caninum* ya que *NcROP18* se ha descrito como un pseudogen y en el caso del gen *NcROP16* parece no expresarse durante la fase de taquizoíto (Reid et al., 2012).

Posteriormente, la incorporación de proteínas de secreción de gránulos densos en la membrana de la vacuola parasitófora (Carruthers & Sibley, 1997) dará lugar a una red tubular en el espacio intercelular de la vacuola permitiendo una intercomunicación entre el parásito y la célula hospedadora (Hemphill et al., 1998). Después de esta secreción, se pueden observar muchas proteínas de gránulos densos asociadas a la membrana vacuolar. De hecho, en *T. gondii* estas proteínas parecen estar implicadas en la modificación de la vacuola parasitófora (Dubremetz et al., 1993), aunque su localización subcelular y función puede variar según el estadio del parásito. Curiosamente, en el caso de *T. gondii*, TgGRA7 ha sido detectada en el citoplasma de la célula hospedadora interaccionando con proteínas de roptrias (TgROP2 y TgROP4) (Dunn et al., 2008). Además, recientemente, TgGRA15 y TgNTPasa han sido también descritas como factores de virulencia (Melo et al., 2011)

Tras la replicación activa del parásito en el interior de la vacuola parasitófora, llega un momento en el que se produce la ruptura de dicha vacuola y, posteriormente, la lisis de la célula hospedadora. Los taquizoítos liberados deben invadir, en un breve periodo de tiempo, nuevas células para continuar con el ciclo lítico. En este proceso, denominado egresión, los mecanismos implicados son aún desconocidos. Sin embargo, en *T. gondii* se ha observado que el desencadenamiento de este proceso es debido principalmente a incrementos en los niveles de calcio intracelular (Black et al., 2000; Arrizabalaga & Boothroyd, 2004).

#### 1.1.3.2. Persistencia y reactivación

Tras varios ciclos líticos, con la consiguiente multiplicación y diseminación del parásito, el hospedador desarrolla una respuesta inmunitaria capaz de eliminar la mayor parte de los taquizoítos (véase apartado 1.5 Respuesta Inmunitaria). Algunos parásitos logran evadir ésta respuesta gracias a un proceso de transformación al estadio de bradizoíto en órganos inmuno-privilegiados, iniciándose la fase crónica de la infección en la que el parásito se acantona en dichos órganos pudiendo persistir en los mismos durante periodos de tiempo prolongados. El bradizoíto presenta un tropismo por el sistema nervioso central (Barr et al., 1991; Barber et al., 1996; Collantes-Fernández et al., 2006b). Es importante destacar que el proceso de diferenciación de taquizoíto a bradizoíto es muy rápido pero ocurre de manera asincrónica, comenzando poco después de la invasión y formación de la vacuola parasitófora.

Los bradizoítos están poco expuestos a la respuesta inmunitaria, lo que va a permitir al parásito permanecer en el hospedador de por vida sin originar ningún tipo de alteración patológica con la consiguiente ausencia de signos clínicos. Estos quistes tisulares no se ven

afectados por la actividad de agentes antimicrobianos ya que éstos no son capaces de atravesar las diferentes barreras biológicas, entre ellas la pared quística. Únicamente, algunos oligómeros de arginina han logrado eliminar quistes tisulares de *T. gondii* (Samuel et al., 2003).

En *N. caninum* se han desarrollado protocolos para la obtención de quistes tisulares en ratones (McGuire et al., 1997a; McGuire et al., 1997b) y jerbos (Gondim et al., 2001) infectados con el parásito. El éxito en el aislamiento de los quistes no solo depende de la especie animal o estirpe de ratón empleada, sino también de otros factores como el aislado de *N. caninum* y su viabilidad, la calidad de la muestra y la carga parasitaria. Además cabe destacar que estos modelos experimentales suelen presentar un bajo rendimiento en la obtención de quistes tisulares. En los últimos años ha sido posible la obtención de bradizoítos de *N. caninum in vitro* utilizando para ello la adición al medio de un donante exógeno de óxido nítrico, como el nitroprusiato sódico (SNP), si bien se han empleado también otros protocolos que han mostrado un menor rendimiento (Risco-Castillo et al., 2004). La obtención *in vitro* de bradizoítos de *N. caninum* ha permitido la caracterización de las únicas proteínas de bradizoíto de *N. caninum* descritas hasta la fecha (Fernández-García et al., 2006; Risco-Castillo et al., 2007; Risco-Castillo et al., 2011) y la aplicación de nuevas técnicas para la identificación de proteínas sobreexpresadas de este estadio (Marugán-Hernández et al., 2010; revisado por Müller & Hemphill, 2013).

La inmunodepresión en el hospedador favorece la transformación del bradizoíto en taquizoíto, diseminándose este estadio de nuevo por el organismo del hospedador, atravesando la placenta durante la gestación. En los casos de toxoplasmosis crónica, se ha descrito la formación de nuevos quistes durante la fase crónica de la infección tras la ruptura de quistes anteriores (Ferguson et al., 1989). Aunque los factores responsables de estos procesos no se conocen con exactitud, la aparición de agrupaciones de quistes tisulares sustenta esta hipótesis (Dubey et al., 1998a). Este equilibrio dinámico entre el estadio de taquizoíto y el de bradizoíto favorecería la persistencia de la infección así como una continua estimulación antigénica, responsable de la presencia de niveles de anticuerpos detectables en el tiempo (Frenkel & Escajadillo, 1987; Ferguson et al., 1989).

#### **1.1.4. Genoma y proteoma de *N. caninum***

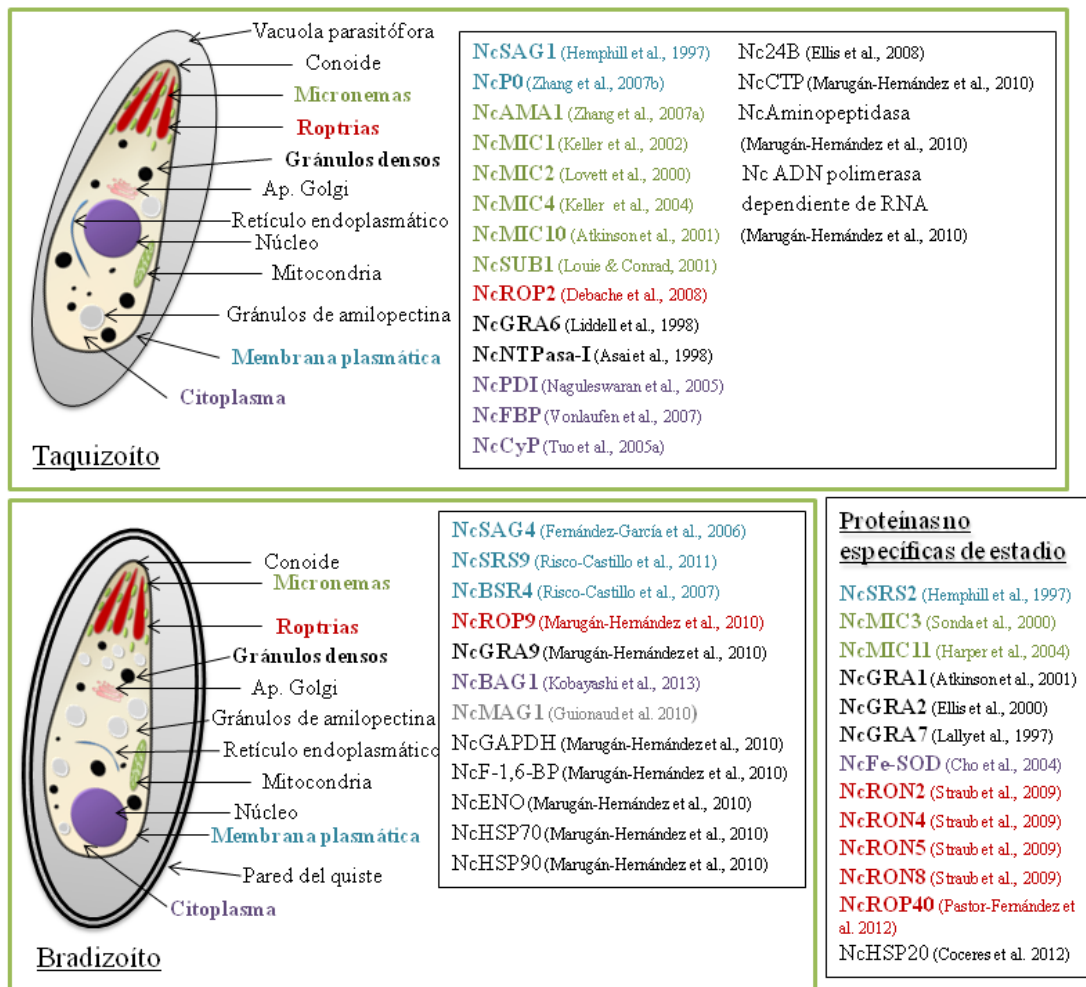
En los últimos años se ha producido un gran avance en los campos de la biología molecular, la genómica y la proteómica de *N. caninum* debido, principalmente, a la mejora en las tecnologías de secuenciación de ADN, a la aparición de técnicas cada vez más sofisticadas para el análisis de genomas completos, a los avances técnicos en la proteómica combinada con la espectrometría de masas y a las nuevas y numerosas herramientas bioinformáticas (Goodswen et al., 2013).

En un estudio reciente se compararon los genomas de *T. gondii* y *N. caninum* (Reid et al., 2012) describiéndose que, aunque la mayoría de los genes están conservados en ambas especies, *N. caninum* posee mayor cantidad de genes que codifican para proteínas de superficie (SRSs) que *T. gondii*. En este estudio, se sugiere que este mayor número de genes está relacionado con una mayor especialización a la hora de invadir células, siendo esta la razón por la que *N. caninum* tenga un espectro más reducido de hospedadores en comparación a *T. gondii*. Por otro lado, las diferencias entre los genes de proteínas de roptrias observadas, podrían deberse a las diferencias que se observan entre ambos parásitos en el comportamiento tanto *in vitro* como *in vivo* (Innes & Mattsson, 2007). De hecho, aunque se han descrito varias proteínas de roptrias con actividad quinasa como factores de virulencia en *T. gondii* (Steinfeldt et al., 2010), en *N. caninum* aún no han sido estudiadas.

En cuanto al proteoma de *N. caninum*, se han estudiado hasta el momento varias de las proteínas de superficie, micronemas, roptrias y gránulos densos (Figura 2), por su implicación en los procesos de adhesión, invasión y proliferación del taquizoíto (Naguleswaran et al., 2002; Debache et al., 2008; Aguado-Martínez et al., 2010). Además, la mayoría de ellas han resultado ser proteínas inmunogénicas de interés para el desarrollo de métodos de diagnóstico serológico (véase apartado 1.6. Diagnóstico) o para el estudio de vacunas de nueva generación frente a la neosporosis (véase apartado 2. Desarrollo de vacunas frente a la neosporosis bovina).

Hasta el momento, se han empleado diversos abordajes en la identificación y caracterización de estas proteínas. Las primeras identificaciones, entre las que destacan los antígenos de superficie NcSAG1 y NcSRS2, así como el antígeno de gránulos densos NcGRA7, se llevaron a cabo mediante técnicas de cribado inmunológico de genotecas utilizando sueros de animales naturalmente infectados, anticuerpos policlonales purificados por afinidad o anticuerpos monoclonales (Hemphill et al., 1999). Otra técnica de biología molecular basada en la amplificación y secuenciación de secuencias genéticas ortólogas en *T. gondii* (paseo cromosómico) dio lugar a la identificación de 3 proteínas específicas del bradizoíto, NcSAG4, NcBSR4 y NcSRS9 (Fernández-García et al., 2006; Risco-Castillo et al., 2007; Risco-Castillo et al., 2011). En los últimos años, destaca la utilización de herramientas proteómicas como la electroforesis bidimensional acoplada a técnicas de identificación de proteínas mediante huella peptídica o fragmentación peptídica (espectrometría de masas) (Cohen et al., 2002; Lee et al., 2003; Lee et al., 2005). Recientemente se ha realizado un estudio proteómico comparativo, mediante el empleo de la técnica 2-D DIGE (“diferencial gel electrophoresis”), de la expresión diferencial de proteínas en taquizoítos y bradizoítos de *N. caninum* que ha conducido a la identificación de 20 proteínas sobre-expresadas en los bradizoítos. Entre ellas, destacan la enolasa, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), NcHPS70, NcHPS90 y NcGRA9 cuyos ortólogos en *T. gondii* están relacionados con procesos de señalización celular

relacionados con la transformación taquizoíto-bradizoíto. De las proteínas identificadas como más abundantes en el estadio de taquizoíto destacan la colinafosfato citidiltransferasa (NcCTP), la aminopeptidasa y la ADN polimerasa dependiente de RNA, todas ellas implicadas en el proceso de replicación (Marugán-Hernández et al., 2010). Del mismo modo y con el fin de identificar proteínas potencialmente asociadas a virulencia, también se han comparado los proteomas de varios aislados de *N. caninum*, encontrándose varias proteínas como NcROP40, NcNTPasa, NcMIC1, aspartil tRNA sintetasa y glucosa-6- fosfato deshidrogenasa (G6PD) más abundantes en los aislados más virulentos (Regidor-Cerrillo et al., 2012a).



**Figura 2:** Morfología del taquizoíto y del bradizoíto y proteínas descritas en *N. caninum*. En azul: proteínas de superficie; en verde: proteínas de micronemas; en rojo: proteínas de roptrias; en negro: proteínas de gránulos densos; en morado: proteínas de citoplasma; en gris: proteínas de la matriz del quiste tisular. Nc24B no ha sido localizada hasta la fecha; Recientemente se ha descrito las enzimas sobreexpresadas en diferentes estadios como la NcCTD: colinafosfato citidiltransferasa; NcGAPDH: gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa; Nc-F-1,6-BP: fructosa-1,6-bifosfato y NcENO: enolasa.

Por último, el estudio de fracciones subcelulares enriquecidas en proteínas de roptrias o micronemas mediante la técnica de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas ha permitido identificar con éxito varias proteínas ortólogas de *T. gondii*, como son NcROP5, NcROP40, NcRON4 y NcRON8, entre otras (Marugán-Hernández et al., 2011a).

### 1.2. Prevalencia

En la actualidad, son relativamente numerosos los estudios de seroprevalencia de la infección por *N. caninum* en el ganado bovino habiéndose descrito tasas de prevalencia de rebaño e individual muy variadas y dependientes de la localización geográfica y de la aptitud del ganado (Dubey et al., 2007).

En Europa se han encontrado importantes variaciones en la prevalencia de la enfermedad. Por ejemplo, Suecia y Alemania tienen una baja prevalencia individual en las vacas de aptitud lechera (0,5 y 1,6%, respectivamente), mientras que en Holanda y España la prevalencia es moderada (9,9 y 16,2%, respectivamente) (Bartels et al., 2006a). Recientemente, se han detectado prevalencias moderadas en ganado de aptitud lechera de Suecia (8,3%) (Frossling et al., 2008) y una prevalencia alta en granjas lecheras del sur de Rumanía (40,3% de media) (Mitrea et al., 2012).

En estudios realizados en España, también se han encontrado prevalencias moderadas-altas de la infección en el ganado bovino de aptitud cárnica y lechera, tanto a nivel de rebaño (55 y 83%, respectivamente), como individual (18 y 36%, respectivamente) (Quintanilla-Gonzalo et al., 1999). Por último, en un amplio estudio llevado a cabo en Galicia, las seroprevalencias a nivel de rebaño fueron de un 87,7, 76,7 y 78,4% en rebaños de leche, carne o mixtos, respectivamente, mientras que la seroprevalencia individual fue de un 21,9, 2,1 y 24,9%, respectivamente (Eiras et al., 2011). Respecto a la detección de la infección por *N. caninum* en fetos abortados, un 38,8% de los analizados en un estudio español resultaron positivos (Pereira-Bueno et al., 2003), lo cual concuerda con las estimaciones realizadas por Dubey et al. (2007) en las que entre un 12 y un 40% de los fetos abortados a nivel mundial estarían infectados.

### 1.3. Transmisión

La transmisión de *N. caninum* en el ganado bovino puede producirse de dos maneras distintas: horizontal y vertical transplacentaria. La **transmisión horizontal** (TH) acontece tras la ingesta de ooquistes eliminados por el hospedador definitivo (infección post-natal) (Dijkstra et al., 2002a; Schares et al., 2002b; Dubey et al., 2006). Otras formas de transmisión post-natal descritas, como la ingestión de calostro o leche contaminados experimentalmente con taquizoítos, se ha demostrado experimentalmente (Uggla et al., 1998; Davison et al., 2001);

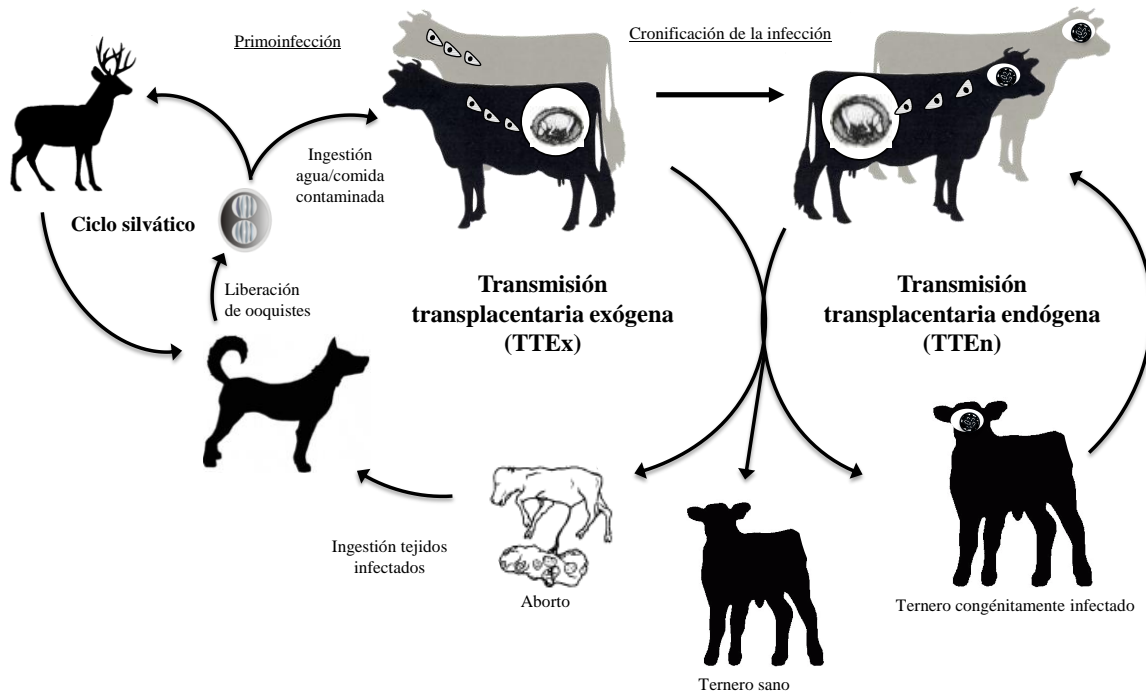
pero no se ha logrado demostrar en casos de infección natural (Schaes et al., 1998; Davison et al., 2001), si bien se ha detectado ADN del parásito en leche o calostro de hembras seropositivas (Moskwa et al., 2007). Por ello, aunque la transmisión galactófora puede ocurrir bajo condiciones experimentales, no parece ser importante en la propagación del parásito en la naturaleza. Por otro lado, también se ha evaluado la posibilidad de una transmisión horizontal venérea ya que ha sido detectado ADN de *N. caninum* en semen de toros infectados (Serrano-Martínez et al., 2007a). Sin embargo esta vía parece poco probable ya que sería necesaria la presencia de una mayor concentración de taquizoítos en el semen que la detectada en animales naturalmente infectados (Serrano-Martínez et al., 2007a; Serrano-Martínez et al., 2007b; Ferre et al., 2008).

La segunda forma de transmisión es la vertical **transplacentaria** (TT) en reproductoras gestantes. Recientemente, fueron propuestos los términos **transmisión transplacentaria endógena** (TTE<sub>n</sub>) y **transmisión transplacentaria exógena** (TTE<sub>x</sub>) para definir con mayor precisión el origen de la infección en el feto (Trees & Williams, 2005) (Figura 3).

La TTE<sub>x</sub> tiene lugar después de la primoinfección de la madre por la vía fecal-oral, cuando el animal ingiere ooquistes esporulados. Este modo de transmisión ha sido relacionado con un patrón epidémico de abortos en el ganado bovino, caracterizado por tasas de abortos superiores al 10-12.5% en menos de 6-8 semanas (Dijkstra et al., 2001; Schaes et al., 2002a; Kul et al., 2009). En cambio, la TTE<sub>n</sub> ocurre tras la reactivación de la infección en hembras crónicamente infectadas durante la gestación. Esta ruta de transmisión está asociada a granjas con patrones endémicos de aborto (Schaes et al., 2002a). Además, la TTE<sub>n</sub> aparece como el modo de transmisión predominante en muchos rebaños (Trees & Williams, 2005). A pesar de la eficacia de esta ruta transmisión, la necesidad de que produzca una TH para mantener la infección dentro del rebaño ha sido calculada mediante modelos matemáticos (French et al., 1999). Recientemente, en un estudio realizado sobre 108 rebaños de aptitud lechera se ha estimado un número de 1,4% de infecciones por TH (Bartels et al., 2007).

Por otro lado, se ha observado que vacas congénitamente infectadas son capaces de transmitir más eficientemente la infección a la siguiente generación que vacas que se han infectado post-natalmente.

En España, el análisis seroepidemiológico de varias granjas de vacuno de leche ha puesto en evidencia la importancia de la TH y la existencia de diferentes situaciones epidemiológicas: granjas infectadas con patrón endémico de aborto y predominancia de la TTE<sub>n</sub>, granjas con patrón epidémico de aborto y predominancia de la TTE<sub>x</sub> y granjas infectadas de forma crónica pero que simultáneamente experimentan TTE<sub>n</sub> y TTE<sub>x</sub> (Rojo-Montejo et al., 2009c).



**Figura 3.** Modos de transmisión transplacentaria de *N. caninum* en el ganado bovino.

#### 1.4. Patogenia

Las consecuencias más importantes de la infección por *N. caninum* en el ganado bovino son el aborto y el nacimiento de terneros congénitamente infectados. La patogenia de la neosporosis bovina es compleja y dependiente de diversos factores relacionados tanto con el propio parásito como con el hospedador. Por tanto, la capacidad del taquizoíto para invadir y multiplicarse en las células y la habilidad del hospedador para inhibir la proliferación del parásito va a ser un binomio determinante en el desarrollo de la enfermedad.

El aborto es el único signo clínico observado en las hembras adultas gestantes durante la fase aguda de la infección (Dubey, 2005). Aunque por lo general una respuesta inmunitaria de tipo Th1 puede proteger a la hembra frente a la infección (Andrianarivo et al., 1999; Andrianarivo et al., 2000), este tipo de respuesta puede causar daño en la placenta en detrimento del desarrollo normal del feto. Por tanto, una inmunosupresión fisiológica en las fases iniciales de la gestación, si bien favorece la implantación embrionaria y evita el rechazo inmunológico, facilita la reactivación de la infección tras una diferenciación del estadio de bradizoíto a taquizoíto en el caso de hembras crónicamente infectadas con *N. caninum*; o una diseminación de los taquizoítos en el caso de una primoinfección. En ambas situaciones, se produce una parasitemia y los taquizoítos alcanzan la placenta provocando la necrosis e inflamación de este tejido (Shivaprasad et al., 1989; Barr et al., 1994; Maley et al., 2003).

Con menor frecuencia, *N. caninum* puede provocar el nacimiento de animales enfermos, generalmente con signos clínicos nerviosos, que no suelen sobrevivir más allá del primer mes de

vida (Dubey et al., 2006). El hecho de que la transmisión de *N. caninum* al feto durante la gestación de lugar al nacimiento de terneros sanos pero congénitamente infectados, depende de diversos factores como la fase de la gestación en la que ocurre la TT (el aborto es más frecuente en el primer y segundo tercio de la gestación), la virulencia del aislado (ciertos aislados poco virulentos no inducen muerte fetal tras la infección experimental en vacas gestantes), la inmunocompetencia de la madre (las hembras crónicamente infectadas no abortan cuando se les infecta experimentalmente durante la gestación a diferencia de las vacas previamente no infectadas), o al origen de la infección (TTE<sub>n</sub> o TTE<sub>x</sub>) (Williams et al., 2003; Innes et al., 2005; Collantes-Fernández et al., 2006a; Collantes-Fernández et al., 2006c; Gibney et al., 2008; Rojo-Montejo et al., 2009a; Williams et al., 2009).

Un último punto a destacar es el hecho de que animales crónicamente infectados desarrollan cierta inmunidad protectora capaz de prevenir el aborto en el caso de que tenga lugar una nueva infección (McAllister et al., 2000; Schares et al., 2002a). Por tanto, estos animales con infección previa resultan más resistentes a una nueva infección que los que la adquieren mediante vía horizontal por primera vez, no obstante pueden producirse abortos repetidos por una reactivación de la infección original (Barr et al., 1993).

### 1.5. Respuesta inmunitaria

Aunque el ganado vacuno infectado con *N. caninum* desarrolla anticuerpos específicos frente al parásito, su localización intracelular sugiere que una respuesta mediada por células es el componente más importante para la protección (Hemphill, 1999; Innes et al., 2000). En este sentido, varios autores han reportado la producción de interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y de anticuerpos (fundamentalmente inmunoglobulinas del isotipo IgG2) después de la infección experimental de vacas no gestantes (Lunden et al., 1998; Marks et al., 1998; De Marez et al., 1999) y gestantes (Williams et al., 2000; Andrianarivo et al., 2001; Innes et al., 2001; Rojo-Montejo et al., 2009a). Este tipo de respuesta, que es inducida rápidamente después de una infección primaria, podría controlar la multiplicación del parásito, inducir la diferenciación de taquizoítos a bradizoítos y favorecer la formación y mantenimiento de quistes tisulares (Williams et al., 2009). La producción de IFN- $\gamma$  tiene una gran importancia en la resistencia del hospedador, ya que se ha demostrado que el IFN- $\gamma$  inhibe el crecimiento intracelular del parásito *in vitro* (Innes et al., 1995; Yamane et al., 2000) e *in vivo* (Khan et al., 1997; Baszler et al., 1999; Ritter et al., 2002).

En un estudio previo, se ha demostrado que las células asesinas (NK) junto con los linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> colaboran en la producción de IFN- $\gamma$  en los estadios iniciales de la infección (Boysen et al., 2006; Klevar et al., 2007), mientras que sólo los CD4<sup>+</sup> predominan en las fases más avanzadas (Marks et al., 1998; Tuo et al., 2005b). Los linfocitos CD4<sup>+</sup> procedentes de animales infectados pueden proliferar cuando se los estimula con antígeno de *N. caninum*

(Andrianarivo et al., 2001) y pueden mediar la lisis directa de células infectadas (Staska et al., 2003). También se ha detectado un aumento en el porcentaje de linfocitos CD8<sup>+</sup> circulantes en vacas inoculadas en el día 70 de gestación, siendo este aumento menos evidente después de la infección en el día 210 (Rosbottom et al., 2007). Sin embargo, el papel de estas células en la inmunidad frente a *N. caninum* permanece sin aclarar (Tanaka et al., 2000; Staska et al., 2003).

En cuanto a la producción de inmunoglobulinas frente a *N. caninum*, estudios experimentales y datos de campo han demostrado un marcado aumento en el título de anticuerpos durante la gestación en aquellos animales que transmitieron la infección (Conrad et al., 1993; Pare et al., 1997; Quintanilla-Gonzalo et al., 1999; Stenlund et al., 1999; Guy et al., 2001; Pereira-Bueno et al., 2003).

### **1.6. Diagnóstico**

Actualmente, existe una amplia batería de técnicas diagnósticas, pero no todas ofrecen la misma información o tienen la misma fiabilidad. El diagnóstico de la neosporosis bovina es complejo y ha de realizarse de manera ordenada y sistemática. La selección del protocolo diagnóstico dependerá de la información que se pretende conseguir. Se puede seguir un protocolo de diagnóstico individual para conocer la causa del aborto en un único individuo o bien seguir un protocolo de diagnóstico colectivo cuando lo que interesa conocer es la situación de la infección en una explotación. En la práctica, el diagnóstico debe abordarse desde un punto de vista colectivo para poder implementar las medidas de control oportunas.

La herramienta de elección para conocer la situación inicial de la granja es la detección de anticuerpos específicos frente a *N. caninum* en muestras de suero. Las técnicas serológicas más útiles incluyen la detección de anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta (IFI) y por ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) (Björkman & Uggl, 1999). En casos dudosos, la prueba confirmatoria utilizada es el inmunoblot (Álvarez-García et al., 2003; von Blumröder et al., 2004). La detección de anticuerpos en muestras de leche mediante ELISA es una herramienta igualmente factible con resultados equiparables a los obtenidos en muestras de suero, con las ventajas añadidas de menores costes y manejo del animal (Björkman et al., 1997; Salas-Calvo et al., 2005). Las muestras para analizar pueden ser individuales o de tanque. Sin embargo, debido al efecto de dilución de los anticuerpos en el tanque, analizar esta última únicamente es útil en rebaños con prevalencias intra-rebaño de la infección superiores al 10-15%. El uso de esta técnica puede ser útil tanto para conocer el estado serológico inicial de una granja, como para realizar el seguimiento de un programa de control de una manera económica y fiable. Las seroprevalencias de la explotación y de las vacas que han abortado, permiten determinar si el problema del aborto está asociado a la infección por *N. caninum* y la magnitud de éste. La

relación entre la serología materna y la de la descendencia, así como la distribución de los animales seropositivos por edades nos orientará sobre el modo de transmisión predominante.

Además, la utilización de herramientas diagnósticas como el ELISA de avidez puede ser de gran utilidad para determinar la situación serológica de la granja (Aguado-Martínez et al., 2005; Björkman et al., 2006). Esta técnica permite detectar los anticuerpos de baja afinidad que aparecen en las fases iniciales de la infección, permitiendo discriminar entre explotaciones en las que gran parte de los animales presentan una infección reciente como causa de una transmisión horizontal, de aquellas en las que sus animales están crónicamente infectados. Los nuevos avances llevados a cabo en el campo del diagnóstico plantean la posibilidad de la utilización de técnicas serológicas de nueva generación, como son el uso de ELISAs basados en proteínas recombinantes del parásito específicas de diferentes estadios del mismo (Aguado-Martínez et al., 2008), que aportan una información más completa sobre la fase de la infección en la que se encuentran los animales y por tanto, el modo de transmisión predominante.

Este primer abordaje serológico se debe acompañar de la aplicación de técnicas de detección del parásito en los tejidos de fetos abortados (cerebro, corazón y placenta, principalmente) mediante la técnica de PCR y la determinación de la existencia de lesiones específicas o compatibles en dichos tejidos mediante técnicas de histopatología, sobre todo en los casos de aparición de brotes inesperados de abortos. El diagnóstico puede complementarse en el feto con la detección de anticuerpos específicos en fluidos de fetos con más de 5 meses de gestación (Pereira-Bueno et al., 2003; Dubey & Schares, 2006). La técnica de PCR cuantitativa, que permite cuantificar la carga parasitaria presente en un tejido, aunque no es utilizada en el diagnóstico rutinario, si resulta útil en estudios de patogenia (Collantes-Fernández et al., 2006a; Collantes-Fernández et al., 2006b; Pereira García-Melo et al., 2010).

## **1.7. Medidas de control de la neosporosis bovina**

### ***1.7.1. Medidas de manejo***

La situación epidemiológica y el impacto económico de la neosporosis bovina varían en cada país, región e incluso en cada explotación, al estar influenciados por diferentes factores de riesgo como son la edad del ganado, la presencia de perros en las granjas, el clima, la densidad del ganado, la extensión de la granja, el tamaño del rebaño, el origen de la reposición, la presencia de otras infecciones y la raza (Dubey et al., 2007).

Una vez confirmada la infección por *N. caninum*, además de la situación serológica de la granja, el siguiente paso es conocer la fase de la infección en la que se encuentran los animales y el principal modo de transmisión en la granja, ya que las medidas de control irán encaminadas a evitar la TTE<sub>n</sub>, la TTE<sub>x</sub> o ambas. De ese modo, los programas de control deberán estar

adaptados de forma específica a la situación epidemiológica concreta además de tener en cuenta el coste-beneficio de las medidas implementadas y el coste de la infección por *N. caninum* (Reichel & Ellis, 2006; Reichel & Ellis, 2009). Las principales medidas de manejo para la prevención de la infección por *N. caninum* intentan controlar o eliminar el modo de transmisión predominante del parásito en la granja:

Prevención de la TTEn:

- Mantenimiento de un estado higiénico-sanitario y bienestar animal óptimo: evitar inmunosupresión que favorezca la reactivación de *N. caninum* (Dubey et al., 2007).
- Medidas de reposición y sacrificio selectivo: si la seroprevalencia es baja puede ser factible económicamente la eliminación de todos los animales seropositivos. Otra opción es la eliminación de hembras positivas que hayan abortado o con repetición de celo, además de las de mayor edad (Hall et al., 2005).
- Manejo de la reproducción: transferencia de embriones de madres seropositivas a madres seronegativas receptoras (Baillargeon et al., 2001; Campero et al., 2003). Inseminación de hembras seropositivas de aptitud lechera con semen de toros de aptitud cárnica para reducir el riesgo de aborto (López-Gatius et al., 2005).

Prevención de TH y TTEx:

- Control de la presencia de perros u otros hospedadores definitivos: la seroprevalencia de *N. caninum* suele ser mayor en perros de granja que en urbanos o de caza (Collantes-Fernández et al., 2008).
- Eliminación de fetos abortados y tejidos placentarios: disminuyéndose el riesgo de infección del hospedador definitivo (McAllister et al., 1998; Dijkstra et al., 2002b).
- Control de roedores y otros hospedadores intermediarios: ha sido detectada la infección en roedores silvestres (Huang et al., 2004; Hughes et al., 2006; Medina-Esparza et al., 2012; Meerburg et al., 2012) que podrían actuar como reservorios de la infección. Además, otros animales silvestres pueden actuar como H.I. e interactuar con el ciclo doméstico del parásito (Gondim et al., 2004b).

Actualmente, la única opción existente para el control de la infección en el ganado se basa, principalmente, en la implementación de medidas de manejo. Sin embargo, la quimioterapia y la inmunoprofilaxis han sido descritas como las mejores alternativas potenciales (Reichel & Ellis, 2006; Reichel & Ellis, 2009).

### 1.7.2. *Quimioterapia y quimioprofilaxis*

En la actualidad, el control farmacológico de la neosporosis bovina parece inviable por la falta de fármacos realmente eficaces y económicamente rentables (Dubey & Schares, 2011). Hasta la fecha se han analizado un gran número de fármacos *in vitro* e *in vivo*. Algunas sulfadiazinas presentan cierta eficacia en modelos experimentales. El toltrazuril y su derivado ponazuril (toltrazuril- sulfona) parecen ser capaces de disminuir la TT de la infección en modelos murinos gestantes, tanto al ser administrado en las madres (Gottstein et al., 2005) como en las crías tras el parto (Strohbusch et al., 2009a). Este mismo fármaco, al emplearse en terneros tras una infección experimental, es capaz de disminuir la presencia de signos clínicos y los niveles de anticuerpos en los animales tratados en relación a los no tratados, además el parásito no fue detectado en los órganos en ninguno de los animales tratados (Kritzner et al., 2002). Otro fármacos con buenos resultados fueron la nitazoxanida y la arilimidamida DB750 tanto en estudios *in vitro* (Esposito et al., 2005; Leepin et al., 2008) como en estudios *in vivo* reduciendo la carga parasitaria y la viabilidad de los taquizoítos (Debache et al., 2011a), así como la artemisona (derivada de la artemisinina), que fue capaz de evitar la proliferación de *N. caninum* en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Mazuz et al., 2012).

Recientemente, ha sido descubierta la actividad antiprotozoaria de un fosfolípido llamado miltefosina que originariamente fue desarrollado para tratamientos contra el cáncer y que está siendo utilizado contra la leishmaniosis cutánea y visceral (Bhattacharya et al., 2007). Además, se ha observado su actividad frente a otros protozoos como *Trypanosoma* sp., *Giardia lamblia* y *Acanthamoeba* sp. (Croft et al., 1996; Eissa & Amer, 2012; Webster et al., 2012; Wege et al., 2012). En el caso de *N. caninum*, se ha conseguido reducir sustancialmente la proliferación en un modelo *in vitro*, así como en un modelo *in vivo* de neosporosis en el que se observó una clara limitación de la diseminación del parásito al SNC de ratones BALB/c (Debache & Hemphill, 2012b).

A pesar de todo, no existe información sobre el efecto que estos fármacos podrían ejercer sobre el estadio de bradizoíto, así como sobre los quistes tisulares, ni tampoco se han ensayado en infecciones naturales en el ganado bovino. Por lo tanto, el uso de tratamientos profilácticos, aunque ha sido sugerido como una posible herramienta para el control, plantea grandes inconvenientes, favoreciendo que otras herramientas como la inmunoprofilaxis aparezcan como alternativas más atractivas para el control de este tipo de enfermedades.

## 2. Desarrollo de vacunas frente a la neosporosis bovina

### 2.1. Consideraciones generales

La magnitud de las pérdidas económicas asociadas a la neosporosis bovina se ha estimado en cientos de millones de euros por año en todo el mundo (Dubey et al., 2007; Reichel & Ellis, 2009). Dichas pérdidas incluyen los costes directos, asociados al aborto (Thornton et al., 1994; Pfeiffer et al., 2002) y los costes indirectos, debidos al incremento de la reposición (Thurmond & Hietala, 1996; Tiwari et al., 2005; Bartels et al., 2006b), la posible disminución de la producción de leche (Thurmond & Hietala, 1997a; Hernández et al., 2001; Hobson et al., 2002), la reducción del valor de la cría (Tees et al., 1999), la asistencia veterinaria y los gastos en el diagnóstico.

Numerosos estudios basados en modelos predictivos han ofrecido estimaciones de las pérdidas económicas, y han evaluado las posibles estrategias de control de la neosporosis bovina, basándose en cálculos de coste-beneficio (French et al., 1999; Larson et al., 2004; Hasler et al., 2006; Hasler et al., 2008). Entre las medidas de control, la vacunación es una de las principales alternativas de futuro en el control de esta enfermedad que debería complementar a las medidas de manejo del rebaño indicadas anteriormente (Reichel & Ellis, 2006; Reichel & Ellis, 2009).

Para el desarrollo de una estrategia eficaz de vacunación, y debido a la complejidad del ciclo biológico de los parásitos apicomplejos como *N. caninum*, es necesario el conocimiento previo de la biología del parásito, la interacción parásito-hospedador, los antígenos involucrados en la supervivencia del parásito, así como los componentes de la respuesta inmunitaria implicados en la protección (Innes & Vermeulen, 2006). Por lo tanto, durante el diseño de una vacuna frente a la neosporosis y, en general, en la mayoría de las vacunas, hay que considerar múltiples factores que determinarán el éxito o fracaso. Básicamente, una vacuna eficaz frente a *N. caninum* debe cumplir los siguientes requisitos:

- Prevención de la TT al feto y la producción de abortos o el nacimiento de terneros congénitamente infectados, mediante la inducción de una respuesta inmunitaria eficaz en los periodos relevantes: segundo y tercer tercio de la gestación.
- El desarrollo de vacunas no solo debe ir encaminado a proteger frente a la TTEx, sino también frente a la TTEn.
- Además, dado que existen diferencias en virulencia entre aislados, las vacunas deben demostrar una eficacia frente a desafíos con aislados de alta virulencia.
- En vacunas vivas atenuadas, es muy importante la seguridad del producto final. Se requiere, por tanto, la comprobación tanto de la completa inactivación, en el caso de vacunas de

parásito muerto, como de la esterilidad del inóculo mediante diversas técnicas *in vitro* (Arranz-Solís et al., 2012).

Por otro lado, hay ciertas características deseables en la elaboración de nuevas formulaciones vacunales:

- Estabilidad, de forma que se conserven sus propiedades físico-químicas desde la producción hasta su aplicación en el campo, además de permitir su producción a gran escala para poder llevar a cabo su comercialización.
- Posibilidad de elaboración de vacunas marcadas para diferenciar animales infectados de vacunados (“Differentiating infected from vaccinated animals”: DIVA).

El mayor problema es la comparación objetiva entre los diferentes estudios *in vitro* e *in vivo* empleados, ya que existe una gran variedad de modelos experimentales de infección, aislados, vías de administración, especie animal, así como estirpe utilizada, adyuvantes y parámetros evaluados. Por todo ello, en la actualidad, los grupos de investigación dedicados al estudio de *N. caninum* y la neosporosis tratan de elaborar una serie de protocolos compartidos para el estudio tanto de la biología del parásito, de la enfermedad que produce en el hospedador, así como para la evaluación de vacunas en modelos experimentales (Ortega-Mora et al., 2012).

## **2.2. Modelos animales experimentales para la evaluación de vacunas**

Durante el diseño de una vacuna, los ensayos preliminares para la evaluación de la eficacia y seguridad de las diferentes formulaciones candidatas se realizan habitualmente en animales de laboratorio. Estos modelos animales son una herramienta útil para realizar un primer cribado, rápido y más económico de las formulaciones diseñadas en comparación con el empleo de la especie de destino. En el caso de la neosporosis bovina, la elección de un modelo experimental de infección para el ensayo de diferentes formulaciones va a depender fundamentalmente del objetivo que se busca con la vacunación: protección frente a la infección cerebral, a la TTE<sub>x</sub> o a la TTE<sub>n</sub>.

En el caso de *N. caninum*, se han empleado diversos modelos experimentales de infección. Sin embargo, el empleo de distintos diseños experimentales dificulta la comparación de los resultados obtenidos por diferentes grupos de investigación.

### **2.2.1. Modelo murino experimental**

El modelo murino es una herramienta muy valiosa para el estudio de la patogenia de la neosporosis (Eperon et al., 1999; Nishikawa et al., 2001b; Collantes-Fernández et al., 2006b; López-Pérez et al., 2006) y de la respuesta inmunitaria del hospedador (Khan et al., 1997; Ritter

et al., 2002), así como para el ensayo de nuevas vacunas y agentes quimioproliféricos y quimioterapéuticos (Cannas et al., 2003a; Ramamoorthy et al., 2006; Debache & Hemphill, 2012a; Debache & Hemphill, 2012b). Este modelo también se ha empleado en pruebas de caracterización patogénica de diferentes aislados de *N. caninum* (Stenlund et al., 1997; Atkinson et al., 1999; Collantes-Fernández et al., 2006b; Pereira García-Melo et al., 2010; Regidor-Cerrillo et al., 2010), en la producción de quistes titulares (McGuire et al., 1997a; McGuire et al., 1997b) y en la obtención de aislados del parásito a partir de tejidos fetales o de terneros congénitamente infectados (Miller et al., 2002; Regidor-Cerrillo et al., 2008; Rojo-Montejo et al., 2009b).

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 ratones deficientes genéticamente. En el caso del modelo gestante, es de gran importancia el corto periodo de gestación.

#### 2.2.1.1. Modelo murino no gestante

Las consecuencias de la neosporosis en el modelo murino son muy variables. Los ratones pueden desarrollar una infección subclínica o una enfermedad de curso mortal dependiendo de la estirpe de ratón, del aislado, dosis, vía de inoculación del parásito y tratamiento con agentes inmunodepresores. Como se ha comentado con anterioridad, resulta difícil comparar entre los diferentes estudios que han empleado modelos murinos debido a las diferentes variables empleadas en cada uno de estos. En general, los ratones no consanguíneos como los pertenecientes a las estirpes Swiss Webster (Lindsay & Dubey, 1989), ICR (Lindsay et al., 1995), CD-1 (Khan et al., 1997) y Quackenbush (Qs) (Miller et al., 2002) son poco susceptibles a la infección y no desarrollan signos clínicos. Sin embargo, la administración de corticoides permite revertir su resistencia natural (Lindsay & Dubey, 1989; Lindsay et al., 1999b; Collantes-Fernández et al., 2004) y reproducir la enfermedad de forma aguda o crónica dependiendo de la dosis empleada (Lindsay & Dubey, 1989). Los ratones consanguíneos como los de la estirpe BALB/c presentan una mayor susceptibilidad a la infección, tanto en la fase aguda como en la fase crónica y pueden desarrollar signos clínicos dependiendo de la dosis y del aislado empleado (Nishikawa et al., 2003). La infección con los aislados de virulencia moderada-alta, como Nc-1, Nc-2, Nc-JPA-1, Nc-Nowra, Nc-Spain 7 y Nc-Liverpool, puede provocar la aparición de signos clínicos durante la fase aguda de la infección como la presentación de pelaje erizado, apatía, anorexia, y signos nerviosos como ataxia, parálisis o torpeza y, finalmente, la muerte (McGuire et al., 1997b; Atkinson et al., 1999; Shibahara et al., 1999; Miller et al., 2002; Collantes-Fernández et al., 2006b; Bartley et al., 2008; Pereira García-Melo et al., 2010), mientras que con otros, como por ejemplo Nc-3, Nc-SweB1, Nc-Spain 1H y

determinados aislados termosensibles los ratones no desarrollan signos clínicos apreciables (Lindsay et al., 1995; Atkinson et al., 1999; Lindsay et al., 1999b; Rojo-Montejo et al., 2009b). Por otro lado, 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).

### *Patogenia*

En el modelo murino, el curso de la infección por *N. caninum* puede ser dividido en dos fases si atendemos a la distribución orgánica del parásito, desarrollo de la respuesta inmunitaria y tipo de signos clínicos.

- *Fase aguda:* durante la primera semana p.i., el parásito se disemina por vía sanguínea o linfática y se multiplica en diferentes órganos (hígado, bazo, ganglios linfáticos y pulmón), sin una localización preferente. Posteriormente, el parásito es detectado principalmente en el pulmón y cerebro, observándose una disminución gradual en el número de parásitos en el pulmón y un aumento en el cerebro (Collantes-Fernández et al., 2006b; Pereira García-Melo et al., 2010). En esta fase de la infección, los ratones muestran signos clínicos inespecíficos como dificultad respiratoria, inactividad, anorexia, apatía y erizamiento del pelo (Eperon et al., 1999; Rettigner et al., 2004b; Collantes-Fernández et al., 2006b). De hecho, el empleo de aislados que expresan constitutivamente el gen de la luciferasa (ej. *Nc-1Luc*) han permitido estudiar la migración del parásito (Collantes-Fernández et al., 2012). Estos estudios son más habituales en el caso de *T. gondii* pudiéndose monitorizar y visualizar tanto la fase aguda como la fase crónica de la infección en el modelo murino sin necesidad de sacrificar a los animales (Saeij et al., 2008).
- *Fase crónica:* aquellos ratones que sobreviven a la fase aguda desarrollan una infección crónica. En la segunda semana p.i., el parásito desaparece de los pulmones y se observa una mayor carga parasitaria en el cerebro (Collantes-Fernández et al., 2006b). En esta fase, los ratones pueden permanecer asintomáticos o desarrollar signos clínicos nerviosos como debilidad y parálisis del tercio posterior, encorvamiento, ladeo de la cabeza, ataxia, temblor de cabeza, torneo y marcha en círculos (Eperon et al., 1999; Rettigner et al., 2004b; Collantes-Fernández et al., 2006b). Estos signos clínicos empeoran con el tiempo hasta la muerte del animal (Lindsay & Dubey, 1989). La mayoría de las muertes ocurren en esta fase y están asociadas con la encefalitis. Según las diferencias observadas en carga parasitaria, la muerte podría estar relacionada con la incapacidad de algunas estirpes de controlar la multiplicación del parásito en el cerebro (Long et al., 1998).

### 2.2.1.2. Modelo murino gestante

#### *Consideraciones generales*

Debido a las limitaciones de la experimentación en el ganado bovino gestante (alto coste, tiempo empleado en la evaluación clínica, recogida de muestras, difícil manejo y dificultad para la realización de un estudio exhaustivo de la infección ya que conllevaría un alto número de sacrificios), el modelo murino gestante ha resultado ser de gran utilidad en el estudio de la neosporosis congénita. Además de las ventajas mencionadas anteriormente, el modelo murino gestante permite evaluar la seguridad y eficacia de fármacos y vacunas frente a la TT como prueba de concepto antes de su estudio en la especie de destino. Por otro lado, muchos de los resultados obtenidos en este modelo indican un alto grado de similitud con los obtenidos en el modelo bovino, a pesar de las diferencias que hay entre ambas especies como son la duración de la gestación, la estructura de la placenta, la respuesta inmunitaria y la susceptibilidad a la infección. De esta forma, el empleo del modelo murino gestante es más adecuado para la evaluación de formulaciones vacunales, cuyo objetivo final es evitar tanto la TT como la mortalidad fetal, que el modelo murino no gestante (Aguado-Martínez et al., 2009a; Marugán-Hernández et al., 2011c; Rojo-Montejo et al., 2011b; Debache & Hemphill, 2013; Monney et al., 2012).

Al igual que en el modelo bovino, el día de gestación en que tiene lugar la infección en el modelo murino es un factor importante que determina tanto la mortalidad fetal como la transmisión vertical (López-Pérez et al., 2006; López-Pérez et al., 2008; López-Pérez et al., 2010). También se ha comprobado que el desarrollo de la infección varía dependiendo del aislado empleado tanto en los modelos bovinos como en los modelos murinos (Rojo-Montejo et al., 2009a; Rojo-Montejo et al., 2009b; Pereira García-Melo et al., 2010; Regidor-Cerrillo et al., 2010; Caspe et al., 2012). Además, al igual que en los modelos no gestantes, la cepa de ratón utilizada influye en el desarrollo posterior de la infección tanto en las madres como en las crías (Quinn et al., 2002).

En el momento actual, existe una gran heterogeneidad de modelos murinos gestantes (Tabla 2, Tabla 3 y Tabla 4). En este sentido, sería necesario adoptar un protocolo común que facilitara la comparación de resultados. El grupo SALUVET ha desarrollado un modelo murino gestante de primoinfección en el que se pueden evaluar parámetros como la mortalidad fetal, la transmisión vertical y la morbilidad y mortalidad en los animales congénitamente infectados (López-Pérez et al., 2006; López-Pérez et al., 2010).

*Patogenia*

Hasta la fecha, la mayoría de modelos de neosporosis congénita en el ratón emulan la TTE<sub>x</sub> ya que la primoinfección tiene lugar durante la gestación (Liddell et al., 1999b; Quinn et al., 2002; López-Pérez et al., 2006; López-Pérez et al., 2008). Pocos han sido los intentos de reproducir la TTE<sub>n</sub> en ratonas crónicamente infectadas (Cole et al., 1995; Omata et al., 2004; Rettigner et al., 2004a; Kano et al., 2005). Los parámetros evaluados en el modelo gestante han sido los siguientes:

- *Morbilidad y mortalidad en las hembras gestantes*: las tasas de mortalidad y morbilidad en hembras gestantes debidas a la inoculación de *N. caninum* durante la gestación varían en función de la dosis (Quinn et al., 2002) y el aislado utilizados (Quinn et al., 2002; Rojo-Montejo et al., 2009b; Regidor-Cerrillo et al., 2010).
- *Morbilidad y mortalidad en las crías*: 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; López-Pérez et al., 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 una mayor tasa de mortalidad fetal ni hebdomadal que la producida en el grupo testigo no infectado (López-Pérez et al., 2006). En ratones BALB/c, la infección en el día 5 de gestación produjo en el día 14 de gestación 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 testigos (Quinn et al., 2002). Cuando la infección tiene lugar entre los días 5-8 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), que podría ser incluso dependiente de la dosis empleada (Quinn et al., 2002). Por otro lado, no se observan pérdidas fetales cuando la infección tiene lugar al final de la gestación (Long & Baszler, 1996).

En cuanto a la morbilidad en las crías, se ha comprobado que los signos clínicos son más evidentes cuando el periodo post-natal evaluado es mayor, a partir de la primera semana de vida, viéndose una mayor frecuencia de aparición de dichos signos en crías nacidas de madres infectadas durante el segundo tercio de gestación (López-Pérez et al., 2008). Normalmente las crías se mantienen con vida hasta el día 30 p.p. extendiéndose hasta el día 50 p.p. si se quiere valorar la respuesta inmunitaria humoral en las crías (Appleby & Catty, 1983).

Tabla 2: Modelos murinos gestantes de infección experimental con *N. caninum*.

Cepa de ratón	Aislado <sup>a</sup> , vía y dosis	Infección	Sacrificio	Parámetros evaluados (en madres y crías)	Referencias
BALB/c	Nc-1, s.c., 2x10 <sup>6</sup>	-10, 5 y 10 a 12 d.g.	11-19 d.g.	Reabsorciones y fetos viables en útero. Lesiones en cerebro y pulmón de madres, placenta y fetos por IHQ	Long & Baszler, 1996
	Nc-1, s.c., 1x10 <sup>5</sup>	10, 15 y 8 a 13 d.g.	2-23 p.p.	Fertilidad y tamaño de camada. Mortalidad en crías. TT mediante PCR (Nc5)	Liddell et al., 1999b
CBA/Ca	Nc-1, s.c., 2x10 <sup>6</sup>	0, 7 y 14 d.g.	14 d.g. y 1 a 7 p.p.	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 TT en crías (cerebro y pulmón) mediante Nested-PCR (ITS1). Así como carga parasitaria en crías.	López-Pérez et al., 2006
	Nc-1, s.c., 5x10 <sup>5</sup>	4-6 meses antes de gestación o 8 a 10 d.g.	8 d.g. a 1 p.p.	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 [Inflorproliferación y RT-PCR (IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-4)]. Detección de DNA del parásito por Nested-PCR (Nc5)	Reitigner et al., 2004a
Swiss Webster	Nc-1, s.c., 4,3 a 9,6x10 <sup>6</sup>	5 a 18 d.g.	16 d.g a 7 p.p.	Gestaciones sucesivas. Morbilidad en madres. Reabsorciones en placenta. TT y transmisión galactófora en crías	Cole et al., 1995
Quakenbush (Qs)	Nc-Liv y Nc-SweB1, s.c. o i.p., 10 <sup>4</sup> , 10 <sup>6</sup> y 10 <sup>7</sup>	8 d.g.	14 d.g. o 7 p.p.	Morbilidad y mortalidad de madres. Tamaño de camada, y mortalidad en las crías. Lesiones en cerebro mediante histología. Detección del parásito mediante PCR (ITS1)	Quinn et al., 2002

<sup>a</sup> Nc-1 (Dubey et al., 1988b); Nc-Liv (Barber et al., 1993; Barber et al., 1995); Nc-SweB1 (Stenlund et al., 1997); IHQ: inmunohistoquímica; ITS1: PCR que amplifica la región "internal transcribed spacer" 1 (Buxton et al., 1998); Nc5: PCR que amplifica un fragmento del cromosoma 5 de *N. caninum* (Müller et al., 2001)

**Tabla 3:** Modelos murinos gestantes empleados en estudios de patogenicidad y/o caracterización de aislados de *N. caninum*.

Cepa de ratón	Aislado <sup>a</sup> , vía y dosis	Infección	Sacrificio	Parámetros evaluados (en madres y crías)	Referencias
	Nc-7, i.p., 2x10 <sup>6</sup>	-28 a -100 y 7 a 19 d.g.	0-1 p.p.	Gestación a 28-80 p.p. Tamaño de camada, TT a crías y respuesta inmune humoral y celular en hembras.	Omata et al., 2004; Kano et al., 2005
	Nc-1, s.c., 2x10 <sup>6</sup>	0, 7 y 14 d.g.	30 o 60 p.p	Reabsorciones y fetos viables. Morbilidad y mortalidad en crías. Lesiones en fetos (cerebro, corazón, hígado y pulmón) mediante histología. TT en crías (cerebro y pulmón) mediante Nested-PCR (ITS1).	López-Pérez et al., 2008
	Nc-Spain1H y Nc-1, s.c., 2x10 <sup>6</sup>	7 a 10 d.g.	30 p.p.	Fertilidad y tamaño de camada. Morbilidad y mortalidad en madres y crías. Presencia de parásito en madres y crías (cerebro y pulmón) mediante Nested-PCR (ITS1) Respuesta inmune humoral en madres	Rojo-Montejo et al., 2009b
BALB/c	Nc-1, s.c., 2x10 <sup>6</sup>	7 d.g.	10 y 14 d.g.	Reabsorciones y mortalidad fetal. Detección de parásito en placentas mediante nested-PCR (ITS1). Expresión de citoquinas mediante RT-PCR (IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-4, TNF- $\alpha$ ). Lesiones en placenta mediante histoquímica.	López-Pérez et al., 2010
	Nc-Spain 2H a 10, s.c., 2x10 <sup>6</sup>	7 a 10 d.g.	30 p.p.	Fertilidad y tamaño de camada. Morbilidad y mortalidad en madres y crías. Presencia de parásito en madres y crías (cerebro y pulmón) mediante Nested-PCR (ITS1) Respuesta inmune humoral en madres	Regidor-Cerrillo et al., 2010
	Nc-ISA G4 <sup>+</sup> , s.c., 2x10 <sup>6</sup>	7 a 10 d.g.	50 p.p.	Morbilidad y mortalidad en madres y crías. Presencia de parásito en madres y crías (cerebro y pulmón) mediante Nested-PCR (ITS1) Respuesta inmune humoral en madres y crías	Mangán-Hernández et al., 2011b
	Nc-Spain 7, s.c., 2x10 <sup>6</sup>	6 a 10 d.g.	30 p.p.	Tamaño de camada. Morbilidad y mortalidad en madres y crías. Presencia de parásito en crías (cerebro) mediante real-time PCR	Collantes-Fernández et al., 2012
C57BL/6	Nc-1, i.p., 5x10 <sup>6</sup>	-14 d.g y 12 a 14 d.g.	18 a 20 d.g	Reabsorción de fetos. Presencia de parásito en fetos mediante PCR (Nc5)	Ramamoorthy et al., 2007a
Qs	Nc-Nowra, s.c., 10 <sup>4</sup> y 10 <sup>6</sup>	6 d.g.	7 p.p.	Reabsorción de fetos. TT a las crías mediante PCR (ITS1)	Miller et al., 2002

<sup>a</sup> Nc-1 (Dubey et al., 1988b); Nc-Liv (Barber et al., 1993; Barber et al., 1995); Nc-7 (Koyama et al., 2001); Nc-Nowra (Miller et al., 2002); Nc-Spain 1H (Rojo-Montejo et al., 2009b); Nc-Spain 2H-10 (Regidor-Cerrillo et al., 2008); Nc-ISA G4<sup>+</sup>(Marugán-Hernández et al., 2011b); ITS1: PCR que amplifica la región "internal transcribed spacer" 1 (Buxton et al., 1998); Nc5: PCR que amplifica un fragmento del cromosoma 5 de *N. caninum* (Müller et al., 2001)

Tabla 4: Modelos murinos gestantes empleados en estudios de la eficacia de vacunas frente a la neosporosis.

Cepa de ratón	Vacuna, vía, dosis (n° inoculaciones), e intervalo	Aislado <sup>a</sup> desafío, vía y dosis	Infección	Sacrificio	Parámetros evaluados (en madres y crías)	Referencias
	Nc-1 <sup>b</sup> , s.c., 5µg (1)	Nc-1, s.c., 1x10 <sup>5</sup>	10 a 12 d.g.	7 p.p.	Tamaño de camada. TT en crías mediante Nested-PCR (Nc5)	Liddell et al., 1999a
	rNcROP2, rNcMIC1 y rNcMIC3, i.p., 20µg (3), 2 semanas	Nc-1, i.p., 2x10 <sup>6</sup>	7 a 9 d.g.	50 p.p.	Morbilidad y mortalidad en madres y crías. Carga parasitaria en hembras y crías (qPCR) y respuesta inmune humoral y celular en hembras.	Debache et al., 2009
	rNcGRA7 y rNcSAG4, s.c., 25µg (3), 3 semanas	Nc-1, s.c., 2x10 <sup>6</sup>	7 a 10 d.g.	30 p.p.	Fertilidad y tamaño de camada. Morbilidad y mortalidad en madres y crías. Presencia de parásito en madres y crías (cerebro y pulmón) mediante Nested-PCR (ITS1) Respuesta inmune humoral en madres	Aguado-Martínez et al., 2009a
	NcAMA1, s.c., 3.3µg (1)	Nc-1, i.p., 1x10 <sup>5</sup>	8 a 10 d.g.	30 p.p.	Fertilidad y tamaño de camada. Mortalidad en crías. Presencia de parásito en madres y crías (Cerebro) mediante Nested-PCR (Nc5)	Zhang et al., 2010
	Nc-1SAG4 <sup>c</sup> , s.c., 5x10 <sup>5</sup> (1)	Nc-Liv, s.c., 2x10 <sup>6</sup>	7 a 11 d.g.	30 p.p.	Fertilidad y tamaño de camada. Morbilidad y mortalidad en madres y crías. Presencia de parásito en madres y crías (cerebro y pulmón) mediante Nested-PCR (ITS1) Respuesta inmune humoral en madres	Marugán-Hernández et al., 2011c
BALB/c	Nc-Spain7 <sup>c</sup> , s.c., 5x10 <sup>5</sup> (1)	Nc-Liv, s.c., 2x10 <sup>6</sup>	7 a 10 d.g.	30 p.p.	Fertilidad y tamaño de camada. Morbilidad y mortalidad en madres y crías. Presencia del parásito en madres y crías (cerebro y pulmón) mediante Nested-PCR (ITS1) Respuesta inmune humoral en madres (IgG1, IgG2a, anti-rNcGRA7, rNcSAG4 y rNcBSR4)	Rojo-Montejo et al., 2011b
	NcMIC1-NcMIC3-NcROP2 química, 10µg (3), 2 semanas	Nc-1, i.p., 2x10 <sup>6</sup>	7 a 9 d.g.	34 p.p.	Fertilidad y tamaño de camada. Morbilidad y mortalidad en madres y crías. Presencia del parásito en madres y crías (cerebro) mediante real-time PCR (Nc5) Respuesta inmune humoral y celular en madres	Monney et al., 2012
	rNcPDI, i.n., 10µg (3), 2 semanas	Nc-1, i.p., 2x10 <sup>6</sup>	7 a 19 d.g.	30 p.p.	Fertilidad y tamaño de camada. Morbilidad y mortalidad en madres y crías. Presencia del parásito en madres y crías (cerebro) mediante real-time PCR (Nc5) Respuesta inmune humoral y celular en madres	Debache & Hemphill, 2013
	Nc-Spain 1H, s.c., 5x10 <sup>5</sup> (2), 3 semanas	Nc-Liv, s.c., 2x10 <sup>6</sup>	7 a 10 d.g.	30 p.p.	Fertilidad y tamaño de camada. Morbilidad y mortalidad en madres y crías. Presencia del parásito en madres y crías (cerebro y pulmón) mediante Nested-PCR (ITS1) y microsatélites para descartar infección por aislado Nc-Spain 1H. Respuesta inmune humoral y celular en madres	Rojo-Montejo et al., 2012
C57BL/6	rNcMIC1, rNcMIC2, rNcGRA2 y rNcGRA6 en <i>B. abortus</i> , i.p., 2x10 <sup>8</sup> UFC	Nc-1, i.p., 5x10 <sup>6</sup>	11 a 13 d.g.	21 p.p.	Mortalidad en hembras y crías. Respuesta inmune humoral y celular en hembras. TT en crías mediante qPCR	Ramamoorthy et al., 2007c
Qs	NcNowra <sup>b,d</sup> , s.c., 10 <sup>4</sup> y/o 10µg	Nc-Liv, s.c., 10 <sup>6</sup>	5 d.g.	7 p.p.	Tamaño de camada. Mortalidad y TT de las crías (cerebro) mediante PCR (ITS1). Respuesta inmune humoral en madres	Miller et al., 2005

<sup>a</sup> Nc-1 (Dubey et al., 1988b); Nc-1SAG4<sup>+</sup> (Marugán-Hernández et al., 2011b); Nc-Liv (Barber et al., 1993; Barber et al., 1995); Nc-Nowra (Miller et al., 2002); Nc-Spain7 (Regidor-Cerrillo et al., 2008); <sup>b</sup> Extracto; <sup>c</sup> TZ o TZ/BZ inactivados; <sup>d</sup> Aislado vivo; UFC: unidades formadoras de colonia; ITS1: PCR que amplifica la región "internal transcribed spacer" 1 (Buxton et al., 1998); Nc5: PCR que amplifica un fragmento del cromosoma 5 de *N. caninum* (Müller et al., 2001)

- *Transmisión vertical*: la tasa de transmisión vertical también varía según el día de gestación en el que tiene lugar la infección. Cuando la infección tiene lugar antes de la gestación, no se detecta la presencia del parásito en el feto mediante inmunohistoquímica (Long & Baszler, 1996). Sin embargo, en los estudios donde se emplean técnicas de diagnóstico más sensibles como la PCR, se ha detectado una elevada tasa de transmisión vertical (Omata et al., 2004; Ramamoorthy et al., 2007a). Cuando la infección se produce en el día 0 de gestación, la transmisión se observa en el 100% de las camadas (López-Pérez et al., 2006), al igual que cuando la infección tiene lugar entre los días 5 y 12 de gestación, donde el 100 % de las camadas transmitieron la infección a la progenie en el día 7 post-parto (p.p.) (Quinn et al., 2002; Omata et al., 2004; López-Pérez et al., 2006). Por otro lado, cuando la infección experimental se realiza después de la mitad de la gestación, se ha detectado el ADN del parásito en un menor número de crías (Liddell et al., 1999b; López-Pérez et al., 2006) y, en algunos casos, no se observó 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). Por tanto, la tasa de transmisión vertical es más elevada cuando la infección tiene lugar antes de la mitad de la gestación y variable con posterioridad. Es importante destacar que esta transmisión vertical también varía, no solo con el periodo de gestación en que se infecta a las madres, si no con el aislado inoculado, siendo más elevada la transmisión en ratones infectados con aislados virulentos que en ratones infectados con aislados poco virulentos (Regidor-Cerrillo et al., 2010). Esta variabilidad, podría estar influenciada por la respuesta inmunitaria generada por el hospedador o por la diferente capacidad de multiplicación y diseminación intra-orgánica del parásito (Cole et al., 1995; Liddell et al., 1999b; Collantes-Fernández et al., 2012).
- *Gestaciones sucesivas*: en la infección por *N. caninum* se ha observado una disminución en el número de animales que transmiten la infección a la progenie en gestaciones sucesivas y, además, disminuye el número de crías infectadas dentro de una misma camada (Cole et al., 1995; Rettigner et al., 2004a). De hecho, en la segunda gestación, sólo el 25 % de las camadas estaba infectada y ninguna en la tercera ni la cuarta gestación, lo que podría estar relacionado con una disminución en el número de parásitos acantonados en los tejidos maternos o con la eficacia de la respuesta inmunitaria de la madre para combatir la infección (Cole et al., 1995; Omata et al., 2004). Sin embargo, estos trabajos son poco comparables entre sí, ya que los aislados utilizados fueron diferentes, no se realizó una sincronización de estro en las hembras (por lo que los partos estuvieron repartidos en el tiempo y, por tanto, la infección se produjo en diferentes periodos de gestación, que como ya hemos visto influye en la tasa de TT). Por otra parte, las crías fueron sacrificadas al nacer o a los pocos días p.p., por lo que no se pudo valorar de forma precisa la mortalidad postnatal. Finalmente, no se ha conseguido emular la TTE en un modelo murino aunque es la ruta de transmisión más común en ganado bovino (véase apartado 1.3 Transmisión). Además, no ha sido valorada

hasta la fecha la TT en generaciones sucesivas de hembras crónicamente infectadas ni de hembras congénitamente infectadas, tal y como sucede en la infección natural por *N. caninum* en el ganado bovino.

#### 2.2.1.3. Respuesta inmunitaria en ratones

Durante las etapas iniciales de la infección por *N. caninum*, los receptores Toll-Like (TLR) juegan un papel importante en el reconocimiento de moléculas asociadas al patógeno (PAMP: “pathogen-associated molecular patterns”) que no son expresadas en el hospedador, iniciándose de este modo una respuesta innata frente al parásito. En el ratón, se ha comprobado, recientemente, que la activación del receptor TLR2 y la proteína MyD88 desencadena una respuesta de tipo Th1 frente a *N. caninum* (Mineo et al., 2010). En el caso de *T. gondii*, los receptores TLR2 y TLR4 pueden ser activados por los anclajes glicosil fosfatidil inositol (“GPI anchors”) de las proteínas del parásito. Sin embargo, el receptor que genera esta primera respuesta frente a *T. gondii* es el TLR11 (Pifer & Yarovinsky, 2011). Estos receptores activan diferentes componentes de la inmunidad celular innata como las células dendríticas, las células asesinas (NK) y los macrófagos, las cuales responden liberando citoquinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y la interleuquina 12 (IL-12) que promueven la producción de IFN- $\gamma$  y de óxido nítrico (NO) (Khan et al., 1997; Baszler et al., 1999; Staska et al., 2005; Strohbusch et al., 2009b) que, junto con los linfocitos CD4+ y CD8+, intervienen en la regulación de la respuesta celular, que es crucial en la protección frente al parásito (Kasper & Khan, 1998; Nishikawa et al., 2002). En general, la resistencia a la neosporosis está asociada con citoquinas de tipo Th1 (Khan et al., 1997; Baszler et al., 1999; Staska et al., 2005), mientras que la susceptibilidad a la encefalitis está asociada con citoquinas de tipo Th2 como la interleuquina 4 (IL-4) (Long et al., 1998; Long & Baszler, 2000).

En cuanto a la respuesta humoral, los isotipos IgG2a e IgG1 se han asociado con un perfil de citoquinas de tipo Th1 (IL-12 e IFN- $\gamma$ ) y tipo Th2 (IL-4), respectivamente (Liew, 2002), de modo que los niveles de anticuerpos reflejan la producción *in vivo* de citoquinas y el tipo de respuesta inmunitaria (Hemphill et al., 2006). En ratones resistentes a la infección predomina el isotipo IgG2a, mientras que en ratones susceptibles a la misma predomina el isotipo IgG1 (Long et al., 1998; Miller et al., 2005). Por otro lado, en las fases iniciales de la infección, se han detectado mayores niveles de IgG2a que de IgG1 en ratones BALB/c y C57BL/6, mientras que, después, predominan niveles más elevados de IgG1, aunque siguen produciéndose ambos isotipos (Long et al., 1998; Collantes-Fernández et al., 2006b).

A pesar de que una respuesta inmunitaria de tipo Th1 tiene un papel protector frente a la neosporosis murina cerebral se ha sugerido que, en los animales gestantes, una respuesta de tipo Th1 podría comprometer la gestación y contribuir a la muerte del feto (Innes et al., 2002). Por

otro lado, parece que el tipo de citoquinas secretadas, como por ejemplo TNF- $\alpha$ , podría tener un papel importante en la prevención de la transmisión congénita o en la inducción de la muerte del feto (López-Pérez et al., 2010), probablemente de una forma similar a como ocurre en la infección por *T. gondii* (Roberts et al., 2001). Se ha descrito que niveles elevados de IL-4 durante la gestación pueden dar lugar a una disminución de la inmunidad mediada por células y afectar a la tasa de transmisión vertical (Quinn et al., 2004). En este sentido, Long & Baszler (2000) observaron una disminución en la transmisión vertical cuando los animales fueron infectados con una dosis sub-letal de *N. caninum* junto con la administración de un anticuerpo monoclonal frente a IL-4 antes de la gestación, e inoculados de nuevo con una dosis de un aislado virulento del parásito durante la gestación. Este estudio demostró que la modulación de las citoquinas de tipo Th2 antes de la gestación puede reducir la frecuencia de transmisión vertical de *N. caninum*. Aunque no se ha caracterizado el mecanismo exacto por el que se produce la transmisión vertical ni la respuesta inmunitaria que facilita la protección frente a la transmisión, en estudios recientes se ha visto que las células dendríticas y otros leucocitos pueden actuar como “caballos de Troya” facilitando el paso del parásito a través de la placenta (Collantes-Fernández et al., 2012).

En otros estudios, se ha observado un aumento en la producción de IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$  e IL-10 en el sobrenadante de células de bazo estimuladas con antígeno de *N. caninum* en ratones gestantes (Quinn et al., 2004) y en los niveles de IFN- $\gamma$  y de IL-4 en suero (Kano et al., 2005). Estos resultados demuestran que no se produce una polarización hacia una respuesta de tipo Th1 o Th2 durante la gestación después de la infección por *N. caninum*. Por otro lado, los niveles de progesterona aumentan durante la gestación y pueden favorecer una respuesta de tipo Th2 que permitiría el mantenimiento de la misma (Roberts et al., 2001; Entrican, 2002). En ratones tratados con progesterona, se ha observado una considerable reducción en la producción de IFN- $\gamma$  después de la infección por *N. caninum*, lo que apoya la idea de que la progesterona puede atenuar una respuesta de tipo Th1, facilitando la transmisión vertical (Kano et al., 2007). Sin embargo, estudios llevados a cabo en ratones gestantes han mostrado que tanto la inducción de una respuesta de tipo Th1 (Long & Baszler, 2000) como de tipo Th2 (Haldorson et al., 2005) pueden reducir la TT, lo que probablemente refleja la complicada naturaleza del problema. No está claro, por tanto, que un mayor grado de protección frente a la TT y el aborto se asocien, clara y constantemente, con un determinado balance Th1/Th2. Probablemente, pequeños matices en la modulación de la respuesta inmunitaria celular influenciada a su vez por un gran número de variables, puedan tener consecuencias clínicas importantes. Parece necesario por tanto, aclarar el tipo de respuesta inmunitaria asociada a la protección eficaz frente a *N. caninum*, ya que facilitaría el desarrollo de modelos experimentales para el cribado de

formulaciones vacunales, reduciendo así el uso de modelos gestantes que resultan más laboriosos y costosos.

Respecto a la respuesta inmunitaria humoral, recientemente se ha descrito un patrón de producción de IgG1 e IgG2a diferente en ratonas gestantes inoculadas con aislados de *N. caninum* de diferente virulencia. Sin embargo, los mecanismos involucrados en la generación de la distinta respuesta inmunitaria entre aislados no se han descrito aún (Regidor-Cerrillo et al., 2010). Tampoco se ha descrito si hay diferencias entre ratones inoculados con diferentes aislados respecto a la generación de anticuerpos específicos frente a determinadas proteínas de *N. caninum*.

### **2.2.2. Modelo bovino experimental**

En la neosporosis bovina, la vaca gestante constituye el animal de destino de estas formulaciones vacunales. Sin embargo, las exigencias que impone la experimentación con estos animales (elevado coste, tiempo empleado en la evaluación clínica, recogida de muestras y la dificultad de realizar un estudio exhaustivo de la infección que conllevaría un laborioso manejo de los animales y un alto número de sacrificios), hace inviable su utilización en las pruebas iniciales para elegir los mejores candidatos para desarrollar una vacuna o evaluar un tratamiento adecuado frente a la neosporosis. Al igual que ocurre en los modelos murinos, no se ha establecido un modelo estándar para la valoración de preparaciones vacunales, ya que existe una gran variedad en cuanto a dosis, aislados, tiempos de desafío empleados así como parámetros evaluados durante el ensayo que hacen difícil la comparación de resultados entre los diferentes estudios.

La infección por *N. caninum* durante la gestación y sus principales consecuencias, el aborto y la transmisión vertical, se han reproducido experimentalmente en numerosos estudios. Se ha conseguido inducir la mortalidad fetal asociada a la infección por *N. caninum* en un modelo bovino gestante, de manera altamente eficaz y reproducible inoculando por la vía i.v. un elevado número de taquizoítos ( $10^7$  -  $5 \times 10^8$ ) en el día 70 de gestación con los aislados Nc-1 o Nc-Liverpool (Williams et al., 2000; Williams et al., 2003; Macaldowie et al., 2004). Innes et al. (2001), demostraron una alta protección frente a la transmisión congénita, al inocular  $10^7$  taquizoítos de Nc-1 antes de la gestación y desafiar posteriormente en la mitad de la gestación (día 140). Si la inoculación se realiza en el último tercio de gestación (día 210), se observa una diseminación más tardía del parásito por el tejido placentario y fetal y una mayor respuesta inmunitaria celular en la placenta (Benavides et al., 2012). Sin embargo, para determinar la protección de una formulación vacunal frente a la mortalidad fetal, el desafío debería realizarse durante el primer tercio de gestación. Por el contrario, si lo que queremos es valorar la eficacia frente a la transmisión vertical, el desafío debería realizarse a mitad de gestación. Actualmente,

el modelo bovino más utilizado es el de inmunización/desafío, durante el primer tercio de gestación (Williams et al., 2007; Rojo-Montejo et al., 2009a; Caspe et al., 2012).

Hasta el momento, son numerosos los modelos experimentales que reproducen la TTE<sub>x</sub> de *N. caninum* en el ganado bovino (Innes et al., 2001; Williams et al., 2007; Rojo-Montejo et al., 2009a; Weston et al., 2012). Por otro lado, aunque la TTE<sub>n</sub> ha sido considerada como la ruta más común para la transmisión de *N. caninum* dentro del rebaño (véase apartado 1.3 Transmisión) (Trees & Williams, 2005), no ha sido posible su reproducción en modelos bovinos experimentales. En otros estudios se observó que vacas infectadas con ooquistes durante su primera gestación no da lugar a terneros infectados en gestaciones sucesivas (McCann et al., 2007). Estos experimentos sugieren que la infección post-natal de vacas adultas no conduciría al establecimiento de una infección persistente. Aunque Maley et al. (2001) encontraron evidencias indirectas de la persistencia de la infección tras la inoculación del aislado Nc-1 basadas en el perfil serológico, estas fueron similares a las observadas en ovejas tras una infección por *T. gondii* (Buxton et al., 1991). Además, se ha descrito una posible protección frente a la reinfección por *N. caninum* (inmunidad concomitante). En este sentido, Williams et al., (2003) observaron una ausencia de pérdida fetal en novillas crónicamente infectadas a las que se reinfectó durante el primer tercio de gestación, mientras que novillas primo-infectadas en el mismo momento de gestación presentaron aborto.

### **2.2.3. Otros modelos experimentales de roedores y de rumiantes**

Otros modelos que se encuentran en la literatura son los modelos de infección aguda por *N. caninum* en gerbos (*Meriones unguiculatus*) como uso alternativo al ratón (*Mus musculus*) (Gondim et al., 1999; Dubey & Lindsay, 2000; Ramamoorthy et al., 2005; Hurková-Hofmannová et al., 2007; Kang et al., 2009), así como para la producción de quistes y posterior purificación de los bradizoítos (Gondim et al., 2001).

Finalmente, los pequeños rumiantes, como la oveja, también han sido empleados para el estudio de la neosporosis (McAllister et al., 1996; Buxton et al., 1997). Estos modelos tienen la ventaja de emular de forma similar la TT presente en el ganado bovino que en el caso de modelos murinos, ya que ambas especies presentan una placenta sindesmocorial. Además, esta especie ha sido descrita como H.I. (Dubey et al., 2007) ya que se han obtenido varios aislados a partir de ovejas naturalmente infectadas (Koyama et al., 2001; Pena et al., 2007). Otras ventajas de un modelo experimental ovino son la mayor facilidad de manejo, los cortos tiempos de gestación y el relativo bajo coste de mantenimiento.

Al igual que en los modelos murinos y bovinos, la tasa de mortalidad fetal varía en función del momento de la gestación en el que se realiza la inoculación del parásito, siendo más

alta durante el primer o segundo tercio de gestación, y de la dosis inoculada (McAllister et al., 1996; Buxton et al., 1997). Sin embargo, son escasos los estudios en los que se ha empleado a la oveja como modelo animal para la evaluación de preparaciones vacunales. En uno de ellos se observó que una vacuna cuya composición incluía extracto total del aislado Nc-1 protegió frente a la mortalidad fetal pero no evitó la transmisión vertical a la descendencia (Jenkins et al., 2004). Por otra parte, O'Handley et al., (2003) obtuvieron resultados de protección parcial frente a la transmisión vertical cuando emplearon una vacuna inactivada.

### **2.3. Aproximaciones experimentales en el desarrollo de vacunas**

En la actualidad, el desarrollo de vacunas frente a la neosporosis es un campo en el que se está trabajando intensamente. En general, los resultados de protección más notables se han encontrado en los estudios de vacunación con aislados vivos atenuados de forma natural o artificial. Igualmente, se han ensayado vacunas inactivadas empleando taquizoítos o bradizoítos inactivados o extractos antigénicos de los taquizoítos de *N. caninum*. La mayoría de estos estudios han arrojado resultados negativos o ambiguos en cuanto a la protección frente a la neosporosis. Por otro lado, muchos investigadores se han centrado en el desarrollo de vacunas de nueva generación, como las basadas en diversas proteínas recombinantes. Aunque estos preparados han demostrado ser seguros, la respuesta inmunitaria que producen resulta ser insuficiente para proteger frente a la infección por *N. caninum*.

#### **2.3.1. Vacunas vivas**

El éxito de las vacunas vivas radica en que estas formulaciones permiten un adecuado procesamiento y presentación del antígeno al sistema inmunitario estimulándolo y dirigiéndolo hacia una respuesta mediada por células y proporcionando una memoria inmunológica de larga duración, ya que simula lo que acontece durante la infección natural (Innes & Vermeulen, 2006). Sin embargo, la principal desventaja del uso de este tipo de vacunas es la posibilidad de que reviertan a la virulencia.

Se han empleado diversos abordajes en la generación de vacunas vivas frente a la neosporosis como:

- La atenuación por pases sucesivos en cultivos celulares (ej. Nc-1 tras 88 pases) (Bartley et al., 2006; Bartley et al., 2008).
- La utilización de métodos físico-químicos (ej. irradiación con rayos  $\gamma$  de Nc-1) (Ramamoorthy et al., 2006).
- La mutagénesis química para seleccionar mutantes sensibles a la temperatura como Ncts-8 (Lindsay et al., 1999b).

- La obtención de parásitos atenuados naturalmente [ej. obtenidos de animales asintomáticos como Nc-SweB1 (Stenlund et al., 1997), JPA1 (Shibahara et al., 1999), Nc-Nowra (Miller et al., 2002) y aislados españoles recientemente caracterizados como Nc-Spain 1H (Rojo-Montejo et al., 2009b)].
- Recientemente, la elaboración de aislados transgénicos (ej. mutante knock-in Nc-1SAG4<sup>+</sup>, que expresan constitutivamente la proteína específica de bradizoíto NcSAG4) (Marugán-Hernández et al., 2011b)

### 2.3.2. Vacunas inactivadas

Las vacunas inactivadas presentan como ventaja, en comparación con las formulaciones vivas, un bajo riesgo de reversión a la virulencia. No obstante, la respuesta inmunitaria que inducen suele ser menos intensa y duradera, teniendo que administrarse varias dosis para conseguir una inmunización completa junto con adyuvantes que potencien de manera inespecífica la respuesta inmunitaria (Babiuk, 2002). Existen dos tipos de vacunas inactivadas en base a su composición antigénica:

- *Formulaciones con parásitos enteros*: la inactivación se ha realizado tradicionalmente mediante métodos físicos o químicos. El método de inactivación es importante ya que resulta difícil inactivar un microorganismo manteniendo intacta su antigenicidad (Babiuk, 2002). Los métodos más comunes son la inactivación por calor o por agentes químicos como los derivados de las aziridinas (Bahnmann, 1975), entre los que destaca la etilenamina binaria (BEI) que es más estable y menos tóxica y no altera los epítomos. Este agente se ha empleado para la inactivación de la única vacuna que hasta la fecha se ha comercializado frente a la neosporosis bovina -Bovilis-Neoguard® (Intervet)- capaz de reducir el porcentaje de abortos en un 61% si la vacunación se realiza tras la concepción. Sin embargo, esta vacuna no previene la TT (Romero et al., 2004; Weston et al., 2012). En la actualidad esta vacuna ha sido retirada del mercado.
- *Formulaciones con extracto proteico de N. caninum (soluble o fracciones enriquecidas)*: incluyen una mezcla compleja de antígenos. En la mayoría de las formulaciones ensayadas frente a la neosporosis se emplea como antígeno un extracto soluble de taquizoítos, obtenido tras la lisis del parásito mediante ciclos de calor/frío y sonicación (Miller et al., 2005; Williams et al., 2007; Ribeiro et al., 2009; Mansilla et al., 2012). En este extracto se encuentran gran cantidad de antígenos pero carece de proteínas insolubles, como las proteínas de superficie, que son altamente inmunogénicas y están implicadas en el proceso de adhesión del parásito a la célula hospedadora (Hemphill et al., 2006). Por último, el uso de fracciones enriquecidas en proteínas de organelas como micronemas o roptrias está

cobrando interés en el desarrollo de vacunas frente a la neosporosis. Recientemente, se ha evaluado la protección inducida frente a la infección en un modelo murino por una fracción rica en proteínas excretadas y secretadas de *N. caninum* (ESA), observándose una intensa respuesta celular asociada a una mayor susceptibilidad a la infección (Ribeiro et al., 2009).

### 2.3.3. Vacunas de nueva generación

Las investigaciones más recientes se están dirigiendo hacia el diseño de vacunas de nueva generación empleando diversos antígenos recombinantes (vacunas de subunidades), utilizando vectores como bacterias (Ramamoorthy et al., 2007c) o virus (Nishikawa et al., 2001a; Nishikawa et al., 2001c) o nuevas técnicas de adyuvantación.

Las ventajas de las vacunas de subunidades como son la seguridad, la facilidad en la producción, su alta estabilidad y fácil manejo, hacen más atractivo su desarrollo y numerosos grupos han centrado sus investigaciones en este tipo de vacunas (revisado por Reichel & Ellis, 2009; Innes et al., 2011; Monney et al., 2011a). En este momento, se están investigando numerosos candidatos vacunales siendo, la mayoría, antígenos inmunodominantes involucrados en interacciones entre los taquizoítos y la célula hospedadora, como diversas proteínas de la superficie del taquizoíto o de organelas de secreción (gránulos densos, micronemas y roptrias).

En líneas generales, la proteína de superficie NcSRS2 parece haber dado buenos resultados de protección de forma consistente en varios estudios (Cannas et al., 2003a; Vemulapalli et al., 2007; Tuo et al., 2011). Diversas proteínas de micronemas han sido, igualmente, testadas con resultados negativos en cuanto al grado de protección (Cannas et al., 2003b; Alaeddine et al., 2005; Srinivasan et al., 2007), aunque en algunos casos se ha encontrado una reducción significativa de la carga parasitaria en los animales vacunados o en sus crías (Alaeddine et al., 2005; Debache et al., 2009; Monney et al., 2011b). En cuanto a las proteínas de gránulos densos, se han probado algunas como NcGRA2, NcGRA6 y NcGRA7 han inducido protección y reducción parcial de la carga parasitaria (Jenkins et al., 2004; Cho et al., 2005; Ramamoorthy et al., 2007b; Vemulapalli et al., 2007) destacando, en uno de los estudios, la combinación NcSRS2-NcGRA7 como la combinación que mostró mejores resultados (Cho et al., 2005). Sin embargo, NcGRA7 en otros casos no confirió protección frente a *N. caninum* aunque sí fue capaz de inducir una intensa respuesta humoral y celular. En este mismo estudio, la eficacia de la proteína específica del estadio de bradizoíto NcSAG4 fue también evaluada, obteniéndose una ligera mejoría en cuanto al retraso observado en la mortalidad de las crías. La mezcla de ambas proteínas redujo la carga parasitaria en cerebro y pulmón de hembras no gestantes (Aguado-Martínez et al., 2009a). Recientemente, se ha valorado la proteína de roptrias NcROP2, la cual redujo la mortalidad en el modelo cerebral y, aunque no protegió frente a la transmisión vertical, sí que redujo la carga parasitaria en las crías en el modelo gestante

(Debache et al., 2008; Debache et al., 2009). Por otro lado, no existe consenso en cuanto a si la inmunización con las proteínas recombinantes, en lugar de con su secuencia de ADN (vacunas de DNA), arroja o no mejores resultados (Cannas et al., 2003a; Alaeddine & Hemphill, 2004; Srinivasan et al., 2007).

En cuanto a la respuesta inmunitaria generada por este tipo de vacunas, los resultados son bastante confusos y discrepantes. Algunos autores describen una ausencia de reconocimiento antigénico de la proteína nativa en el taquizoito tras inmunizar con la versión recombinante (Cannas et al., 2003a; Aguado-Martínez et al., 2009a) pese a obtener resultados de protección parcial (Ellis et al., 2008). En otros estudios se asocia una mayor protección con una respuesta inmunitaria celular predominante Th1 (Nishikawa et al., 2009) o Th2 (Haldorson et al., 2005), o se asocia el fracaso en la protección con una respuesta predominante Th1 (Vemulapalli et al., 2007). Sin embargo, casi todos los autores coinciden en la importancia del adyuvante elegido (véase apartado 2.4 Sistemas de adyuvantación) siendo, a veces, determinante para obtener buenos resultados de eficacia (Jenkins et al., 2004; Nishikawa et al., 2009; Debache et al., 2010; Rojo-Montejo et al., 2011a). En ocasiones, la combinación de varias proteínas a la vez ha permitido obtener una mayor protección que con cada proteína por separado (Cho et al., 2005; Debache et al., 2009).

#### **2.4. Sistemas de adyuvantación**

Los adyuvantes son compuestos que se añaden a las formulaciones vacunales con el fin de intensificar o modular la respuesta inmunitaria del hospedador frente al antígeno administrado. La elección de un adyuvante adecuado se debe realizar teniendo en cuenta la naturaleza del antígeno así como la vía de administración. Los adyuvantes determinan la magnitud, el tipo y la duración de la respuesta inmunitaria efectora mediante mecanismos que incluyen la presentación del antígeno y su distribución tisular, así como la fagocitosis y la digestión enzimática de la molécula (Heldens et al., 2008). Los diferentes mecanismos de acción de estas sustancias han sido extensamente revisados (Aucouturier et al., 2001; Schijns, 2001; Degen et al., 2003; Schijns, 2003; Singh & O'Hagan, 2003). Sin embargo, los mecanismos exactos que inducen esta modificación en la respuesta inmunitaria no se conocen completamente. Los adyuvantes pueden clasificarse según su mecanismo de acción en tres grupos:

- Un primer grupo integrado por aquellos que tienen capacidad para formar un depósito o reservorio que permite la liberación lenta del antígeno, protegiéndolo de una degradación rápida y proporcionando un estímulo inmunogénico prolongado.

- Un segundo grupo compuesto por partículas fácilmente fagocitables, que incorporan el antígeno actuando como vehículo, permitiendo que las células presentadoras de antígeno lo atrapen y procesen de forma más eficiente que el antígeno libre.
- El tercer grupo de adyuvantes lo forman aquellos con capacidad de inmunomodulación, induciendo la síntesis de citoquinas por parte del animal vacunado.

Además, se pueden obtener adyuvantes más potentes a partir de las combinaciones de los mencionados anteriormente. Un ejemplo es el adyuvante completo de Freund formado por una emulsión oleosa, que actúa como depósito, y bacterinas de *Mycobacterium tuberculosis*, que se comportan como activadores de los macrófagos y de las células dendríticas. La influencia de los adyuvantes en la protección inducida por vacunas inactivadas o de nueva generación frente a protozoos apicomplejos es bien conocida (McLeod et al., 1985; Daly & Long, 1996; Rafi-Janajreh et al., 2002). En el caso particular de *N. caninum*, aunque son escasos los estudios que comparan la eficacia protectora entre los diferentes adyuvantes frente a la infección por este parásito, muchos ensayos de vacunación han mostrado que la capacidad protectora de las formulaciones elaboradas a partir de extracto de taquizoítos depende, fundamentalmente, del adyuvante con el que se combine (Andrianarivo et al., 1999; Rojo-Montejo et al., 2011a). Los adyuvantes utilizados recientemente para la vacunación frente a la neosporosis están resumidos en la Tabla 5 y en la Tabla 6.

### **2.5. Uso de la nanotecnología para el desarrollo de adyuvantes de nueva generación**

En la actualidad, se está investigando el papel de nuevos adyuvantes e inmunoestimuladores que resulten más seguros y eficaces frente a la infección por *N. caninum* (Debache et al., 2011b; Arranz-Solís et al., 2012). Este es el caso de la nanoencapsulación de antígenos que permiten la liberación lenta de éstos y favorecen una buena respuesta inmunitaria, no solo de tipo humoral sino también celular.

La nanotecnología se empezó a introducir en formulaciones farmacéuticas durante la década de los 70 (Birrenbach & Speiser, 1976). La correlación existente entre nanomateriales sintéticos y estructuras biológicas permite unas interacciones únicas, sobre todo debidas a un tamaño similar, que no se observan con materiales clásicos de mayores dimensiones. Estas interacciones permiten tanto el transporte de sustancias a través de mucosas como la habilidad, para atravesar barreras como la hemato-encefálica (Singh et al., 2011). Así pues, la nanomedicina diseña y evalúa sistemas complejos, a escala nanométrica, formados por al menos dos componentes, uno de los cuales es el principio activo o molécula biológicamente activa, y el segundo es el propio sistema que permite una función especial relacionada con el diagnóstico, tratamiento, o prevención de una enfermedad.

**Tabla 5:** Adyuvantes clásicos utilizados recientemente en vacunas frente a *N. caninum*.

<b>Adyuvante</b>	<b>Antígeno</b>	<b>Modelo</b>	<b>Vía</b>	<b>Observaciones</b>	<b>Referencia</b>
<b>Freund's</b>	Nc-1 <sup>b</sup>	Murino no gestante	i.p.	Supervivencia del 66% de animales infectados. Mayor respuesta IgG1 tras el desafío que grupo control sin antígeno	Debache & Hemphill, 2012a
	rNcSRS2	Bovino de primo-infección	i.m.	Con GM-CSF <sup>d</sup> y Flt3L <sup>c</sup> no se induce la activación de linfocitos T ni la producción de IFN- $\gamma$	Baszler et al., 2008
	NcROP2	Murino no gestante	i.m. <sup>c</sup>	Aumento respuesta inmune humoral y celular (Th1) al inmunizar con la proteína recombinante junto al adyuvante. Reducción del 75% de la carga en este grupo respecto a controles adyuvantes. Esta reducción fue mayor en el grupo inmunizado con saponinas como inmunoestimulador (Tabla 6)	Zhao et al., 2009 Debache et al., 2008
<b>Havlogen</b>	NcBPA1 <sup>b</sup>	Bovino de primo-infección	s.c.	Aunque se indujo una respuesta proliferativa en linfocitos no indujo respuesta humoral ni producción de IFN- $\gamma$ mayor que el grupo control	Andrianarivo et al., 1999
	Bovilis-Neoguard <sup>®</sup>	Bovino gestante (estudio de campo)	s.c.	Se observó una protección parcial frente al aborto del 46% en vacas infectadas naturalmente	Romero et al. 2004
<b>Poligen<sup>®</sup></b>	NcBPA1 <sup>b</sup>	Bovino gestante	s.c.	Indujo mayor respuesta inmune al comparar con el adyuvante Havlogen. Sin embargo, no generó protección frente a la infección fetal tras el desafío	Andrianarivo et al., 2000
	rNcSAG1 rNcSRS2 Nc-1 <sup>b</sup>	Murino no gestante	i.p. i.m. <sup>c</sup>	Protección 100% frente a la aparición de signos clínicos pero reducida disminución de la carga parasitaria en todos los grupos siendo algo mayor en el grupo con la combinación vacuna DNA/ vacuna recombinante	Cannas et al., 2003a
<b>RIBI</b>	rNcMIC3	Murino no gestante	i.p.	Reducción del 75% de ratones positivos por PCR a <i>N. caninum</i> , así como de la carga parasitaria en animales infectados. Estos resultados fueron confirmados por inmunohistoquímica.	Cannas et al., 2003b
	rNcMIC1	Murino no gestante	i.p. i.m. <sup>c</sup>	Protección del 100% frente a la aparición de signos clínicos en los grupos vacunados. Se detectó parásito en el 100% de las muestras aunque hubo una reducción de la carga en los grupos vacunados con la proteína recombinante sola.	Alaeddine et al. 2005
<b>Titermax Gold<sup>®</sup></b>	rNcGRA7 rNcSAG4	Murino gestante	s.c.	rNcGRA7 no protegió pero se indujo una fuerte respuesta inmune humoral y celular y se observó un menor número de madres positivas. En la mezcla de antígenos se vio una ligera reducción de la transmisión vertical, así como una mejora en la supervivencia de crías con rNcSAG4.	Aguado-Martínez et al., 2009a
	Nc-Nowra <sup>a</sup>	Bovino gestante	i.v.	No protegió frente a la mortalidad fetal tras el desafío a día 70 de gestación	Williams et al., 2007
<b>VSA-3</b>	rNcGRA1 rNcGRA2	Murino gestante	s.c.	Se observó una reducción de la TT de casi un 20% en el grupo inoculado con el extracto de Nc-Nowra y de un 90% con el aislado vivo.	Ellis et al., 2008
	rNcMIC10 rNcp24B	Murino gestante	s.c.	Sólo la mezcla rNcMIC10+rNcp24B indujo protección parcial frente a la TT (33%)	
	NcNowra <sup>a,b</sup>				

<sup>a</sup> Aislado vivo

<sup>b</sup> Extracto soluble

<sup>c</sup> Vacuna DNA

<sup>d</sup> Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

<sup>e</sup> Tirosin-quinasa fetal 3

Tabla 6: Inmunoestimuladores utilizados recientemente en vacunas frente a *N. caninum*.

Ayuvante	Antígeno	Modelo	Vía	Observaciones	Referencia	
<b>Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	Nc-1 <sup>b</sup>	Murino no gestante	s.c.	Aunque hubo una alta respuesta tras la segunda inmunización hubo una menor producción de IgG2a que con otros adyuvantes	Mansilla et al., 2012	
	Nc-Spain1H <sup>a</sup>	Murino no gestante	s.c.	Junto con saponinas hubo una disminución de la parasitemia (f. aguda) y no protección en crónica.	Rojo-Montejo et al., 2011a	
	TZ <sup>b</sup>	Nc-Spain7	s.c.	Con saponinas mas extracto TZ-BZ se disminuyó el tiempo de supervivencia y aumentó la TT a las crías (exacerbación de la neosporosis cerebral).	Rojo-Montejo et al., 2011b	
	TZ-BZ <sup>b</sup>			Reducción de carga parasitaria y de lesiones en fase crónica.	Rojo-Montejo et al., 2011a	
<b>CpGs<sup>d</sup></b>	rNcCyp <sup>e</sup>	Murino no gestante	s.c.	Hubo una producción de anticuerpos específicos y además una menor detección del parásito en cerebro (86.4%-60%).	Tuo et al., 2011	
	rNcSRS2	Murino gestante	i.m. <sup>e</sup>	83% reducción DNA del parásito en crías. Mayor protección con CpG que frente a la proteína sola.	Jenkins et al., 2004	
	NcGRA7	Murino no gestante	s.c.	+ AIO <sub>3</sub> se observó una disminución de la parasitemia en fase aguda pero sin protección en fase crónica.	Rojo-Montejo et al., 2011a	
	TZ <sup>b</sup>	Nc-Spain7	s.c.	+ AIO <sub>3</sub> + TZ: no se observó protección	Rojo-Montejo et al., 2011b	
TZ-BZ <sup>b</sup>	Pero + AIO <sub>3</sub> + TZ-BZ: se observó además una exacerbación de la neosporosis cerebral en crías			Rojo-Montejo et al., 2011b		
<b>Saponinas</b>	rNcROP2	Murino no gestante	i.p.	100% reducción de morbilidad y 93% reducción de la carga parasitaria.	Debache et al., 2008	
	rNcMIC3	Murino no gestante	i.p.	En la mezcla NcROP2+NcMIC1+NcMIC3 se observó una reducción carga parasitaria aunque hubo una TT del 100% en las crías	Debache et al., 2009	
	rNcMIC1			50% } 20% } 70% }	de reducción en la carga parasitaria en cerebro	Debache et al., 2010
	rNcROP2					
	rNcMAG1	Murino no gestante	i.p.	Se observó un 100% de supervivencia con la construcción MIC3-MIC1-ROP2 y una reducción significativa de la carga parasitaria en el modelo no gestante. Sin embargo, no protegió frente a la TT a las crías en el modelo gestante.	Monney et al., 2011b Monney et al., 2012	
	rNcPDI					
rNcROP2	Murino no gestante	i.p.	Supervivencia del 55% de animales infectados, inferior que con adyuvante Freund. Mayor respuesta IgG totales tras el desafío que con Freund	Debache & Hemphill, 2012a		
<b>SclL<sup>e</sup></b>	Nc-1 <sup>b</sup>	Murino no gestante	s.c.	Tasas de supervivencia del 70-80% y una reducción de la carga parasitaria en los grupos en los que el inmunoestimulador fue utilizado. Además se indujo una respuesta humoral y celular alta en estos grupos.	Cardoso et al., 2012	
	Nc-1 <sup>b</sup>	Murino no gestante	i.n.	10% } 90% } 60% }	Debache et al., 2010	
<b>Toxina colérica A<sub>2</sub>/B</b>	rNcMAG1	Murino no gestante	i.n.	de reducción en la carga parasitaria en cerebro	Debache et al., 2010	
	rNcROP2					
	rNcPDI					

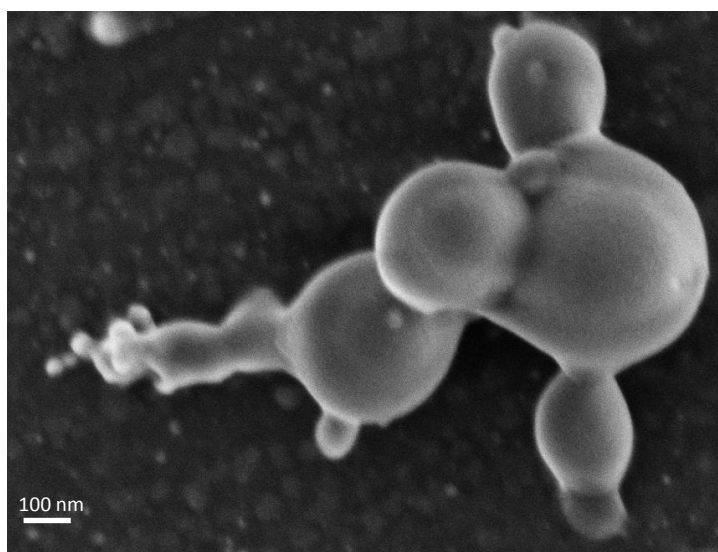
<sup>a</sup> Aislado vivo atenuado<sup>b</sup> Extracto soluble<sup>c</sup> Vacuna DNA<sup>d</sup> Inmunoestimulante formado por oligonucleótidos<sup>e</sup> Lectina de *Synadenium carinatum*

Cuando la molécula activa se administra bajo forma de nanopartículas, son las propiedades físico-químicas de éstas (tamaño, características superficiales) las que condicionan la distribución del fármaco en el organismo y su concentración en su lugar de acción. El hecho de poder concentrar el fármaco en su lugar de acción o de absorción ofrece la posibilidad de minimizar los efectos secundarios y aumentar el índice terapéutico de la molécula en cuestión (Irache, 2008; Irache et al., 2011).

Dentro de la nanomedicina se encuentran una gran cantidad de compuestos diferentes, donde se diferencian las nanopartículas poliméricas (Figura 4; Tabla 7), los liposomas o las micelas poliméricas. El rango de tamaño de estas partículas está comprendido desde un nanómetro hasta varios cientos de nanómetros (Murthy, 2007).

La utilización de estas nanopartículas, en tratamientos o como adyuvantes, aporta una serie de ventajas respecto a los tratamientos más convencionales:

- capacidad para proteger la molécula encapsulada frente a su eventual degradación desde el momento de la administración en el sujeto hasta que alcanza su lugar de acción o absorción
- capacidad para atravesar las barreras biológicas como la piel, las mucosas gastrointestinal o respiratoria o, también, la barrera hemato-encefálica
- capacidad para alcanzar el órgano, tejido o grupo celular diana donde la molécula debe ejercer su acción
- capacidad para alcanzar compartimentos intracelulares
- capacidad para controlar la liberación de la molécula activa en su lugar de acción o absorción



**Figura 4:** Fotografía de nanopartículas poliméricas de poli-ε-caprolactona obtenidas por microscopía electrónica de transmisión.

### ***2.5.1. Nanopartículas en la elaboración de vacunas para la prevención de enfermedades parasitarias***

La utilización de la nanotecnología en el caso de los parásitos ha tenido como objetivo la administración sistémica de fármacos frente infecciones graves tales como la leishmaniosis visceral o la malaria. En general tanto los liposomas como las nanopartículas poliméricas han demostrado ser más eficaces con respecto al fármaco libre en el tratamiento de este tipo de infecciones (Tripathy et al., 2012; Van de Ven et al., 2012).

Cuando estos dispositivos a escala nanométrica son utilizados para el desarrollo de formulaciones vacunales suelen combinarse con moléculas de origen biotecnológico, incluyendo péptidos, proteínas, oligonucleótidos, plásmidos, etc. Estas moléculas, activas por sí solas, pueden ser muy sensibles a la degradación físico-química y enzimática, se muestran incapaces de atravesar barreras biológicas (mucosas) y, además, en algunos casos deben alcanzar compartimentos celulares muy precisos para poder ejercer su acción. Además, estos antígenos suelen ser menos inmunogénicos que su correspondiente extracto inactivado completo. Por todo ello, su inclusión en nanopartículas ofrece posibilidades interesantes para su administración de forma segura y eficaz (Wei et al., 2007).

Por otra parte, las nanopartículas pueden utilizarse como base para el diseño de sistemas farmacéuticos que imiten el comportamiento de ciertos microorganismos. Con este abordaje se busca mimetizar las estrategias desarrolladas por ciertas bacterias, virus o parásitos a lo largo de su evolución para evitar los mecanismos de defensa del organismo y/o colonizar de forma específica determinados tipos de tejidos o células. Estas nanopartículas biomiméticas pueden ser de gran utilidad para el desarrollo de nuevos adyuvantes que permitan la puesta a punto de nuevas vacunas y nuevos tratamientos de inmunoterapia [ej. nanopartículas de poli (anhídrido) tapizadas con flagelinas derivadas de *Salmonella enteridis* o con lipopolisacáridos de *Brucella ovis*, resultaron ser absorbidas en mayor medida por la vía oral que por la subcutánea y son capaces de inducir una respuesta inmunitaria humoral equilibrada (Salman et al., 2008; Salman et al., 2009). Esta aproximación también ha sido evaluada en el caso de algunos tratamientos o vacunaciones frente a infecciones víricas (Lee & Wang, 2006)].

**Tabla 7:** Tipos de polímeros y métodos de formulación de nanopartículas (adaptado de Irache et al. 2011)

Tipo	Polímero	Ventajas	Desventajas	Métodos de formulación
<b>Poli (esters)</b>	Poli-ε-caprolactona (PCL)	Biocompatible y biodegradable Apropiado para liberación a largo plazo Bajo coste	Ausencia de grupos funcionales Hidrofóbico	Nanoprecipitación Emulsión- evaporación de solventes (también para la formación de copolímeros anfífilos: PEG-PLGA, PEG-PCL, PEG-PACA)
	Poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA)	Biodegradable Excelente compatibilidad con tejidos	Baja deformación al romperse Alto coste Ausencia de grupos funcionales Generación de pH ácido durante la degradación Ausencia de grupos funcionales	“Salting out” (precipitación salina)
	Poli (ácido láctico) (PLA)	Excelente compatibilidad con tejidos	Hidrofobicidad: la suspensión coloidal puede ser un problema	
<b>Poli (cianocrilatos)</b>	Poli (alquianocrilato) (PACA)	Biocompatible Rápida degradación <i>in vivo</i>	Necesario un pH bajo para su formulación Citotoxicidad	Emulsión- evaporación de solventes (formación de copolímeros anfífilos: PEG-PACA )
	Poli (metilvinilether -co- maléico anhídrido) (PVM/MA; Gantrez®)	Posee grupos funcionales Excelentes propiedades muco/bioadhesivas	Baja capacidad para admitir grupos hidrofóbicos en su formulación Restringido a su administración vía mucosas	Desolvatación
<b>Polisacáridos</b>	Quitosano	Biocompatible y biodegradable Excelentes propiedades muco/bioadhesivas	Necesario un pH bajo para su formulación	Formación de complejos polielectrolíticos Gelificación iónica
	Albumina sérica humana (HAS)	Biodegradable No tóxico La carga de fármacos se produce por adsorción electrostática	Dificultad para su purificación y producción a gran escala Baja estabilidad en fluidos biológicos	Coacervación

PEG: Poli (etilen glicol)

En el caso de las formulaciones vacunales frente a la neosporosis, las nanopartículas poliméricas han tenido un menor uso y desarrollo que los liposomas (Nishikawa et al., 2009; Zhang et al., 2010), o los ISCOMs (“immune stimulating complex”, formulados a partir de glicoproteínas, colesterol, fosfatidilcolina y saponinas) (Pinitkiatisakul et al., 2007a; Moore et al., 2011; Mansilla et al., 2012). Existen formulaciones con partículas poliméricas que han demostrado una actividad prometedora en modelos murinos como es el caso de los nanogeles formulados a partir del polisacárido quitosano (Debache et al., 2011b), así como los antígenos encapsulados en nano/micropartículas formados a partir de polímeros o proteínas (Arranz-Solís et al., 2012).

En otros casos se ha conseguido encapsular con cierto éxito proteínas recombinantes como NcGRA7 en polímeros comerciales como Gantrez<sup>®</sup> (Aguado-Martínez et al., 2006), aunque su eficacia como vacuna no ha sido probada hasta la fecha. En la Tabla 8 se encuentran detallados los últimos experimentos en los que se ha investigado el potencial de diferentes nanopartículas como adyuvantes frente a la neosporosis.

## 2.6. Vías de administración

El lugar del organismo en el que se deposita la vacuna va a determinar la perfusión de esta a través de la circulación sanguínea o linfática, alcanzando los órganos linfoides secundarios y, por tanto, determinando la respuesta inmunitaria que se desarrollará tras la inmunización (Johansen et al., 2010). En protozoosis como la leishmaniosis, la relevancia de la vía de administración se ha demostrado en diversos experimentos. La vacunación con parásitos vivos por vía subcutánea (s.c.) favoreció un mayor reclutamiento de linfocitos CD4<sup>+</sup> en el sitio secundario de infección y la eliminación del parásito de manera más eficaz que la vía intradérmica (i.d.) (Tabbara et al., 2005). A su vez, la vía intramuscular (i.m.) y la i.d. han sido las vías de elección para las vacunas DNA ya que permiten una mayor transfección de las células somáticas que por otras vías de inoculación. Sin embargo, la vía i.d. ha demostrado ser más eficiente en el desarrollo de una inmunidad de larga duración que las vías i.m. y s.c., permitiendo una disminución de la dosis antigénica (Méndez et al., 2002).

En el caso de *N. caninum*, la mayoría de los ensayos de vacunación han empleado las vías intravenosa (i.v.) o la s.c. en bovinos y las vías intraperitoneal (i.p.) y la vía s.c. en modelos murinos, pero los efectos de este factor sobre el nivel y el tipo de respuesta inmunitaria generada, con el consiguiente impacto sobre la infección, han sido poco estudiados. Las últimas investigaciones en este campo están probando nuevas vías como la inoculación intra-nasal (i.n.) que permitiría una mayor absorción estimulando la respuesta humoral y celular en mucosas y mejorando los resultados respecto a la inoculación i.p. (Debache et al., 2010).

**Tabla 8:** Nanopartículas utilizadas en vacunas frente a la neosporosis.

<b>Adyuvante</b>	<b>Antígeno</b>	<b>Modelo</b>	<b>Vía</b>	<b>Observaciones</b>	<b>Referencia</b>
	rNcGRA7	Murino gestante	s.c.	68.6% de crías supervivientes. 33% de protección en madres.	Nishikawa et al., 2009
<b>Liposomas</b>	rNcAMA1	Murino gestante	s.c.	Producción específica de IFN- $\gamma$ frente a rNcAMA1 y N. <i>caninum</i> Supervivencia del 60% en las crías (17,5% en grupo control)	Zhang et al., 2010
	rNcSRS2	Murino no gestante	s.c.	Reducción de la carga parasitaria en cerebro Mayor producción de IFN- $\gamma$ e IL-4	Pinitkiatisakul et al., 2007a
		Murino no gestante	s.c.	Reducción del periodo de parasitemia y disminución de la carga parasitaria en grupos vacunados	Pinitkiatisakul et al., 2007b
<b>ISCOMS</b>	Nc-1 <sup>a</sup>	Murino no gestante	s.c.	Aumento de la respuesta Th2 tras el desafío Reducción de la carga parasitaria comparado con el grupo control	Mansilla et al., 2012
	Nc-1 <sup>a</sup>	Bovino	s.c.	Mayor IgG1/IgG2a ratio que en el grupo sin adyuvante. Mayor respuesta celular (IFN- $\gamma$ ) tras el desafío que grupos no adyuvantados	Moore et al., 2011
<b>Nanogeles de quitosano</b>	rNcPDI	Murino no gestante	i.p.	Con saponinas como inmunostimulante: reducción de la mortalidad en un 60-80%	
			i.n.	Con toxina colérica como inmunostimulante: reducción de la mortalidad en un 90-100% y reducción de la carga parasitaria.	Debache et al., 2011b
<b>PLGA</b>				Todos las formulaciones con polímeros estimularon una respuesta inmune humoral (IgG1)	
<b>PCL</b>	NcSpain7 <sup>b,c</sup>	Murino no gestante (solo fase inductora)	s.c.	La mejor combinación fue PLGA-Taquizoitos liofilizados en cuanto a estimulación de la respuesta inmune celular	Arranz-Solis et al., 2012
<b>Zelma</b>					

<sup>a</sup> Extracto soluble

<sup>b</sup> Taquizoitos liofilizados

<sup>c</sup> Extracto total

Recientemente, se ha investigado la vía intra-cisternal (i.c.) para la inoculación de proteínas recombinantes de *N. caninum*, obteniéndose mejores resultados de protección frente a la neosporosis cerebral en ratón con respecto a la vía clásica i.p. (Debache & Hemphill, 2012a). Sin embargo, esta vía de administración no es viable en la práctica debido a la necesidad de emplear anestésicos, que incrementarían el coste, y la posibilidad de complicaciones durante la administración de la vacuna.



### 3. Justificación y objetivos

La neosporosis es una de las principales enfermedades productoras de aborto en el ganado bovino y el control debe ir encaminado, fundamentalmente, a reducir la prevalencia de la infección en las explotaciones, evitando el fallo reproductivo, y a prevenir su propagación a otras. En este sentido, Reichel & Ellis (2006) han señalado que la inmunoprofilaxis debe ser la principal medida de control a poner en marcha en las explotaciones bovinas teniendo en cuenta el binomio coste-beneficio. El desarrollo de vacunas de subunidades para la prevención de la infección, el aborto o la transmisión vertical de la infección, basadas en los antígenos de *N. caninum*, podría ofrecer nuevas herramientas para el control de la misma. Las futuras investigaciones deberían orientarse, por un lado, al estudio de nuevas proteínas de *N. caninum*, entre ellas las proteínas específicas del estadio del bradizoíto. Su posible implicación en los mecanismos de conversión taquizoíto-bradizoíto, durante la cronificación de la infección, o durante la recrudescencia, las convierte en posibles candidatos vacunales. Por otro lado, se requiere una mayor profundización en los mecanismos de la respuesta inmunitaria asociada a la protección, así como la valoración de nuevos sistemas de adyuvancia. Además, contar con un buen modelo experimental en el que poder valorar la eficacia de dichas formulaciones vacunales resulta de gran importancia. En este sentido, el modelo murino es un recurso ampliamente utilizado para el cribado de formulaciones vacunales antes de su utilización en la especie de destino (Reichel & Ellis, 2009).

Las cuatro proteínas seleccionadas para el desarrollo de la presente tesis doctoral están involucradas en dos procesos claves del ciclo biológico del parásito dentro del hospedador intermediario: el ciclo lítico (NcGRA7) y la persistencia del parásito en el hospedador (NcSAG4, NcBSR4 y NcSRS9). El conocimiento de los mecanismos moleculares y celulares implicados en ambos procesos es de gran interés de cara al desarrollo y mejora del control de la neosporosis y, en especial, de la inmunoprofilaxis. En este sentido, no se conocen con exactitud los factores de virulencia de *N. caninum*, así como los mecanismos dependientes del parásito y del hospedador para la generación de una respuesta inmunitaria eficaz. El interés por estas cuatro proteínas tiene su origen en los estudios previos llevados a cabo en el grupo de investigación SALUVET, así como en otros grupos dedicados tanto al estudio de *N. caninum* (Liddell et al., 2003; Jenkins et al., 2004; Jongert et al., 2007; Vemulapalli et al., 2007; Hiasa et al., 2012) como de *T. gondii* (Kim & Boothroyd, 2005; Kim et al., 2007; Van et al., 2007).

NcGRA7 fue descrita como el principal antígeno inmunodominante (fracción proteica p17) siendo reconocida por bovinos infectados naturalmente (Álvarez-García et al., 2006; Álvarez-García et al., 2007). NcGRA7 es una proteína de gránulos densos que se expresa tanto en taquizoítos como en bradizoítos y que se secreta a la vacuola parasitofora tras la invasión de la célula hospedadora. Su función está relacionada con la maduración y modificación de la

vacuola parasitófora y, posiblemente, dirige la adaptación del parásito a las nuevas condiciones intracitoplasmáticas y las interacciones con la célula hospedadora (Hemphill et al., 1998). Además, esta proteína es altamente inmunogénica y ha arrojado resultados prometedores en cuanto a inmunidad protectora en ratones (Jenkins et al., 1997; Lally et al., 1997; Jenkins et al., 2004; Nishikawa et al., 2009). Además, se ha comprobado su implicación en la invasión de células hospedadoras (Aguado-Martínez et al., 2010).

NcSAG4 es también una proteína inmunogénica. El interés de dicha proteína radica en que fue la primera proteína identificada del bradizoíto. Los primeros estudios de caracterización demostraron su expresión específica en este estadio aunque la colocalización de NcSAG4 y NcSAG1 en algunas vacuolas parasitóforas *in vitro*, así como el incremento temprano de los niveles de ARN de transcripción durante el proceso de conversión a bradizoíto, sugirieron que NcSAG4 podría ser una proteína de expresión temprana durante la conversión (Fernández-García et al., 2006). En un estudio, en el que se obtuvo un aislado modificado genéticamente que expresaba constitutivamente esta proteína (Nc-1SAG4<sup>+</sup>), se vio que la persistencia de *N. caninum* en el hospedador se reducía (Marugán-Hernández et al., 2011b). Además el empleo de este aislado como vacuna viva protegió al 89% de las crías frente a la transmisión vertical en un modelo murino gestante (Marugán-Hernández et al., 2011c). Sin embargo, es posible que la baja virulencia de este aislado transgénico se debiera a la inserción al azar del plásmido en una zona del genoma implicada en virulencia durante la manipulación genética del mismo, reduciendo la habilidad de éste para invadir las células del hospedador.

Ambas proteínas, rNcGRA7 y rNcSAG4, fueron utilizadas en una prueba serológica capaz de diferenciar entre primoinfección, infección crónica y reactivación en ganado bovino natural y experimentalmente infectado (Aguado-Martínez et al., 2008). Por otro lado, ambas son proteínas muy inmunogénicas que inducen niveles de anticuerpos específicos en ratones infectados con distintos aislados (Aguado-Martínez et al., 2009b).

Por otra parte, las otras dos proteínas, NcBSR4 y NcSRS9, son exclusivas de la fase de bradizoíto. En sus respectivos estudios de caracterización, se comprobó que su expresión era tardía ya que solo se detectaban en quistes tisulares maduros de animales naturalmente infectados. Por otro lado, en estudios de conversión *in vitro* de bradizoítos, apenas fueron detectadas, al igual que se observaron bajos o nulos niveles de ARN de transcripción (Risco-Castillo et al., 2007; Risco-Castillo et al., 2011). En *T. gondii*, estas proteínas han sido relacionadas con la capacidad del parásito para persistir en tejidos del hospedador. En sendos experimentos, TgSRS9 demostró ser importante para la persistencia y el control de la replicación del parásito en el intestino del hospedador (Kim & Boothroyd, 2005; Kim et al., 2007). Por todo ello, el interés de dichas proteínas para su uso en una formulación vacunal

radica en la posibilidad de bloquear la cronificación de la infección en el hospedador, evitando así una posible reactivación de la infección y bloqueando la ruta de infección más común en el ganado bovino: TTE<sub>n</sub>.

Por todo ello, los objetivos que se plantean en la actual tesis son los siguientes:

**Objetivo 1:** desarrollo de vacunas basadas en la utilización de proteínas NcGRA7, NcSAG4, NcBSR4 y NcSRS9 junto con el empleo de nuevos sistemas de formulación basados en la nanoencapsulación.

◇ **Subobjetivo 1.1. (Capítulo II):** Determinación de la posible implicación de estas cuatro proteínas en la generación de la respuesta inmunitaria en el hospedador y su posible correlación con parámetros de virulencia (Pereira García-Melo et al., 2010; Regidor-Cerrillo et al., 2010; Regidor-Cerrillo et al., 2011).

◇ **Subobjetivo 1.2. (Capítulo III):** Evaluación de la eficacia protectora de dichas proteínas encapsuladas en polímeros de poli- $\epsilon$ -caprolactona en un modelo murino gestante. Mencionar que rNcGRA7 y rNcSAG4, junto con un adyuvante clásico, fueron empleadas en una prueba vacunal anterior no obteniéndose buenos resultados de eficacia, aunque alguno de ellos fue prometedor (elevada respuesta humoral y celular con rNcGRA7, retraso en la mortalidad de las crías con rNcSAG4 y menor carga parasitaria en cerebro y pulmón de hembras inmunizadas con la mezcla de ambas proteínas) (Aguado-Martínez et al., 2009a).

**Objetivo 2:** Desarrollo de un nuevo modelo murino de reactivación a partir de una infección crónica o congénita. Este modelo podría ser muy útil para valorar con mayor precisión en un futuro la eficacia protectora de antígenos frente a la TTE<sub>n</sub>. Para ello se plantearon dos posibles alternativas:

◇ **Subobjetivo 2.1. (Capítulo IV):** Desarrollo de un modelo empleando hembras crónicamente infectadas con dos aislados de alta y de moderada-baja virulencia. El desarrollo de la infección y la transmisión a la descendencia fue evaluada en tres generaciones consecutivas.

◇ **Subobjetivo 2.2. (Capítulo V):** Estudio de la infección y transmisión a la descendencia en tres generaciones consecutivas comenzando por un modelo de primoinfección con dos aislados de moderada-baja virulencia. En las hembras congénitamente infectadas (2<sup>a</sup> generación) se estudió la posible reactivación de la infección y posterior transmisión transplacentaria a la descendencia (3<sup>a</sup> generación).



#### 4. Justification and objectives

Neosporosis is considered to be one of the main infectious causes of abortions in cattle and the control measures should be focused on the reduction of prevalence within the herd, avoiding the reproductive failure and the spread to others. Reichel & Ellis (2006) suggested the immunoprophylaxis as the main control measure in farms taking into consideration the cost-profit balance. The development of subunit vaccines for the prevention of the infection, abortion or vertical transmission, based on *N. caninum* antigens, is a feasible tool for the control of neosporosis. Future approaches should be focussed on the study of new *N. caninum* proteins, especially those bradyzoite-stage specific proteins, due to their involvement in tachyzoite-bradyzoite conversion during chronic phase and during reactivation of the infection. On the other hand, a more in depth knowledge of the mechanism involved in the protective immune response along with the evaluation of new adjuvant systems is needed. Furthermore, a suitable experimental model in which the efficacy of vaccine formulations could be evaluated is of great importance. In this sense, the mouse model is a useful tool for the initial screening of vaccine formulations before their use in the target species (Reichel & Ellis, 2009).

Four proteins were selected for the development of this Doctoral Thesis, which are considered likely to be related to two essential events in the pathogenesis of neosporosis: the lytic cycle (NcGRA7) and the establishment of the latent infection in the host's tissues and the reactivation (NcSAG4, NcBSR4 and NcSRS9). The knowledge of the molecular and cellular mechanisms involved in both processes is of great interest for the development and improvement of control measures against neosporosis, especially the immunoprophylaxis. In this sense, the *N. caninum* virulence factors have not yet been elucidated, as little as the parasite and host mechanisms involved in an efficient immune response. Therefore, the interest in these four proteins comes from previous studies conducted in our research group SALUVET, as well as other groups dedicated to the study of *N. caninum* (Liddell et al., 2003; Jenkins et al., 2004; Jongert et al., 2007; Vemulapalli et al., 2007; Hiasa et al., 2012) or *T. gondii* (Kim & Boothroyd, 2005; Kim et al., 2007; Van et al., 2007).

NcGRA7 was described as a highly immunodominant antigen (p17 fraction) which is recognised by naturally infected cattle (Álvarez-García et al., 2006; Álvarez-García et al., 2007). NcGRA7 is a dense granule protein which is expressed in both tachyzoite and bradyzoite stages. Moreover, it is secreted within the parasitophorous vacuole after the invasion of the host cell. Its function is related to the maturation and modification of the parasitophorous vacuole and possibly to the adaptation of the parasite to the new intracytoplasmic conditions and the interactions with the host cell (Hemphill et al., 1998). This protein is highly immunogenic and has shown promising results in terms of protective immunity in mice (Jenkins et al., 1997; Lally

et al., 1997; Jenkins et al., 2004; Nishikawa et al., 2009). In addition, its involvement in the invasion of host cells has been confirmed (Aguado-Martínez et al., 2010).

NcSAG4 is also a highly immunogenic protein, it was the first bradyzoite-stage specific protein identified. The early characterisation studies showed specific expression in bradyzoites although NcSAG4 seems to be expressed in the early bradyzoite conversion process since it was colocalised with NcSAG1 –tachyzoite-specific protein- within parasitophorous vacuoles after the *in vitro* conversion assay. Moreover, *NcSAG4* transcription was detected close to the beginning of the bradyzoite-tachyzoite conversion (Fernández-García et al., 2006). In a previous study, a decrease in the persistence of *N. caninum* in mice inoculated with a transgenic isolate constitutively expressing NcSAG4 (Nc-1SAG4<sup>+</sup>) was observed (Marugán-Hernández et al., 2011b). Furthermore, 89% of the offspring were protected against the transmission in a pregnant mouse model when this isolate was used as a life vaccine (Marugán-Hernández et al., 2011c). However, it is possible that the low virulence shown in this transgenic isolate was due to a random insertion of the plasmid in a region of the genome involved in virulence during the genetic manipulation. In this sense, its ability to invade host cells could be reduced.

Both proteins, rNcGRA7 and rNcSAG4, were employed in a serological test which is able to differentiate between primary infection, chronic infection and reactivation in naturally and experimentally infected cattle (Aguado-Martínez et al., 2008). On the other hand, both immunogenic proteins induced the production of specific antibodies in mice infected with different isolates (Aguado-Martínez et al., 2009b).

Finally, NcBSR4 and NcSRS9 are proteins expressed only during bradyzoite stage. In their characterisation studies, only a late expression in mature cysts of naturally infected animals was observed. On the other hand, these proteins were hardly detected in *in vitro* conversion assays, and very low levels of transcription RNA were detected (Risco-Castillo et al., 2007; Risco-Castillo et al., 2011). In case of *T. gondii*, these proteins have been associated with the parasite's ability to persist within the host tissues. In several studies, TgSRS9 seems to be essential for the persistence and the control of the parasite multiplication in the host's intestine (Kim & Boothroyd, 2005; Kim et al., 2007). Therefore, the significance of these proteins for vaccine formulation lies in the possibility of blocking the chronic infection in the host, thereby preventing a possible reactivation of the infection and blocking the most common route of infection in cattle: endogenous transplacental transmission (EnTT).

Thus, the proposed objectives in the present Doctoral Thesis are:

**Objective 1:** development of vaccines based on the proteins NcGRA7, NcSAG4, NcBSR4 and NcSRS9 with a new adjuvant system based on nanoencapsulation

◇ **Subobjective 1.1. (Chapter II):** determine the possible involvement of these four proteins in the generation of immune response in the host, and their possible correlation with parameters of virulence (Pereira García-Melo et al., 2010; Regidor-Cerrillo et al., 2010; Regidor-Cerrillo et al., 2011).

◇ **Subobjective 1.2. (Chapter III):** evaluation of the protective efficacy of these proteins encapsulated in poly- $\epsilon$ -caprolactone in a pregnant mouse model. rNcGRA7 and rNcSAG4, along with a classic adjuvant, were used in a previous vaccine trial. Although there was a failure in protection, promising results were obtained with both proteins (high humoral and cellular responses to rNcGRA7, a delay in the death of the pups with rNcSAG4, and lower parasite burden in brain and lung in females immunised with a mixture of both proteins) (Aguado-Martínez et al., 2009a).

**Objective 2:** development of a new mouse model for the reactivation of a *N. caninum* chronic infection or a congenital infection. This model could be more suitable for the evaluation of the protective efficacy of antigens against the EnTT. Two possible alternatives were proposed:

◇ **Subobjective 2.1 (Chapter IV):** development of a model starting from chronically infected females using two *N. caninum* isolates of high and low-to-moderate virulence. The outcome of infection and transplacental transmission to the offspring was evaluated in three consecutive generations.

◇ **Subobjective 2.2. (Chapter V):** the study of infection and transmission to offspring in three consecutive generations starting with a model of primary infection with two isolates of low-to-moderate virulence. In congenitally infected females (2nd generation) the possible reactivation of infection and the subsequent transplacental transmission to offspring was studied (3rd generation)

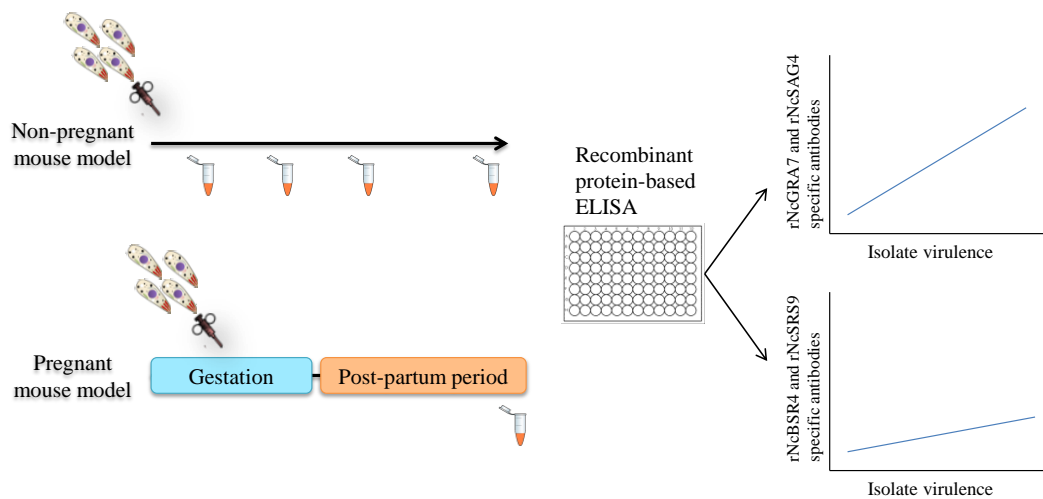


## Chapter II:

### **Specific antibody responses against *Neospora caninum* recombinant rNcGRA7, rNcSAG4, rNcBSR4 and rNcSRS9 proteins are correlated with virulence in mice.**

Jiménez-Ruiz, E., Bech-Sàbat, G., Álvarez-García, G., Regidor-Cerrillo, J., Hinojal-Campaña, L., Ortega-Mora, L.M.

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



Published in *Parasitology*. Doi: 10.1017/S0031182012002041

Presented as poster in Apicowplexa congress 2012 (23rd-28th October, Lisbon, Portugal).



**Abstract**

The intraspecific diversity of *Neospora caninum* is a determinant for *in vivo* parasite virulence and *in vitro* parasite behaviour. The relationship between isolate virulence and specific antibody responses against key parasite proteins has not been well characterised. The response kinetics and the differences in specific anti-rNcGRA7, -rNcSAG4, -rNcBSR4 and -rNcSRS9 antibody levels were analysed by recombinant protein-based ELISA in groups of mice inoculated with ten different *N. caninum* isolates that differ in their virulence. The majority of the virulence parameters analysed correlated with the specific antibody levels against the four recombinant proteins. The antibodies developed against the highly immunogenic protein NcGRA7 were significantly higher in mice inoculated with high virulence isolates than in those inoculated with low-to-moderate virulence isolates in both non-pregnant and pregnant mouse models. Moreover, these levels were correlated with the anti-*N. caninum* IgG1 and IgG2a responses and the *in vitro* tachyzoite yield at 56 h. The antibodies directed against the bradyzoite-specific proteins were not detected in a non-pregnant mouse model. However, some seropositive mice were found in groups inoculated with high virulence isolates in a pregnant mouse model. NcGRA7 and NcSAG4 are proteins clearly correlated with virulence, and in a lesser extent NcBSR4 and NcSRS9 proteins. Moreover, antibodies to bradyzoite-specific proteins appear to also be related to virulence in mice. Further analyses should be performed in order to verify the usefulness of these proteins as predictive markers for virulence in an experimental bovine model of neosporosis.

**Key words:** *Neospora caninum* / virulence / BALB/c mice / rNcGRA7 / rNcSAG4 / rNcBSR4 / rNcSRS9 / antibody response

**1. Introduction**

*Neospora caninum* is a tissue cyst-forming coccidian parasite closely related to *Toxoplasma gondii* that causes reproductive failure in cattle worldwide (Dubey et al., 2007; Dubey & Schares, 2011). The pathogenesis of bovine neosporosis depends on several factors related to the host (e.g., infection route, immune responses of the pregnant cow and foetus and stage of gestation) and factors related to the parasite (parasite stage, dosage and isolate) (Dubey et al., 2006). In particular, it has been recently shown that *N. caninum* intraspecific diversity is a determinant of parasite virulence and *in vitro* parasite behaviour. Intra-specific diversity was firstly evidenced by genetic differences found among *N. caninum* isolates (Schock et al., 2001; Regidor-Cerrillo et al., 2006; Al-Qassab et al., 2009; Basso et al.,

2009; Pedraza-Díaz et al., 2009). Later, several authors reported the influence of the *N. caninum* isolate used on the outcomes of infection and the immune responses to the infection in murine and bovine experimental models (Miller et al., 2002; Quinn et al., 2002; Collantes-Fernández et al., 2006b; Rojo-Montejo et al., 2009a; Pereira García-Melo et al., 2010; Regidor-Cerrillo et al., 2010; Caspe et al., 2012). Indeed higher anti-*N. caninum* IgG1-IgG2a humoral immune responses were induced by high virulence isolates than by isolates with low-to-moderate virulence (Pereira García-Melo et al., 2010; Regidor-Cerrillo et al., 2010). However, the host- and parasite-dependent mechanisms responsible for these differences have not been determined although several proteins (NcMIC1, NcNTPase, NcROP40, aspartyl tRNA synthetase and

G6PD) have been identified as being more abundant in highly virulent isolates (Regidor-Cerrillo et al., 2012a). One approach to determine the mechanisms behind the differing immune response is to investigate the proteins involved in the tachyzoite lytic cycle because high virulence isolates have displayed significantly higher invasion and proliferation rates in *in vitro* assays (Regidor-Cerrillo et al., 2011). However, bradyzoite-specific proteins are also interesting candidates because these proteins seem to be involved in the evasion of host immune response and persistence within the host tissues by *T. gondii* (Kim & Boothroyd, 2005; Kim et al., 2007). Interestingly, cystogenic isolates such as Nc-Liverpool and Nc-Spain 7 have proven to be virulent (Collantes-Fernández et al., 2006b; Pereira García-Melo et al., 2010; Regidor-Cerrillo et al., 2010). In this sense, four proteins (NcGRA7, NcSAG4, NcBSR4 and NcSRS9) that are considered likely to be related to these two important processes (lytic cycle and persistence) were chosen in order to accomplish this work.

NcGRA7 is a dense granule protein involved in invasion and parasite proliferation that is expressed in both the tachyzoite and bradyzoite stages (Hemphill et al., 1998; Álvarez-García et al., 2007; Aguado-Martínez et al., 2010). NcSAG4 is an early-expressed bradyzoite-specific protein, and NcBSR4 and NcSRS9 are late-expressed bradyzoite-specific proteins (Fernández-García et al., 2006; Risco-Castillo et al., 2007; Risco-Castillo et al., 2011).

The aim of the present study was to investigate the relationship between the specific humoral immune responses directed against rNcGRA7, rNcSAG4, rNcBSR4 and rNcSRS9 and the virulence of the parasite. To this end, differences in the kinetics and specific antibody levels against these proteins were analysed in

mice inoculated with 10 *N. caninum* isolates, which differ in their virulence. Additionally, the association of these differences with *in vivo* and *in vitro* parameters was investigated.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Parasites

The *N. caninum* isolates used in this study are shown in Table 1 and were classified into two groups (low-to-moderate and high virulence isolates) according to their *in vivo* and *in vitro* behaviour described in previous works (Pereira García-Melo et al., 2010; Regidor-Cerrillo et al., 2010; Regidor-Cerrillo et al., 2011). These isolates were maintained in monolayer cultures of the monkey kidney cell line MARC-145, as previously described (Pérez-Zaballos et al., 2005). All isolates used to infect mice were synchronised and tachyzoites were recovered from 3-day growth cultures when the greater part of them was still intracellular (at least 80% of undisrupted parasite vacuoles in the cell monolayer in order to maintain parasite viability). Moreover, isolates were collected when they were in a similar low number of passages with the purpose of minimising its potential changes in virulence (Bartley et al., 2006). Tachyzoite number was determined by Trypan blue exclusion followed by counting in a Neubauer chamber, and the parasites were resuspended in PBS at the required dose in a final volume of 200 µl per mouse. Mice were inoculated within an hour of tachyzoite collection.

### 2.2. Mice and experimental design

Seven-week-old female BALB/c mice were obtained from a commercial supplier (Harlan Interfauna Ibérica, Barcelona, Spain). They were free of common viral, parasite and bacterial pathogens according to the results of the routine screening procedures performed by the manufacturer. The mice were fed *ad libitum* in a controlled environment with cycles of 12

hours of light and 12 hours of dark. All of the protocols involving animals were approved by the Animal Research Committee of Complutense University, Madrid, Spain, following the proceedings described by the Regulation of Internal Regime for Animal Research Committee (published at BOUC, no. 2, on 9 February 2006) and EU legislation (Council Directive 86/609/EEC).

Inoculations of 10 *N. caninum* isolates in non-pregnant and pregnant BALB/c mouse models of neosporosis have been published by Pereira García-Melo et al. (2010) and Regidor-Cerrillo et al. (2010). Briefly, the mice in both experimental models were examined daily for clinical signs indicative of neosporosis (rough hair coats, inactivity, anorexia and neurological signs consisting of head tilting, walking in circles, ataxia, pelvic limb weakness and paralysis). Severe, clinically affected mice were sacrificed by CO<sub>2</sub> inhalation.

In the non-pregnant mouse model, the mice were inoculated with sterile PBS (control group) or with 10<sup>6</sup> tachyzoites per mouse by an intra-peritoneal route (Table 1). Five mice from the *N. caninum*-inoculated groups and 3 mice from the control group were randomly sacrificed by CO<sub>2</sub> inhalation on 1, 2, 4, 8, 16, 32 and 64 days post-inoculation (days p.i.) except for the Nc-Spain 5H-infected group, for which the 64 days p.i. time point was not performed.

For the pregnant mouse model, the mice in all of the groups were subcutaneously (s.c.) inoculated with 2 x 10<sup>6</sup> tachyzoites of different *N. caninum* isolates (Table 1) or with sterile PBS (control group) by the subcutaneous route at day 7 of pregnancy. The neonates were housed with dams until day 30 post-partum (p.p.) when both neonates and dams were sacrificed by CO<sub>2</sub> inhalation. Blood samples from non-pregnant and pregnant mice were

collected by cardiac puncture at necropsy. Sera were aliquoted and preserved at -80° C for analysis by ELISA.

### 2.3. Cloning and purification of recombinant proteins.

cDNAs used for cloning NcGRA7, NcSAG4, NcBSR4 and NcSRS9 were obtained from Nc-Liverpool isolate. In previous studies, no differences in nucleotide sequence were observed among isolates (Walsh et al., 2001; Fernández-García et al., 2006; Risco-Castillo et al., 2007; Risco-Castillo et al., 2011). Both the rNcGRA7 and rNcSAG4 proteins were produced in the pET-45b (+) (Novagen, Germany) prokaryotic expression vector system following previously described procedures, with a few modifications (Fernández-García et al., 2006; Álvarez-García et al., 2007; Chapter III). rNcBSR4 and rNcSRS9 were cloned into the prokaryotic expression vector pRSET-C (Invitrogen, USA) as previously described (Risco-Castillo et al., 2007; Risco-Castillo et al., 2011). After the bacteria were lysed, rNcGRA7 was purified from the soluble fraction by immobilised metal ion affinity chromatography (IMAC) using HisTrapHP columns (GE Healthcare, USA) (Álvarez-García et al., 2007). rNcSAG4, rNcSRS9 and rNcBSR4 were extracted from inclusion bodies and denatured with a binding buffer containing 20 mM phosphate salts, 8 M urea and 40 mM imidazole (Aguado-Martínez et al., 2008). These recombinant proteins were obtained using an on-column refolding and purification procedure based on a method previously reported (Zhao et al., 2005).

The concentration and purity of the recombinant proteins were determined by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) with a standard BSA scale (Roche, Switzerland) and by western blotting with a monoclonal anti-T7 tag antibody (Novagen, Germany) and polyclonal anti-

rNcGRA7, rNcSAG4, rNcBSR4 and rNcSRS9 mouse sera (Fernández-García et al., 2006; Risco-Castillo et al., 2007; Aguado-Martínez et al., 2008; Risco-Castillo et al., 2011). The protein concentrations were measured using Quantity One software (v.7.2, BioRad, USA). All of the proteins were stored at -80°C until use.

#### **2.4. Analysis of the humoral immune response**

The ELISAs for detecting specific IgGs developed against rNcGRA7, rNcSAG4, rNcBSR4 and rNcSRS9 were carried out as described previously (Rojo-Montejo et al., 2011b). Briefly, 96-well plates were coated with 0.1 µg/well of rNcGRA7 or rNcSAG4 and 0.2 µg/well of rNcBSR4 or rNcSRS9. The serum samples were applied at a 1:100 dilution and an anti-mouse IgG peroxidase conjugated antibody (Sigma, USA) was used at a 1:3000 dilution. For the non-pregnant mouse model, only sera from 8, 16, 32 and 64 days p.i. were analysed because the production of specific antibodies against *N. caninum* and against rNcGRA7 occurs from 8 days p.i. onwards and the production of those against rNcSAG4 occurs from 14 days p.i. onwards (Collantes-Fernández et al., 2006b; Aguado-Martínez et al., 2009b). Control group samples of each day were also analysed.

Sera from mice immunised with rNcSAG4, rNcGRA7, rNcBSR4 and rNcSRS9 in previous studies were employed as positive controls, whereas sera from non-immunised uninfected mice were used as negative controls in each plate (Aguado-Martínez et al., 2009a; Chapter III). Serum samples were analysed in duplicate. The threshold value (cut-off) was defined arbitrarily to discriminate between ‘positive’ and ‘negative’ by adding 2 standard deviations to the mean A405 value of sera from non-

immunised uninfected mice. The cut-off values corresponded to 0.27, 0.29, 0.24 and 0.42 optical density (O.D.) values for the rNcGRA7, rNcSAG4, rNcBSR4 and rNcSRS9 ELISA tests, respectively.

The ELISAs for detecting specific IgG1 and IgG2a against *N. caninum* extract were performed by Pereira Garcia-Melo *et al.* (2010) and Regidor-Cerrillo *et al.* (2010). Briefly, an ELISA was developed with soluble *N. caninum* tachyzoite antigen (0.5 µg in 100 µl/well) using diluted serum samples (1:100) and anti-mouse IgG2a or IgG1 antibody (1:5000; Southern Biotechnology, Birmingham, AL, USA). Serum samples were analysed in duplicate.

#### **2.5. Statistical analysis**

A one-way ANOVA followed by Duncan’s multiple range tests was employed to compare specific antibody levels (measured as O.D. values) developed against the four recombinant proteins included in this study. In the non-pregnant model, comparisons were performed between groups inoculated with low-to-moderate *versus* high virulence isolates for each day evaluated (8, 16, 32, 64 days p.i.). Moreover, different days p.i. samples were also compared for each isolate. In the pregnant model, the specific antibody levels were compared between groups of mice inoculated with different isolates or grouped in virulence categories (low-to-moderate *vs.* high virulence isolates). The significance for these analyses was established at  $P < 0.05$ .

Spearman’s rank correlation coefficient ( $\rho$ ) was applied to investigate the potential association between the specific antibody levels and different parameters of isolate virulence reported in previous studies.

**Table 1.** *In vivo* and *in vitro* potential virulence-related parameters measured in 10 *Neospora caninum* isolates and their consensus classifications according to virulence. The isolates were categorised into low, moderate or high virulence categories for each trait based on the significant differences found in previous studies for the different *in vivo* (Pereira García-Melo et al. 2010, Regidor-Cerrillo et al. 2010) and *in vitro* (Regidor-Cerrillo et al. 2011) parameters studied. Thus, the isolates that showed significantly higher or lower results for each parameter were considered as high and low virulence isolates, respectively. On the contrary, isolates that did not show significant differences from the other isolates were considered to be moderate virulence isolates. The consensus classification was as follows: high virulence isolates (isolates with 6 parameters considered as high and a maximum of 1 parameter considered as low) and low-to-moderate virulence isolates (the remaining isolates with less than 4 high parameters and more than 3 low parameters).

Isolates	<i>In vivo</i>			Pregnant mouse model				<i>In vitro</i>			Virulence (consensus <sup>g</sup> )
	Parasite presence, Early phase <sup>a</sup>	Parasite presence, Chronic phase <sup>b</sup>	Dam morbidity <sup>c</sup>	Parasite presence in dams <sup>d</sup>	Neonatal morbidity <sup>e</sup>	Neonatal mortality <sup>f</sup>	Vertical transmission rate <sup>g</sup>	IR <sub>4h</sub> <sup>h</sup>	Td <sup>i</sup>	TY <sub>56h</sub> <sup>j</sup>	
Nc-Spain 2H	Moderate (85)	Low (20)	Low (0)	Low (27.2)	Moderate (46.1)	Moderate (20.4)	Low (61.3)	Moderate (3726)	Moderate (11.7)	Low (5328)	Low-to-moderate
Nc-Spain 3H	High (95)	Low (13.3)	Low (0)	Moderate (78.5)	Low (10.6)	Low (7.7)	High (89)	Low (1088)	Moderate (12.1)	Low (5163)	Low-to-moderate
Nc-Spain 4H	Moderate (80)	Moderate (33.3)	High (100)	High (91.6)	High (100)	High (100)	High (97.3)	High (8758)	Low (14.2)	High (35500)	High
Nc-Spain 5H	Low (40)	High (80)	High (27.7)	High (100)	High (98.6)	High (96)	High (100)	Moderate (1657)	High (10.3)	High (18030)	High
Nc-Spain 6	High (90)	Low (23.3)	Low (0)	Low (25)	Moderate (34.5)	Moderate (29.8)	Low (57.6)	Moderate (976.5)	High (9.8)	High (17110)	Low-to-moderate
Nc-Spain 7	Low (30)	High (60)	High (30.7)	Moderate (69.2)	High (98.3)	High (95)	High (79.1)	Moderate (5249)	Moderate (11.6)	High (36170)	High
Nc-Spain 8	Moderate (65)	Moderate (30)	Low (0)	Low (26.3)	Low (4.7)	Low (1.1)	Low (56.4)	Moderate (2991)	Moderate (13.3)	Low (1731)	Low-to-moderate
Nc-Spain 9	Moderate (80)	High (63.3)	Low (0)	Low (10)	Moderate (39)	Moderate (32.5)	Low (52.6)	Moderate (1911)	Moderate (12.8)	Moderate (11140)	Low-to-moderate
Nc-Spain 10	N.D.	N.D.	Low (0)	Moderate (84.6)	Moderate (25.5-20.9)	Moderate (17.9)	Moderate (65.5)	Moderate (1729)	Moderate (13.45)	High (22190)	Low-to-moderate
Nc-Liverpool	N.D.	N.D.	High (62.5)	High (100)	High (100)	High (100)	High (95.6)	High (5325)	High (10.78)	High (16270)	High

<sup>a</sup>. Parasite presence in the lungs during the early phase of *N. caninum* infection (1-8 days p.i.; average percentages). <sup>b</sup> Parasite presence in the brain during the chronic phase of *N. caninum* infection (16-64 days p.i.; average percentages). <sup>c</sup> No. of dams with clinical signs / no. of dams (percentage). <sup>d</sup> No. of nested-PCR positive dams at day 30 p.p. / no. of dams in the group (percentage). <sup>e</sup> No. of pups with clinical signs from day 2 to 30 p.p. / no. of pups (percentage). <sup>f</sup> No. of pups dead from day 2 to 30 p.p. / no. of pups (percentage). <sup>g</sup> No. of nested-PCR positive pups / no. of pups per group (percentage). <sup>h</sup> Invasion rate measured as the median number of intracellular parasites / scan area at 4 hours post-infection (average). <sup>i</sup> Doubling time (average hours). <sup>j</sup> The tachyzoite yield was defined as the average value of the number of tachyzoites quantified by qPCR at 56 h p.i. N.D.: not determined.

In the non-pregnant mouse model, the percentages of mice with parasites present in the brain at 8, 16, 32 and 64 days p.i. for each inoculated group were compared to median O.D. values of specific antibodies developed against each recombinant protein (Pereira García-Melo et al., 2010). Because no morbidity and mortality rates were recorded, correlation analyses were not performed. In the pregnant mouse model, parameters related to virulence in dams (morbidity and parasite presence) and in pups (neonatal morbidity and mortality and vertical transmission rates) (Regidor-Cerrillo et al., 2010) were compared to the median values of the specific antibodies developed against the recombinant proteins. The optical density (O.D.) values of IgG1 and IgG2a antibodies against the *N. caninum* soluble extract detected in the non-pregnant model at 8, 16, 32 and 64 days p.i. by Pereira García-Melo et al. (2010) were correlated with the corresponding individual values of specific antibodies against the recombinant proteins. Similar analyses were conducted for the pregnant model (Regidor-Cerrillo et al., 2010).

Additionally, *in vitro* parameters such as the invasion rate at 4 h ( $IR_{4h}$ ), doubling time (Td) and tachyzoite yield at 56 h ( $TY_{56h}$ ) obtained in another recent study (Regidor-Cerrillo et al., 2011) were compared to the median specific anti-rNcGRA7 antibody values detected in the non-pregnant and pregnant models for each isolate. In this analysis, the antibody levels against bradyzoite-specific proteins were not included because the *in vitro* assays were carried out exclusively with tachyzoites.

All statistical analyses were performed and graphics generated using IBM SPSS Statistics v.19 software.

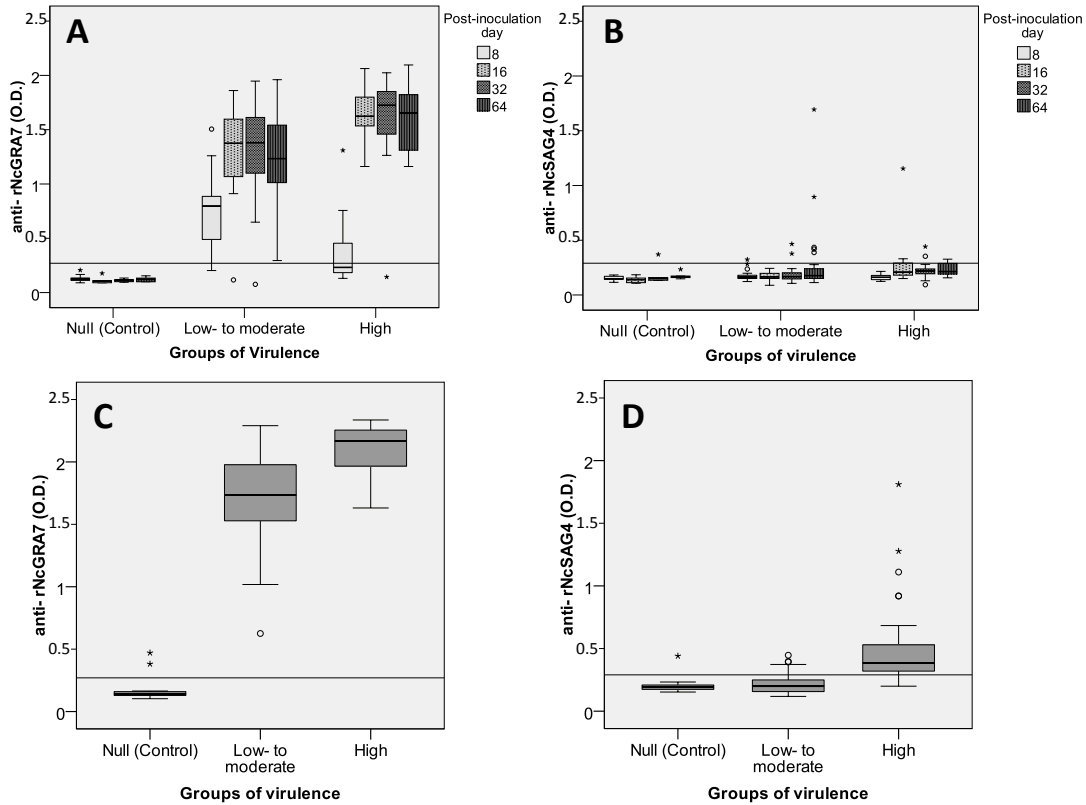
### 3. Results

#### 3.1. Non- pregnant mouse model.

All of the groups inoculated with the *N. caninum* isolates developed specific antibodies against rNcGRA7 (Figure 1A). When the immune responses were analysed to compare days p.i. within each group, the anti- rNcGRA7 levels were higher during the chronic infection in all groups (16, 32 and 64 days p.i.) ( $P<0.05$ ) compared to acute infection (8 days p.i.), but no differences were detected between the different days of chronic infection. Additionally, higher O.D. values of specific anti-*Neospora* IgG1 and IgG2a antibodies were correlated with higher specific anti-rNcGRA7 levels at each days p.i. analysed (Table 2).

When the specific anti-rNcGRA7 antibody levels were compared between the low-to-moderate and high virulence groups, significant differences were observed (Figure 1A). During the early infection (8 days p.i.), the levels anti-rNcGRA7 were higher in the low-to-moderate virulence groups ( $P<0.05$ ). In this case, the isolates Nc-Spain 2H, 3H, 6 and 8 produced a significantly higher humoral immune response against rNcGRA7 than Nc- Spain 4H, 5H and 7 ( $P<0.05$ ). On the contrary, during the late infection (16, 32 and 64 days p.i.), the highest anti-rNcGRA7 levels corresponded to the high virulence isolate group with significant differences between 16 and 64 days p.i. ( $P<0.05$ ). The Duncan post-hoc test identified the isolates that produced the lowest antibody response at 16 days p.i. (Nc-Spain 3H), 32 days p.i. (Nc-Spain 2H, 3H) and 64 days p.i. (Nc-Spain 2H, 3H and 8).

Regarding the bradyzoite stage-specific proteins, no antibody levels against rNcSAG4 (Figure 1B), rNcBSR4 or rNcSRS9 (data not shown) were observed over the cut-off values for each test. Therefore, no further comparisons were performed for these proteins in the non-pregnant model.



**Figure 1:** Box-plot graphs representing the median, lower and upper quartiles (boxes), non-outlier minimum and maximum (whiskers), and outlier ( $^{\circ}$ ; values 1.5-fold more than the inter-quartile range away from the quartiles) and extreme ( $*$ ; values 3-fold more than the inter-quartile range away from the quartiles) optical density (O.D.) values obtained with rNcGRA7 (A) and rNcSAG4 (B) from non-pregnant mice sera at different days post-infection and rNcGRA7 (C) and rNcSAG4 (D) from pregnant mice sera at day 30 post-partum. Mice were inoculated with isolates of low-to-moderate virulence (Nc-Spain 2H, Nc-Spain 3H, Nc-Spain 6, Nc-Spain 8 and Nc-Spain 9), high virulence (Nc-Spain 4H, Nc-Spain 5H, Nc-Spain 7) or with PBS (control group). The horizontal lines represent the cut-off point for each test.

The correlation analyses between parasite presence and specific antibodies levels against rNcGRA7 were not significant at any period of time (data not shown). Moreover, significant correlations could be found between the average values of the *in vitro* parameter  $TY_{56h}$  and median values of specific antibodies against rNcGRA7 at 32 days p.i. and 64 days p.i. (Table 3).

All statistical analysis were also performed with normalised ELISA data measured as relative index percent (R.I.P.C. =  $(O.D. \text{ sample} - O.D. \text{ negative control}) / (O.D. \text{ positive control} - O.D. \text{ negative control}) \times 100$ ). The results with R.I.P.C.s data showed similar significant variations than the results obtained with data not normalised but for  $TY_{56h}$  and specific antibodies against rNcGRA7 at 64 days p.i. (supplementary Table 1 and Table 2).

**Table 1.** Correlation analyses of specific antibody values against rNcGRA7, rNcSAG4, rNcBSR4 and rNcSRS9 with anti-IgG1 and IgG2a values and *in vivo* parameters measured in both the non-pregnant and pregnant mouse models.

Model	Specific antibodies	Days	IgG1		IgG2a		Dams morbidity		Parasite presence in dams		Neonatal morbidity		Neonatal mortality		Vertical transmission			
			R <sup>2a</sup>	P <sup>b</sup>	R <sup>2a</sup>	P <sup>b</sup>	ρ <sup>c</sup>	P <sup>b</sup>	ρ <sup>c</sup>	P <sup>b</sup>	ρ <sup>c</sup>	P <sup>b</sup>	ρ <sup>c</sup>	P <sup>b</sup>	ρ <sup>c</sup>	P <sup>b</sup>		
Non-pregnant <sup>d</sup> (Pereira García-Melo et al. 2010)	rNcGRA7	8 p.i.	0.317	0.038	0.739	<0.001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		16 p.i.	0.442	0.003	0.495	0.001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		32 p.i.	0.650	<0.001	0.557	<0.001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		64 p.i.	0.706	<0.001	0.618	<0.001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pregnant (Regidor- Cerrillo et al. 2010)	rNcGRA7	30 p.p.	0.896	<0.001	0.904	<0.001	0.748	0.008	N.C.	-	0.815	0.002	0.752	0.008	0.609	0.047	0.047	
		30 p.p.	N.C.	-	0.222	0.008	0.832	0.001	0.679	0.022	0.688	0.019	0.733	0.01	0.764	0.006	0.006	
		30 p.p.	N.C.	-	0.160	0.061	0.695	0.018	0.62	0.042	0.679	0.022	0.724	0.012	0.600	0.051	0.051	
		30 p.p.	N.C.	-	0.174	0.039	0.642	0.033	N.C.	-	N.C.	-	0.638	0.035	0.673	0.023	0.023	

<sup>a</sup> R<sup>2</sup> of Pearson. <sup>b</sup> P-value (two-tailed). <sup>c</sup> Spearman rho coefficient. <sup>d</sup> Morbidity and mortality rates were not recorded and correlation analyses were not performed. N.C.: no correlation

**Table 2.** Spearman correlation analyses of median values of specific antibodies against rNcGRA7 and the *in vitro* parameters for each isolate.

Model	Days p.i.	Median IR <sub>4h</sub> <sup>a</sup>		Average Td <sup>a</sup>		TY <sub>56h</sub> <sup>a</sup>	
		ρ*	P <sup>#</sup>	ρ*	P <sup>#</sup>	ρ*	P <sup>#</sup>
Non- pregnant (Pereira García-Melo et al. 2010)	8	N.C.	-	N.C.	-	N.C.	-
	16	N.C.	-	N.C.	-	N.C.	-
	32	N.C.	-	N.C.	-	0.810	0.015
	64	N.C.	-	N.C.	-	0.821	0.023
<b>Pregnant</b>							
(Regidor-Cerrillo et al., 2010)		0.673	0.033	N.C.	-	N.C.	-

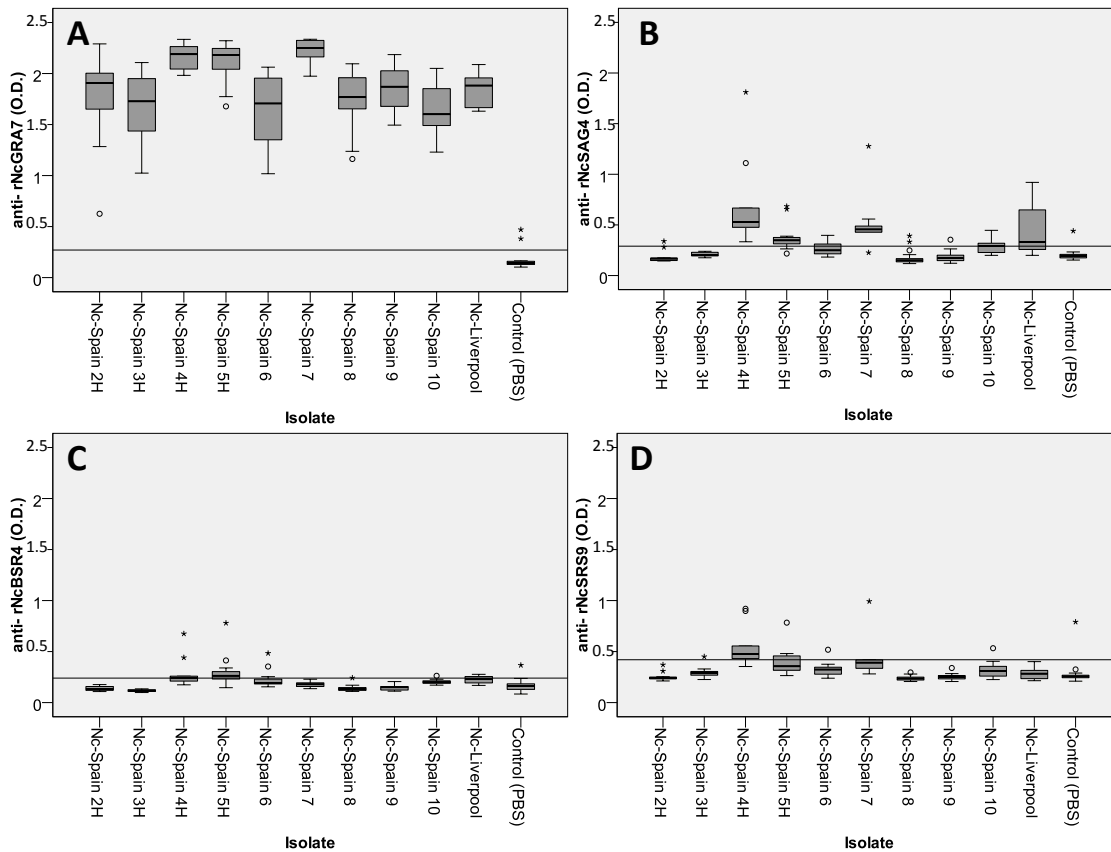
<sup>a</sup> *In vitro* parameters reported by Regidor-Cerrillo *et al.* 2011; IR<sub>4h</sub>: invasion rate at 4 h; Td: doubling time; TY<sub>56h</sub>: tachyzoite yield at 56 hours; \* Spearman rho coefficient; <sup>#</sup>P-value (two-tailed). N.C.: no correlation

### 3.2. Pregnant mouse model.

All of the mice inoculated with any of the *N. caninum* isolates developed specific antibodies against rNcGRA7 above the cut-off value. The high virulence isolate group developed significantly higher specific antibody levels against rNcGRA7 than the low-to-moderate virulence group (Figure 1C,  $P < 0.05$ ). In the case of rNcSAG4, 16.7 % and 84.1 % of the samples belonging to the low-to-moderate and high virulence groups, respectively, showed detectable specific antibody levels that were significantly higher in the high virulence group compared to the low-to-moderate virulence group (Figure 1D,  $P < 0.05$ ). The antibody levels against the late-expressed bradyzoite stage-specific proteins rNcBSR4 and rNcSRS9 were close to the cut-off values (data not shown). However, specific antibody levels above the cut-off were detected in 6.4% and 47.6% of mice for rNcBSR4 ( $P < 0.0001$ ; Fisher's exact

test) and 3.8% and 37.2% for rNcSRS9 ( $P < 0.0001$ ; Fisher's exact test) in the low-to-moderate and high virulence isolate groups, respectively.

Higher levels of anti-rNcGRA7 antibodies were detected in the mice that were inoculated with the Nc-Spain 4H, Nc-Spain 5H and Nc-Spain 7 isolates ( $P < 0.05$ ) (Figure 2A). Regarding rNcSAG4, dams inoculated with the high virulence isolates (Nc-Spain 4H, Nc-Spain 5H, Nc-Spain 7 and Nc-Liverpool) developed specific antibodies above the cut-off point, whereas the dams inoculated with the low-to-moderate virulence isolates (Nc-Spain 2H, Nc-Spain 3H, Nc-Spain 8 and Nc-Spain 9; Figure 2B) remained seronegative ( $P < 0.05$ ). Only some mice from the groups inoculated with Nc-Spain 4H (50%), Nc-Spain 5H (70.6%), Nc-Spain 6 (25%) and Nc-Liverpool (37.6%) showed a specific response against rNcBSR4 above the cut-off value (Figure 2C).



**Figure 2:** Box-plot graphs representing the median, lower and upper quartiles (boxes), non-outlier minimum and maximum (whiskers), and outlier (°; values 1.5-fold more than the inter-quartile range away from the quartiles) and extreme (\*; values 3-fold more than the inter-quartile range away from the quartiles) optical density (O.D.) values obtained with rNcGRA7 (A), rNcSAG4 (B), rNcBSR4 (C) and rNcSRS9 (D) antigen-based ELISAs from serum samples of mice inoculated with different isolates (Nc-Spain 2H (n=11), Nc-Spain 3H (n=14), Nc-Spain 6 (n=12), Nc-Spain 8 (n=19), Nc-Spain 9 (n=10) and Nc-Spain 10 (n=13) -low-to-moderate virulence isolates- and Nc-Spain 4H (n=10), Nc-Spain 5H (n=17), Nc-Spain 7 (n=9) and Nc-Liv (n=8) -high virulence-) or with PBS (control group) in the pregnant mouse model. The samples were taken at day 30 post-partum from mice inoculated at day 7 of gestation. The horizontal lines represent the cut-off point for each test

Additionally, some mice inoculated with the high virulence isolates, such as Nc-Spain 4H (80%), Nc-Spain 5H (29.4%) and Nc-Spain 7 (37.5%), recognised rNcSRS9, but no rNcSRS9-specific antibodies were developed by mice inoculated with the low-to-moderate virulence isolates, such as Nc-Spain 2H, Nc-Spain 3H, Nc-Spain 8 and Nc-Spain 9 (Figure 2D).

Moreover, the IgG1 and IgG2a individual values were highly correlated with the levels of

specific antibodies against rNcGRA7 (Table 2). Almost all of the virulence parameters analysed correlated with the specific antibody levels against the four recombinant proteins ( $\rho > 0.6$ ;  $P < 0.05$ ; Table 2). Additionally, regarding the *in vitro* parameters, the median  $IR_{4h}$  could be correlated with the median specific antibody levels against rNcGRA7 ( $\rho = 0,673$ ;  $P = 0.033$ ). There was no correlation between any of the specific antibody responses analysed and the other *in vitro* parameters (Table 3).

All statistical analysis were also performed with normalised ELISA data measured as relative index percent (R.I.P.C. = (O.D. sample - O.D. negative control) / (O.D. positive control - O.D. negative control) x 100). The results with R.I.P.C.s data showed similar significant variations than the results obtained with data not normalised but for a few exceptions: anti-rNcSAG4 antibody levels correlated with anti-*N. caninum* IgG1 antibody levels. In a similar way anti-rNcBSR4 antibody levels correlated with both anti-*N. caninum* IgG1 antibody levels and neonatal morbidity. On the other hand, anti-rNcBSR4 antibody levels did not correlate with parasite presence in dams. However, the  $\rho$  value was low in case of both late-expressed bradyzoite proteins (supplementary Table 1). Moreover, the same variation was observed in the case of anti-rNcGRA7 antibody levels developed by pregnant mice *versus* IR<sub>4h</sub> (supplementary Table 2).

#### 4. Discussion

The specific antibody responses against proteins involved in the lytic cycle (NcGRA7) and the tachyzoite-bradyzoite transition (NcSAG4, NcBSR4 and NcSRS9) were investigated for the first time and shown to be correlated with virulence in mice infected with *N. caninum*. Differences in virulence related parameters such as morbidity, mortality and abortions between different *N. caninum* isolates have been observed in previous *in vivo* experiments (Miller et al., 2002; Quinn et al., 2002; Collantes-Fernández et al., 2006b; Rojo-Montejo et al., 2009a; Pereira García-Melo et al., 2010; Regidor-Cerrillo et al., 2010; Caspe et al., 2012). These findings correlate with specific antibody responses because high virulence isolates (i.e., Nc-Spain 5H, 7 and Nc-Liverpool) induced higher levels of anti-*N. caninum* IgG1 and IgG2 than low-to-moderate virulence isolates (i.e.: Nc-Spain 3H, 2H and 9) (Regidor-Cerrillo et al., 2010). Interestingly,

Regidor-Cerrillo et al. (2012a) recently used a proteomics approach to show that some proteins are more abundant in highly virulent *N. caninum* isolates. However, *Neospora* virulence factors remain to be elucidated, and the host- and parasite-dependant mechanisms responsible for the differences observed in the humoral immune responses developed by mice inoculated with isolates that differ in virulence have not been identified.

When the specific antibody levels against rNcGRA7, rNcSAG4, rNcBSR4 and rNcSRS9 developed by both pregnant and non-pregnant mice inoculated with 9 different bovine Spanish isolates and the Nc-Liverpool isolate were studied in the present work, significant correlations between the specific humoral immune responses developed against these proteins and several *in vivo* and *in vitro* parameters were observed.

The specific antibody responses developed against rNcGRA7 were correlated with virulence parameters in both non-pregnant and pregnant mouse models. It has been postulated that a higher parasite burden of the high virulence isolates increases the exposure of the mice to the protein and, consequently, a major production of specific anti-rNcGRA7 immunoglobulins (Aguado-Martínez et al., 2009b). However, the tendency of the high virulence isolates to produce higher levels of antibodies against rNcGRA7 was reversed in non-pregnant mice during the early infection (8 days p.i.) when low-to-moderate virulence isolates showed higher levels of anti-rNcGRA7 antibodies. This result is in accordance with the higher parasite burden observed in the blood and lungs of mice inoculated with low-to-moderate virulence isolates during the acute phase of infection reported by Pereira García-Melo et al. (2010). In this case, it is thought that the low-to-moderate virulence isolates could be more exposed to the host cellular and

humoral immune responses during the parasitemia period that is evidenced by higher levels of specific- *N. caninum* antibodies and may lead to a faster clearance of the parasite. On the other hand, the highest levels of anti-rNcGRA7 detected in sera from mice inoculated with high virulence isolates corresponded to the chronic phase of infection (16-64 days p.i.) in the non-pregnant model and day 30 p.p. in the pregnant model when the morbidity and mortality rates were recorded. Moreover, the pattern of recognition of rNcGRA7 observed in our study was in accordance with the results observed previously by Aguado-Martínez et al. (2009b), who reported higher levels of anti-rNcGRA7 antibodies in mice inoculated with the Nc-Liverpool isolate compared to mice inoculated with the Nc-1 isolate. However, virulence-related parameters such as dam morbidity, neonatal morbidity and mortality and vertical transmission were correlated with specific anti-rNcGRA7 antibody levels. In addition, a correlation between the *N. caninum*-specific IgG1 and IgG2a antibodies and the production of specific antibodies against rNcGRA7 was observed in both the non-pregnant and pregnant mouse models. This result is in accordance with previous mouse assays that reported high morbidity rates in mice when high anti-*N. caninum* IgG1 and IgG2a and anti-rNcGRA7 responses were detected in response to a high virulence isolate (Aguado-Martínez et al., 2009b). In this sense, higher levels of anti-rNcGRA7 antibodies induced by high virulence isolates could be explained by increases in the parasite dissemination and growth rate in host tissues compared to low-to-moderate virulence isolates because a correlation with the  $TY_{56h}$  values was detected. This hypothesis is supported by several different findings. It is known that the highly immunogenic dense granule protein NcGRA7 is involved in invasion and is associated with the active

replication of the parasite as well as the establishment of the parasitophorous vacuole in the host cell (Hemphill et al., 1997; Aguado-Martínez et al., 2010). Moreover, in a recent study of *in vivo* *N. caninum* dissemination, low-to-moderate virulence isolates showed a lower efficiency of transmigration within dendritic cells and a lower gliding motility than high virulence isolates (Collantes-Fernández et al., 2012). Therefore, the differences observed between the infected groups could reflect the different abilities of the isolates to replicate and disseminate within the host, in agreement with the correlations found between the *in vivo* virulence parameters and the *in vitro* parasite invasion and proliferation rates reported by Regidor-Cerrillo et al. (2011). However, the outcome of a *N. caninum* infection is affected by a combination of host and parasite factors, whereas *in vitro* parameters are only parasite dependent, so associations between the *in vitro* and *in vivo* behaviour of *N. caninum* isolates should be considered with caution.

Regarding the bradyzoite stage-specific proteins, no specific antibodies against the immunogenic protein rNcSAG4 in the non-pregnant mouse model were detected, contrary to the results obtained by Aguado-Martínez et al. (2009b); this difference might be due to a lower parasite dose employed since  $10^6$  tachyzoites per mouse was used in our study *versus*  $2 \times 10^6$  tachyzoites per mouse in Aguado-Martínez et al. (2009b). On the other hand, there were a higher number of mice inoculated with high virulence isolates that showed specific anti-rNcSAG4 antibodies in the pregnant mouse model. Similarly, antibodies against rNcBSR4 and rNcSRS9 were only detected by some dams inoculated with high virulence isolates, such as Nc-Spain 4H, Nc-Spain 7 and Nc-Liverpool, although specific antibodies against these two proteins were not detected in the non-pregnant model. Because NcSAG4 is early expressed during the

tachyzoite-bradyzoite conversion (Fernández-García et al., 2006), this protein could be exposed to the host immune system. On the contrary, the bradyzoite-specific late-expressed proteins NcBSR4 and NcSRS9 have been only detected in mature cysts within host tissues (Risco-Castillo et al., 2007; Risco-Castillo et al., 2011). In this sense, NcBSR4 and NcSRS9 would be only exposed to the host immune system after a cyst ruptured to reactivate the infection. In accordance with this model, several experiments with TgSRS9 in transgenic parasites demonstrated that this protein plays a role in parasite persistence and posterior parasite reactivation (Kim & Boothroyd, 2005; Kim et al., 2007). Indeed, whereas both *N. caninum* proteins were detected by immunohistochemistry techniques in tissue cysts of cattle congenitally infected with the Nc- Spain 7 isolate, these proteins have been rarely detected *in vitro* assays in which mainly vacuoles with a mixture of tachyzoites and bradyzoites instead of mature cysts were obtained (Risco-Castillo et al., 2007; Risco-Castillo et al., 2011). The detection of these three bradyzoite-specific proteins by a few mice from groups inoculated with high virulence isolates for which morbidity and mortality were recorded could be due to a spontaneous rupture of the cysts (Rettigner et al., 2004a). The serological differences observed between the infections with the low-to-moderate virulence isolates and the high virulence isolates might be not only attributed to their intra-organic distribution during infection and the final parasite burden in brain, but also to their different capacities for the tachyzoite-bradyzoite switch (Collantes-Fernández et al., 2006b; Pereira García-Melo et al., 2010). Therefore, further investigations would be needed to clarify the differences in conversion rates among this panel of *N. caninum* isolates.

This association of virulence with the specific immune response observed in *N. caninum* infections is in accordance with the results obtained in studies of the closely related parasite *T. gondii*. Regarding the humoral immune response, Pardini. et al. (2012) have recently reported that a high virulence strain in mice (RH; type I) induced earlier and more specific antibody levels against TgSAG1 compared to type II and type III strains in infected pigs. Moreover, Sousa et al. (2008) reported that TgGRA6 could potentially be used to serotype different *T. gondii* strains in human samples because higher antibody levels against TgGRA6 were detected in sera from patients infected with the high virulence strains (type I). Interestingly, Hill et al. (2012) reported that a higher number of genes involved in the host immune and inflammatory responses were up-regulated in mice infected with a type I strain. In fact, several *T. gondii* proteins have been identified as virulence factors, particularly the rhoptry protein kinases and pseudokinases that modulate proinflammatory host cytokine IL-12 and interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) responses (Saeij et al., 2006).

In conclusion, NcGRA7 and NcSAG4 are proteins clearly correlated with virulence, and in a lesser extent NcBSR4 and NcSRS9 proteins. Further analyses should be performed in order to verify the usefulness of NcGRA7 and NcSAG4 as predictive markers for virulence in an experimental bovine model of neosporosis. However, the utility of these proteins as serological markers in naturally infected cattle might be difficult to analyse due to several variables that may have influence on the serological response (eg. circulating isolate in the herd, parasite burden and parasite stage). Moreover, antibodies against anti-bradyzoite-specific late expressed proteins seem to also be related to virulence. Further functionality and host cellular immune response studies should

be conducted, and other proteins involved in the tachyzoite lytic cycle (i.e., proteins involved in adhesion and invasion processes like surface proteins -NcSAG1, NcSRS2- dense granules- NcGRA1, NcGRA2, NcGRA6-

microneme –NcMIC1, NcMIC3- and rhostry - NcROP2- proteins) as well as proteins more abundant in high virulence isolates (Regidor-Cerrillo et al., 2012a) should also be considered for their potential roles in virulence.

### **Acknowledgements**

We gratefully acknowledge Carmen Cuevas and Vanesa Navarro for their excellent technical assistance. We thank Diana Williams (Liverpool School of Tropical Medicine, Liverpool, U.K.) for kindly providing the Nc-Liverpool isolate. This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (M.I.N.E.C.O.; grant number AGL2010-22191/GAN). Elena Jiménez-Ruiz was supported by a fellowship from M.I.N.E.C.O. (grant number BES-2008-005403).

**Supplementary Table 1.** Correlation analyses of O.D. (in black) and R.I.C.P. (in red) of specific antibody values against rNcGRA7, rNcSAG4, rNcBSR4 and rNcSRS9 with anti-IgG1 and IgG2a values and *in vivo* parameters measured in both the non-pregnant and pregnant mouse models. Globally similar significant variations were observed with both groups

Model	Specific antibodies	Days	IgG1		IgG2a		Dams morbidity		Parasite presence in dams		Neonatal morbidity		Neonatal mortality		Vertical transmission			
			R <sup>2a</sup>	P <sup>b</sup>	R <sup>2a</sup>	P <sup>b</sup>	ρ <sup>c</sup>	P <sup>b</sup>	ρ <sup>c</sup>	P <sup>b</sup>	ρ <sup>c</sup>	P <sup>b</sup>	ρ <sup>c</sup>	P <sup>b</sup>	ρ <sup>c</sup>	P <sup>b</sup>	ρ <sup>c</sup>	P <sup>b</sup>
Non-pregnant <sup>d</sup> (Pereira)	rNcGRA7	8 p.i.	0.317	0.038	0.739	<0.001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		16 p.i.	0.442	0.003	0.495	0.001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
García-Melo et al. 2010)	rNcGRA7	32 p.i.	0.650	<0.001	0.557	<0.001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		64 p.i.	0.706	<0.001	0.618	<0.001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pregnant (Regidor-Cerrillo et al. 2010)	rNcGRA7	30 p.p.	0.896	<0.001	0.904	<0.001	0.748	0.008	N.C.	-	0.815	0.002	0.752	0.008	0.609	0.047	0.885	<0.001
		30 p.p.	N.C.	-	0.222	0.008	0.832	0.001	0.679	0.022	0.688	0.019	0.733	0.01	0.764	0.006	0.214	0.011
Pregnant (Regidor-Cerrillo et al. 2010)	rNcSAG4	30 p.p.	0.214	0.011	0.286	0.001	0.853	0.001	0.661	0.027	0.875	<0.001	0.893	<0.001	0.709	0.015	0.853	0.001
		30 p.p.	N.C.	-	0.160	0.061	0.695	0.018	0.62	0.042	0.679	0.022	0.724	0.012	0.600	0.051	N.C.	-
Pregnant (Regidor-Cerrillo et al. 2010)	rNcBSR4	30 p.p.	N.C.	-	0.211	0.012	0.853	0.001	N.C.	-	0.765	0.006	0.756	0.007	0.636	0.035	0.211	0.012
		30 p.p.	N.C.	-	0.174	0.039	0.642	0.033	N.C.	-	N.C.	-	0.638	0.035	0.673	0.023	0.211	0.012
Pregnant (Regidor-Cerrillo et al. 2010)	rNcSRS9	30 p.p.	0.211	0.012	0.264	0.002	0.705	0.015	N.C.	-	0.688	0.019	0.743	0.009	0.627	0.039	0.211	0.012
		30 p.p.	N.C.	-	0.174	0.039	0.642	0.033	N.C.	-	N.C.	-	0.638	0.035	0.673	0.023	0.211	0.012

<sup>a</sup> R<sup>2</sup> of Pearson. <sup>b</sup> P-value (two-tailed). <sup>c</sup> Spearman rho coefficient. <sup>d</sup> Morbidity and mortality rates were not recorded and correlation analyses were not performed. N.C.: no correlation

**Supplementary Table 2:** Spearman correlation analyses of median values of O.D. (in black) or R.I.C.P. (in red) specific antibodies against rNcGRA7 and the *in vitro* parameters for each isolate. Globally similar significant variations were observed with both groups.

Model	Days p.i.	Median IR <sub>4h</sub> <sup>a</sup>		Average Td <sup>a</sup>		TY <sub>56h</sub> <sup>a</sup>	
		ρ*	P <sup>#</sup>	ρ*	P <sup>#</sup>	ρ*	P <sup>#</sup>
Non- pregnant (Pereira García-Melo et al. 2010)	8	N.C.	-	N.C.	-	N.C.	-
		N.C.		N.C.		N.C.	
	16	N.C.	-	N.C.	-	N.C.	-
		N.C.		N.C.		N.C.	
	32	N.C.	-	N.C.	-	0.810	0.015
		N.C.		N.C.		0.810	0.015
	64	N.C.	-	N.C.	-	0.821	0.023
		N.C.		N.C.		N.C.	
<b>Pregnant</b>							
(Regidor-Cerrillo et al., 2010)		0.673	0.033	N.C.	-	N.C.	-
		N.C.	-	N.C.		N.C.	

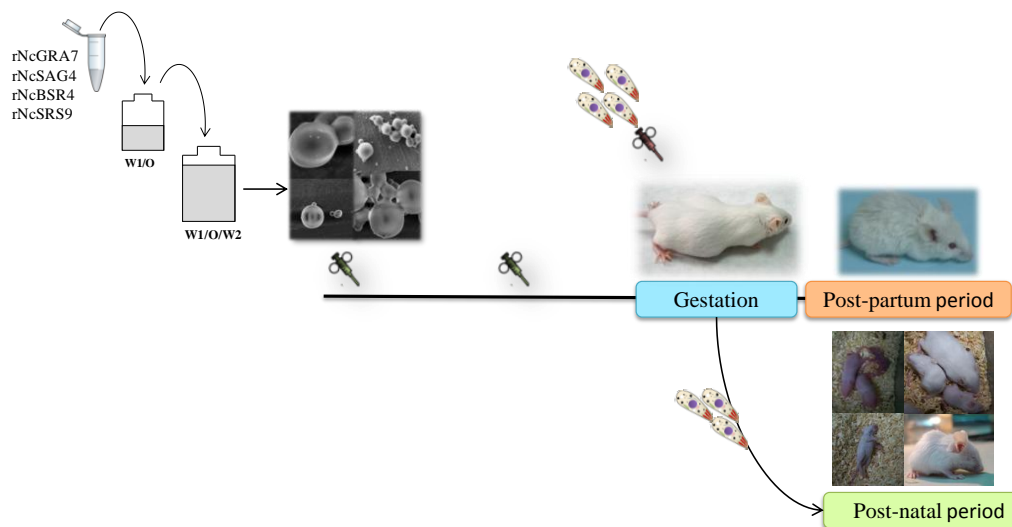
<sup>a</sup> *In vitro* parameters reported by Regidor-Cerrillo *et al.* 2011; IR<sub>4h</sub>: invasion rate at 4 h; Td: doubling time; TY<sub>56h</sub>: tachyzoite yield at 56 hours. \* Spearman rho coefficient. <sup>#</sup>P-value (two-tailed). N.C.: no correlation

# Chapter III:

## **Low efficacy of NcGRA7, NcSAG4, NcBSR4 and NcSRS9 formulated in poly- $\epsilon$ -caprolactone against *Neospora caninum* infection in mice.**

Jiménez-Ruiz, E.<sup>1</sup>, Álvarez- García, G.<sup>1</sup>, Aguado-Martínez, A.<sup>1</sup>, Salman, H.<sup>2</sup>, Irache, J.M.<sup>2</sup>, Marugán-Hernández, V.<sup>1</sup>, Ortega-Mora, L.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>SALUVET, Animal Health Department, Faculty of Veterinary Sciences, Complutense University of Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain. <sup>2</sup> Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology. University of Navarra. 31008. Pamplona. Spain.



Published in *Vaccine* (2012) 30, 4983–4992.

Presented as poster in WAAVP congress 2011 (21st-25th August, Buenos Aires, Argentina)



**Abstract**

The protective efficacy of vaccination with *Neospora caninum* recombinant antigens was evaluated in BALB/c pregnant and non-pregnant mouse models of neosporosis. A major immunodominant dense granule protein (NcGRA7) and three bradyzoite-specific surface antigens (NcSAG4, NcBSR4 and NcSRS9) were expressed in *Escherichia coli* and encapsulated within poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL) nanoparticles for the first time. Good efficiencies of entrapment (greater than 50%) were obtained for all encapsulated proteins. Moreover, antigenicity was unaffected after formulation. Afterwards, separate groups of mice were immunised with the nanoparticles and were then challenged with *N. caninum* tachyzoites. High IgG1 and IgG2a antibody levels of anti-*N. caninum* and specific antibodies directed against recombinant proteins were developed by all of the immunised groups. Mice previously inoculated with encapsulated rNcGRA7 produced significant levels of IFN- $\gamma$ . However, in general, a low production of IFN- $\gamma$  was detected. This may indicate a failure in the complete liberation of antigens after immunisation or an incorrect balance of the Th1/Th2 response to combat acute neosporosis during pregnancy. In fact, high morbidity and mortality rates were observed in dams. Moreover, vertical transmission was not prevented, and high neonatal mortality rates occurred similarly among the groups. Despite the global absence of efficacy, the study reveals some results of positive efficacy regarding dams and pups' survival and parasite presence for NcSRS9 recombinant protein. Furthermore, vaccination with rNcGRA7 encapsulated alone or combined with rNcSAG4 resulted in a slight decrease of parasite presence in non-pregnant mice. These promising results are further discussed to suggest new approaches that may be more suitable to test vaccine formulations based on bradyzoite stage-specific proteins.

**Keywords:** *Neospora caninum* / rNcGRA7 / rNcSAG4 / rNcSRS9 / rNcBSR4 / vaccines / Poly- $\epsilon$ -caprolactone / mice

**1. Introduction**

*Neospora caninum* is an obligate intracellular protozoan parasite closely related to *Toxoplasma gondii*, which has been recognised worldwide as a major cause of infectious bovine abortion (Dubey et al., 2007; Dubey & Schares, 2011). Currently, there are no effective methods for the control of neosporosis, and thus, vaccine development for neosporosis prevention in cattle remains the main objective in several research efforts. Although bovine models are more suitable for the study of neosporosis and immunoprophylactic control measures, the availability of inbred strains of mice led to the

extensive use of different mouse models for an initial screening of vaccines owed to the reduced cost, easy handling and reduced time of pregnancy. In previous studies, live-parasite vaccines have shown good results in experimental trials (Williams et al., 2007; Rojo-Montejo et al., 2009b; Marugán-Hernández et al., 2011c). However, live vaccines have several disadvantages due to their high cost of production, stability along the distribution process and safety. Inactivated vaccines are a good option because they can show promising levels of protection against vertical transmission (Romero et al., 2004; Rojo-Montejo et al., 2011a). However, their

production is also expensive. For these reasons, recombinant vaccines may represent a good alternative in terms of a lower cost of manufacturing and safety, as well as a focussed selection of the relevant antigens to selectively target effective immune responses (Ellis et al., 2008). In this sense, a repertoire of surface and secretory *N. caninum* proteins have been previously selected and tested in mouse models with variable results such as NcGRA7, NcROP2, NcMIC1 and NcPDI, among others (Nishikawa et al., 2001c; Cannas et al., 2003b; Liddell et al., 2003; Haldorson et al., 2005; Debache et al., 2010; Monney et al., 2011b). When choosing the antigens as vaccine targets for this study, we focused on proteins involved in two essential events in the pathogenesis of neosporosis: the lytic cycle and the establishment of the parasite into the host's tissues. Thus, we employed the recombinant NcGRA7 protein (Álvarez-García et al., 2007), which is a highly immunogenic dense granule protein involved in invasion and associated with the active replication of the parasite as well as the establishment of the parasitophorous vacuole in the host cell (Hemphill et al., 1998; Aguado-Martínez et al., 2010). NcGRA7 has been previously evaluated in vaccine formulations with variable protection results (Liddell et al., 2003; Jenkins et al., 2004; Aguado-Martínez et al., 2009a; Nishikawa et al., 2009). We followed the same approach with the protein NcSAG4, which is expressed early in bradyzoite conversion (Fernández-García et al., 2006) and has been tested in vaccine formulations with the water-in-oil Titermax Gold Adjuvant without any protection results (Aguado-Martínez et al., 2009a). Additionally, this is the first time that two bradyzoite late-expressed-specific proteins, NcBSR4 (Risco-Castillo et al., 2007) and NcSRS9 (Risco-Castillo et al., 2011), were employed as vaccine candidates. It is known that these proteins play a role in maintaining parasite persistence in host

tissues and are involved in the reactivation within the intestinal cycle in *T. gondii* (Kim & Boothroyd, 2005; Kim et al., 2007), indicating that they may be good vaccine targets. Neither TgSRS9 nor TgBSR4 have been previously tested in vaccines against toxoplasmosis and neosporosis. However, other bradyzoite-specific proteins, such as TgBAG1 and TgMAG1, showed protection in a mouse model of toxoplasmosis (Nielsen et al., 2006).

Another critical variable in designing formulations against intracellular protozoan is the use of potent adjuvants that can boost antigen immunogenicity and induce an appropriate cell-mediated immune response. (Innes et al., 2002). Several adjuvants have been tested in vaccine assays against intracellular parasites like *N. caninum*, with promising results (Jenkins et al., 2004; Nishikawa et al., 2009; Debache et al., 2010; Debache et al., 2011b). It is known that polymer particles prepared from both synthetic and natural macromolecules have shown great potential as new generation adjuvants (Irache et al., 2011). In the present study, we employed poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL), a biodegradable and biocompatible polymer that has been previously tested as an adjuvant with good results against *Streptococcus equi* and *Brucella ovis* (Murillo et al., 2001; Florindo et al., 2009).

The objectives of our work were first, to entrap four different recombinant proteins of *N. caninum* within PCL nanoparticles prepared by the water/oil/water (w/o/w)-method together and to characterise these formulations in terms of protein loading, morphology, size and physical state of all nanoparticles. Second, the vaccine efficacy of these new formulations was evaluated in pregnant and cerebral mouse models to establish their efficacy against vertical transmission and chronic infection of *N. caninum*. In the present work, we attempted to improve the efficacy of rNcGRA7 and rNcSAG4 with a new adjuvant (Aguado-

Martínez et al., 2009a), and to obtain a possible synergetic effect with the mixture NcGRA7 and rNcSAG4 or the mixture of the poorly immunogenic rNcBSR4 and rNcSRS9 proteins.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Cloning and purification of recombinant proteins.

Both NcGRA7 and NcSAG4 proteins were produced in a prokaryotic expression vector system following previously described procedures with few modifications (Fernández-García et al., 2006; Álvarez-García et al., 2007). Both proteins were cloned into a new plasmid called pET-45b (+) (Novagen, Germany). NcSAG4 was cloned without the N-terminal signal peptide and GPI-anchor to modify its possible posterior folding and to improve its immunogenicity (Aguado-Martínez et al., 2009a). In contrast, rNcBSR4 and rNcSRS9 were cloned into a prokaryotic expression vector, pRSET-C (Invitrogen, USA), and expressed as polyhistidine-tagged fusion proteins in *Escherichia coli*, as previously described (Risco-Castillo et al., 2007; Risco-Castillo et al., 2011).

After the bacteria were lysed, rNcGRA7 was purified from the soluble fraction by immobilised metal ion affinity chromatography (IMAC) using HisTrapHP columns (GE Healthcare, USA) (Álvarez-García et al., 2007). rNcSAG4, rNcSRS9 and rNcBSR4 were extracted from inclusion bodies and denatured with a binding buffer containing 20 mM phosphate salts, 8 M urea and 40 mM imidazole (Aguado-Martínez et al., 2008). These recombinant proteins were obtained using an on-column refolding and purification procedure based on a method previously reported (Zhao et al., 2005) that consisted of a descent urea gradient followed by an elution with a high imidazole concentration buffer. The concentration and purity of both recombinant proteins were analysed by sodium dodecyl

sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) with a standard BSA scale (Roche, Switzerland) and by Western blot with a monoclonal anti-T7 tag antibody (Novagen, Germany) and polyclonal anti-rNcGRA7, rNcSAG4, rNcBSR4 and rNcSRS9 mouse sera (Fernández-García et al., 2006; Risco-Castillo et al., 2007; Aguado-Martínez et al., 2008; Risco-Castillo et al., 2011). Protein concentrations were measured using Quantity One software (v.7.2, BioRad, USA). All the proteins were stored at -80°C until use.

### 2.2. Encapsulation of recombinant proteins.

#### 2.1.1. Preparation of nanoparticles.

Nanoparticles were prepared by a multiple ( $w_1/o/w_2$ ) emulsion solvent evaporation method, as described by Sinha et al. (2004) with some modifications. Briefly, 1 mg of rNcSAG4, rNcSRS9 or rNcBSR4 (hydrophobic proteins) in 1 ml of an elution buffer (NaCl [50 mM],  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  [1 mM],  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  [1 mM], imidazole [500 mM], glycerol [20%], glucose [5%] at pH 7.4) were mixed with 60 mg of a non-ionic surfactant Pluronic F-68<sup>®</sup> (Sigma, USA). In parallel, 150 mg of poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL; Aldrich) was dissolved in 2.5 ml trichloromethane (Scharlau, USA). Then, the aqueous phase containing the antigen was dispersed in the organic phase of the polymer by sonication for 20 seconds (Microson<sup>™</sup> Ultrasonic Cell Disruptor, USA) to obtain the inner emulsion ( $w_1/o$ ). This emulsion was then mixed again at high speed with 8 ml of a continuous aqueous phase containing 0.5% w/v polyvinyl alcohol (PVA; Mw: 115,000, BDH-Supplies). The resulting multiple emulsions ( $w_1/o/w_2$ ) were stirred with a bladder agitator in a fume hood for 2 hours at room temperature to facilitate the evaporation of the organic solvent. Finally, the resulting nanoparticles were centrifuged, washed and freeze-dried using 5% mannitol as a

cryoprotector. The resulting nanoparticles were named NP1-rNcSAG4, NP1-rNcBSR4 and NP1-rNcSRS9. Empty PCL nanoparticles were prepared in the same way in the absence of antigen (NP1).

For the encapsulation of the soluble rNcGRA7 protein in PCL nanoparticles (NP2-rNcGRA7), the previous protocol was modified. In this case, the inner aqueous emulsion was obtained after mixing 1 mg/ml of antigen in 0.5 ml with 300  $\mu$ l of calcium chloride (10 mg/ml in water; Sigma, USA), 100 ml Protasan UP G113 (10  $\mu$ g/ml water; NovaMatrix/FMC, Norway) and 60 mg Pluronic F-68<sup>®</sup> (Sigma, USA). The organic phase of PCL and the multiple emulsions were prepared following the protocol mentioned above. Similarly, the nanoparticles were purified and freeze-dried, as described above. Empty PCL nanoparticles (NP2) were also prepared in the same way and used as a control. Before freeze-drying, 20  $\mu$ l samples from all formulations were collected for the characterisation of the particles.

### **2.1.2. Characterisation of nanoparticles and quantification of antigen loading.**

The size, zeta potential (particles superficial charge) and polydispersity of the nanoparticles were determined immediately after the preparation, using photon correlation spectroscopy by a Malvern Nano ZS instrument (Malvern Instruments Ltd., UK). The diameter of nanoparticles was determined after dispersion in ultrapure water (1:10 dilution) and measured at 25°C with a dynamic light scattering angle of 90°. The average particle size was expressed as the volume mean diameter ( $V_{md}$ ) in nanometres (nm), and the average surface charge in milliVolts (mV).

The particles were purified by centrifugation (17000xg, 20 min at RT), then the supernatant and the precipitated nanoparticles were stored separately until the quantification by SDS-

PAGE gel with their previous-quantified protein scale. For this purpose, the nanoparticles within the pellet were dissolved with trichloromethane and acetone (3:1, v/v) by shaking overnight on a magnetic stirrer. Then, the organic solvent was evaporated. The concentration of released protein was measured in a Coomassie-stained SDS-PAGE using a recombinant non-encapsulated protein curve and the Quantity One software (v.7.2, BioRad, USA).

Entrapment efficiency (EE) was calculated as the percentage of the weight of the antigen entrapped in the batch of nanoparticles regarding the initial weight of antigen.

### **2.1.3. Structural integrity and antigenicity.**

The structural integrity and antigenicity of the nanoparticles were assessed by SDS-PAGE and immunoblotting, respectively. For SDS-PAGE, the samples were analysed using 15% acrylamide gels stained with a Coomassie blue colorant. Immunoblotting was performed following previously described protocols (Aguado-Martínez et al., 2009a), using bovine sera naturally infected with *N. caninum*. Antibodies used for detection were peroxidase-conjugated monoclonal anti-bovine IgG1-IgG2a IgG (LSI, France) and 4-chloro-1-naphtol (BioRad, USA).

### **2.3. Soluble extract of parasites and tachyzoite.**

*N. caninum* tachyzoites of the Nc-Liverpool isolate (Barber et al., 1993) were maintained *in vitro* by continuous passage in MARC-145 cells and Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Lonza, Switzerland), using standard procedures (Pérez-Zaballos et al., 2005). For the *N. caninum* challenge, tachyzoites were resuspended at the required dose of  $2 \times 10^6$  in a final volume of 200  $\mu$ l per mouse and used immediately to infect the mice (Collantes-

Fernández et al., 2004). Tachyzoites for the PCR controls were prepared as previously described (López-Pérez et al., 2006).

## 2.4. Vaccination assay in mice.

### 2.4.1. Mice and immunisations.

From a commercial supplier (Harlan Interfauna Ibérica, Spain), we obtained 10 groups of 29 6-week-old BALB/c female mice. They were free of common viral, parasite and bacterial pathogens, according to the results of routine screening procedures performed by the manufacturer. Mice were fed *ad libitum* in a controlled environment with 12-h light and 12-h dark cycles. All mice handling procedures complied with current EU legislation.

The vaccination assay was performed in two steps, due to the high number of animals to be handled. An adjuvant group, non-vaccinated and non-challenged group and a non-vaccinated but challenged group were included as controls in both assays, and the results were expressed as a unique experiment.

Animals were immunised twice within a 21-day interval with a total of 40 µg of protein, as detailed in Table 1. Subcutaneous inoculations were done in the back. The immunisation dose was calculated based on micrograms loaded in the nanoparticles. Empty particles doses, used in the adjuvant control groups (G7 and G8), were calculated as average polymer milligrams inoculated with encapsulated proteins (G1, G2, G3, G4, G5 and G6).

Prior to challenge, five mice from each group were randomly euthanised to analyse their humoral and cellular immune responses. Blood samples were collected by cardiac puncture, and serum was obtained by centrifugation and cryopreserved until serological analysis could be performed. The spleens of the mice were aseptically removed

and immediately processed for splenocyte culture (Aguado-Martínez et al., 2009a).

Pregnancy was achieved following the procedures described previously (López-Pérez et al., 2006; Aguado-Martínez et al., 2009a). Briefly, two weeks after the second booster vaccination, the mice were mated for 96 h following synchronisation of oestrus by the Whitten effect (Whitten, 1957). Mice from groups 1 to 9 were challenged subcutaneously with  $2 \times 10^6$  tachyzoites of the Nc-Liverpool isolate at mid-gestation (between days 7 and 11 of gestation). Mice from group 10 were left unchallenged and received an inoculation of PBS.

Dams and their progeny were evaluated from birth to day 30 post-partum (p.p.). The data on the fertility rate, litter size, hebdomadal mortality, neo-natal mortality and clinical signs of dams and pups were collected along the course of the experiment. The fertility rate was calculated as the percentage of female mice housed with males that became pregnant. Hebdomadal mortality was considered as the number of pups that died within 48 h after birth. Neo-natal mortality was considered as the number of pups that died from day 3 p.p. to day 30 p.p. The brain and lungs of dead pups were collected, but some samples were lost due to cannibalism. Dams and surviving litters were euthanised in a CO<sub>2</sub> chamber on day 30 p.p. The brains and lungs were aseptically collected from dams and pups and stored at -20°C until PCR analysis could be performed. Non-pregnant mice were also simultaneously challenged (3 weeks following the second booster vaccination). Non-pregnant mice were euthanised at day 30 post-challenge (p.c.). Brains, lungs and blood for serum samples were also collected and frozen at -20°C until further analysis. All mice were euthanised in a CO<sub>2</sub> chamber.

**Table 1:** Groups of mice employed in the vaccination assay.

Group	Protein	Dose <sup>a</sup>	Adjuvant	Challenge <sup>b</sup>
G1	rNcGRA7	40 µg	PCL*	2·10 <sup>6</sup>
G2	rNcSAG4	40 µg	PCL	2·10 <sup>6</sup>
G3	rNcGRA7 & rNcSAG4	40 µg	PCL*	2·10 <sup>6</sup>
G4	rNcBSR4	40 µg	PCL	2·10 <sup>6</sup>
G5	rNcSRS9	40 µg	PCL	2·10 <sup>6</sup>
G6	rNcBSR4 & rNcSRS9	40 µg	PCL	2·10 <sup>6</sup>
G7	-	-	PCL*	2·10 <sup>6</sup>
G8	-	-	PCL	2·10 <sup>6</sup>
G9	PBS	-	-	2·10 <sup>6</sup>
G10	PBS	-	-	PBS

<sup>a</sup> Amount of encapsulated proteins inoculated in two boosts per mouse (µg); <sup>b</sup> Dose of Nc-Liverpool tachyzoites inoculated per mouse; \* Inner phase with Protosan™ UP G113 and CaCl<sub>2</sub>.

#### 2.4.2. Analysis of humoral and cellular immune response.

Specific IgG1 and IgG2a against *N. caninum* were detected by a soluble tachyzoite antigen based ELISAs (Collantes-Fernández et al., 2006b). To measure serum levels of specific IgGs against native NcSAG4 prior to challenge, a tachyzoite-based ELISA was performed; this assay used soluble extracts of transgenic *N. caninum* tachyzoites that constitutively expressed the bradyzoite stage-specific NcSAG4 antigen (Marugán-Hernández et al., 2011b).

Western blots using rNcSAG4, rNcGRA7, rNcSRS9 and rNcBSR4 were performed as previously described (Aguado-Martínez et al., 2008) by employing mouse serum samples prior to challenge at a dilution of 1:50 and then using an anti-mouse IgG peroxidase-conjugated antibody (Sigma) at a dilution of 1:3000.

Splenocytes of mice sacrificed five days after the second booster were aseptically recovered (Vemulapalli et al., 2007) and cultured in 96-well plates at a concentration of 4·10<sup>5</sup> cells/well with the following antigens or extracts: 1 µg of concanavalin A (ConA; all groups), 4 µg of rNcGRA7 (groups 1, 3, 7 and 10), 4 µg of rNcSAG4 (groups 2, 3, 8 and 10),

4 µg of rNcBSR4 (groups 4, 5, 6, 8 and 10), 4 µg of rNcSRS9 (groups 4, 5, 6, 8 and 10), 2 µg of soluble tachyzoites extract (all groups), 10 µg of empty particles, and no stimulant (medium control; all groups). The cells were cultured for 72 h at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. Afterward, the culture supernatants were collected by centrifugation and stored at -80°C until analysis. The assay was performed in triplicate. IFN-γ, IL-4 and IL-10 were quantified in supernatants using cytokine ELISA kits (BD Biosciences, USA), according to the manufacturer's instructions. The results were expressed in pg/ml.

Th1/Th2 ratio could be measured by the ratio of IFN-γ/IL-4. If no detectable IL-4 levels were observed, the ratio of IFN-γ/IL-10 was calculated.

#### 2.4.3. DNA extraction and PCR techniques for parasite detection.

Genomic DNA from brain or lung tissues was extracted using commercial kits (Real Pure DNA Extraction, Durviz, Spain), according to the manufacturer's instructions.

*N. caninum* DNA in tissue samples was detected via nested-PCR of the ITS1 region

(Buxton et al., 1998). DNA from  $10^7$  Nc-1 tachyzoites was employed as a positive control.

### 2.5. Statistical analysis.

Data analysis was conducted following the recommendations given by Morrison (2002). Data were organised in a contingency table to compare the fertility rates, the proportion of dead animals and the proportion of animals with clinical signs or with *N. caninum* DNA in their tissues. The chi-squared test ( $\chi^2$ ) was performed when comparing three or more groups, and a *P* value < 0.05 was considered as statistically significant. Pair-wise comparisons were analysed by Fisher's exact test. In these cases, Bonferroni's adjustment was applied to the *P* value using the formula  $[0.05/k \times (k-1)/2]$ , where *k* corresponded to the number of challenged groups.

The Kaplan-Meier survival method was applied to estimate the portion of all pups surviving at each time point from birth to day 30 p.p. The log-rank statistical test was applied to compare survival curves between the different groups. Bonferroni's adjustment was also applied to the *P* value for comparing all pair-wise groups.

Optical density values obtained from ELISA analysis were compared between groups by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test.

Cytokine levels were compared between groups by one-way ANOVA, followed by a pair-wise Fisher's exact test. To compare antigen-specific cytokine response levels with those of the nonspecific levels produced by adding medium to the culture, Student's t-test was used. A *P* value < 0.05 was considered statistically significant. All statistical analyses were carried out using Statgraphics Plus v.5.1 (StatPoint, Inc., USA) and GraphPad Prism 5 v.5.01 (USA) software

## 3. Results

### 3.1. Nanoparticle characteristics and the entrapment efficiency within particles.

Table 2 summarises the main physico-chemical characteristics of the different nanoparticle formulations used in this work. For control nanoparticles, the mean size was approximately 430 nm (NP1) and 490 nm (NP2), and both nanoparticles displayed a negative superficial charge.

**Table 2:** Physico-chemical characteristics of the nanoparticles formulated with PCL with or without recombinant proteins.

	NP2- rNcGRA7	NP1- rNcSAG4	NP1- rNcBSR4	NP1- rNcSRS9	NP2 <sup>a</sup>	NP1 <sup>a</sup>
Size <sup>b</sup>	589	588	438	536	488	429
PdI <sup>c</sup>	0.436	0.431	0.497	0.604	0.281	0.461
Zeta potential <sup>d</sup>	-11.9	-6.1	-	-	-8.2	-8.56
EE <sup>e</sup>	53	80	70	50	-	-

<sup>a</sup> Empty particles; <sup>b</sup> Average particle size (nm); <sup>c</sup> Polydispersity index; <sup>d</sup> Average zeta potential (mV);

<sup>e</sup> Encapsulation efficiency: percentage of encapsulated proteins.

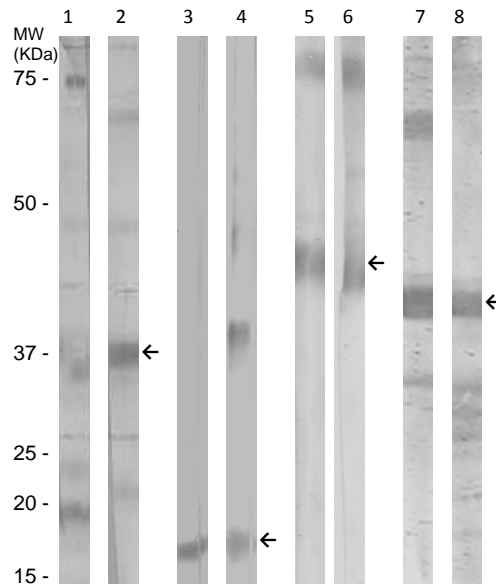
The encapsulation of antigens in the nanoparticles resulted in an increase of the mean sizes compared with the control particles. However, the zeta potential values of the antigen-loaded nanoparticles were found to be similar to those observed for empty nanoparticles, confirming the encapsulation of the antigen within the PCL particles.

In contrast, EE of the different antigens was always found to be greater than 50%. This parameter was particularly high when rNcSAG4 was loaded into the PCL nanoparticles. More importantly, all the encapsulated proteins preserved their structural integrity and antigenicity because they were recognised by sera collected from bovines naturally infected with *N. caninum* (Figure 1).

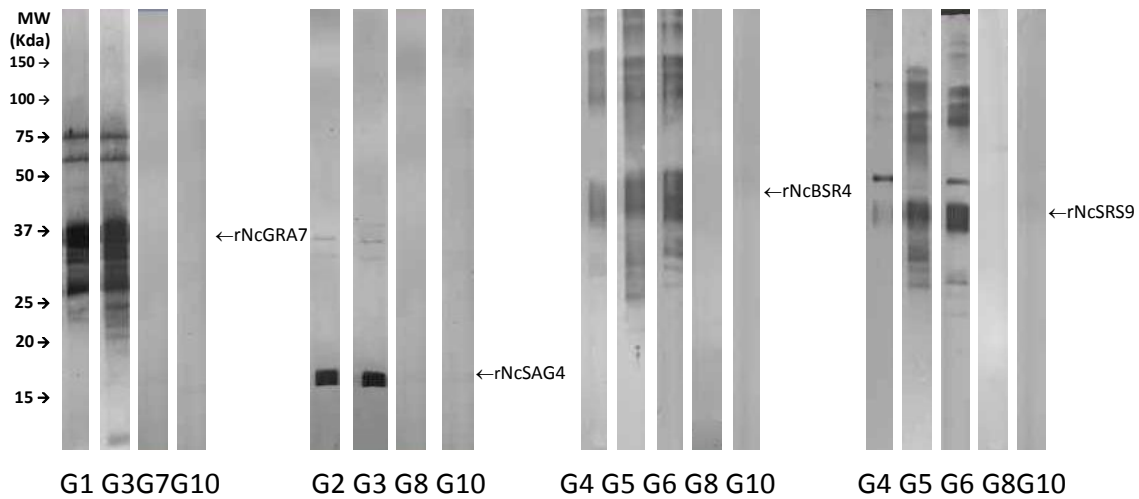
### 3.2. Humoral immune response.

Prior to challenge, all vaccinated groups showed specific antibodies against the corresponding inoculated recombinant protein, as analysed by western blot. G4, G5, G6, G7 and G8 recognised both rNcSRS9 and rNcBSR4 (Figure 2).

Mice immunised with NP2-rNcGRA7 (G1 and G3) recognised native NcGRA7 protein measured in a soluble extract-based ELISA, where IgG1 levels were higher than IgG2a levels ( $P < 0.05$ ; one-way ANOVA). Groups immunised with NP1-rNcSAG4 (G2) did not recognise the NcSAG4 native protein expressed by the transgenic isolate Nc1-SAG4<sup>c</sup> in a soluble extract-based ELISA.



**Figure 1:** Immunogenicity of both free and encapsulated recombinant proteins. 4-chloro-1-naphtol was used as substrate for visualizing peroxidase conjugates in Western blotting. Lane 1: rNcGRA7; lane 2: NP2-rNcGRA7; lane 3: rNcSAG4; lane 4: NP1-rNcSAG4; lane 5: rNcBSR4; lane 6: NP1-rNcBSR4; lane 7: rNcSRS9; lane 8: NP1-rNcSRS9.



**Figure 2:** Recombinant protein antigen-based western blots with sera from vaccinated mice prior to challenge. Groups immunised with encapsulated rNcBSR4 and/or rNcSRS9 (G4-G6) recognised both antigens by western blot. Sera from adjuvant control groups (G7 and G8) and a non-vaccinated control group (G10) were included in all cases.

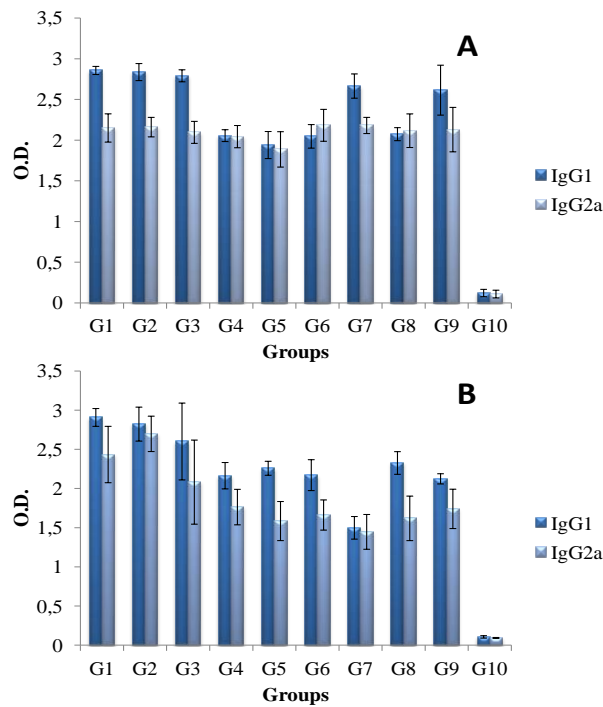
In pregnant mice, differences between the IgG1 and IgG2a levels in G1 to G3 and in control groups were similar to those in non-pregnant mice ( $P < 0.05$ ; one-way ANOVA). In contrast, in groups immunised with NP1-rNcBSR4 and NP1-rNcSRS9, the levels between IgG1 and IgG2a were similar, whereas in non-pregnant mice at day 30 p.i. showed higher levels of IgG1 than IgG2a (Figure 3).

### 3.3. Cell-mediated immune response.

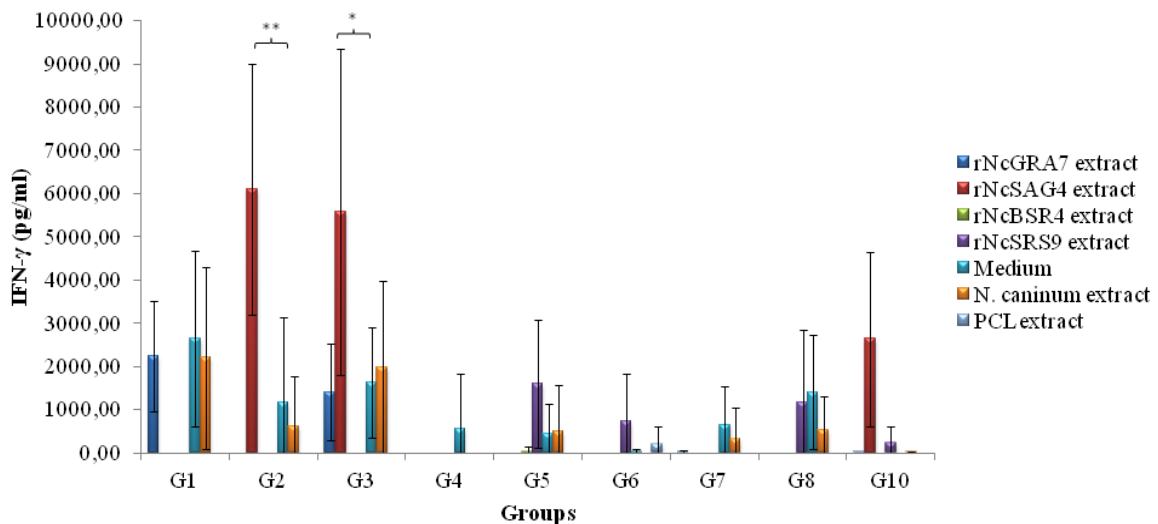
IFN- $\gamma$  was produced at lower levels than expected in response to recombinant proteins and showed a great variability between mice (Figure 4). G1 and G3 produced low levels of this cytokine against rNcGRA7, but only G1 levels were significantly different between G1 and the adjuvant control group (G7) and unvaccinated group (G10) ( $P < 0.05$ ; one way ANOVA; Student's t test). Both G2 and G3 produced high levels of IFN- $\gamma$  against rNcSAG4, but the control group (G10) secreted non-specific levels of IFN- $\gamma$  in response to the

rNcSAG4 antigen ( $P > 0.05$ ; one way ANOVA). No levels of IFN- $\gamma$  were found in the supernatants from splenocytes stimulated with the rNcBSR4 antigen. In the case of groups stimulated with the rNcSRS9 antigen, groups G5, G6 and G8 produced moderate levels compared with the control group, but these secreted levels were not significant ( $P > 0.05$ ; one way ANOVA, Student's T test). No statistically significant levels of IFN- $\gamma$  were secreted in response to the PCL polymer ( $P > 0.05$ ; one way ANOVA).

No significant amounts of IL-4 were produced after stimulation with any antigen in any group (data not shown). In contrast, IL-10 levels were measured and detectable upon stimulation with rNcGRA7 in G1 (1097.5 pg/ml) and G3 (521.3 pg/ml). Concerning stimulation with rNcSAG4, low levels of IL-10 were detected in groups vaccinated with this protein. No levels of IL-10 were detected in groups stimulated with rNcBSR4.



**Figure 3:** Anti-*N. caninum* immunoglobulins (IgG1 and IgG2a isotypes against tachyzoite soluble extract antigen) generated by vaccinated (G1-G8) and control groups (G9 and G10) during the post-challenge phase in pregnant mice (panel A) and non-pregnant mice (panel B). Bars represent the average O.D., and error bars represent standard deviations for each group.



**Figure 4:** Secretion of IFN- $\gamma$  by splenocytes of mice from groups G1 (NP2-rNcGRA7), G2 (NP1-rNcSAG4), G3 (NP2-rNcGRA7 and NP1-rNcSAG4), G4 (NP1-rNcBSR4), G5 (NP1-rNcSRS9), G6 (NP1-rNcBSR4 and NP1-rNcSRS9), G7 (NP2), G8 (NP1), and G10 (control group) during the pre-challenge phase after *in vitro* stimulation with specific antigens. Bars represent the average amount of IFN- $\gamma$  (pg/ml), and error bars represent the standard deviation for each group. \* moderately significant differences ( $P$  value = 0.047); \*\* highly significant differences ( $P$  value = 0.014).

**Table 3:** Fertility rates, morbidity, mortality and parasite DNA presence in dams at day 30 p.p.

Group	Fertility <sup>a</sup>	Morbidity <sup>b</sup>	Mortality <sup>c</sup>	Parasite presence <sup>d</sup>
<b>G1</b>	16.7	2/4 (50)	0/4 (0)	3/4 (75)
<b>G2</b>	20.8	4/5 (80)	0/5 (0)	5/5(100)
<b>G3</b>	33.3	2/8 (25)	0/8 (0)	7/8 (87.5)
<b>G4</b>	66.7	6/16 (38)	0/16 (0)	15/16 (93.8)
<b>G5</b>	50	3/12 (25)	0/12 (0)	8/12 (66.6)
<b>G6</b>	45.8	8/11 (73)	4/11 (36)	11/11(100)
<b>G7</b>	16.7	1/4 (25)	0/4 (0)	4/4 (100)
<b>G8</b>	25	3/6 (50)	0/6 (0)	5/6 (83.3)
<b>G9</b>	41.7	13/21 (61.9)	0/21 (0)	18/21 (85.7)
<b>G10</b>	37.5	0/19 (0)	0/19 (0)	0/19 (0)

<sup>a</sup> Percentage of pregnant mice; <sup>b</sup> No. of dams with clinical signs / no. of dams (percentage); <sup>c</sup> No. of dead dams / no. of dams (percentage); <sup>d</sup> No. of nested-PCR positive dams at day 30 p.p. / no. of dams in the group (percentage).

As no detectable amounts of IL-4 were found, Th1/Th2 ratios were all based on IL-10 measurements. Only these ratios were significant (2.05 and 2.7) in the case of G1 and G3, respectively, stimulated with rNcGRA7.

### 3.4. Vaccine safety.

No systemic side effects were observed in any animal following immunisation. Upon palpation, nodules at the injection site were found in 100% of mice receiving nanoparticles, but the nodules disappeared prior to mating.

### 3.5. Efficacy in dams.

All challenged groups showed skin lesions at the site of parasite inoculation between days 7 to 14 post infection (p.i.). Data on fertility rates, morbidity, mortality and parasite presence are summarised in Table 3. Non-significant differences in fertility rates were observed ( $P>0.05$ ;  $\chi^2$ ). Dams from groups that were immunised exhibited clinical signs compatible with neosporosis, such as rough hair coat, rounded back, low body weight and nervous

signs, which, in some cases, led to death. Regarding the presence of parasites, no differences were observed among the groups ( $P>0.05$ ;  $\chi^2$ ).

In general, the best results in terms of higher fertility rates and lower morbidity, mortality and parasite presence rates were obtained in G3 and G5. However, only mortality rates showed significant differences between groups ( $P<0.05$ ;  $\chi^2$ ).

### 3.6. Efficacy in pups.

No significant differences ( $P>0.05$ , 1-way ANOVA and Turkey's comparison test) were observed in the litter size among the groups (Table 4).

High morbidity rates were observed in all groups, including weight loss, delay in hair coat grow and nervous signs (ataxia, walking in circles, blindness, pelvic limb weakness). Finally, most of these affected pups died before day 30 p.p.

**Table 4:** Litter size, hebdomadal mortality, neonatal mortality and vertical transmission in pups at day 30 p.p.

Group	Litter size <sup>a</sup>	Hebdomadal mortality		Neonatal mortality		Vertical transmission <sup>f</sup>
		Per pup <sup>b</sup>	Per litter <sup>c</sup>	Per pup <sup>d</sup>	Per litter <sup>e</sup>	
G1	6 ± 0.8	6/24 (25)	3/4 (75)	1/18 (88.8)	4/4 (100)	23/23 (100)
G2	5,2 ± 0.8	4/26 (15.1)	4/5 (80)	22/22 (100)	5/5 (100)	22/23 (95.7)
G3	4,75 ± 1.8	8/38 (21.1)	5/8 (62.5)	28/30 (93.3)	8/8 (100)	31/32 (96.8)
G4	5.9 ± 2.3	5/94 (5.3)	5/16 (31.3)	84/89 (94.4)	16/16 (100)	76/85 (89.4)
G5	5.6 ± 1.8	3/67 (4.5)	2/12 (16.7)	62/64 (96.9)	11/11 (100)	57/71 (80.3)
G6	6.2 ± 2.1	8/68 (11.8)	6/11 (54.5)	59/60 (98.3)	10/10 (100)	49/54 (90.7)
G7	5 ± 2.4	10/20 (50)	4/4 (100)	8/10 (80)	4/4 (100)	9/17 (52.9)
G8	5.8 ± 2.1	1/35 (2.9)	1/6 (1.6)	33/34 (97.1)	16/16 (100)	27/30 (90)
G9	5.5 ± 2.1	12/111 (10.8)	7/20 (35)	98/99 (99)	20/20 (100)	78/81 (96.3)
G10	5.6 ± 1.5	7/97 (7.2)	5/18 (27.7)	2/90 (2.2)	2/19 (10.5)	0/97 (0)

<sup>a</sup> Average no. of pups born ± standard error; <sup>b</sup> No. of hebdomadal dead pups / no. of pups born in the group (percentage); <sup>c</sup> No. of litters with at least 1 stillbirth / no. of litters in the group (percentage); <sup>d</sup> No. of pups dead from day 3 to 30 p.p. / no. of pups born alive (percentage); <sup>e</sup> No. of litters with at least 1 pup dead from day 3 to 30 p.p. / no. of litters in the group (percentage); <sup>f</sup> No. of nested-PCR positive pups / no. of pups per group (percentage).

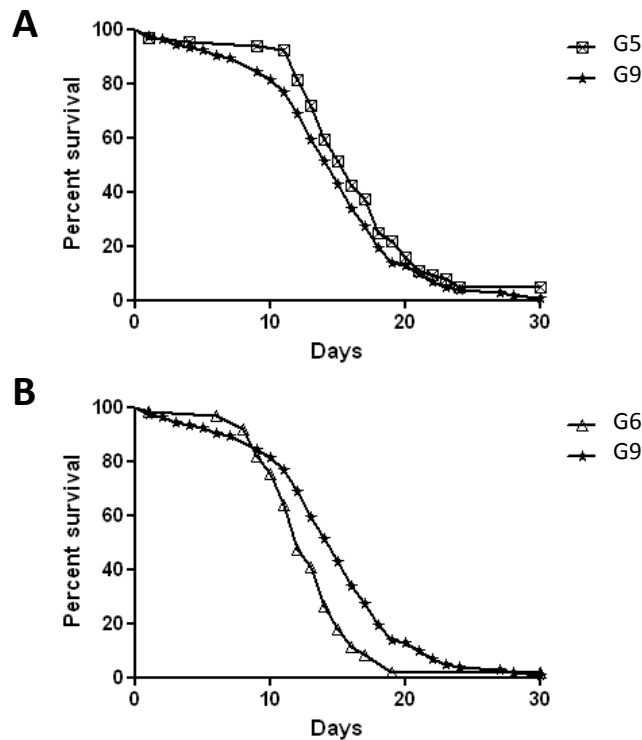
Regarding hebdomadal mortality, groups G1, G2, and G3 showed significant higher mortality rates than those of the challenged control group ( $P < 0.05$ ;  $\chi^2$ ). Post-natal mortality was high in all the groups ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2$ ). When survival curves were analysed during the follow-up period (Figure 5), all vaccinated groups exhibited a similar percentage of survival compared to that observed in the positive control group (G9). However, non-statistically significant delays in mortality during days 7 to 15 p.p. were found in G5, whereas a statistically significant acceleration of this mortality could be observed in G6 (NP1-rNcBSR4 & NP1-rNcSRS9) ( $P < 0.05$ ; low-rank test). Concerning vertical transmission, all challenged groups showed a high number of PCR-positive pups, and no differences were observed between the immunised groups and control group (G9) ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2$ ). The group

with the least number of positive pups was G5 (NP1-rNcSRS9) ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2$ ).

The best results in terms of lower neonatal mortality rates and vertical transmission corresponded to G7 ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2$ ). However, a low number of pups were born within this group.

### 3.7. Efficacy in non-pregnant mice.

All challenged groups showed skin lesions at the site of parasite inoculation between days 7 to 14 p.i. Clinical signs, such as rough hair coat, rounded back, and inactivity followed by nervous signs (ataxia, paralysis and walking in circles), were observed in almost all the challenged groups, except groups immunised with NP1-rNcSAG4 (G2, G3) and groups immunised with the mix NP1-rNcSRS9 and NP1-rNcBSR4 (G6).



**Figure 5:** Kaplan–Meier survival curves for pups. Groups vaccinated with rNcSRS9 and a matching control group (panel A), and groups vaccinated with the mixture of both NcBSR4 and NcSRS9 recombinant proteins and a matching control group (panel B). The curves represent percent survival as the proportion of all individuals surviving over a period of 30 days after birth. Note that a delay in time to death was observed in rNcSRS9 group (G5) compared with the positive control group. Vertical steps downward correspond to days p.p. when a death was observed. Percent survival among mice from G6 (panel C) was lower than among mice from G9 (positive control) ( $P < 0.05$ , log-rank test).

The highest mortality rate corresponded to G1 (NP2-rNcGRA7). Moreover, in groups G2 and G9, mortality and morbidity were also recorded ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2$ ) (Table 5). No differences in parasite presence were observed at day 30 p.i. among the challenged groups ( $P > 0.05$ ;  $\chi^2$ ). However, G3 showed lower morbidity, mortality and parasite presence rates.

#### 4. Discussion

The development of new generation vaccines should focus on blocking two important processes involved in *N. caninum* pathogenicity: the lytic cycle, to avoid parasite proliferation

and dissemination (Innes et al., 2002), and the tachyzoite-bradyzoite switch, to prevent the establishment of chronic infection (Nielsen et al., 2006; Zimmermann et al., 2008). In this sense, four *N. caninum* recombinant proteins, rNcGRA7, rNcSAG4, rNcBSR4 and rNcSRS9, were chosen as vaccine candidates. In parallel, the choice of a good antigen together with a suitable adjuvant capable of modulating the immune response towards a Th1 response, which has been associated with the main control of parasite replication (Baszler et al., 2000; Yamane et al., 2000), is crucial for improving vaccine formulations.

**Table 5:** Morbidity, mortality and parasite presence in non-pregnant mice at day 30 p.i.

Groups	Morbidity <sup>a</sup>	Mortality <sup>b</sup>	Parasite presence <sup>c</sup>
<b>G1</b>	8/20 (40)	4/20 (20)	12/16 (75)
<b>G2</b>	0/19 (0)	1/19 (5,3)	21/24(87.5)
<b>G3</b>	0/16 (0)	0/16 (0)	12/16 (75)
<b>G4</b>	1/8 (12.5)	0/8 (0)	7/8 (87.5)
<b>G5</b>	3/12 (25)	0/12 (0)	12/12 (100)
<b>G6</b>	0/12 (0)	0/12 (0)	11/12 (91.6)
<b>G7</b>	2/20 (20)	2/20(10)	17/18 (94.4)
<b>G8</b>	2/16 (12.5)	0/16(0)	14/16 (87.5)
<b>G9</b>	3/28 (10.7)	1/28 (3.5)	27/27 (100)
<b>G10</b>	0/28 (0)	0/28 (0)	0/28 (0)

<sup>a</sup> No. of non-pregnant mice with clinical signs / no. of non-pregnant mice (percentage); <sup>b</sup> No. of dead non-pregnant mice / no. of non-pregnant mice (percentage); <sup>c</sup> No. of nested-PCR positive non-pregnant mice at day 30 p.i. / no. of non-pregnant mice in the group (percentage).

Moreover, we report for the first time the use of a semicrystalline polymer as an adjuvant in *N. caninum* subunit-based vaccines. This new vaccine formulation system, which is based on nanoencapsulation with the PCL polymer, was applied successfully. This was evident by the fact that nanoparticles demonstrated good physico-chemical properties, and the proteins maintained their antigenicity. PCL is a biocompatible polymer and demonstrated to be a safe adjuvant for a vaccine formulation. Moreover, the PCL particles degradation kinetics are very slow (Sinha et al., 2004) and, unlike other polymers, do not generate an unfavourably low pH micro-environment for antigens, which can be an advantage for the generation of cellular and antibody-mediated responses (Lemoine et al., 1996) that are crucial for effective protection against *N. caninum*. In fact, Debache et al. have reported an improvement in efficacy with the rNcPDI protein-based vaccine when chitosan nanogels were employed as the adjuvant instead of saponines (60-80% versus 20% protection, respectively, in terms of clinical signs in a cerebral mouse model) (Debache et al., 2009; Debache et al., 2011b), which lead us to use PCL nanoparticles in a vaccination assay to prevent *N. caninum* infection.

Despite the high levels of specific antibodies directed against the recombinant proteins displayed by all immunised groups, there was no significant boost in the cellular-mediated immune response and protection was not observed. In fact, expected levels of IFN- $\gamma$  prior to challenge, similar to those observed in other studies in which live vaccines were tested and showed high levels of protection (Marugán-Hernández et al., 2011c), were not detected in any immunised group. In contrast, detectable levels of IFN- $\gamma$  were found in animals immunised with PCL alone, in accordance with a previous study where PCL was able to induce cellular immune responses (Murillo et al., 2001). However, mice developed levels of IFN- $\gamma$  similar to other vaccine assays accomplished with recombinant proteins (Nishikawa et al., 2001a; Pinitkiatisakul et al., 2007a; Aguado-Martínez et al., 2009a). In this sense, other authors have suggested that cell-mediated immune responses are essential in protective immunity against the parasite supported by the intracellular location of *N. caninum* in the host. A feasible explanation for a lack of an appropriate protective immune response is that the *in vivo* degradation process of PCL particles involves a complete absorption within 60 days

(Sinha et al., 2004). In consequence, a delay in the challenge date of immunised mice should be taken into consideration in further assays when the immune response and efficacy induced by an encapsulated vaccine is evaluated, as described in previous assays (between 15 days to 6 weeks after the last immunisation), including this type of adjuvant (Murillo et al., 2001; Slobbe et al., 2003). Moreover, in the case of NcGRA7, a slow liberation of this antigen could also be favoured by a different inner phase structure in the entrapment of the soluble rNcGRA7 that consequently might result in the low levels of IFN- $\gamma$  observed at the moment of sacrifice, despite the high specific humoral immune response detected in the immunised mice. In the case of rNcSAG4, mice developed similar levels of IFN- $\gamma$  to that reported by previous studies where recombinant protein-based vaccines were employed (Nishikawa et al., 2001c; Pinitkiatasakul et al., 2007a) with cytokine levels between 7,500 and 10,000 pg/ml, in contrast to lower levels induced by rNcSAG4 formulated with other water-in-oil adjuvants (Aguado-Martínez et al., 2009a).

Concerning protection in terms of morbidity and mortality, encapsulated rNcGRA7 and rNcSAG4 induced a slight protection demonstrated by lower morbidity and mortality and a slight decrease in parasite presence in both non-pregnant and pregnant mice, in contrast to a previous study where the mixture of rNcGRA7 and rNcSAG4 showed an exacerbation of infection evidenced by mortality in dams (Aguado-Martínez et al., 2009a). In contrast, groups vaccinated with rNcBSR4 displayed an exacerbation of cerebral and congenital neosporosis. In particular, the group immunised with the encapsulated bradyzoite recombinant proteins, rNcBSR4 and rNcSRS9, showed high morbidity and mortality rates in dams. Furthermore, the pups also showed an accelerated mortality, as observed in

the survival curves, compared with the infection control group. It is known that the presence of IFN- $\gamma$  led predominantly to the production of IgG2a antibodies as well as the suppression of IgG1 antibody production (Raghupathy, 1997). This alteration in the normal balance of IgG1/IgG2a in the BALB/c strain could indicate that a high level of IFN- $\gamma$  was present in challenged mice, and a low balance between the pro- and anti-inflammatory immune response could be responsible for the exacerbation of infection in these groups (O'Garra & Vieira, 2007). This is not the first time a bradyzoite-specific antigen-based vaccine was associated with a failure to induce a protective immune response against neosporosis. In fact, Rojo Montejo et al. (2011b) reported an exacerbation of neosporosis in groups vaccinated with soluble extracts of a mixture of tachyzoites and bradyzoites, with high morbidity and mortality rates in dams. In contrast, *T. gondii* bradyzoite recombinant proteins formulated into vaccines have shown specific protective immunity in a mouse model (Nielsen et al., 2006).

Regarding encapsulated rNcSRS9, some encouraging results were obtained, such as a slight delay in mortality and a lower vertical transmission to pups, together with a lower parasite presence in dams. Similar results were observed in a previous assay with the rNcSAG4 protein using a water-in-oil adjuvant (Titermax Gold<sup>®</sup> adjuvant) (Aguado-Martínez et al., 2009a). In this case, recombinant NcSAG4 did not show the same results with the PCL adjuvant as it did previously with the Titermax Gold<sup>®</sup> adjuvant. There are several potential explanations for the decrease in protection: (a) a new cloning of this protein was performed such that the new folding of the recombinant protein may hide immunogenic epitopes, which could, consequently, explain the lack of recognition of the native protein. Although recognition of the native protein does not guarantee protection, it

is a desirable requisite because in previous non-protective vaccines based on recombinant proteins, there was an absence of recognition of their corresponding native antigens (Cannas et al., 2003a; Aguado-Martínez et al., 2009a); (b) moreover, the study was performed until day 30 p.i.; thus, we cannot predict if these results could be enhanced after reactivation of a chronic infection because these bradyzoite proteins (rNcSAG4, rNcBSR4 and rNcSRS9) may be exposed to the host immune system after the cyst ruptures. Thus, the primoinfection mouse models may not be the most suitable model to test vaccines based on bradyzoite antigens. However, the variability in this mouse models makes the interpretation of results very complex due to the little improvement in the groups immunised regarding infected control group.

These bradyzoite proteins have been detected in mice vaccinated with an extract composed of a mixture of bradyzoites and tachyzoites during chronic infection in a cerebral (30 days p.i.) and pregnant mouse model (over 40 days p.i.), highlighting that these proteins may be exposed to the immune system only after bradyzoite conversion is completed (Kim & Boothroyd, 2005). Furthermore, immunisation with *T. gondii* bradyzoite-specific SRS9 induced a late decrease of parasite load in the brain only after day 42 p.i. (Kim & Boothroyd, 2005). In this work, the primoinfection at mid-gestation has shown itself to be too aggressive for testing the efficacy of bradyzoite-specific proteins. Therefore, the performance of the rNcSAG4-, rNcBSR4- and rNcSRS9-based vaccines in the chronically infected pregnant mouse model, in which a reactivation of the infection could occur, should be considered for future trials.

In contrast, lower neonatal mortality rates and vertical transmission were obtained in the adjuvant control group immunised with PCL particles, which include CaCl<sub>2</sub>, Protasan and

Pluoronic in the formulation. It is known that some adjuvants have certain inherent protective effects. In particular, some authors have reported a slight degree of protection in mice immunised with PCL particles alone (Murillo et al., 2001; Estevan et al., 2006). In our study, the protective effect found in the group immunised with the PCL particles may be due at least in part to additives, such as Ca<sub>2+</sub> and a chitosan salt, which are also used similar to adjuvant alone (Ozcan et al., 2009).

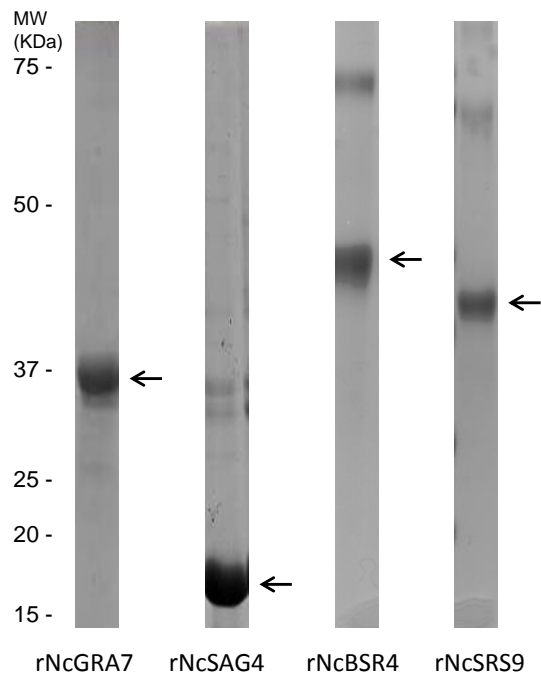
Interestingly, encapsulated rNcBSR4 and rNcSRS9 were capable of inducing high levels of specific IgGs in vaccinated mice, whereas these proteins are hardly detected in chronically infected mice (Rojo-Montejo et al., 2011b). Moreover, sera from immunised mice with rNcSRS9 displayed cross-reactivity with rNcBSR4 and *vice versa*, as shown by the western blot results and in accordance with previous observations reported about their homologous proteins in *T. gondii* (Van et al., 2007).

In conclusion, four *N. caninum* recombinant proteins were successfully encapsulated within PCL nanoparticles. Moreover, recombinant proteins kept their structural integrity and antigenicity. However, encapsulated rNcGRA7 and these three bradyzoite-specific recombinant proteins did not protect against cerebral neosporosis and vertical transmission. The failure in the efficacy of these vaccines should not prevent the use of these recombinant proteins in future formulations. In fact, immunisation with rNcGRA7 in combination with rNcSAG4 improved previously reported efficacy results (Aguado-Martínez et al., 2009a). Moreover, bradyzoite-specific proteins are still of interest, as immunisation with rNcSRS9 demonstrated a slight improvement in the survival of pups and a decrease in parasite presence. The employment of a more suitable experimental model, where a recrudescence of cerebral neosporosis occurs, may be more

appropriate to test the efficacy of vaccines formulated with bradyzoite stage-specific proteins that play a role in parasite persistence mechanisms.

### **Acknowledgements**

We gratefully acknowledge Vanesa Navarro, Carmen Cuevas and María Díaz from the SALUVET group (Complutense University of Madrid, Spain) and Hugo Lana from the Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology (University of Navarra, Pamplona, Spain) for their excellent technical assistance. We also thank Dr. Diana Williams from the Liverpool School of Tropical Medicine (Liverpool, UK) for the *N. caninum* Nc-Liverpool isolate and Dr. Jose Manuel Bautista from the Biochemistry Department of the Veterinary Faculty (Complutense University of Madrid, Spain) for his help in protein purification. This work was supported by the AGL2007-60132/GAN and AGL2010-22191/GAN grants from the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC). Elena Jiménez-Ruiz was supported by a fellowship from the Ministry of Science and Innovation (MICINN).



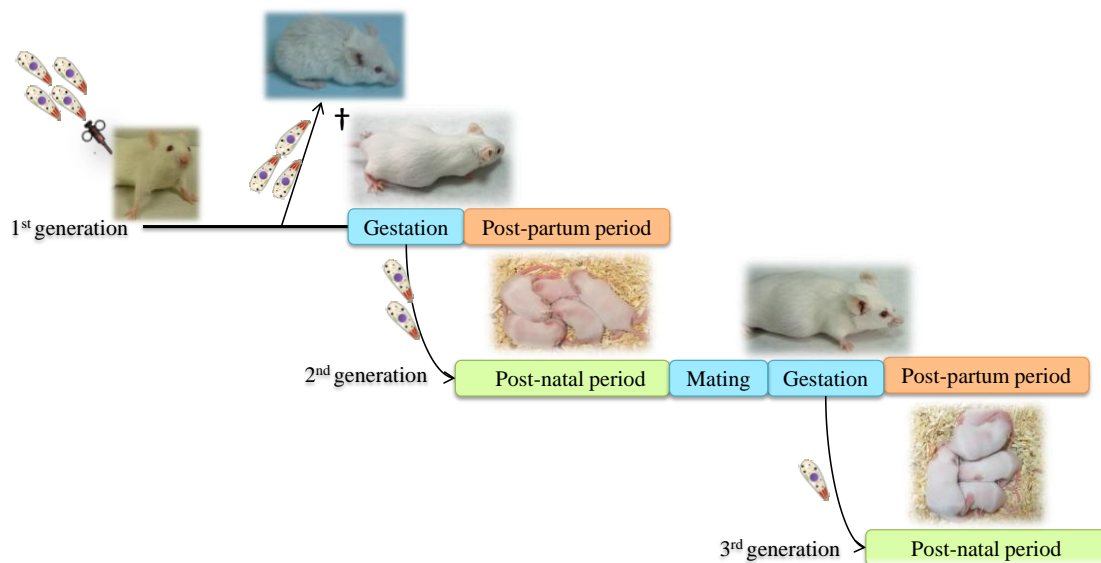
**Supplementary Figure 1:** SDS-PAGE with Coomassie blue stain of *N. caninum* recombinant proteins: rNcGRA7, rNcSAG4, rNcBSR4 and rNcSRS9. Both NcGRA7 and NcSAG4 proteins were produced in a prokaryotic expression vector system (pET-45b (+)) following previously described procedures with few modifications (Álvarez-García et al. 2007, Fernández-García et al. 2006). rNcBSR4 and rNcSRS9 were cloned into another prokaryotic expression vector (pRSET-C) and expressed as polyhistidine-tagged fusion proteins in *Escherichia coli*, as previously described (Risco-Castillo et al. 2011, Risco-Castillo et al. 2007). After the bacteria were lysed, rNcGRA7 was purified from the soluble fraction by immobilised metal ion affinity chromatography (IMAC) (Álvarez-García et al. 2007). rNcSAG4, rNcSRS9 and rNcBSR4 were extracted from inclusion bodies and denatured with a binding buffer (Aguado-Martínez et al. 2008). These recombinant proteins were obtained using an on-column refolding and purification procedure based on a method previously reported (Zhao et al. 2005).

# Chapter IV:

**Low rates of *Neospora caninum* infection reactivation during gestation are observed in both chronically and congenitally infected mice.**

Jiménez-Ruiz, E., Álvarez-García, G., Aguado-Martínez, A., Ortega-Mora, L.M.

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



Published in *Parasitology*. (2013) 140 (2), 220–228.

Presented as poster in WAAVP congress 2011 (21st-25th August, Buenos Aires, Argentina)



## Abstract

Endogenous transplacental transmission (EnTT) of *Neospora caninum* is the most common route of infection in cattle and occurs as a consequence of a reactivation of *N. caninum* infection that may lead to abortion or to the birth of congenitally infected calves. The reactivation of *N. caninum* infection was studied during the gestation of chronically infected dams and, for the first time, in their congenitally infected pups. BALB/c mice were infected with Nc-Spain 7 (Group 1) or Nc-Spain 3H (Group 2), high virulence isolates and low-to-moderate virulence isolates, respectively. The mice were mated after 90 days post-infection, and the morbidity, mortality, vertical transmission and humoral immune responses were recorded for 2 consecutive generations. In the first generation, higher morbidity and mortality rates were observed in G1 before mating than in G2 ( $P < 0.0001$ ). In the second generation, low vertical transmission rates were observed in both inoculated groups (7.7% and 17.1% in G1 and G2, respectively) and were significantly diminished in the third generation (8.7% in G2 versus 0% in G1). Low rates of reactivation of *N. caninum* infection were induced in chronically infected mice and decreased in subsequent generations regardless of the isolate employed in the inoculations. Thus, further studies are needed to improve this reactivation mouse model.

**Key words:** *Neospora caninum* / BALB/c mice / reactivation / pregnancy / high and low- to-moderate virulence isolates

## 1. Introduction

Neosporosis, caused by the apicomplexan cyst-forming coccidian parasite *Neospora caninum*, is a major cause of abortion in cattle worldwide (Dubey et al. 2007; Dubey & Schares, 2011). The *N. caninum* life cycle includes 3 different stages. Initially, sporozoites inside oocysts are shed in the feces of dogs, which are the definitive hosts. The second stage consists of fast replicating tachyzoites responsible for the acute phase of infection (primoinfection or reactivation). Lastly, the dormant bradyzoites persist inside tissue cysts in the brain and muscle tissues during chronic infection. These cysts remain quiescent while awaiting an appropriate immunological environment for reactivation. Although post-natal infections occur in cattle after oocyst ingestion, the major route of parasite transmission is congenital infection by transplacental transmission (TT), which, depending on the origin, can be classified as exogenous TT (ExTT) or endogenous TT

(EnTT). Exogenous TT occurs as a consequence of a post-natal primoinfection during pregnancy, whereas EnTT seems to take place after a reactivation of a chronic infection during pregnancy as a consequence of the conversion of bradyzoites to tachyzoites (Trees & Williams, 2005).

Experimental ExTT has been successfully induced in cattle (Macaldowie et al. 2004). However, EnTT has not been reproduced because cows experimentally infected before insemination give birth to uninfected calves (Trees & Williams, 2005). Nevertheless, some studies indicate that EnTT is the more frequent and efficient route of transmission in naturally infected cattle compared to ExTT (Trees & Williams, 2005). In mice, congenital models have been developed to study acute infection associated with ExTT and to examine the frequency of the TT of *N. caninum* (López-Pérez et al. 2006, López-Pérez et al., 2008). Moreover, these models have been successfully

employed to evaluate the protective efficacy of vaccine formulations (Aguado-Martínez et al. 2009a; Rojo-Montejo et al. 2011b; Chapter III). Thus, mouse models able to reproduce the reactivation of infection could be extremely useful in testing drugs and vaccine efficacy against EnTT. Although it is known that reactivation of *N. caninum* infection is possible in mice, the success of previous attempts in terms of TT rate was limited (Omata et al. 2004; Rettigner et al. 2004a; Kano et al. 2005).

Therefore, the aim of the present study was to induce the reactivation of *N. caninum* infection through synchronized gestations in chronically infected dams and their congenitally infected pups in 2 consecutive generations, emulating the EnTT described in pregnant cattle. Two *N. caninum* isolates, Nc-Spain 3H and Nc-Spain 7, were used; both of these isolates showed high TT rates, although they differed in their virulence and were classified as low-to-moderate (Nc-Spain 3H) or high (Nc-Spain 7) virulence isolates.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Mice

Two groups of 54 (G1 and G2) and one group of 24 eight-week-old female BALB/c mice (G3) were obtained from a commercial supplier (Harlan Interfauna Iberica, Barcelona, Spain). They were free of common viral, parasitic, and bacterial pathogens according to the results of routine screening procedures performed by the manufacturer. The mice were fed *ad libitum* and maintained in a controlled environment with 12-hr light/dark cycles. All protocols involving animals were approved by the Animal Research Committee of the Complutense University, Madrid, Spain, following proceedings described by the Regulation of Internal Regime for Animal Research Committee (published at BOUC, no.

2, on 9 February 2006) and EU legislation (Council Directive 86/609/EEC).

### 2.2. Parasite and preparation of inocula

*N. caninum* Nc-Spain 7 and Nc-Spain 3H tachyzoites were maintained *in vitro* by continuous passage in MARC-145 cells using standard procedures (Pérez-Zaballos et al. 2005). The cell cultures were scraped, and the parasites were passed through a 25-gauge needle to eliminate cellular debris. The tachyzoites were centrifuged for 15 min at 1,350 *g* and resuspended in sterile phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4. The viability and total parasite counts were determined by trypan blue exclusion using a Neubauer chamber. The parasites were resuspended in PBS at the required dose of  $10^6$  tachyzoites in a final volume of 200  $\mu$ l/mouse and used immediately to infect the mice subcutaneously. Nc-1 tachyzoites were prepared as previously described for PCR controls (López-Pérez et al. 2006).

### 2.3. Experimental design and parameters evaluated

BALB/c mice were infected with  $10^6$  tachyzoites of two different *N. caninum* isolates that displayed significant virulence differences in previous studies (Pereira García-Melo et al., 2010; Regidor-Cerrillo et al., 2010; Caspe et al., 2012). Nc-Spain 7 is a highly virulent isolate characterised by a high TT rate to the offspring (79%), high morbidity rates in dams (30%) and pups (98%), a high mortality rate in transplacentally infected pups (95%) and foetal death and abortion in cattle. Conversely, Nc-Spain 3H, when employed at the same dosage, is a low-to-moderate virulence isolate; clinical signs have been observed in only 10% of pups, while mortality rates were 8% in pups and 0% in dams. Interestingly, 89% TT was recorded in pups born to dams inoculated with this isolate. Group 1 (G1) was inoculated with  $10^6$

tachyzoites of Nc-Spain 7 per mouse. Group 2 (G2) received  $10^6$  tachyzoites of Nc-Spain 3H per mouse, and group 3 received an injection of PBS and served as the negative control to monitor the environmental conditions. The mice of these groups represented the first generation, and the overall experimental design is shown in Figure 1. After 54 days post-infection (p.i.), blood samples were collected and specific *N. caninum* antibodies were measured. At day 90 p.i., the mice were mated following synchronisation of oestrus by the Whitten effect, as previously described (Whitten, 1957), and their pups represented the second generation. The pups were maintained until day 50 post-partum (p.p.), when the males were sacrificed and blood and tissue samples (brain and lungs) were collected. A blood sample was taken from each female's tail to identify the seropositive mice. The seropositive females were mated following the same procedure described above; their pups represented the final third generation and were sacrificed at day 50 p.p. The dams of the first and second generations were sacrificed at day 30 p.p. The non-pregnant mice in the first generation were maintained until day 200 p.i. to assess the progression of the *N. caninum* infection. Any mice exhibiting clinical signs of infection were euthanized in a CO<sub>2</sub> chamber.

Data regarding the fertility rate, litter size, post-natal mortality and clinical signs of dams and pups were collected throughout the experiment. The fertility rate was calculated as the percentage of female mice that became pregnant after being housed with males. Post-natal mortality was calculated as the number of pups that died between days 3 and 50 p.p. All of the mice were euthanised in a CO<sub>2</sub> chamber. The brains and lungs were aseptically collected from non-pregnant mice, dams and pups and frozen. Some samples from dead animals were lost due to cannibalism. Serum samples were

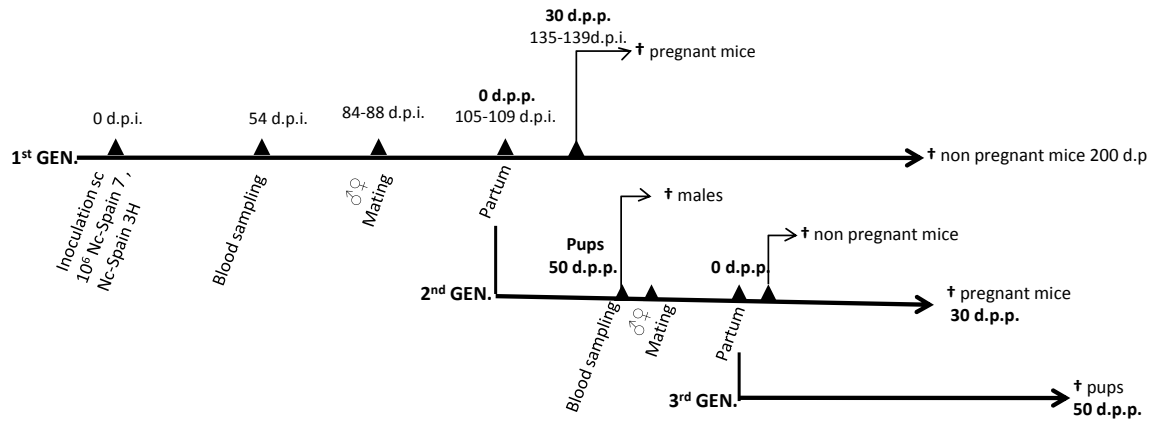
also collected and frozen until analysis. Parasite presence was investigated by PCR in the brain and lungs. All of the brains were analysed by PCR, whereas the lungs were only processed when parasites were not detected in the brain. Lastly, specific antibodies were measured in the sera.

#### **2.4. *N. caninum* detection by DNA extraction and PCR techniques**

Genomic DNA from the lungs and brains of the mice was extracted using a commercial Maxwell<sup>®</sup> 16 Mouse Tail DNA Purification Kit, developed for the automated Maxwell<sup>®</sup> 16 System (Promega, Wisconsin, USA), following the manufacturer's instructions. For the detection of parasite DNA, a nested-PCR procedure based on the internal transcribed spacer 1 (ITS1) region of *N. caninum* was carried out as previously described (Buxton, 1998). DNA from Nc-1 tachyzoites was also extracted as a PCR control.

#### **2.5. Analysis of the humoral immune response**

Total *N. caninum*-specific IgG, IgG1 and IgG2a antibodies were measured by ELISA using tachyzoite soluble antigen (0.25 µg per well). Specific antibody responses directed against NcSAG4 and NcGRA7 were measured in recombinant protein-based ELISAs (0.1 µg per well) (Collantes-Fernández et al., 2006b; Aguado-Martínez et al., 2009b). Anti-*N. caninum* total IgG, rather than specific IgG1 or IgG2a isotypes, was measured at day 54 p.i. (first generation) and at day 50 p.p. (second generation before mating) due to the low volume of serum obtained from blood samples collected from the tails. *N. caninum* soluble protein antigen was prepared as previously described (Álvarez-García et al., 2002), and the recombinant proteins were produced and



**Figure 1:** Experimental design.

†: Animals sacrificed; sc: subcutaneously; d.p.p.: days post-partum; d.p.i.: days post-infection

purified as previously described (Fernández-García et al., 2006; Álvarez-García et al., 2007). The serum samples were diluted 1:100, and the secondary antibody was horseradish peroxidase-labelled rabbit anti-mouse IgG (1:5000 in PBS-0.05% Tween 20; Sigma, St. Louis, MO, USA). The absorbance was measured at 405 nm in an electronic plate reader (Multiskan RC version 6.0, Thermo Labsystems, Helsinki, Finland).

## 2.6. Data analysis

The post-natal morbidity and mortality rates were analysed using the Kaplan-Meier survival method to estimate the percentage of animals without clinical signs and the percentage of surviving individuals at each time point (days p.p.). To compare the survival curves between infected groups, the log-rank statistical test was applied (Bland & Altman, 2004). A one-way ANOVA test followed by Duncan's multiple range test was employed to compare the neonate body weights and serum anti-*N. caninum* IgG. The differences in parasite detection by PCR and vertical transmission were analysed using the chi-squared ( $\chi^2$ ) and Fisher's exact tests. The non-parametric Kruskal-Wallis test was used to analyse differences in the severity of lesions. When significant differences were found, a non-

parametric multiple comparison test was employed to examine all possible pairwise comparisons. A value of  $P < 0.05/[k \times (k - 1)/2]$  was considered statistically significant, with  $k$  corresponding to the number of groups. When statistically significant differences were obtained using the Kruskal-Wallis test but were not detected by the multiple comparison test, the results obtained by the Kruskal-Wallis test were preferred, as indicated by Morrison (2002). All of the statistical analyses were carried out using Statgraphics Plus v.5.1 (StatPoint, Inc., Herndon, VA, USA) and GraphPad Prism 5 v.5.01 (San Diego, CA, USA) software.

## 3. Results

### 3.1. First generation

Data on the fertility rates, litter size and mortality rates are summarised in Table 1. Mice from G1 (Nc-Spain 7) developed clinical signs such as anorexia, rough coat, and inactivity followed by nervous signs (rounded back, pelvic limb weakness and walking in circles). In contrast, less severe clinical signs were observed in mice from G2 (Nc-Spain 3H), in which only one mouse showed serious nervous signs and was euthanised before mating. A high mortality rate was also recorded in G1 ( $P < 0.0001$ ;  $\chi^2$ ); almost 30% of these mice died

before mating at day 84 p.i., and a mortality rate of 44.4% was recorded at the end of the experiment. Conversely, a mortality rate of only 1.8% was observed in G2. Regarding the fertility rates, fewer mice from G1 became pregnant than from G2 ( $P<0.05$ ; Fisher's exact test). Parasite DNA was detected in 95.1% of non-pregnant and chronically Nc-Spain 7-infected mice, *versus* 25.8% in mice infected with Nc-Spain 3H (G2) (Table 2).

Parasite detection rates were significantly lower in dams analysed at day 30 p.p. (day 135 p.i.) than in non-pregnant mice in both groups ( $P<0.0001$ ;  $\chi^2$ ; Table 2). Only 8% of the pregnant mice were PCR-positive in G2. Moreover, a clear difference in the percentage of positive dams was observed between the infected groups (higher in G1 than in G2;  $P<0.05$ ; Fisher's exact test). Interestingly, 1 negative dam from G1 and 7 negative dams from G2 transmitted the parasite to their pups (second generation).

A higher humoral immune response (IgG1, IgG2a and anti-rNcGRA7 levels) was observed

in Nc-Spain 7-infected mice (G1) compared to the group inoculated with Nc-Spain 3H (G2) before mating ( $P<0.0001$ ; one-way ANOVA). High levels of anti-rNcSAG4 antibodies were detected at day 54 p.i. and maintained until day 200 p.i. in non-pregnant mice (data not shown). After pregnancy, the dams maintained high levels of IgG and anti-rNcGRA7 antibodies in both infected groups. The anti-rNcSAG4 antibodies were barely detectable at day 30 p.p. in both groups (Figure 2).

### 3.2. Second generation

Low morbidity rates were recorded in the second generation in both infected groups (G1 and G2), and only one pup inoculated with Nc-Spain 3H maintained a low body weight (data not shown; 1/75; 1.3%). No differences were observed between the groups regarding post-natal mortality ( $P>0.05$ ;  $\chi^2$ ; Table 1).

Vertical transmission was recorded in almost 50% of litters in both infected groups ( $P>0.05$ ; Fisher's exact test). However, the individual TT rates were low in both groups, and parasites

**Table 1:** Fertility rates, litter size and mortality rates in mice.

	<u>First generation</u>			<u>Second generation</u>				<u>Third generation</u>	
	Mortality*	Fertility rate <sup>a</sup>	Litter size <sup>b</sup>	Post-natal mortality		Fertility rate <sup>a</sup>	Litter size <sup>b</sup>	Post-natal mortality	
				Per pup <sup>c</sup>	Per litter <sup>d</sup>			Per pup <sup>c</sup>	Per litter <sup>d</sup>
<b>G1</b> (Nc-Spain 7)	24/54 (44.4)	5/30 (16.6)	6.2 ± 1.1	0/26 (0)	0/5 (0)	10/21 (47.6)	4.8 ± 1.4	0/43 (0)	0/10 (0)
<b>G2</b> (Nc-Spain 3H)	1/54 (1.9)	23/53 (43.4)	5.4 ± 2.4	4/76 (5.3)	3/23 (13)	25/42 (59.5)	5 ± 1.7	2/103 (1.9)	2/25 (8)
<b>G3</b> (PBS)	0/24 (0)	7/24 (29.1)	5 ± 2.6	1/29 (3.4)	1/7 (14.3)	9/14 (64.3)	4.7 ± 1.3	0/39 (0)	0/9 (0)

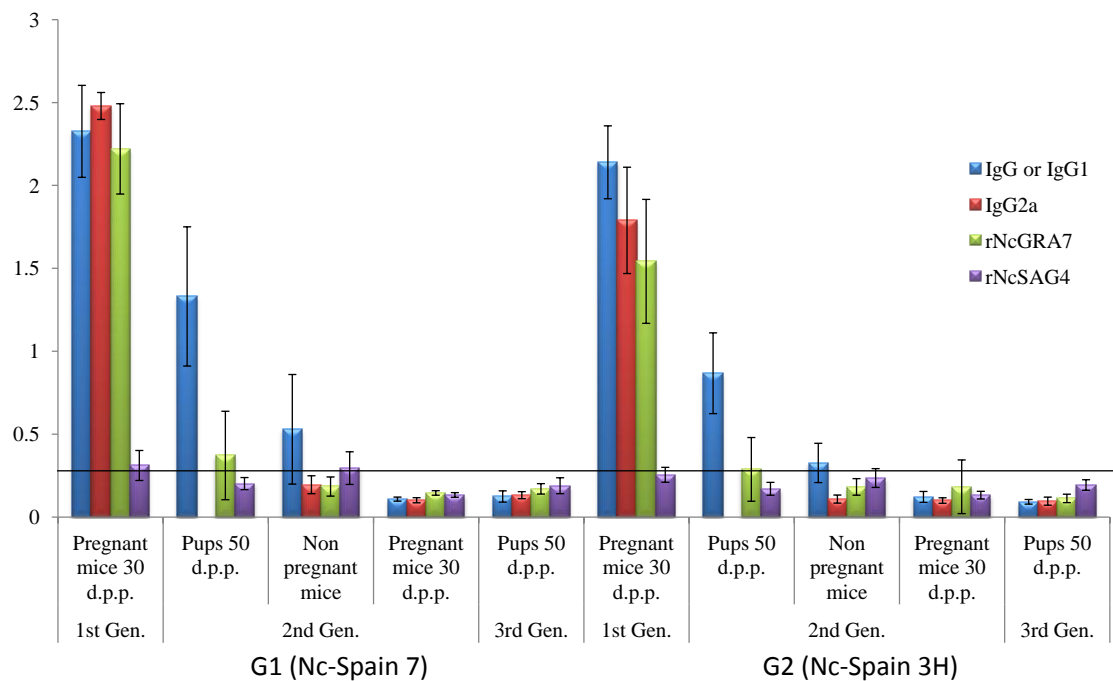
\* No. of mice in the first generation (including pregnant and non pregnant mice) that were sacrificed due to the severity of clinical signs occurring before mating/ no. of mice in the group (percentage).; <sup>a</sup> No. of pregnant mice in each generation / no. of females in each generation (percentage); <sup>b</sup> Average number of pups born ± standard error; <sup>c</sup> No. of pups (males and females) that died between days 3 and 50 p.p./no. of pups born alive (percentage).; <sup>d</sup> No. of litters in which at least one pup died between days 3 and 50 p.p./no. of litters in the group (percentage).

were only detected in an average of one pup per litter in G1 and 1.2 pups per litter in G2 (7.7% versus 17.1%;  $P>0.05$ ;  $\chi^2$ ; Table 2).

All survivor female mice from the second generation showed antibodies specific to *N. caninum* at day 50 after birth and were mated 60 days after birth. No significant differences were observed in the fertility rates between the groups ( $P>0.05$ ;  $\chi^2$ ; Table 1). As occurred in G2 in the first generation, 9 PCR-negative dams from this second generation transmitted *N. caninum* to at least one pup per litter. Regarding the humoral immune response, all of the survivor pups (including males and females) from G1 showed higher levels of

specific IgG antibodies than those from G2 at day 50 after birth ( $P<0.05$ ; one-way ANOVA). Moreover, the levels of anti-rNcGRA7 antibodies were lower than the levels of IgG antibodies in both groups, in contrast to the specific IgG and anti-rNcGRA7 levels developed by the first generation. No antibodies against rNcSAG4 were observed in these pups ( $P>0.05$ ; one-way ANOVA).

The specific antibody levels (IgG1, IgG2a and anti-rNcGRA7) were barely detectable in the dams from both G1 and G2, whereas detectable levels remained in non-pregnant mice from this generation until the time of sacrifice (Figure 2).



**Figure 2:** Specific anti-*N. caninum* immunoglobulins (total IgG, IgG1 and IgG2a isotypes against tachyzoite soluble extract antigen) and antibodies specific for the recombinant proteins rNcGRA7 and rNcSAG4 found in the three generations studied. The bars represent the average O.D., and the error bars represent the standard deviations for each group. Horizontal lines represent the cut-off point for specific anti-rNcSAG4 antibody levels (0.26) calculated by adding 2 standard deviations to the mean sera A405 value from non-infected mice. Note that the immune response against *N. caninum* decreases in subsequent generations regardless of the isolate employed. \*: A blood sample from each mouse's tail was collected at day 50 p.p. (second generation). Only total IgG against tachyzoite soluble extract antigen and antibodies directed against rNcGRA7 and rNcSAG4 were analysed.

**Table 2:** Parasite presence in chronically infected dams and their pups (first and second generations, respectively) and in congenitally infected dams and their pups (second and third generations, respectively).

		Non-pregnant mice <sup>a</sup>	Dams <sup>b</sup>	Pups	
				Individual <sup>c</sup>	Per litter <sup>d</sup>
<b>Chronically infected mice</b>	<b>G1(Nc-Spain 7)</b>	39/41 (95.1) <sup>†</sup>	3/5 (60)	2/26 (7.7)	2/5 (40)
	<b>G2(Nc-Spain 3H)</b>	8/31 (25.8) <sup>†</sup>	2/25 (8)	13/76(17.1)	13/25 (52)
	<b>G3(PBS)</b>	0/17 (0) <sup>†</sup>	0/7 (0)	0/29 (0)	0/7 (0)
<b>Congenitally infected mice</b>	<b>G1(Nc-Spain 7)</b>	2/16 (12.5) <sup>*</sup>	0/10 (0)	0/43 (0)	0/10 (0)
	<b>G2(Nc-Spain 3H)</b>	7/51 (13.7) <sup>*</sup>	6/25 (24)	9/103 (8.7)	8/25 (32)
	<b>G3(PBS)</b>	0/20 (0) <sup>*</sup>	0/9 (0)	0/39 (0)	0/9 (0)

<sup>†</sup>: Mice that died or were sacrificed due to the presence of clinical signs prior to mating (several samples were lost due to cannibalism) together with non pregnant mice that were sacrificed at the end of the experiment; \*: Males and non-pregnant females (Cole et al., 1995; Omata et al., 2004; Rettigner et al., 2004a; Kano et al., 2005) from the second generation; <sup>a</sup> No. of non-pregnant mice positive by nested-PCR / no. of non-pregnant mice in the group (percentage); <sup>b</sup> No. of dams positive by nested-PCR at day 30 p.p. / no. of dams in the group (percentage); <sup>c</sup> No. of pups positive by nested-PCR (from day 3 p.p. to the time of sacrifice) / no. of pups (from day 3 p.p. to the time of sacrifice) in the group (percentage); <sup>d</sup> No. of litters positive by nested-PCR / no. of litters in the group (percentage).

### 3.3. Third generation

Neither pups from G1 nor pups from G2 developed specific clinical signs, and the body weights were similar in all groups (data not shown). The post-natal mortality rates were negligible in all groups. Moreover, no vertical transmission was observed in the pups from G1 (Nc-Spain 7), and low rates were detected in G2 (8.7%): 32% of the litters were positive by PCR (an average of one infected pup per infected litter; Table 2). Concerning the humoral immune response, neither pups from G1 nor pups from G2 developed antibodies by day 50 p.p. (Figure2).

### 4. Discussion

In the present work, the reactivation of *N. caninum* infection was studied during the gestation of chronically infected dams and, for the first time, in their congenitally infected pups. However, although the TT rates per litter were moderate (almost 50%) in the first generation, the individual TT rates were low. Experimental models are essential to test the

efficacy of different vaccine formulations developed against neosporosis (Reichel & Ellis, 2009). In particular, appropriate experimental models in which EnTT may be induced are needed because EnTT is the principal natural route of infection and is responsible for maintaining the parasite within the population (Trees & Williams, 2005; McCann et al., 2007). Unfortunately, it has not been possible to induce EnTT in experimentally infected cattle. Traditionally, cerebral mouse models have been used, and congenital mouse models have been developed more recently (Collantes-Fernández et al., 2006b; López-Pérez et al., 2006); these models are representative of chronic and primoinfection during gestation, respectively, and have been widely employed to evaluate the efficacy of different vaccine formulations (Aguado-Martínez et al., 2009a; Rojo-Montejo et al., 2011b; Chapter III). However, these experimental models may be less useful for testing the efficacy of vaccine formulations to prevent EnTT and, in particular, vaccines based on bradyzoite stage-specific antigens that may

be involved in reactivation. This hypothesis is supported by the recently reported lack of efficacy obtained with whole inactivated tachyzoite-bradyzoite extract (Rojo-Montejo et al., 2011b) and with recombinant rNcSAG4, rNcBSR4 and rNcSRS9 bradyzoite stage-specific proteins tested in the mouse models mentioned above (Aguado-Martínez et al., 2009a; Chapter III). The success of previous attempts to induce the reactivation of *N. caninum* infection in chronically infected mice has been limited (Cole et al., 1995; Omata et al., 2004; Rettigner et al., 2004a; Kano et al., 2005). This is the first study where a total of three consecutive generations of mice were studied, involving two pregnancies and two different infection scenarios, first in the chronically infected dams (post-natal infection) and second in their congenitally infected pups (congenital infection). As it is well known that individual isolates greatly influence the outcome of the infection, we used both the highly virulent Nc-Spain 7 isolate as well as the low-to-moderate virulence Nc-Spain 3 isolate. Both of these isolates caused high rates of vertical transmission (Pereira García-Melo et al. 2010; Regidor-Cerrillo et al. 2010). Additionally, the outcome of the infection was evaluated by measuring the same parameters in dams and, for the first time, in their pups; these parameters included morbidity, mortality, parasite presence and the humoral immune response.

We found that chronic infection could be established at approximately day 90 p.i., based on the specific antibody response detected and the results obtained in previous studies. In these previous studies, the authors reported that after day 30 p.i., parasites are only present in the brain, and tachyzoite to bradyzoite conversion takes place during the late chronic phase of infection, as NcSAG4 mRNA levels peak between days 32 and 64 p.i. in parallel with decreasing tachyzoite loads in the brain

(Collantes-Fernández et al., 2006b; Aguado-Martínez et al., 2009b).

The reactivation of *N. caninum* was studied during pregnancy and evidenced by TT of the parasite from the dams to the pups. The success of attempts to induce reactivation was limited. Vertical transmission was recorded in almost 50% of the litters from the second generation in both infected groups, taking into account that parasite burden is expected to be low during the chronic stage of infection (Collantes-Fernández et al., 2006b; Aguado-Martínez et al., 2009b). However, vertical transmission did not occur in every pup from positive litters, in accordance with the results reported by Omata et al. (2004). Interestingly, this author reported a higher number of infected litters when the dams became pregnant between days 28 and 45 p.i. One explanation for the high transmission rate during early chronic infection could be the presence of tachyzoites at this stage. In fact, Aguado-Martínez et al. (2009b) suggested that even during the late chronic infection, there are significant numbers of tachyzoites or intermediate zoites within parasitised mouse brains, as evidenced by the presence of NcSAG1 mRNA in the late chronic period. In our study, although reactivation was observed from the first to the second generations, it was almost absent from the second to the third generations. The morbidity, mortality, parasite presence and immune response all decreased with subsequent generations. A tendency toward decreasing TT in subsequent generations was also reported by Cole et al. (1995) and Rettigner et al. (2004a) in serial rebreeds of the same dams. The mechanisms of latent infection reactivation during a cow's pregnancy are not yet fully understood but are thought to be related to the immunological and endocrinal modifications that take place during gestation (Innes et al., 2005). Indeed, some authors reported that the type 1 response was consistently down-regulated in mice infected

during pregnancy, resulting in a high rate of vertical transmission (Omata et al., 2004; Kano et al., 2005). In contrast, Rettigner et al. (2004a) asserted that neither hormones associated with pregnancy nor the modulation of the immune response during pregnancy are responsible for the reactivation of chronic *N. caninum* infections because a TT rate of only 14.6% was reported in a mouse model. Given this finding, reactivation could be the result of an occasional cyst rupture that could occur naturally during the course of a chronic infection. However, these studies are not necessarily comparable because oestrus was not synchronised, different isolates were employed in the inoculations and the morbidity and mortality rates were not evaluated in the pups. Indeed, TT rates vary in mice depending on the term of gestation during which inoculation is performed (López-Pérez et al., 2006; López-Pérez et al., 2008) and are isolate-dependant (Regidor-Cerrillo et al., 2010). On the other hand, the high number of mice employed and the vertical transmission percentage observed in our study did not support the theory of a reactivation mediated only by the occasional spontaneous rupture of a cyst in chronically infected dams. In fact, the presence of parasite DNA in 50% of the litters (7.7 and 17.1% of pups were positive by PCR in G1 and G2, respectively) suggests that, in this case, reactivation of *N. caninum* infection is likely to be the result of both events: the immunomodulation during pregnancy and the spontaneous cyst rupture.

Regarding the immune response, specific antibody levels (anti-*N. caninum* total IgG, IgG1, IgG2a and anti-rNcGRA7 and anti-rNcSAG4 IgG) correlated with parasite presence. Antibody levels were high in chronically infected mice, as expected based on previous experiments with mouse models (Aguado-Martínez et al., 2009b). The high levels of anti-NcGRA7 antibodies correlated with high levels of *N. caninum*-specific IgG1

and IgG2a. Moreover, high levels of rNcSAG4-specific antibodies were also detected at day 54 p.i., primarily in G1, indicating that a chronic infection had been established (Aguado-Martínez et al., 2008; Aguado-Martínez et al., 2009b). These antibody levels were maintained until day 200 p.i. in the cerebral mouse model, similar to the findings reported by Aguado-Martínez et al. (2009b), where these levels were maintained until day 155 p.i. However, both the humoral immune response and parasite presence were significantly diminished in the second and third generations, regardless of the isolate employed in the inoculations. This finding, together with the higher antibody levels observed in non-pregnant mice compared to dams, supports the hypothesis that only mice without clinical signs and parasite loads too low to induce a significant humoral response became pregnant; this may also explain the differences observed between the inoculated groups. Indeed, in the case of G1 inoculated with the Nc-Spain 7 isolate, there was less vertical transmission to the pups than expected and an absence of clinical signs and mortality in both the second and third generations. The differences observed between the isolates in terms of the TT rates in consecutive pregnancies are probably due to the fact that only healthier mice with a low parasite burden in the brain became pregnant at this point (average fertility rates of 16.6% in G1 versus 43.4% in G2), whereas in previous congenital mouse models, pregnant dams were inoculated directly with tachyzoites, facilitating the crossing of the placental barrier by the parasite. This hypothesis is also supported by the high morbidity and mortality rates detected in the females before pregnancy, as a higher parasite presence was observed in non-pregnant mice compared to dams after pregnancy in this first generation.

Regarding G2 (inoculated with the Nc-Spain 3H isolate), vertical transmission was observed,

although at rates lower than those reported in ExTT by Regidor-Cerrillo et al. (2010). Despite the progressive clearance of infection in subsequent generations, even dams with low parasite loads are able to transmit the parasite to their offspring because PCR-negative dams delivered PCR-positive pups. The opposite scenario was also observed, where PCR-positive dams delivered PCR-negative pups (5 congenitally infected dams out of 25). Consequently, the absence of clinical signs in pups from the second and third generations and the absence of specific antibody titres against *N. caninum* may be explained by a low parasite burden that was probably localised only in immunoprivileged tissues such as the brain and was unable to induce pathology or detectable antibody levels.

Surprisingly, the low EnTT rates observed in mice are in contrast to the high TT rates observed in naturally infected cattle (Dubey & Schares, 2011). It has been postulated that the placenta may play a key role in the pathogenesis of neosporosis (Innes et al., 2005; López-Pérez et al., 2010). The parasite may exploit different pathways to cross the placenta depending on the particular isolate involved (Collantes-Fernández et al., 2012). Furthermore, the haemochorial placenta in mice permits closer contact between the foetal and maternal tissues, in contrast to the synepitheliochorial placenta in cattle that does not permit transmission of maternal antibodies to the foetus (Entrican, 2002). In this sense, rodent pups acquire maternal antibodies both

placentally and in the milk (Appleby & Catty, 1983), and these antibodies may be protective against infection *in utero*. In support of this idea, it has been shown previously that maternal antibodies against *Plasmodium* transferred to the pup suppress the growth of the parasite (Stanisic et al., 2003).

In conclusion, we have explored an experimental reactivation mouse model with two different isolates under two different situations: post-natal infection in a first generation and congenital infection in subsequent generations. Because only mice without clinical signs and low parasite loads became pregnant, reactivation of the infection was more successful in mice infected with the low-to-moderate virulence Nc-Spain 3H isolate. However, infection seems to gradually decrease in subsequent generations. According to the results obtained, an improvement of this experimental mouse model could be achieved with an increase in the number of healthy but chronically infected dams, which is a key point favouring a higher TT to their offspring. This is a complex issue because a highly virulent isolate caused a decrease in fertility rates; in contrast, a low parasite burden may increase TT rates. To overcome this difficult balance, further efforts should be made to increase the number of congenitally infected litters or pups within each litter in an acute congenital mouse model by employing low-to-moderate virulence isolates followed by the breeding of the infected offspring.

### **Acknowledgements**

We gratefully acknowledge Carmen Cuevas and Laura Hinojal for their excellent technical assistance. This work was supported by the Ministerio de Economía y Competitividad (M.I.N.E.C.O., grant number AGL2010-22191/GAN). Elena Jiménez-Ruiz was supported by a fellowship from M.I.N.E.C.O. (grant number BES-2008-005403).

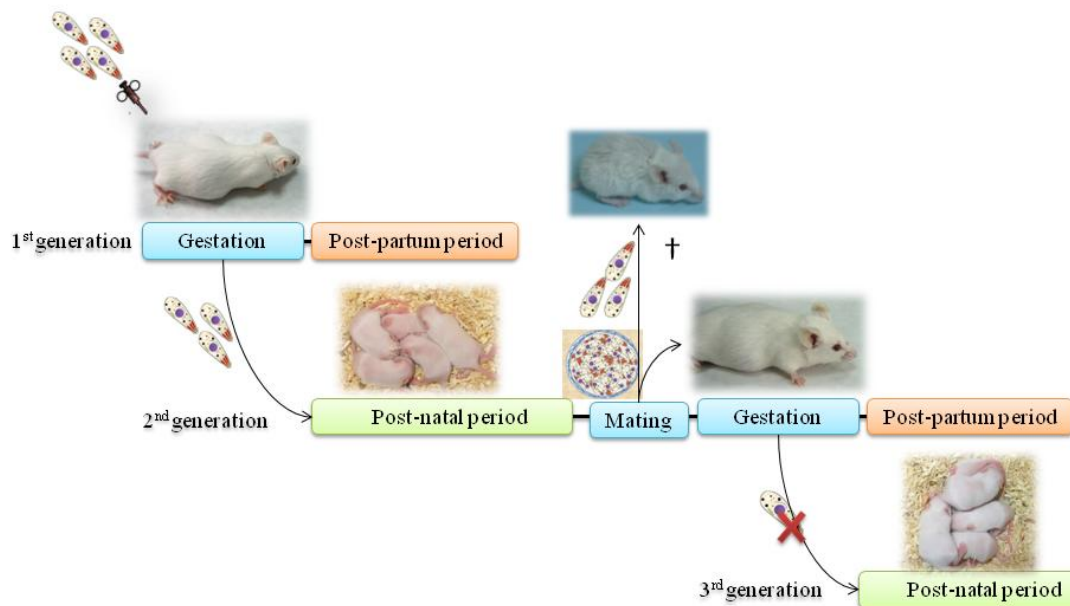


# Chapter V:

**Mice congenitally infected with low-to-moderate virulence *Neospora caninum* isolates exhibited clinical reactivation during the mating period without transmission to the next generation.**

Jiménez-Ruiz, E., Álvarez-García, G., Aguado-Martínez, A., Ortega-Mora, L.M.

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



Manuscript submitted in *Experimental Parasitology*.

Presented as oral communication in Apicowplexa congress 2012 (23rd- 28th October, Lisbon, Portugal)



**Abstract**

Endogenous transplacental transmission (EnTT) is the major transmission route of *N. caninum* in cattle. Thus, the development of a standardised experimental model of EnTT is needed for more appropriate testing of parasite biology and control strategies. A recent study reported up to 40-50% EnTT rates in chronically infected dams with either high or low-to-moderate virulence isolates, although low fertility rates were observed in dams inoculated with the high virulence isolate. Therefore, low-to-moderate virulence *N. caninum* isolates (Nc-Spain 3H; G1 and Nc-Spain 8; G2) that previously showed high TT rates *versus* low mortality and morbidity rates in a congenital mouse model were inoculated into dams (first generation). The new approach followed in the present study aimed to start with a high number of congenitally infected mice (second generation), which allowed a more efficient EnTT from congenitally infected dams to their progeny (third generation). Interestingly, a reactivation of infection occurred in several congenitally infected non-pregnant females (second generation) from both infected groups, evidenced by neosporosis-associated clinical signs after mating accompanied by an increase of specific antibody levels (IgG1, IgG2a and anti-rNcGRA7) ( $P < 0.0001$ ; one-way ANOVA) and a higher number of PCR-positive mice compared to pregnant females ( $P < 0.05$ ; Fisher's exact test). These results support the hypothesis that only mice without clinical signs and with a low parasite burden in the brain became pregnant, which may explain the posterior failure in inducing EnTT from the second to the third generation. These findings confirm that this mouse model is not a suitable experimental EnTT model for testing the efficacy of drugs and vaccine candidates against EnTT. The employment of other putative suitable species with a similar placenta structure, such as small ruminants, should be taken into consideration.

**Key words:** *Neospora caninum* / mouse model / congenital neosporosis / reactivation / endogenous transplacental transmission / low-to-moderate virulence isolates.

**1. Introduction**

*Neospora caninum* is an Apicomplexan parasite that is closely related to *Toxoplasma gondii* (Dubey et al. 1988b) and is considered to be one of the main infectious causes of bovine reproductive failure worldwide. Transplacental transmission (TT) of *N. caninum* may lead to the abortion or birth of congenitally infected calves. Moreover, endogenous TT (EnTT) is the most common route of infection in cattle and occurs as a consequence of a reactivation of a chronic infection (Trees & Williams 2005). Moreover, some studies conducted in cattle point to the exogenous TT (ExTT) as a less efficient infection route than

EnTT taking place in a primary infection after oocyst ingestion (McCann et al. 2007). Mouse models are a suitable tool for an initial screening of vaccines (Innes & Vermeulen 2006). Indeed, cerebral and congenital mouse models of *N. caninum* infections associated with ExTT have been successfully developed (Collantes-Fernández et al. 2006b, López-Pérez et al. 2006) and, afterwards, employed in vaccine assays (Aguado-Martínez et al. 2009a, Chapter III). Therefore, the development of an experimental model of EnTT should be desirable for a more appropriate testing of the efficacy of vaccines (Innes & Vermeulen 2006, Reichel & Ellis 2009). Previous attempts to study reactivation of *N. caninum* infection in

mice by rebreeding acutely or chronically infected dams caused low rates of TT (Omata et al. 2004, Rettigner et al. 2004). A recent study reported promising results because EnTT were observed in chronically infected dams with a low-to-moderate and high virulence isolates that delivered 40-50% positive litters, despite the low fertility rates observed in dams inoculated with high virulence isolates. Thus, further improvement of the EnTT mouse model is recommended to increase TT rates throughout generations (Chapter VI).

The new approach followed in the present study aimed to start with a high number of congenitally infected mice by inoculating low-to-moderate *N. caninum* isolates to dams during gestation and subsequently study EnTT in a posterior pregnancy of congenitally infected offspring. Thus, Nc-Spain 3H and Nc-Spain 8 isolates were employed, as they caused low morbidity and mortality rates in dams and their pups *versus* high TT rates in a previous congenital mouse model (90% and 56.4%, respectively) (Regidor-Cerrillo et al. 2010). Moreover, Nc-Spain3H does not compromise fertility (Chapter VI). Tachyzoites were maintained *in vitro* using standard procedures (Pérez-Zaballos et al. 2005). For the *N. caninum* infection, tachyzoites were resuspended at the required dose of  $2 \times 10^6$  in a final volume of 200  $\mu$ l per mouse (Regidor-Cerrillo et al. 2010).

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Experimental design

Eight-week-old female BALB/c mice were free of common viral, parasitic, and bacterial pathogens according to the results of routine screening procedures performed by the manufacturer. They were fed *ad libitum* in a controlled environment with 12-hr light/dark cycles. All protocols involving animals were approved by the Animal Research Committee

of the Complutense University, Madrid, Spain, following the proceedings described by the Regulation of Internal Regime for Animal Research Committee (published at BOUC, no. 2, on 9 February 2006) and EU legislation (Council Directive 86/609/EEC).

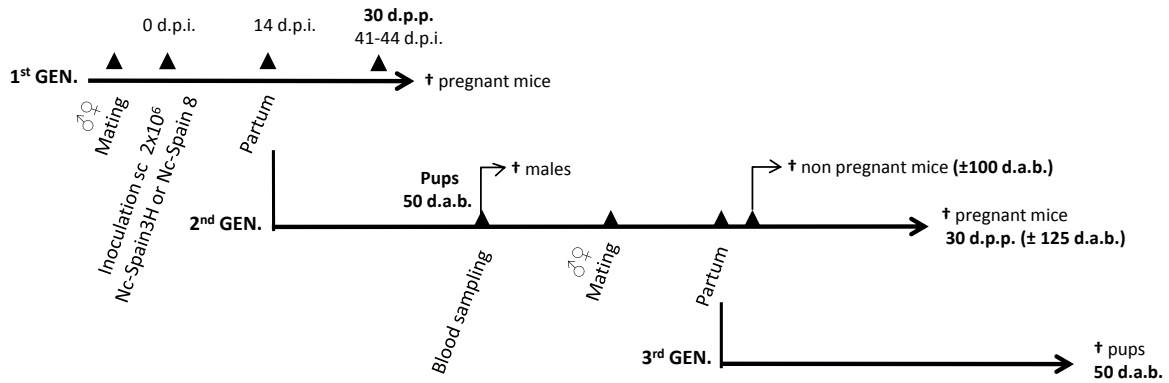
Mice were mated after the Whitten effect (first generation) and were infected subcutaneously with  $2 \times 10^6$  tachyzoites of each *N. caninum* isolate, Nc-Spain 3H (Group 1; n=40) and Nc-Spain 8 (Group 2; n=40), between days 7-10 of gestation. The control group was inoculated with 200  $\mu$ l of PBS (Group 3; n=24). The procedure followed was performed according to Regidor-Cerrillo et al. (2010) and López-Pérez et al. (2008). Dams were sacrificed at day 30 post-partum (p.p.), and their pups (second generation) were maintained until day 50 after birth (a.b.). At this point, males were sacrificed, and sera from both males and females were obtained. Seropositive females were maintained until day 80 a.b. when they were mated. After pregnancy and partum, dams were maintained with their pups until day 30 p.p., and non-pregnant females were sacrificed. New pups (third generation) were maintained until day 50 a.b., when they were sacrificed (Figure 1). All mice were euthanised in a CO<sub>2</sub> chamber.

### 2.2. Parameters evaluated

Brains, lungs and sera were collected and kept at -20°C until further analysis. Data on fertility rates, litter size and morbidity and mortality rates in dams and their pups were recorded throughout the experiment.

### 2.3. Analysis of samples from dams and offspring

Humoral immune response and parasite presence were also evaluated in all generations. Anti-*N. caninum*-specific IgG1 and IgG2a and



**Figure 1:** Experimental design

specific antibodies against rNcGRA7 and rNcSAG4 were determined in sera using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), as previously described (Aguado-Martínez et al. 2008, Chapter VI).

Genomic DNA was extracted from tissues using a commercial kit, Maxwell<sup>®</sup> 16 Mouse Tail DNA Purification Kit (Promega, Wisconsin, USA), followed by a nested-PCR according to Buxton (1998); DNA from Nc-1 tachyzoites was used as a PCR control.

All statistical analyses were carried out using GraphPad Prism 5 v.5.01 software (San Diego, CA, USA).

### 3. Results and Discussion

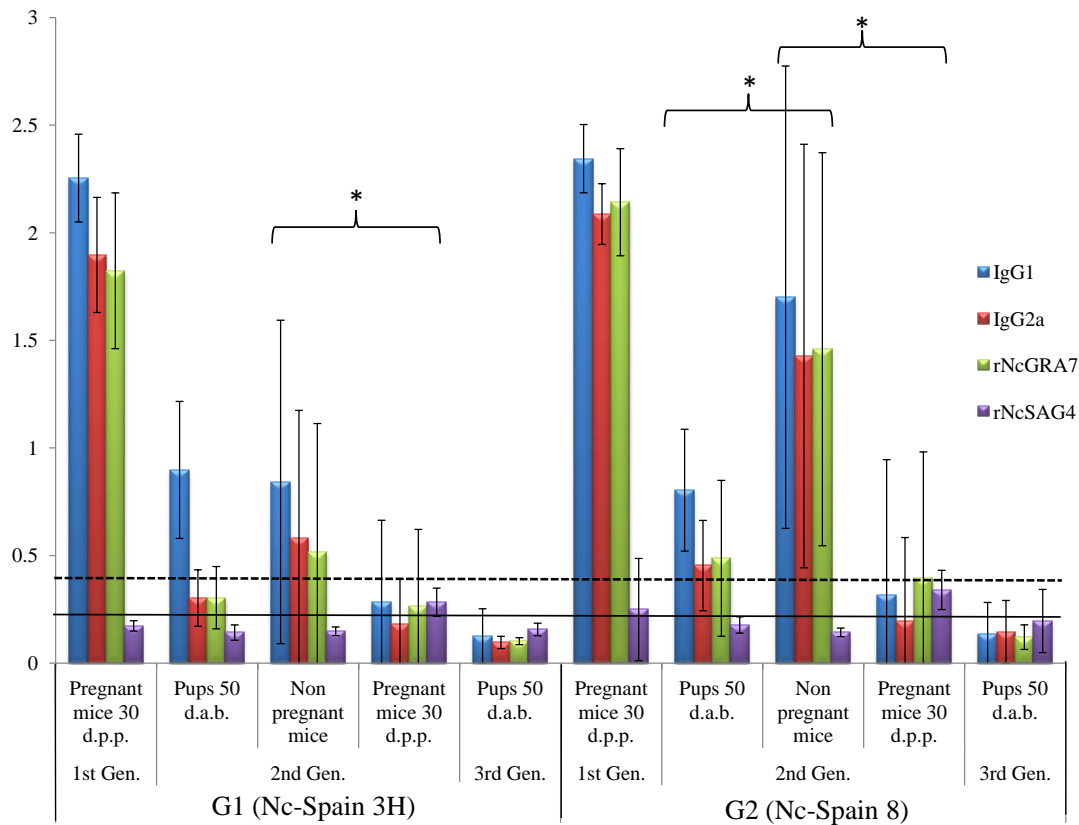
The experimental mouse model developed in the present study comprised three generations, where the first and second generations were based on previous ExTT mouse models to obtain higher TT rates, which allowed a more efficient EnTT from congenitally infected dams to their progeny. Fertility rates and litter sizes were similar in all groups for both pregnancies (data not shown;  $P > 0.05$ ;  $\chi^2$ ). Globally, the results observed in the first generation and the post-natal period of the second generation were in accordance with a previous study (Regidor-Cerrillo et al. 2010), where there was an absence of morbidity and

mortality in dams and moderate mortality rates in pups from both infected groups (Table 1;  $P > 0.05$ ; Fisher's exact test).

Successfully, all pups at day 50 a.b. had specific antibodies (IgG1 and IgG2a) against *N. caninum*, which indicates previous exposure to the parasite. Reactivation of the infection was expected to occur in congenitally infected pregnant mice (second generation), with subsequent TT to their offspring (third generation). Surprisingly, several females (second generation) from G1 and G2 showed neosporosis-associated clinical signs after the Whitten effect and mating, which could compromise the pregnancy. Moreover, 2 mice from G1 and 6 mice from G2 were sacrificed due to the severity of nervous signs. This is the first study where a clinical reactivation has been induced. These results could be explained by a reactivation of infection as a consequence of a stress period induced during the mating period and an inappropriate responsiveness of the stress system. This stress system interacts with the immune system (Habib et al. 2001, Charmandari, et al. 2005), and activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis has profound inhibitory effects on the immune/inflammatory response (Chrousos 1995), which may affect the outcome of the infection.

Additionally, an increase of specific antibodies levels (IgG1, IgG2a and anti-rNcGRA7) was observed in non-pregnant mice from this generation (Figure 2). These antibody levels were significantly higher in G2 compared to those levels detected at day 50 a.b. as well as in both groups infected with *N. caninum* compared to pregnant mice at day 30 p.p. ( $P < 0.0001$ ; one-way ANOVA). Moreover, non-pregnant mice had a higher number of PCR-positive animals compared to dams (Table 1;  $P < 0.05$ ; Fisher's exact test). Differences in

immune response and parasite detection observed between congenitally infected non-pregnant mice and dams have been recently reported in mice born to chronically infected dams, particularly when mice were infected with a high virulence isolate (Nc-Spain 7) (Chapter VI). Here, it was speculated that only mice without clinical signs and with a low parasite burden in the brain became pregnant, which has been confirmed with the results obtained in the present study.



**Figure 2:** Specific anti-*N. caninum* IgG1 and IgG2a and anti- rNcGRA7 and rNcSAG4 antibody levels in the three generations studied. The bars represent the average O.D., and the error bars represent the standard deviations for each group. Note that the immune response against *N. caninum* is higher in non-pregnant mice than in pregnant mice of the second generation and that response decreases in subsequent generations regardless of the isolate employed. Horizontal lines represents the cut-offs for specific anti-rNcGRA7 (0.2; —) and anti- rNcSAG4 antibody levels (0.42; ....) calculated by adding 2 standard deviations to the 15 mean sera A405 value from non-infected mice. D.p.p.: days post-partum; d.a.b.: days after birth; \*: significant differences (one-way ANOVA).

**Table 1:** Morbidity and mortality rates and parasite presence in mice.

	First generation <sup>a</sup>			Second generation				Third generation					
	Parasite presence in dams <sup>b</sup>		Post-natal mortality	Morbidity rate <sup>e</sup>	Mortality rate <sup>f</sup>	Parasite presence		Post-natal mortality <sup>c</sup>		Parasite presence in pups			
	Per pup <sup>c</sup>	Per Litter <sup>d</sup>	Non-pregnant <sup>g</sup>			Dams <sup>b</sup>	Total PCR-positives <sup>h</sup>	Per litter <sup>i</sup>	Per Pup <sup>h</sup>	Per litter <sup>i</sup>			
<b>G1</b>	13/31	18/31	23/119	12/64	2/64	16/28	11/36	52/108	27/31	2/140	2/36	1/137	1/36
<b>(Nc-Spain 3H)</b>	(41.9)	(58.1)	(19.3)	(18.8)	(3.1)	(57.1)	(31.4)	(48.1)	(87.1)	(1.4)	(5.6)	(0.7)	(2.7)
<b>G2</b>	15/21	6/21	12/71	14/34	6/34	15/18	1/16	28/67	13/21	3/75	1/16	0/72	0/16
<b>(Nc-Spain 8)</b>	(71.4)	(28.6)	(16.9)	(41.2)	(17.6)	(83.3)	(6.25)	(41.8)	(61.9)	(4)	(5.5)	(0)	(0)
<b>G3</b>	0/14	0/14	0/47	0/20	0/20	0/20 (0)	0/12 (0)	0/47 (0)	0/14 (0)	0/54 (0)	0/12 (0)	0/5 (0)	0/12 (0)
<b>(PBS)</b>	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)								

<sup>a</sup> Morbidity/mortality rates were not observed in any group in this generation.; <sup>b</sup> No. of nested-PCR positive dams at day 30 p.p. / no. of dams in the group (percentage).; <sup>c</sup> No. of pups dead from day 3 to 50 a.b. / no. of pups (percentage).; <sup>d</sup> No. of litters with at least 1 dead pup /no. of litters in the group (percentage).; <sup>e</sup> No. of females with clinical signs in the second generation from day 50 a.b. onwards / no. of mice in the group (percentage).; <sup>f</sup> No. of sacrificed females in the second generation due to severity of clinical signs occurred from day 50 a.b. onwards / no. of mice in the group (percentage).; <sup>g</sup> No. of PCR- positive non-pregnant mice / no. of non-pregnant mice (percentage).; <sup>h</sup> No. of PCR- positive mice (dead mice, males and females) from day 3 p.p. to sacrifice (several samples were lost due to cannibalism) /no. of mice analysed in the group (percentage).; <sup>i</sup> No. of litters with at least 1 Nested-PCR-positive pup/no. of litters in the group (percentage).

Another interesting finding is that the Nc-Spain 8 isolate seems to be more efficient at inducing clinical reactivation because morbidity and mortality rates as well as antibody levels after the Whitten effect and mating were significantly higher in G2 than G1 ( $P < 0.05$ ; Fisher's exact test and one-way ANOVA, respectively) (Table 1); nonetheless, both groups showed similar TT rates in terms of PCR-positive mice ( $P > 0.05$ ; Fisher's exact test), and G1 showed a higher number of PCR-positive litters ( $P < 0.05$ ; Fisher's exact test) (Table 1).

Conversely, no differences in parasite presence between the groups were observed when all mice (including dead mice, males and females) from the second generation were evaluated in a statistical analysis (48.1% in G1 and 41.8% in G2;  $P > 0.05$ ; Fisher's exact test). These percentages were lower than those described by Regidor-Cerrillo et al. (2010) (89% in pups inoculated with Nc-Spain 3H and 56.4% in pups inoculated with Nc-Spain 8). However, both studies may not be comparable: in the previous study, pups were maintained until day 30 a.b.; in the present study, congenitally infected mice were sacrificed at different time points (from day 50 a.b. to over day 140 a.b.). Thus, the differences observed between both experiments might be attributed to a possible clearance of infection over time.

Contrary to our initial expectations, the *N. caninum* infection cleared out in the last generation, despite the high TT rates observed in the second generation. In this sense, the results obtained in this new model agree with the low percentage of PCR-positive third generation pups infected with Nc-Spain 3H that was reported previously (Chapter VI). Indeed, no specific antibody levels were detected in any group (Figure 2), and no morbidity and very low post-natal mortality rates were also observed. Moreover, parasites were not

detected in pups from both infected groups, except for a single pup in G1 (Table 1). Therefore, the clearance of the infection from the second to the third generation supports the hypothesis that only second generation females with a low parasite burden, where clinical reactivation was not generated, become pregnant. This finding is not surprising because Jiménez-Ruiz et al. (Chapter IV) recently reported that there was no *N. caninum* clinical reactivation during the Whitten effect in congenitally infected mice that became pregnant. Although parasites were able to cross the placental barrier, EnTT rates were lower in the present work.

In conclusion, a clinical reactivation of *N. caninum* infection was successfully achieved in mice for the first time; unfortunately, there was a failure in inducing EnTT. These findings confirm that the mouse is not an appropriate or suitable species for inducing the EnTT that frequently occurs in naturally infected cattle. In this sense, the differences in *N. caninum* persistence in foetal-pup tissues could be due to the distinct placental structures (haemochorial *versus* synepitheliochorial) that determine a different maternal-foetal exchange (Entrican 2002, Chapter VI). Rodent pups acquire maternal antibodies placentally (Appleby & Catty 1983), and these antibodies may be protective against infection *in utero*. Although EnTT has not been reproduced in experimentally infected cattle (Williams et al. 2000), employing other putative suitable species with a similar placenta structure, such as small ruminants, should be further analysed. Apart from their placenta, there are many additional advantages of using caprine and ovine models, such as their shorter gestation, easy handling and lower cost compared to bovine models. Moreover, sheep are considered intermediate hosts for *N. caninum*, as some isolates were obtained from naturally infected animals (reviewed by Dubey et al. 2007).

Furthermore, *N. caninum* associated abortion rates in these animals seem to be higher than expected (Moreno et al. 2012), and moderate seroprevalence rates have been reported (Nasir et al. 2012).

### **Acknowledgements**

We gratefully acknowledge Carmen Cuevas, Laura Hinojal and Vanesa Navarro for their excellent technical assistance. This work was supported by the Ministerio de Economía y Competitividad (M.I.N.E.C.O., grant number AGL2010-22191/GAN). Elena Jiménez-Ruiz was supported by a fellowship from M.I.N.E.C.O. (grant number BES-2008-005403).



## **Capítulo VI:**

### **Discusión general**



La neosporosis es una de las enfermedades bovinas con mayor repercusión económica a nivel mundial ya que causa fallo reproductivo y mortalidad neonatal y frente a la cual no existen ni fármacos ni vacunas eficaces (Dubey & Schares, 2011). En este sentido, los esfuerzos de la comunidad científica por desarrollar nuevas medidas de control son cruciales para reducir las pérdidas económicas asociadas a dicha enfermedad. El uso de vacunas tiene múltiples beneficios en el ámbito de la sanidad animal como el aumento de la salud y bienestar del animal, control de las zoonosis y, además, evita los problemas de resistencia que existen con determinados fármacos y reduce los residuos químicos en el animal y en el medioambiente. En particular, en el caso de la neosporosis bovina, entre las posibles medidas de control la vacunación está considerada como la herramienta más eficaz y rentable, ya que implica un menor coste para el ganadero (Reichel & Ellis, 2009). De entre los posibles tipos de vacunas, las vacunas de subunidades han sido ampliamente estudiadas en los últimos años debido a las grandes ventajas que presentan con respecto a las vacunas vivas o inactivadas: seguridad, facilidad en la producción a gran escala, alta estabilidad y fácil manejo durante el proceso de elaboración y distribución (Monney et al., 2011a).

Por otro lado, los modelos animales de infección experimental son herramientas esenciales para una adecuada evaluación de la eficacia de las vacunas desarrolladas frente a la neosporosis (Reichel & Ellis, 2009). Tradicionalmente, los modelos murinos no gestantes de neosporosis cerebral (Collantes-Fernández et al., 2006b) y, recientemente, los modelos gestantes de infección congénita (López-Pérez et al., 2006), han sido utilizados para dicho fin (Aguado-Martínez et al., 2009a; Marugán-Hernández et al., 2011c; Rojo-Montejo et al., 2011b). Sin embargo, es necesaria la obtención de un modelo experimental eficaz en el que la TTEn pueda ser inducida, ya que éste es el principal modo de transmisión de la infección en el ganado bovino (Trees & Williams, 2005; McCann et al., 2007). Además, hasta el momento no ha sido posible inducir la TTEn en el ganado bovino infectado experimentalmente (Williams et al., 2000). Cabe destacar que, como hemos visto en capítulos anteriores, existe una gran heterogeneidad de modelos animales utilizados para el estudio de la neosporosis. Por lo tanto, parece necesaria la elaboración de unos protocolos comunes y consensuados entre los diferentes laboratorios de investigación que permitan comparar y validar los resultados obtenidos en cada uno de ellos. En este sentido se ha realizado un notable esfuerzo de difusión de esta necesidad en foros de discusión internacionales (Campero & Ortega-Mora, 2011; Ortega-Mora et al., 2012). Con este fin, nuestro grupo ha estandarizado un modelo de neosporosis congénita en ratón (López-Pérez et al., 2006), que ha sido empleado en diversos estudios de eficacia vacunal (Debache et al., 2009; Debache & Hemphill, 2013; Monney et al., 2012).

En base a lo anteriormente expuesto en la presente tesis se han abordado dos objetivos principales: la valoración y caracterización de proteínas candidatas involucradas en dos

procesos esenciales en la biología del parásito (ciclo lítico y persistencia en el hospedador) para la posible elaboración de una vacuna de subunidades frente a la neosporosis (Capítulo II), así como una prueba para la valoración de su eficacia en un modelo murino gestante (Capítulo III); y, por otro lado, el desarrollo de un modelo murino experimental en el que se reproduzca la TTEn (Capítulos IV y V).

Para la consecución del primer objetivo de la tesis, se estudiaron cuatro proteínas recombinantes clonadas y producidas en un vector procariota en el laboratorio del grupo SALUVET (rNcGRA7, rNcSAG4, rNcBSR4 y rNcSRS9). Estas cuatro proteínas están implicadas en el ciclo lítico y en la persistencia del parásito en los tejidos del hospedador. La proteína NcGRA7 (presente tanto en el estadio de taquizoíto como de bradizoíto) está implicada en la multiplicación activa del parásito y participa en la formación de la vacuola parasitófora (Hemphill et al., 1998). Por su parte, NcSAG4 (proteína específica del estadio de bradizoíto) se expresa durante la fase temprana de la transformación del taquizoíto al bradizoíto (Fernández-García et al., 2006). Finalmente, NcBSR4 y NcSRS9 (ambas proteínas específicas del estadio de bradizoíto) se han detectado en quistes tisulares y se consideran proteínas de expresión tardía durante la transformación del taquizoíto al bradizoíto (Risco-Castillo et al., 2007; Risco-Castillo et al., 2011).

En el Capítulo II de la tesis, se valoró la idoneidad de los cuatro candidatos para la formulación de vacunas mediante el estudio de la respuesta inmunitaria humoral específica producida frente a las mismas en ratones inoculados con 10 aislados que mostraron diferencias en su virulencia en estudios previos (Pereira García-Melo et al., 2010; Regidor-Cerrillo et al., 2010). Además, por primera vez, se demostró que existe una correlación entre esta respuesta inmunitaria humoral específica y la virulencia del parásito.

Se sabe que la patogenia de la neosporosis es dependiente de varios factores relativos al hospedador y al parásito. Los factores dependientes del parásito descritos son: el estadio, la dosis y el aislado (Dubey et al., 2006). En particular, la diversidad intra-específica ha ganado importancia durante los últimos años ya que se ha comprobado que existen diferencias genéticas entre los diferentes aislados (Schock et al., 2001; Regidor-Cerrillo et al., 2006; Al-Qassab et al., 2009; Basso et al., 2009; Pedraza-Díaz et al., 2009), así como un distinto comportamiento *in vitro* (Regidor-Cerrillo et al., 2011) e *in vivo* en experimentos tanto en modelos experimentales murinos como bovinos (Miller et al., 2002; Quinn et al., 2002; Collantes-Fernández et al., 2006b; Rojo-Montejo et al., 2009a; Pereira García-Melo et al., 2010; Regidor-Cerrillo et al., 2010; Caspe et al., 2012). En algunos de estos experimentos se han observado diferencias significativas en la morbilidad, mortalidad tanto en crías como en madres en un modelo murino, diferente tasa de abortos en el ganado bovino, así como una diferente respuesta inmunitaria de

tipo humoral inducida por los aislados inoculados, observándose mayores niveles de IgG1 e IgG2a anti-*N. caninum* en ratones inoculados con aislados más virulentos (ej. Nc-Spain 5H, 7 y Nc-Liverpool) que en los inoculados con aislados de virulencia moderada-baja (ej. Nc-Spain 2H, 3H y 9) (Pereira García-Melo et al., 2010; Regidor-Cerrillo et al., 2010). Sin embargo, los mecanismos dependientes del parásito responsables de las diferencias en los diferentes parámetros asociados a virulencia no han sido esclarecidos todavía, si bien mediante un abordaje proteómico se han identificado varias proteínas (ej. NcMIC1, NcNTPasa, NcROP40, aspartil tRNA sintetasa y G6PD) que han demostrado ser más abundantes en los aislados virulentos de *N. caninum* (Regidor-Cerrillo et al., 2012a). Aunque no se conocen exactamente las proteínas del parásito que intervienen en el estímulo de la respuesta inmunitaria específica en el hospedador, se investigó la implicación de rNcGRA7, rNcSAG4, rNcBSR4 y rNcSRS9 en este hecho observándose correlaciones significativas entre los niveles de anticuerpos específicos desarrollados frente a estas cuatro proteínas, tanto en ratonas gestantes a día 30 p.p. como en las no gestantes a día 30 p.i., con respecto a los diferentes parámetros estudiados en ensayos tanto *in vivo* como *in vitro* (Pereira García-Melo et al., 2010; Regidor-Cerrillo et al., 2010; Regidor-Cerrillo et al., 2011).

La respuesta específica frente a la proteína rNcGRA7 se correlacionó en este estudio con parámetros de virulencia en ambos modelos murinos (gestante y no gestante). Curiosamente, en el modelo no gestante se observaron menores niveles de anticuerpos frente a rNcGRA7 en los aislados de alta virulencia en comparación a los aislados de virulencia moderada-baja durante la fase temprana de la infección (8 p.i.). Este resultado concuerda con la alta carga parasitaria observada durante esta fase en las ratonas inoculadas con estos últimos aislados en estudios previos (Pereira García-Melo et al., 2010). La explicación a este hecho podría ser que los aislados de virulencia moderada-baja podrían estar más expuestos tanto a la respuesta inmunitaria celular como humoral del hospedador durante el periodo de parasitemia, ya que coincidió con una mayor producción de IgGs frente a *N. caninum* y que, por tanto, conduciría a una reducción de la carga parasitaria. Por el contrario, esta tendencia se invertía, posteriormente, durante la fase crónica de la infección (16-64 p.i.), al igual que ocurre con los anticuerpos específicos frente a rNcGRA7. Además, el patrón de reconocimiento de rNcGRA7 observado en el presente trabajo coincidió con el descrito por Aguado-Martínez et al. (2009b), siendo mayores los niveles de anticuerpos frente a NcGRA7 en ratones inoculados con el aislado virulento Nc-Liverpool en comparación con aquellos ratones inoculados con el aislado Nc-1 (de moderada virulencia). En este sentido, se sabe que la proteína altamente inmunogénica de gránulos densos, NcGRA7, está implicada en la invasión y asociada a la replicación activa del parásito, así como al establecimiento de la vacuola parasitófora en el interior de la célula hospedadora (Hemphill et al., 1998; Aguado-Martínez et al., 2010). De hecho se detectó

también una correlación entre los niveles de anticuerpos anti-rNcGRA7 y la tasa de proliferación del parásito observada *in vitro*. Por ello, se determinó que una carga parasitaria elevada de aislados de alta virulencia, podría suponer una mayor exposición de esta proteína al sistema inmunitario del hospedador y que, en consecuencia, se produciría unos mayores niveles de inmunoglobulinas específicas anti-NcGRA7 (Aguado-Martínez et al., 2009b). Además, en un estudio reciente sobre la diseminación de *N. caninum* *in vivo*, los aislados de virulencia moderada-baja presentaron una menor eficiencia de transmigración en el interior de las células dendríticas y una menor motilidad (“gliding motility”) que los aislados de alta virulencia (Collantes-Fernández et al., 2012). De esta manera, las diferencias observadas entre los grupos infectados podría ser el reflejo de las distintas habilidades de los aislados para replicarse y diseminarse en el interior del hospedador.

Respecto a las proteínas específicas del estadio de bradizoíto, mientras que no se detectaron anticuerpos específicos frente a las proteínas rNcSAG4, rNcBSR4 y rNcSRS9 en el modelo murino no gestante a día 30 p.i., sí se observó un alto número de ratones inoculados con aislados de alta virulencia (Nc-Spain 4H, Nc-Spain 7 y Nc-Liverpool) que mostraron anticuerpos específicos frente a dichas proteínas en el modelo murino gestante a día 30 p.p.

Cabe destacar que rNcSAG4 fue reconocida por un número mayor de ratones que las otras dos proteínas específicas de bradizoíto. Esto podría deberse a los diferentes periodos en los que se expresan estas proteínas durante la conversión taquizoíto-bradizoíto (Fernández-García et al., 2006; Risco-Castillo et al., 2007; Risco-Castillo et al., 2011). Por lo tanto, NcSAG4 podría estar expuesta al sistema inmunitario del hospedador antes que NcBSR4 y NcSRS9 al tratarse de una proteína de expresión temprana. Por otro lado, NcBSR4 y NcSRS9 podrían estar solamente expuestas al sistema inmunitario del hospedador tras una rotura de los quistes tisulares ya que estas proteínas pueden estar relacionadas con la reactivación de la infección, tal y como se ha observado en *T. gondii* (Kim & Boothroyd, 2005; Kim et al., 2007). Las diferencias serológicas observadas entre las infecciones realizadas con los aislados de virulencia moderada-baja o de alta virulencia podrían ser también el reflejo de su diferente capacidad de conversión de taquizoíto a bradizoíto (Collantes-Fernández et al., 2006b; Pereira García-Melo et al., 2010). Cabe destacar que se ha descrito que el aislado español de baja virulencia, Nc-Spain 1H, es capaz de formar un número similar de vacuolas con bradizoítos *in vitro* que el aislado de alta virulencia Nc-Liverpool en ensayos previos. Sin embargo, en el caso del aislado Nc-Spain 1H las vacuolas parasitóforas estaban constituidas por una mezcla de taquizoítos y bradizoítos, no observándose vacuolas puras integradas exclusivamente por bradizoítos (Rojo-Montejo et al., 2009b). Por lo tanto, se necesitarían nuevos estudios para determinar si existen diferencias entre las tasas de conversión de taquizoíto a bradizoíto entre estos aislados españoles de *N. caninum*.

Esta asociación entre virulencia y respuesta inmunitaria específica observada en infecciones por *N. caninum* es similar a la observada en otros estudios realizados con *T. gondii*. Respecto a la respuesta inmunitaria humoral, se detectaron mayores niveles de anticuerpos frente a las proteínas TgSAG1 y TgGRA6, en sueros de cerdos y humanos, respectivamente, infectados con aislados de alta virulencia (tipo I) (Pardini et al., 2012; Sousa et al., 2008). De hecho, TgGRA6 ha sido propuesto como una posible herramienta diagnóstica para el serotipado de los aislados en muestras humanas. Sería por tanto interesante verificar la utilidad de NcGRA7 y NcSAG4 como marcadores predictivos de virulencia en modelos bovinos experimentales de neosporosis y en un futuro, en el ganado bovino naturalmente infectado. Por otro lado, se ha descrito un alto número de genes involucrados en la respuesta inflamatoria del hospedador sobre-expresados en ratones infectados con un aislado virulento tipo I (Hill et al., 2012). De hecho, un estudio reciente en el que se compararon los genomas de *N. caninum* y *T. gondii*, se determinó que alguna proteína descrita como factor de virulencia en *T. gondii*, no se expresa en el caso de *N. caninum* (Reid et al., 2012). Algunas de estas proteínas propias de *T. gondii* con actividad quinasa y pseudoquinasa modularían la respuesta proinflamatoria de las citoquinas IL-12 e IFN- $\gamma$  (Saeij et al., 2006). Por lo tanto, el análisis de la funcionalidad y de la respuesta inmunitaria celular inducida por las proteínas estudiadas en la presente tesis debería ser investigado por su posible papel como factor de virulencia, junto con algunas proteínas involucradas en el ciclo lítico y, posiblemente, otras como las proteínas más abundantes en los aislados de alta virulencia (Regidor-Cerrillo et al., 2012a).

Dado que NcGRA7, NcSAG4, NcBSR4 y NcSRS9 demostraron estar correlacionadas con la virulencia de la infección en ratón todas ellas fueron elegidas como candidatas para la elaboración de vacunas en el siguiente subobjetivo 1.2 de la tesis. El desarrollo de vacunas de nueva generación debería estar enfocado al bloqueo de dos procesos importantes involucrados en la patogenia de *N. caninum*: el ciclo lítico, evitando la proliferación y diseminación del parásito (Innes et al., 2002), y la conversión al estadio de bradizoíto, previniendo así el establecimiento de la infección crónica (Nielsen et al., 2006; Zimmermann et al., 2008), en paralelo con la elección de un adyuvante capaz de modular la respuesta inmunitaria humoral hacia una respuesta tipo Th1, la cual está relacionada con el control de la replicación de parásitos intracelulares como *N. caninum* (Baszler et al., 2000; Yamane et al., 2000). Además, en este trabajo se empleó por primera vez el polímero semicristalino PCL como adyuvante en vacunas frente a *N. caninum*. Esta nueva formulación basada en la nanoencapsulación de las proteínas en PCL fue efectuada con éxito. Además, las nanopartículas obtenidas demostraron tener buenas propiedades fisicoquímicas y mantuvieron la integridad y antigenicidad de las proteínas encapsuladas.

A pesar de los altos niveles de anticuerpos específicos detectados en todos los grupos inmunizados no hubo una estimulación significativa de la respuesta inmunitaria celular. Una explicación posible para esta falta de una adecuada respuesta inmunitaria es que el proceso de degradación *in vivo* de las partículas de PCL puede llegar a los 60 días (Sinha et al., 2004). En consecuencia, en próximos ensayos debería considerarse un retraso en el desafío de ratones inmunizados en los que se evalúe la eficacia y la respuesta inmunitaria inducida por vacunas encapsuladas, tal y como describen otros autores (Murillo et al., 2001; Slobbe et al., 2003). La modificación en el método de encapsulación de rNcGRA7 pudo ser la responsable de la disminución en los niveles de IFN- $\gamma$  obtenidos previamente (Aguado-Martínez et al., 2009a). En el caso de rNcSAG4 los ratones desarrollaron unos niveles similares de IFN- $\gamma$  a los descritos en estudios previos en los que se emplearon vacunas de subunidades (Nishikawa et al., 2001c; Pinitkiatisakul et al., 2007a), y mayores que los observados con otros adyuvantes clásicos tipo aceite en agua (Aguado-Martínez et al., 2009a). En cuanto a las proteínas de bradizoíto NcBSR4 y rNcSRS9 encapsuladas, aunque no estimularon la producción de citoquinas, sí fueron capaces de inducir altos niveles de IgGs específicos en todos los ratones.

Respecto a la protección, evaluada en términos de morbilidad y mortalidad, rNcGRA7 y rNcSAG4 encapsuladas indujeron una ligera protección observándose además, una ligera reducción en la presencia del parásito tanto en ratonas no gestantes como en gestantes, al contrario de lo que se describió en un estudio anterior en el que la mezcla de estas dos proteínas produjo una exacerbación de la infección evidenciada por una alta mortalidad de las hembras en el modelo gestante (Aguado-Martínez et al., 2009a). También se obtuvieron resultados prometedores con rNcSRS9 encapsulada, observándose un retraso en la mortalidad y una menor TT en las crías junto con una menor presencia del parásito en las madres. Resultados similares de protección fueron observados en un estudio previo con la proteína rNcSAG4 y el adyuvante Titermax Gold<sup>®</sup> (Aguado-Martínez et al., 2009a). Sin embargo, rNcSAG4 encapsulada no mostró el mismo resultado en el presente estudio. Es posible que la clonación en un nuevo vector procariota afectase a la conformación de la proteína recombinante (Cannas et al., 2003a; Aguado-Martínez et al., 2009a). De hecho una posible mejora en la expresión podría ser la utilización de un sistema eucariota, como el recientemente descrito para la producción de NcSAG1 y NcSRS2 (Otsuki et al., 2013), ya que las modificaciones post-traduccionales en la forma recombinante serían más similares a las que se producen en las proteínas nativas (Francis & Page, 2010).

Por el contrario, en los grupos vacunados con rNcBSR4 se observó una exacerbación de la neosporosis. En particular, el grupo inmunizado con la mezcla de proteínas recombinantes específicas de bradizoíto, rNcBSR4 y rNcSRS9, mostraron una alto índice de mortalidad y morbilidad en madres, así como un menor tiempo de supervivencia medio en las crías. La

alteración observada en el balance normal de IgG1/IgG2a podría indicar la presencia de niveles altos de IFN-  $\gamma$  en los ratones desafiados y, por tanto, podría ser responsable de la exacerbación de la infección descrita en este grupo (O'Garra & Vieira, 2007). Aunque algunas vacunas formuladas con proteínas recombinantes específicas de bradizoíto de *T. gondii* mostraron una inmunidad protectora en un modelo murino (Nielsen et al., 2006), esta no es la primera vez en la que una vacuna basada en antígenos de bradizoítos está asociada a un fallo en la inducción de una respuesta inmunitaria protectora frente a la neosporosis (Rojo-Montejo et al., 2011b). Es posible que estos resultados mejoraran tras la reactivación de una infección crónica ya que se especula con la posibilidad de que estas proteínas (rNcSAG4, rNcBSR4 y rNcSRS9), tal y como se ha mencionado en el subobjetivo anterior (Capítulo II), solo estarían expuestas al sistema inmunitario tras la ruptura de los quistes tisulares.

El corto periodo de evaluación de la vacuna (día 30 p.i. o 30 p.p.) podría influir en los resultados obtenidos. De hecho, en estudios previos se ha descrito que la inmunización con TgSRS9 indujo una reducción tardía de la carga del parásito en cerebro a partir del día 42 p.i. (Kim & Boothroyd, 2005). Por tanto, los resultados obtenidos plantearon la necesidad de disponer de un buen modelo de infección crónica en el cual la reactivación de la infección pudiera tener lugar y así poder evaluar en estudios futuros la protección frente a la TTEn. Esto nos condujo al planteamiento del objetivo 2.

En los Capítulos IV y V de la tesis se desarrollaron dos modelos en los que se abordó el estudio de la reactivación de la infección por *N. caninum*.

En el Capítulo IV, se realizó el primer estudio en el que se estudiaron un total de tres generaciones consecutivas de ratones incluyendo dos gestaciones en dos situaciones diferentes en cuanto a la infección; primero, en las hembras crónicamente infectadas (infección post-natal) y, después, en sus crías congénitamente infectadas (infección congénita).

El éxito de estudios previos para inducir una reactivación de la infección por *N. caninum* en ratonas crónicamente infectadas ha sido escaso (Cole et al., 1995; Omata et al., 2004; Rettigner et al., 2004a; Kano et al., 2005). Sin embargo, estas investigaciones no son comparables ya que no se sincronizó el estro de las ratonas, se emplearon aislados diferentes para la infección y tampoco se evaluó la morbilidad y mortalidad en las crías. Como hemos visto en el primer objetivo, el desarrollo de la infección es dependiente del aislado empleado (Regidor-Cerrillo et al., 2010). Por tanto, en este caso se eligieron dos aislados de diferente virulencia pero con unos índices altos de TT, Nc-Spain 7, como representante de los aislados de alta virulencia, y Nc-Spain 3H, como aislado de moderada-baja virulencia. Además, se evaluaron los mismos parámetros en hembras gestantes y, por primera vez, en sus crías (morbilidad, mortalidad, presencia del parásito y la respuesta inmunitaria humoral).

Para asegurar que las ratonas gestantes estuvieran en una fase crónica de la infección, la gestación se estableció alrededor del día 90 p.i, ya que en estudios previos varios autores han descrito que a partir del día 30 p.i. *N. caninum* solo está presente en cerebro y que la conversión de taquizoíto a bradizoíto ocurre durante la fase crónica tardía de la infección, ya que los niveles de mRNA del gen *NcSAG4* mostraron un mayor incremento entre los días 32 y 64 p.i., observándose en paralelo una disminución de la presencia de taquizoítos en el cerebro (Collantes-Fernández et al., 2006b; Aguado-Martínez et al., 2009b), al contrario de lo que ocurre en la infección por *T. gondii* durante la cual se observan quistes tisulares entre los días 8 y 15 p.i. (Dubey et al., 1998b; Chew et al., 2012).

El éxito de este ensayo ha sido moderado ya que la TT fue observada en al menos un 50% de las camadas de esta segunda generación en ambos grupos infectados, si bien se esperaba una carga parasitaria baja durante esta fase crónica de la infección (Collantes-Fernández et al., 2006b; Aguado-Martínez et al., 2009b). Sin embargo, la TT apenas fue observada en la tercera generación. Esta tendencia a disminuir la TT en generaciones consecutivas fue también descrita por Cole et al. (1995) y por Rettigner et al. (2004a), aunque en estos modelos solo se estudiaron gestaciones sucesivas de las mismas hembras y no de sus crías. Los mecanismos de reactivación de la infección crónica durante la gestación en vacas no se conocen del todo pero se especula que puedan estar relacionados con cambios inmunológicos y endocrinos durante la gestación (Innes et al., 2005). En el modelo murino varios autores han descrito que la respuesta tipo Th1 es menor durante la gestación facilitando la TT (Omata et al., 2004; Kano et al., 2005). Por el contrario, Rettigner et al. (2004a) postularon que ni las hormonas asociadas a la gestación ni la modulación de la respuesta inmunitaria durante la gestación son las responsables de la reactivación de la infección crónica por *N. caninum*. Según estos autores, la reactivación sería el resultado de la ruptura ocasional de quistes tisulares que ocurrirían de manera natural durante el curso de la infección crónica. Sin embargo, la tasa moderada de TT observada en nuestro estudio no apoyaría dicha teoría. De hecho, la presencia de ADN del parásito en el 50% de las camadas sugiere que, en este caso al menos, la reactivación de la infección por *N. caninum* podría ocurrir como consecuencia de ambos eventos: la inmuno-modulación durante la gestación y la ruptura espontánea de quistes tisulares.

Tal y como se ha visto en el Capítulo II, los niveles de anticuerpos específicos frente a *N. caninum* o frente a las proteínas recombinantes NcGRA7 y NcSAG4 están relacionados con los porcentajes de presencia del parásito, siendo mayores en el caso del grupo inoculado con el aislado de alta virulencia a día 54 p.i. Los niveles altos de anticuerpos frente a rNcSAG4 indicarían que se ha establecido la infección crónica (Aguado-Martínez et al., 2008; Aguado-Martínez et al., 2009b). Sin embargo, tanto la respuesta inmunitaria humoral como la presencia del parásito disminuyeron significativamente en la segunda y tercera generación en ambos

grupos infectados con independencia del aislado empleado para las inoculaciones. Esto junto con la mayor respuesta de anticuerpos observada en las hembras no gestantes respecto a las hembras gestantes nos llevó a considerar que solo ratonas sin signos clínicos y cargas parasitarias muy bajas quedaron gestantes (posiblemente también relacionado con una menor respuesta inmunitaria humoral en estos animales). De hecho, en el caso del grupo inoculado con Nc-Spain 7, en el que se observó una alta morbilidad y mortalidad antes de la cubrición y una mayor presencia del parásito en hembras no gestantes al compararla con las hembras gestantes a día 30 p.p., hubo una menor TT a las crías de la esperada, así como una ausencia de signos clínicos y mortalidad en la segunda y tercera generación. Respecto al grupo inoculado con Nc-Spain 3H se observó TT en todas las generaciones aunque la disminución progresiva de animales infectados a lo largo de sucesivas generaciones fue significativa. En consecuencia, la ausencia de signos clínicos en crías de la segunda y tercera generación junto con la ausencia de anticuerpos específicos frente a *N. caninum*, podrían explicarse por la existencia de una baja carga parasitaria, siendo el parásito incapaz de inducir patología o al menos niveles de anticuerpos detectables.

De acuerdo con estos resultados, nos planeamos una posible mejora de este modelo murino teniendo en cuenta la existencia de dos factores limitantes: i) los aislados de alta virulencia causan un descenso en la fertilidad debido a la morbilidad generada en la hembra; ii) por el contrario, una baja carga parasitaria podría comprometer la TT.

Para conseguir un equilibrio entre estas dos situaciones que favoreciera la TTEn, se desarrolló un modelo murino (Capítulo V) en el que se obtuviera un mayor número de animales congénitamente infectados a partir de los cuales inducir la TTEn durante la gestación. Por ello se utilizó el modelo murino gestante de primoinfección a día 7 de gestación (López-Pérez et al., 2008) como primera generación y se emplearon además en las inoculaciones dos aislados de moderada-baja virulencia, cuyos índices de TT en este modelo de primoinfección ya estaban descritos: Nc-Spain 3H con el que se obtuvieron resultados moderadamente buenos en el anterior modelo, y Nc-Spain 8, que aun siendo un aislado de virulencia moderada-baja había presentado una alta TT (Regidor-Cerrillo et al., 2010). De esta forma se esperó inducir la reactivación (evidenciada por una TTEn) en las hembras congénitamente infectadas de la segunda a la tercera generación.

El resultado más destacable obtenido con este último modelo experimental fue que se indujo por primera vez una reactivación clínica de la neosporosis ya que varias hembras de la segunda generación en ambos grupos mostraron signos clínicos tras sincronizar e inducir la gestación mediante el efecto Whitten. De hecho, varias de estas hembras tuvieron que ser sacrificadas debido a la gravedad de los signos clínicos mostrados. Consideramos que esta

reactivación podría ser consecuencia del estrés inducido durante la inducción del estro y la posterior cubrición. De hecho se sabe que el estrés influye en el sistema inmunitario a través del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal originando una inmunodepresión que favorecería al desarrollo de la infección (Habib et al., 2001; Charmandari et al., 2005). Además, se observó un incremento significativo en la respuesta inmunitaria humoral específica y en el número de animales con presencia del parásito en ratonas no gestantes de esta segunda generación respecto a lo observado en las hembras gestantes de esta misma generación. En el grupo inoculado con Nc-Spain 8 estas diferencias fueron más evidentes, por lo tanto Nc-Spain 8 parece ser un aislado más eficaz a la hora de inducir una reactivación clínica de la neosporosis. En el modelo anterior se observaron también estas diferencias entre hembras gestantes y no gestantes, si bien en este caso sucedió en la primera generación durante la fase crónica de la infección. En ese momento se especuló con la posibilidad de que solo las ratonas más sanas y con menor carga parasitaria se quedaban gestantes, y esta teoría parece confirmarse en el presente modelo.

Al igual que en el modelo anterior, no se detectó al parásito en la tercera generación, a pesar de la alta TT observada en la segunda generación, confirmándose la hipótesis de que únicamente las hembras con menor carga parasitaria, en las que no se indujo una reactivación clínica, se quedaron gestantes.

Sorprendentemente, los bajos índices de TTEn observados en ambos modelos contrastan con las altas tasas de TT observadas en el ganado bovino naturalmente infectado (Dubey & Schares, 2011). Estos hallazgos confirman que el ratón no sería una especie apropiada para inducir la TTEn que con tanta frecuencia ocurre en el ganado bovino. Se ha postulado que la placenta podría jugar un papel importante en la patogénesis de la neosporosis (Innes et al., 2005; López-Pérez et al., 2010). En este sentido, la placenta hemocorial propia de los roedores permite un contacto más estrecho entre los tejidos materno y fetal en comparación con la placenta sindesmocorial del ganado bovino, la cual no permite el paso de anticuerpos maternos al feto (Entrican, 2002). De este modo las crías de roedores adquirirían los anticuerpos maternos *in utero* (Appleby & Catty, 1983), siendo estos anticuerpos protectores frente a la infección por *N. caninum*. De hecho, se ha visto previamente que anticuerpos maternos frente a *Plasmodium* transferidos a las crías evitan la proliferación del parásito en un modelo murino (Stanisic et al., 2003). Por otro lado, aunque la TTEn no ha sido reproducida experimentalmente en el ganado bovino (Williams et al., 2000), el empleo de una especie animal con una estructura placentaria similar, como son los pequeños rumiantes, debería ser considerada para futuros ensayos. Además de por el tipo de placentación, existen muchas otras ventajas del uso de un modelo ovino experimental como son una gestación más corta, mayor facilidad de manejo y el menor coste comparado con el modelo bovino. Además, la oveja está considerada como H.I. de *N. caninum*, ya que se ha realizado el aislamiento del parásito de animales naturalmente infectados

(revisado por Dubey et al., 2007). Por otro lado, se han descrito valores de seroprevalencia moderados (Nasir et al., 2012) y el índice de abortos asociado a la infección por *N. caninum* parece ser mayor de lo esperado en esta especie (Moreno et al., 2012).

En resumen, se ha demostrado por primera vez que existe una correlación entre esta respuesta inmunitaria humoral específica frente a las proteínas NcGRA7, NcSAG4, y en menor medida NcBSR4 y NcSRS9, y la virulencia del parásito. Este hecho que junto con la implicación de estas proteínas en procesos biológicos clave del parásito nos hizo pensar que eran buenas candidatas a la hora de desarrollar preparaciones vacunales frente a la neosporosis, en combinación con el empleo de nuevos sistemas de adyuvantación. Por ello, las cuatro proteínas en su forma recombinante se encapsularon con éxito por primera vez en partículas de PCL, manteniendo su integridad y antigenicidad. Sin embargo, la vacunación con dichas proteínas recombinantes, solas o en combinación, no indujo una respuesta inmunitaria protectora frente a la infección por *N. caninum* en un modelo murino gestante, debido posiblemente a que este modelo de primoinfección no haya sido el más adecuado para valorar la eficacia de las proteínas específicas del estadio de bradizoíto. Por ello se desarrollaron nuevos modelos murinos de infección crónica o congénita con posterior reactivación de *N. caninum*, emulando así la ruta TTEn, obteniéndose tasas moderadas-bajas de TT y cierto éxito en inducir reactivación clínica por primera vez.

Los resultados obtenidos en relación al estudio de la respuesta inmunitaria específica de anticuerpos inducida por las proteínas estudiadas junto con algunos resultados prometedores obtenidos en relación a la eficacia de algunas de las preparaciones vacunales estudiadas en un modelo murino de TTEx nos hacen pensar que una mejora en la eficacia de las mismas podría conseguirse siguiendo nuevos abordajes: i) empleo de otros adyuvantes que potencien una respuesta inmunitaria eficaz contra el parásito; ii) desarrollo de otro modelo animal capaz de inducir la TTEn para evaluar con mayor precisión la eficacia de antígenos específicos del estadio de bradizoíto; iii) identificación de nuevos antígenos implicados en virulencia.



## **Capítulo VII:**

### **Conclusiones**



**OBJETIVO 1. Desarrollo de vacunas basadas en la utilización de proteínas NcGRA7, NcSAG4, NcBSR4 y NcSRS9 junto con el empleo de nuevos sistemas de adyuvantación basados en la nanoencapsulación.**

**Primera.** Se han determinado los niveles de anticuerpos específicos frente a cuatro proteínas implicadas en el ciclo lítico (NcGRA7) y en la persistencia del parásito en el hospedador (NcSAG4, NcBSR4 y NcSRS9) en muestras de suero de ratones inoculados con 10 aislados de *N. caninum*. Los niveles de anticuerpos específicos frente a rNcGRA7 y rNcSAG4, y en menor medida los niveles de anticuerpos específicos frente a rNcBSR4 y rNcSRS9, se correlacionaron con parámetros de virulencia previamente estudiados en ensayos *in vivo* e *in vitro*. De esta manera, NcGRA7 y NcSAG4 podrían ser consideradas como posibles marcadores serológicos de virulencia en ratón y, en menor grado, las proteínas NcBSR4 y NcSRS9.

**Segunda.** Se ha estudiado la eficacia vacunal de las proteínas recombinantes rNcBSR4 y rNcSRS9 junto con las proteínas rNcGRA7 y rNcSAG4 encapsuladas en nanopartículas de poli- $\epsilon$ -caprolactona. Todas las formulaciones vacunales mantuvieron su integridad estructural y antigenicidad tras el proceso de encapsulación. Sin embargo ninguna de las proteínas encapsuladas, solas o en combinación, protegió frente a la neosporosis en ratonas adultas ni frente a la TT en sus crías. Por el contrario, cuando se inmunizó con la mezcla rNcGRA7-rNcSAG4 encapsuladas, así como con rNcSRS9 encapsulada, se obtuvieron unos resultados ligeramente mejores en comparación al resto de formulaciones vacunales.

**OBJETIVO 2. Desarrollo de un nuevo modelo murino de infección crónica o congénita con posterior reactivación de *N. caninum* emulando así la ruta TTE<sub>n</sub>**

**Primera.** Se ha inducido la TTE<sub>n</sub> en el modelo murino a lo largo de tres generaciones consecutivas y en tres diferentes escenarios: la reactivación en hembras crónicamente infectadas, la reactivación en crías congénitamente infectadas tras una TTE<sub>n</sub> y la reactivación en crías congénitamente infectadas tras una TTE<sub>x</sub>. Sin embargo, las tasas de TTE<sub>n</sub> fueron moderadas o bajas disminuyendo gradualmente a lo largo de las generaciones en todos los casos.

**Segunda.** El aislado empleado fue un factor determinante en los modelos murinos de TTE<sub>n</sub>, ya que la fertilidad se vio comprometida en las hembras inoculadas con el aislado de alta virulencia. Por el contrario, se detectó TT, hasta la tercera generación, en ratonas infectadas con el aislado de moderada-baja virulencia Nc-Spain 3H, siendo el modelo de hembras crónicamente infectadas el más eficaz para la inducción de la TTE<sub>n</sub>.

**Tercera.** Ha sido observada una reactivación clínica de la infección en un modelo murino, siendo el aislado Nc- Spain 8, también de moderada- baja virulencia, y el aislado Nc-

Spain 7, los más eficaces para la inducción de dicha reactivación en ratones congénitamente infectados tras una TTE<sub>x</sub> y en ratones crónicamente infectados, respectivamente. Sin embargo, los bajos índices de reactivación obtenidos indican que el ratón no parece ser la especie más adecuada para emular de forma experimental la TTE<sub>n</sub> tan frecuente en el ganado bovino, probablemente debido a las diferencias en la estructura de las placentas murina y bovina.

## **Chapter VII:**

### **Conclusions**



**OBJECTIVE 1. Development of vaccines based on the proteins NcGRA7, NcSAG4, NcBSR4 and NcSRS9 with a new adjuvant system based on nanoencapsulation**

**First.** The specific antibody levels against four proteins involved in the lytic cycle (NcGRA7) and the persistence of the parasite in the host (NcSAG4, NcBSR4 and NcSRS9) in serum samples from mice inoculated with 10 *N. caninum* isolates have been studied. The specific antibody levels against rNcSAG4 and rNcGRA7 proteins, and to a lesser degree, the specific antibody levels against rNcSRS9 and rNcBSR4 proteins, were correlated to virulence parameters previously studied in both *in vivo* and *in vitro* assays. Therefore, NcSAG4 and NcGRA7 and, to a lesser extent, NcSRS9 and NcBSR4 proteins, could be considered as potential serological markers of virulence in mice.

**Second.** The vaccine efficacy of the recombinant proteins rNcSRS9 and rNcBSR4, along with rNcSAG4 and rNcGRA7 encapsulated in nanoparticles of poly- $\epsilon$ -caprolactone polymer was studied. All proteins maintained their structural integrity and antigenicity after the encapsulation process. However, none of the encapsulated proteins, alone or in combination, protected against neosporosis in adult mice or against the TT in their offspring. Conversely, mice immunised with the mixture of rNcGRA7-rNcSAG4 encapsulated, as well as with rNcSRS9 encapsulated showed some indications of efficacy compared to the other vaccine formulations.

**OBJECTIVE 2. Development of a new mouse model for the reactivation of a *N. caninum* chronic infection or a congenital infection**

**First.** The EnTT has been induced in a mouse model through three consecutive generations and three different scenarios: the reactivation in chronically infected dams, the reactivation in congenitally infected pups after an EnTT, and the reactivation in congenitally infected pups after an ExTT. However, the moderate-to-low rates of EnTT were gradually decreasing throughout generations in all scenarios.

**Second.** The isolate used in these mouse models of EnTT was a decisive factor because the fertility was compromised in females inoculated with a high virulence isolate. In contrast, TT was detected in mice infected with the low-to-moderate virulence isolate Nc-Spain 3H throughout the generations. However, the chronically infected mouse model was the most efficient for inducing the EnTT.

**Third.** A clinical reactivation of the infection has been observed. The low-to-moderate virulence isolate Nc-Spain 8 and the high virulence isolate Nc-Spain 7 were the most efficient for inducing the reactivation of infection in congenitally infected mice after an ExTT, and in chronically infected mice, respectively. However, the low reactivation rates obtained confirm

that the mouse is not the most suitable species for inducing the EnTT that frequently occurs in naturally infected cattle, probably due to differences in the placental structure between mice and cattle.

# **Resumen**



*Neospora caninum* es un parásito intracelular, formador de quistes, considerado como una de las principales causas de fallo reproductivo en el ganado bovino y, por tanto, responsable de importantes pérdidas económicas en la industria bovina tanto de leche como de carne. Uno de los principales retos de los investigadores en este campo, es el desarrollo de vacunas seguras, eficaces y económicamente viables que protejan del aborto y de la transmisión vertical del parásito. Para ello, es de gran importancia la selección de antígenos capaces de inducir una respuesta inmunitaria en el hospedador frente al parásito. Sin embargo, aunque las técnicas más novedosas para el estudio del genoma y del proteoma de *N. caninum* han permitido identificar nuevos candidatos que podrían estar involucrados en la virulencia del parásito, los mecanismos dependientes del parásito y del hospedador implicados en el desarrollo de una respuesta inmunitaria eficaz no han sido descritos aún. En este contexto, el empleo de antígenos implicados en la multiplicación, diseminación y acantonamiento del parásito en órganos inmunoprivilegiados capaces de inducir una respuesta inmunitaria, junto con nuevos sistemas de adyuvanciación es en la actualidad, uno de los abordajes más atractivos en el desarrollo de vacunas de nueva generación frente a la infección por *N. caninum*. Sin embargo, los estudios de seguridad y eficacia vacunal deben emplear modelos experimentales adecuados a los parámetros a evaluar. En este sentido, los modelos murinos no gestantes y gestantes se han utilizado, como prueba de concepto, para el cribado de formulaciones vacunales, lo cual es recomendable antes de su empleo en la especie de destino.

En la primera parte de la presente Tesis Doctoral (Capítulo II), con el objetivo de determinar la posible implicación de ciertas proteínas en la generación de la respuesta inmunitaria en el hospedador y su posible correlación con parámetros de virulencia, se seleccionaron cuatro proteínas involucradas en dos procesos claves del parásito relacionados con el ciclo biológico y la patogenicidad: el ciclo lítico (NcGRA7) y su persistencia en los tejidos del hospedador (NcSAG4, NcBSR4 y NcSRS9). La cinética de la respuesta inmunitaria y las diferencias entre los niveles de anticuerpos específicos desarrollados frente a estas cuatro proteínas fueron analizadas en los sueros de ratones, infectados con 9 aislados españoles de diferente virulencia y Nc-Liverpool, mediante la técnica ELISA y comparados con diferentes parámetros asociados a virulencia. Se observaron unos mayores niveles de anticuerpos específicos frente a rNcGRA7 y rNcSAG4 en los grupos de ratonas no gestantes en el día 30 p.i. y en las gestantes en el día 30 p.p., inoculados con aislados de alta virulencia (Nc-Spain4H, Nc-Spain 5H y NcSpain7) cuando se compararon con sueros de ratones inoculados con los aislados de virulencia moderada-baja (Nc-Spain 2H, Nc-Spain 3H, Nc-Spain 6, Nc-Spain 8, Nc-Spain 9 y Nc-Spain 10). También se observaron en algunas ratonas gestantes, inoculadas con aislados de alta virulencia, niveles moderados de anticuerpos específicos frente a las proteínas rNcBSR4 y rNcSRS9. Además, los niveles de anticuerpos específicos frente a rNcGRA7 y rNcSAG4 se

correlacionaron tanto con los niveles de anticuerpos específicos anti *N. caninum* IgG1 e IgG2a, como con los parámetros de virulencia observados previamente en ensayos *in vivo* e *in vitro*. Estos resultados indican la relevancia de NcGRA7 y NcSAG4 (y, en menor medida, a las proteínas NcBSR4 y NcSRS9) como posibles marcadores serológicos de virulencia en ratón.

Dada la posible implicación de estas proteínas en la virulencia del parásito observada en el capítulo anterior, así como su participación en el ciclo lítico -invasión de la célula hospedadora y formación de la vacuola parasitófora, y en la persistencia del parásito en los tejidos del hospedador-; en el Capítulo III se valoró la posible eficacia de las mismas, expresadas como proteínas recombinantes en *Escherichia coli* y formuladas con poli-  $\epsilon$ -caprolactona (PCL), en un ensayo vacunal en un modelo gestante y no gestante de neosporosis aguda en ratones BALB/c. La eficacia de encapsulación de las proteínas en nanopartículas de PCL superó el 50% en todos los casos, manteniéndose tanto la integridad estructural como la antigenicidad de las mismas. Los ratones fueron inmunizados dos veces con cada formulación vacunal y, posteriormente, fueron desafiados con un aislado de alta virulencia en los días 7-10 de gestación. Todos los grupos inmunizados desarrollaron unos niveles elevados tanto de anticuerpos IgG1 e IgG2a frente al antígeno soluble del taquizoíto de *N. caninum* como de anticuerpos específicos frente a las respectivas proteínas recombinantes. Sin embargo, la producción de citoquinas fue menor que la esperada. Esto podría indicar un fallo en la completa liberación de los antígenos tras la inmunización o un desequilibrio en las respuestas Th1/Th2. De hecho, se observó una alta morbilidad y mortalidad en las hembras gestantes. Además, estas formulaciones no protegieron frente a la transmisión transplacentaria (TT) y se observó una alta mortalidad neonatal similar en todos los grupos. A pesar de la falta de eficacia obtenida, se observó un ligero retraso de la mortalidad en las crías, así como una menor presencia del parásito, tanto en las hembras como en sus crías, en el grupo inmunizado con rNcSRS9 encapsulado. Además, la vacunación con rNcGRA7, sola o en combinación con rNcSAG4, ocasionó una ligera disminución de la presencia del parásito en hembras no gestantes.

Sin embargo, debido a que las proteínas NcSAG4, NcBSR4 y NcSRS9 podrían estar implicadas en la persistencia y reactivación de la infección producida por *N. caninum*, es posible que el modelo murino de primoinfección, que ha sido ampliamente utilizado para el estudio de la neosporosis hasta la fecha, no sea el más apropiado para estudiar la eficacia de formulaciones vacunales basadas en proteínas específicas de bradizoíto. Por ello, en los Capítulos IV y V, se intentó desarrollar un modelo murino experimental en el que se indujera la transmisión transplacentaria endógena (TTE<sub>n</sub>) de *N. caninum*. Hasta la fecha, no se han desarrollado modelos experimentales ni murinos ni bovinos en los que ocurra una TTE<sub>n</sub>. Estos modelos permitirían valorar de forma más apropiada la seguridad y eficacia de las formulaciones vacunales, ya que este modo de transmisión acontece con mayor frecuencia en el ganado

bovino. Con el objetivo de obtener dicho modelo, se estudiaron tres escenarios en los que pudiera inducirse una reactivación de la infección: i) hembras crónicamente infectadas; ii) hembras congénitamente infectadas tras una TTEn (Capítulo IV); iii) hembras congénitamente infectadas tras una transmisión transplacentaria exógena (TTEEx) (Capítulo V). En ambos capítulos, la morbilidad, mortalidad, la TT y la respuesta inmunitaria humoral fue determinada en tres generaciones consecutivas.

Para el desarrollo del modelo se utilizaron tres aislados de *N. caninum* con distinta virulencia: el aislado de alta virulencia, Nc-Spain 7, y los aislados de virulencia moderada-baja, Nc-Spain 3H y Nc-Spain 8. Se observó que el aislado elegido podría ser un factor determinante a la hora de inducir TTEn, ya que en el caso del aislado de alta virulencia, observándose una alta morbilidad y mortalidad en hembras crónicamente infectadas, junto con una disminución en la fertilidad (solamente un 17% de las hembras supervivientes, que no presentaron signos clínicos y, posiblemente, con una menor carga parasitaria en el organismo, quedaron gestantes). Por el contrario, si el aislado utilizado es de virulencia moderada-baja, la carga parasitaria esperada en los tejidos del hospedador es baja, y por tanto, la TT puede verse afectada, obteniéndose un bajo número de animales congénitamente infectados. Sin embargo, el aislado más eficaz en términos de TTEn fue Nc-Spain 3H, observándose transmisión del parásito en la segunda y la tercera generación en el caso del Capítulo IV (17,1% y 8,7% respectivamente) y en la tercera generación en el Capítulo V (0,7%). Por otro lado, se indujo por primera vez una reactivación clínica en hembras no gestantes congénitamente infectadas tras una TTEEx, en las que se observaron signos clínicos asociados a la neosporosis tras la sincronización del estro y durante la cubrición. La hipótesis es que la reactivación se produjo como consecuencia del estrés generado en las ratonas durante este periodo. En este caso, el grupo inoculado con el aislado Nc-Spain 8 presentó la mayor tasa de morbilidad. Además también se detectaron mayores niveles específicos de anticuerpos, así como un número mayor de hembras positivas por PCR en el grupo de no gestantes en comparación con el grupo de gestantes de la misma generación. Estos resultados apoyarían la hipótesis de que solo las hembras sin signos clínicos y con menor carga parasitaria se quedan gestantes, lo que explicaría la ausencia de TTEn a la tercera generación.

En resumen, los bajos índices de reactivación de la infección por *N. caninum* tanto en hembras crónicamente infectadas como en hembras congénitamente infectadas, desaconsejan el empleo de este modelo murino en la valoración de la seguridad y la eficacia de fármacos o formulaciones vacunales frente a la TTEn. Las diferencias en cuanto a la inducción de la TTEn en el ratón y en el ganado bovino pueden ser debidas, entre otras razones, a la diferente estructura de la placenta, hemocorial en el ratón y sindesmocorial en la vaca, que permitiría, en el caso del ratón, un paso de anticuerpos maternos al feto, limitando por tanto el desarrollo de la infección en las crías. El empleo de otras especies con una placenta similar a la del ganado

bovino, como son los ovinos y caprinos, debería ser tomado en consideración para el desarrollo de futuros modelos experimentales de TTEn. Además de su similar placentación, la oveja es hospedador intermediario natural de *N. caninum* y en esta especie se han descrito tasas de prevalencia de la infección por *N. caninum* moderadas así como abortos asociados a la presencia del parásito. Por último, el empleo de un modelo ovino experimental presenta otras ventajas como una corta gestación y un menor coste si lo comparamos con el modelo bovino.

Los resultados obtenidos en relación al estudio de la respuesta inmunitaria específica inducida por las proteínas estudiadas (niveles de anticuerpos específicos anti-NcGRA7, NcSAG4, NcBSR4 y NcSRS9 correlacionados con parámetros de virulencia) junto con algunos resultados prometedores obtenidos en relación a la eficacia de algunas de las preparaciones vacunales estudiadas en un modelo murino de TTEx nos hacen pensar que una mejora en la eficacia de las mismas podría conseguirse siguiendo nuevos abordajes: i) empleo de otros adyuvantes que potencien una respuesta inmunitaria eficaz contra el parásito ya que, pese a que NcGRA7 parece ser un buen candidato vacunal, la nanoencapsulación con PCL no indujo la respuesta inmunitaria protectora esperada; ii) la valoración de la eficacia de antígenos específicos del estadio de bradizoíto en un modelo animal capaz de inducir la TTEn para evaluar con mayor precisión la eficacia de estas proteínas como vacunas, ya que, si bien los modelos murinos de reactivación desarrollados en la presente Tesis fueron capaces de inducir TTEn, las tasas no fueron lo suficientemente elevadas para poderlos emplear en futuros ensayos vacunales; iii) identificación de nuevos antígenos implicados en virulencia.

# Summary



*Neospora caninum* is an intracellular cyst forming parasite, considered as a major cause of reproductive failure in cattle and therefore responsible for significant economic losses in the milk and meat cattle industry. The main challenge for researchers is to develop a safe, effective and economically viable vaccine in order to prevent abortion and vertical transmission of the parasite. Thus, the selection of antigens capable of inducing a protective immune response against the parasite in the host is of great importance. Although the newest techniques for the study of the genome and the proteome of *N. caninum* have identified new candidates that might be involved in the virulence of the parasite, the parasite- and host- mechanisms involved in the development of an effective immune response have not yet been described. In this context, the use of immunogenic antigens involved in the parasite proliferation, dissemination and persistence within immune privileged tissues, along with new adjuvant systems, are currently one of the most attractive approaches in the development of new generation vaccines against *N. caninum*. However, it is important to employ suitable experimental models for the evaluation of safety and efficacy of vaccine formulations in accordance with the studied parameters. In this sense, the pregnant and non pregnant mouse models have been used, as a proof of concept, for the vaccine formulations screening prior to their use in the target species.

In the Chapter II of this Doctoral Thesis, four proteins involved in two key processes -the lytic cycle (NcGRA7) and persistence in host tissues (NcSAG4, NcBSR4 and NcSRS9)- were selected, in order to determine the possible involvement of these proteins in the generation of an immune response in the host and their possible correlation with virulence parameters. The kinetics of the immune response and the differences in the specific antibody levels against these four proteins were analysed by recombinant protein-based ELISA in groups of mice inoculated with 9 different Spanish *N. caninum* isolates and Nc-Liverpool isolate which differ in their virulence. The antibodies developed against the highly immunogenic proteins NcGRA7 and NcSAG4 were significantly higher in mice inoculated with high virulence isolates (Nc-Spain4H, Nc-Spain 5H and Nc-Spain7) than in those inoculated with low-to-moderate virulence isolates (Nc-Spain 2H, Nc-Spain 3H, Nc-Spain 6, Nc-Spain 8, Nc-Spain 9 and Nc-Spain 10). This effect was observed in both non-pregnant mice at day 30 p.i. and pregnant mice at day 30 p.p. In addition, moderate antibody levels against rNcBSR4 and rNcSRS9 were observed in some pregnant mice inoculated with high virulence isolates. Moreover, the antibody levels against rNcGRA7 and rNcSAG4 were correlated with the anti-*N. caninum* IgG1 and IgG2a antibody levels and with the virulence parameters observed previously in *in vivo* and *in vitro* assays. These results highlight the relevance of NcGRA7 and NcSAG4 (and to a lesser extent the relevance of NcBSR4 and NcSRS9 proteins) as serological markers for virulence in mice.

Since these four proteins might be related to parasite virulence, along with their implication in the lytic cycle -host cell invasion, parasitophorous vacuole formation and

persistence within host tissues-; their protective efficacy of these proteins expressed as recombinant proteins in *E. coli* and formulated with poly-  $\epsilon$ -caprolactone (PCL) was evaluated in pregnant and non-pregnant mouse models of acute neosporosis (Chapter III). Good efficiencies of entrapment (more than 50%) were obtained for all encapsulated proteins. Moreover, antigenicity was unaffected after formulation. Afterwards, separate groups of mice were immunised with the nanoparticles and were then challenged with *N. caninum* tachyzoites. High IgG1 and IgG2a antibody levels against *N. caninum* and specific antibodies directed against recombinant proteins were developed by all of the immunised groups. However, in general, a lower production of IFN- $\gamma$  than expected was detected. This may indicate a failure in the complete liberation of antigens after immunisation or an incorrect balance of the Th1/Th2 response to combat acute neosporosis during pregnancy. In fact, high morbidity and mortality rates were observed in dams. Moreover, transplacental transmission (TT) was not prevented, and high neonatal mortality rates occurred similarly among the groups. Despite the global absence of efficacy, the study revealed some indications of positive efficacy regarding dams and pup survival and parasite presence for NcSRS9 recombinant protein. Furthermore, vaccination with rNcGRA7 encapsulated alone or combined with rNcSAG4 resulted in a slight decrease of parasite presence in non-pregnant mice.

However, the primary infection mouse model, widely used for the study of neosporosis, might not be the most suitable model to evaluate the efficacy of bradyzoite-stage specific proteins in vaccine formulations since NcSAG4, NcBSR4 and NcSRS9 are involved in the persistence of the parasite in the host. Moreover, the use of bradyzoite-stage specific antigens as vaccine candidates in a murine model could be able to prevent the reactivation of *N. caninum* and the EnTT. Therefore, in Chapters IV and V, an experimental murine model was performed, in which an endogenous transplacental transmission could be induced. At present, EnTT has not been reproduced in bovine or murine experimental models. A model able to reproduce the reactivation of infection could be extremely useful for testing drugs and vaccine efficacy against EnTT since it is the most common route of infection in cattle and occurs as a consequence of a reactivation of *N. caninum* infection. Three different scenarios were studied: i) the reactivation in chronically infected dams; ii) the reactivation in congenitally infected pups after an EnTT (Chapter IV); iii) the reactivation in congenitally infected pups after an ExTT (Chapter V). In both Chapters, morbidity and mortality rates, TT and humoral immune response were measured in three consecutive generations.

Three *N. caninum* isolates with different virulence were used: a high virulence isolate, Nc-Spain 7, and two low-to-moderate virulence isolates, Nc-Spain 3H and Nc-Spain 8. The virulence of the isolate used in these mouse models of EnTT was a decisive factor for the morbidity, mortality and fertility rate observed in chronically infected females. Conversely, if a

low-to-moderate virulence isolate is used, a low parasite burden in host tissues is expected and the TT could be affected, resulting in a low number of congenitally infected animals. However, Nc-Spain 3H was the most efficient isolate for the transmission of the infection to the second and third generation (17.1% and 8.7% respectively; Chapter IV), as in the third generation (0.7%; Chapter V). On the other hand, a clinical reactivation of *N. caninum* infection was successfully achieved for the first time in congenitally infected non-pregnant mice in which neosporosis-associated clinical signs were exhibited after oestrus synchronisation. These results could be explained by a reactivation of infection as a consequence of a stress period induced during the mating period. In this case, the group inoculated with Nc-Spain8 isolate showed a higher morbidity rate, accompanied by an increase of specific antibody levels and a higher number of PCR positive mice in non-pregnant mice than in pregnant mice. These results support the hypothesis that only mice without clinical signs and with a low parasite burden in the brain became pregnant, which may explain the posterior failure in inducing EnTT from the second to the third generation.

In summary, the low rates of reactivation of *N. caninum* infection in both chronically and congenitally infected mice confirm that the mouse is not an appropriate or suitable species for inducing the EnTT that frequently occurs in naturally infected cattle. The differences in the induction of EnTT between mice and cattle can be due, among other reasons, to a different placental structure (haemochorial vs. synepitheliochorial), which allows the acquisition of maternal antibodies placentally in case of mice. These antibodies may be protective against infection *in utero*. The employment of other putative suitable species with a similar placental structure, such as small ruminants, should be taken into consideration for the future development of an experimental EnTT model. Besides a similar placenta structure, the sheep is a natural intermediate host for *N. caninum* and in this species moderate prevalence rates of infection with *N. caninum* and related abortions have been reported. Finally, the use of an experimental sheep model has other advantages such as short gestation and a lower cost when compared to the bovine model.

The results obtained regarding the specific immune response induced by the proteins studied (levels of specific anti-NcGRA7, NcSAG4, NcSRS9 and NcBSR4 correlated with virulence parameters) along with some promising results regarding the efficacy of some vaccine formulations tested in a murine model of ExTT, lead us to think that an improvement in the efficacy of these vaccines could be achieved following new approaches: i) employment of other adjuvant systems which could enhance an effective immune response against the parasite. Although NcGRA7 seems to be a good vaccine candidate, its nanoencapsulation in PCL did not induce the protective immune response expected; ii) development of a suitable experimental model in which a EnTT could be induced in order to test the efficacy of bradyzoite- stage

specific antigens. The EnTT rates induced in this Thesis were not high enough for the use of this murine model of reactivation in future vaccine trials; iii) identification of new antigens involved in virulence.

**Bibliografía**

**References**



- Aguado-Martínez, A., Álvarez-García, G., Arnaiz-Seco, I., Innes, E., Ortega-Mora, L.M., 2005. Use of avidity enzyme-linked immunosorbent assay and avidity Western blot to discriminate between acute and chronic *Neospora caninum* infection in cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17 (5), 442-450.
- Aguado-Martínez, A., Irache, J.M., Agüeros, M., Gamazo, C., Fernández-García, A., Álvarez-García, G., Ortega-Mora, L.M., 2006. Development and characterization of Gantrez®-nanoparticles associated with a *Neospora caninum* recombinant protein. VII Spanish-Portuguese Conference on Controlled Drug Delivery, Pamplona.
- Aguado-Martínez, A., Álvarez-García, G., Fernández-García, A., Risco-Castillo, V., Arnaiz-Seco, I., Rebordosa-Trigueros, X., Navarro-Lozano, V., Ortega-Mora, L.M., 2008. Usefulness of rNcGRA7- and rNcSAG4-based ELISA tests for distinguishing primo-infection, recrudescence, and chronic bovine neosporosis. *Vet. Parasitol.* 157, 182-195.
- Aguado-Martínez, A., Álvarez-García, G., Fernández-García, A., Risco-Castillo, V., Marugán-Hernández, V., Ortega-Mora, L.M., 2009a. Failure of a vaccine using immunogenic recombinant proteins rNcSAG4 and rNcGRA7 against neosporosis in mice. *Vaccine* 27 (52), 7331-7338.
- Aguado-Martínez, A., Ortega-Mora, L.M., Álvarez-García, G., Rodríguez-Marco, S., Risco-Castillo, V., Marugán-Hernández, V., Fernández-García, A., 2009b. Stage-specific expression of NcSAG4 as a marker of chronic *Neospora caninum* infection in a mouse model. *Parasitology* 136 (7), 757-764.
- Aguado-Martínez, A., Álvarez-García, G., Schares, G., Risco-Castillo, V., Fernández-García, A., Marugán-Hernández, V., Ortega-Mora, L.M., 2010. Characterisation of NcGRA7 and NcSAG4 proteins: Immunolocalisation and their role in the host cell invasion by *Neospora caninum* tachyzoites. *Acta Parasitol.* 55 (4), 304-312.
- Alaeddine, F., Hemphill, A., 2004. Vaccination of mice against experimental *Neospora caninum* infection using NcMIC1-recombinant antigen and DNA-vaccination. *Int. J. Med. Microbiol.* 293, 80-80.
- 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. *J. Parasitol.* 91 (3), 657-665.
- Al-Qassab, S., Reichel, M.P., Ivens, A., Ellis, J.T., 2009. Genetic diversity amongst isolates of *Neospora caninum*, and the development of a multiplex assay for the detection of distinct strains. *Mol. Cell. Probes* 23 (3-4), 132-139.
- Al-Qassab, S., Reichel, M.P., Ellis, J., 2010. A second generation multiplex PCR for typing strains of *Neospora caninum* using six DNA targets. *Mol. Cell. Probes* 24 (1), 20-26.

- Álvarez-García, G., Pereira-Bueno, J., Gómez-Bautista, M., Ortega-Mora, L.M., 2002. Pattern of recognition of *Neospora caninum* tachyzoite antigens by naturally infected pregnant cattle and aborted fetuses. *Vet. Parasitol.* 107 (1-2), 15-27.
- Álvarez-García, G., Collantes-Fernández, E., Costas, E., Rebordosa, X., Ortega-Mora, L.M., 2003. Influence of age and purpose for testing on the cut-off selection of serological methods in bovine neosporosis. *Vet. Res.* 34 (3), 341-352.
- Álvarez-García, G., López-Pérez, I., Innes, E., Collantes-Fernández, E., Fernández-García, A., Gómez-Bautista, M., Ortega-Mora, L.M., 2006. Use of an immunodominant P17 antigenic fraction of *Neospora caninum* in detection of antibody response in cattle. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101 (5), 529-534.
- Álvarez-García, G., Pitarch, A., Zaballos, A., Fernández-García, A., Gil, C., Gómez-Bautista, M., Aguado-Martínez, A., Ortega-Mora, L.M., 2007. The NcGRA7 gene encodes the immunodominant 17 kDa antigen of *Neospora caninum*. *Parasitology* 134 (Pt 1), 41-50.
- Andrianarivo, A.G., Choromanski, L., McDonough, S.P., Packham, A.E., Conrad, P.A., 1999. Immunogenicity of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite preparation formulated with different adjuvants. *Int. J. Parasitol.* 29 (10), 1613-1625.
- Andrianarivo, A.G., Rowe, J.D., Barr, B.C., Anderson, M.L., Packham, A.E., Sverlow, K.W., Choromanski, L., Loui, C., Grace, A., Conrad, P.A., 2000. A POLYGEN-adjuvanted killed *Neospora caninum* tachyzoite preparation failed to prevent foetal infection in pregnant cattle following i.v./i.m. experimental tachyzoite challenge. *Int. J. Parasitol.* 30 (9), 985-990.
- Andrianarivo, A.G., Barr, B.C., Anderson, M.L., Rowe, J.D., Packham, A.E., Sverlow, K.W., Conrad, P.A., 2001. Immune responses in pregnant cattle and bovine fetuses following experimental infection with *Neospora caninum*. *Parasitol. Res.* 87 (10), 817-825.
- Appleby, P., Catty, D., 1983. Transmission of immunoglobulin to foetal and neonatal mice. *J. Reprod. Immunol.* 5 (4), 203-213.
- Arranz-Solís, D., Collantes-Fernández, E., Aguado-Martínez, A., Esparza, I., Agüeros, M., Irache, J.M., Ortega-Mora, L.M., 2012. Development of *Neospora caninum* inactivated vaccines based on nano/microparticles. *Apicowplexa. Apicomplexan in farm animals congress*, Lisbon.
- Arrizabalaga, G., Boothroyd, J.C., 2004. Role of calcium during *Toxoplasma gondii* invasion and egress. *Int. J. Parasitol.* 34 (3), 361-368.
- Asai, T., Howe, D.K., Nakajima, K., Nozaki, T., Takeuchi, T., Sibley, L.D., 1998. *Neospora caninum*: tachyzoites express a potent type-I nucleoside triphosphate hydrolase. *Exp. Parasitol.* 90 (3), 277-285.
- Atkinson, R., Harper, P.A., Ryce, C., Morrison, D.A., Ellis, J.T., 1999. Comparison of the biological characteristics of two isolates of *Neospora caninum*. *Parasitology* 118 (Pt 4), 363-370.

- Atkinson, R.A., Ryce, C., Miller, C.M., Balu, S., Harper, P.A., Ellis, J.T., 2001. Isolation of *Neospora caninum* genes detected during a chronic murine infection. *Int. J. Parasitol.* 31 (1), 67-71.
- Aucouturier, J., Dupuis, L., Ganne, V., 2001. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine* 19 (17-19), 2666-2672.
- Babiuk, L.A., 2002. Vaccination: A management tool in veterinary medicine. *Vet. J.* 164 (3), 188-201.
- Bahnemann, H.G., 1975. Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth-disease virus and its application for vaccine production. *Arch. Virol.* 47(1):47-56.
- Baillargeon, P., Fecteau, G., Pare, J., Lamothe, P., Sauve, R., 2001. Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the International Embryo Transfer Society as a method of controlling vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 218 (11), 1803-1806.
- Barber, J., Trees, A.J., Owen, M., Tennant, B., 1993. Isolation of *Neospora caninum* from a British dog. *Vet. Rec.* 133 (21), 531-532.
- Barber, J.S., Holmdahl, O.J., Owen, M.R., Guy, F., Uggla, A., Trees, A.J., 1995. Characterization of the first European isolate of *Neospora caninum* (Dubey, Carpenter, Speer, Topper and Uggla). *Parasitology* 111 (Pt 5), 563-568.
- Barber, J.S., Payne-Johnson, C.E., Trees, A.J., 1996. Distribution of *Neospora caninum* within the central nervous system and other tissues of six dogs with clinical neosporosis. *J. Small Anim. Pract.* 37 (12), 568-574.
- Barr, B.C., Conrad, P.A., Dubey, J.P., Anderson, M.L., 1991. *Neospora*-like encephalomyelitis in a calf: pathology, ultrastructure, and immunoreactivity. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3 (1), 39-46.
- Barr, B.C., Conrad, P.A., Breitmeyer, R., Sverlow, K., Anderson, M.L., Reynolds, J., Chauvet, A.E., Dubey, J.P., Ardans, A.A., 1993. Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora*-infected fetuses: four cases (1990-1992). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 202 (1), 113-117.
- Barr, B.C., Rowe, J.D., Sverlow, K.W., BonDurant, R.H., Ardans, A.A., Oliver, M.N., Conrad, P.A., 1994. Experimental reproduction of bovine fetal *Neospora* infection and death with a bovine *Neospora* isolate. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6 (2), 207-215.
- Bartels, C.J., Arnaiz-Seco, J.I., Ruiz-Santa-Quitera, A., Björkman, C., Frossling, J., von, B.D., Conraths, F.J., Schares, G., van, M.C., Wouda, W., Ortega-Mora, L.M., 2006a. Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, The Netherlands, Spain and Sweden. *Vet. Parasitol.* 137 (1-2), 17-27.

- Bartels, C.J., van, S.G., Veldhuisen, J.P., van, d.B., Wouda, W., Dijkstra, T., 2006b. Effect of *Neospora caninum*-serostatus on culling, reproductive performance and milk production in Dutch dairy herds with and without a history of *Neospora caninum*-associated abortion epidemics. *Prev. Vet. Med.* 77 (3-4), 186-198.
- Bartels, C.J., Huinink, I., Beiboer, M.L., van, S.G., Wouda, W., Dijkstra, T., Stegeman, A., 2007. Quantification of vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* infection in Dutch dairy herds. *Vet. Parasitol.* 148 (2), 83-92.
- Bartley, P.M., Wright, S., Sales, J., Chianini, F., Buxton, D., Innes, E.A., 2006. Long-term passage of tachyzoites in tissue culture can attenuate virulence of *Neospora caninum* *in vivo*. *Parasitology* 133, 421-432.
- Bartley, P.M., Wright, S., Chianini, F., Buxton, D., Innes, E.A., 2008. Inoculation of BALB/c mice with live attenuated tachyzoites protects against a lethal challenge of *Neospora caninum*. *Parasitology* 135 (Pt 1), 13-21.
- Basso, W., Schares, S., Barwald, A., Herrmann, D.C., Conraths, F.J., Pantchev, N., Vrhovec, M.G., 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. *Vet. Parasitol.* 160 (1-2), 43-50.
- Baszler, T.V., Long, M.T., McElwain, T.F., Mathison, B.A., 1999. Interferon-gamma and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. *Int. J. Parasitol.* 29 (10), 1635-1646.
- Baszler, T.V., McElwain, T.F., Mathison, B.A., 2000. Immunization of BALB/c mice with killed *Neospora caninum* tachyzoite antigen induces a type 2 immune response and exacerbates encephalitis and neurological disease. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7 (1071-412; 6), 893-898.
- Baszler, T.V., Shkap, V., Mwangi, W., Davies, C.J., Mathison, B.A., Mazuz, M., Resnikov, D., Fish, L., Leibovitch, B., Staska, L.M., 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, H.P., Blake, D., Darde, M.L., Felger, I., Pedraza-Diaz, S., Regidor-Cerrillo, J., Gomez-Bautista, M., Ortega-Mora, L.M., Putignani, L., Shiels, B., Tait, A., Weir, W., 2009. Molecular approaches to diversity of populations of apicomplexan parasites. *Int. J. Parasitol.* 39 (2), 175-189.
- Benavides, J., Katzer, F., Maley, S.W., Bartley, P.M., Canton, G., Palarea-Albaladejo, J., Purslow, C.A., Pang, Y., Rocchi, M.S., Chianini, F., Buxton, D., Innes, E.A., 2012. High rate of transplacental infection and transmission of *Neospora caninum* following experimental challenge of cattle at day 210 of gestation. *Vet. Res.* 43 (1), 83.

- Besteiro, S., Michelin, A., Poncet, J., Dubremetz, J.F., Lebrun, M., 2009. Export of a *Toxoplasma gondii* rhoptry neck protein complex at the host cell membrane to form the moving junction during invasion. PLoS Pathog. 5 (2), e1000309.
- Bhattacharya, S.K., Sinha, P.K., Sundar, S., Thakur, C.P., Jha, T.K., Pandey, K., Das, V.R., Kumar, N., Lal, C., Verma, N., Singh, V.P., Ranjan, A., Verma, R.B., Anders, G., Sindermann, H., Ganguly, N.K., 2007. Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. J. Infect. Dis. 196 (4), 591-598.
- Birrenbach, G., Speiser, P.P., 1976. Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology. J. Pharm. Sci. 65 (12), 1763-1766.
- Bjerkås, I., Mohn, S.F., Presthus, J., 1984. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. Z. Parasitenkd. 70 (2), 271-274.
- Bjerkås, I., Presthus, J., 1989. The neuropathology in toxoplasmosis-like infection caused by a newly recognized cyst-forming sporozoon in dogs. APMIS 97 (5), 459-468.
- Björkman, C., Holmdahl, O.J., Ugglå, A., 1997. An indirect enzyme-linked immunoassay (ELISA) for demonstration of antibodies to *Neospora caninum* in serum and milk of cattle. Vet. Parasitol. 68 (3), 251-260.
- Björkman, C., Ugglå, A., 1999. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. Int. J. Parasitol. 29 (10), 1497-1507.
- Björkman, C., Álvarez-García, G., Conraths, F.J., Mattsson, J.G., Ortega-Mora, L.M., Sager, H., Schares, G., 2006. *Neospora caninum* IgG avidity tests: an interlaboratory comparison. Vet. Parasitol. 140 (3-4), 273-280.
- Black, M.W., Arrizabalaga, G., Boothroyd, J.C., 2000. Ionophore-resistant mutants of *Toxoplasma gondii* reveal host cell permeabilization as an early event in egress. Mol. Cell. Biol. 20 (24), 9399-9408.
- Black, M.W., Boothroyd, J.C., 2000. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64 (3), 607-623.
- Bland, J.M., Altman, D.G., 2004. The logrank test. BMJ 328 (7447), 1073.
- Botelho, A.S., Teixeira, L., Correia-da-Costa, J.M., Faustino, A.M., Castro, A.G., Vilanova, M., 2007. *Neospora caninum*: high susceptibility to the parasite in C57BL/10ScCr mice. Exp. Parasitol. 115 (1), 68-75.
- Boysen, P., Klevar, S., Olsen, I., Storset, A.K., 2006. The protozoan *Neospora caninum* directly triggers bovine NK cells to produce gamma interferon and to kill infected fibroblasts. Infect. Immun. 74 (2), 953-960.

- Buxton, D., Thomson, K., Maley, S., Wright, S., Bos, H.J., 1991. Vaccination of sheep with a live incomplete strain (s48) of *Toxoplasma gondii* and their immunity to challenge when pregnant. *Vet. Rec.* 129 (5), 89-93.
- Buxton, D., Maley, S.W., Thomson, K.M., Trees, A.J., Innes, E.A., 1997. Experimental infection of non-pregnant and pregnant sheep with *Neospora caninum*. *J. Comp. Pathol.* 117 (1), 1-16.
- Buxton, D., Maley, S.W., Wright, S., Thomson, K.M., Rae, A.G., Innes, E.A., 1998. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. *J. Comp. Pathol.* 118 (4), 267-279.
- Buxton, D., McAllister, M.M., Dubey, J.P., 2002. The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends Parasitol.* 18 (12), 546-552.
- Campero, C.M., Moore, D.P., Lagomarsino, H., Odeon, A.C., Castro, M., Visca, H., 2003. Serological status and abortion rate in progeny obtained by natural service or embryo transfer from *Neospora caninum*-seropositive cows. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 50 (9), 458-460.
- Campero, C.M., Ortega-Mora, L.M., 2011. Workshop: protozoal reproductive diseases in cattle: new perspectives for control. 23rd International conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP), Buenos Aires. Argentina.
- 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. *J. Parasitol.* 89 (1), 44-50.
- Cardoso, M.R., Mota, C.M., Ribeiro, D.P., Noieto, P.G., Andrade, W.B., Souza, M.A., Silva, N.M., Mineo, T.W., Mineo, J.R., Silva, D.A., 2012. Adjuvant and immunostimulatory effects of a D-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum latex* (ScLL) in the mouse model of vaccination against neosporosis. *Vet. Res.* 43 (1), 76.
- Carruthers, V.B., Sibley, L.D., 1997. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur. J. Cell Biol.* 73 (2), 114-123.
- Caspe, S.G., Moore, D.P., Leunda, M.R., Cano, D.B., Lischinsky, L., Regidor-Cerrillo, J., Álvarez-García, G., Echaide, I.G., Bacigalupe, D., Ortega-Mora, L.M., Odeon, A.C., Campero, C.M., 2012. The *Neospora caninum*-Spain 7 isolate induces placental damage, fetal death and abortion in cattle when inoculated in early gestation. *Vet. Parasitol.* 189 (2-4), 171-181.
- Charmandari, E., Tsigos, C., Chrousos, G., 2005. Endocrinology of the stress response. *Annu. Rev. Physiol.* 67, 259-84

- Chew, W.K., Wah, M.J., Ambu, S., Segarra, I., 2012. *Toxoplasma gondii*: determination of the onset of chronic infection in mice and the *in vitro* reactivation of brain cysts. *Exp. Parasitol.* 130 (1), 22-25.
- Cho, J.H., Chung, W.S., Song, K.J., Na, B.K., Kang, S.W., Song, C.Y., Kim, T.S., 2005. Protective efficacy of vaccination with *Neospora caninum* multiple recombinant antigens against experimental *Neospora caninum* infection. *Korean J. Parasitol.* 43 (1), 19-25.
- Cho, M.H., Na, B.K., Song, K.J., Cho, J.H., Kang, S.W., Lee, K.H., Song, C.Y., Kim, T.S., 2004. Cloning, expression, and characterization of iron-containing superoxide dismutase from *Neospora caninum*. *J. Parasitol.* 90 (2), 278-285.
- Chrousos, G.P. 1995, The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med.* 332 (20), 1351-1362.
- Coceres, V.M., Alonso, A.M., Alomar, M.L., Corvi, M.M., 2012. Rabbit antibodies against *Toxoplasma* Hsp20 are able to reduce parasite invasion and gliding motility in *Toxoplasma gondii* and parasite invasion in *Neospora caninum*. *Exp. Parasitol.* 132 (2), 274-281.
- Cohen, A.M., Rumpel, K., Coombs, G.H., Wastling, J.M., 2002. Characterisation of global protein expression by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry: proteomics of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 32 (1), 39-51.
- Cole, R.A., Lindsay, D.S., Blagburn, B.L., Dubey, J.P., 1995. Vertical transmission of *Neospora caninum* in mice. *J. Parasitol.* 81 (5), 730-732.
- Collantes-Fernández, E., Álvarez-García, G., Pérez-Pérez, V., Pereira-Bueno, J., Ortega-Mora, L.M., 2004. Characterization of pathology and parasite load in outbred and inbred mouse models of chronic *Neospora caninum* infection. *J. Parasitol.* 90 (3), 579-583.
- Collantes-Fernández, E., Arnaiz-Seco, I., Burgos, B.M., Rodríguez-Bertos, A., Aduriz, G., Fernández-García, A., Ortega-Mora, L.M., 2006a. Comparison of *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions between epidemic and endemic bovine abortion cases. *Vet. Parasitol.* 142 (1-2), 187-191.
- Collantes-Fernández, E., López-Pérez, I., Álvarez-García, G., Ortega-Mora, L.M., 2006b. Temporal distribution and parasite load kinetics in blood and tissues during *Neospora caninum* infection in mice. *Infect. Immun.* 74 (4), 2491-2494.
- Collantes-Fernández, E., Rodríguez-Bertos, A., Arnaiz-Seco, I., Moreno, B., Aduriz, G., Ortega-Mora, L.M., 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., Gómez-Bautista, M., Miró, G., Álvarez-García, G., Pereira-Bueno, J., Frisuelos, C., Ortega-Mora, L.M., 2008. Seroprevalence and risk factors associated with

- Neospora caninum* infection in different dog populations in Spain. *Vet. Parasitol.* 152 (1-2), 148-151.
- Collantes-Fernández, E., Arrighi, R.B., Álvarez-García, G., Weidner, J.M., Regidor-Cerrillo, J., Boothroyd, J.C., Ortega-Mora, L.M., 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, P.A., Sverlow, K., Anderson, M., Rowe, J., BonDurant, R., Tuter, G., Breitmeyer, R., Palmer, C., Thurmond, M., Ardans, A., 1993. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5 (4), 572-578.
- Croft, S.L., Snowdon, D., Yardley, V., 1996. The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *J. Antimicrob. Chemother.* 38 (6), 1041-1047.
- Daly, T.M., Long, C.A., 1996. Influence of adjuvants on protection induced by a recombinant fusion protein against malarial infection. *Infect. Immun.* 64 (7), 2602-2608.
- Darwich, L., Cabezón, O., Echeverría, I., Pabón, M., Marco, I., Molina-López, R., Alarcia-Alejos, O., López-Gatius, F., Lavin, S., Almería, S., 2012. Presence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* DNA in the brain of wild birds. *Vet. Parasitol.* 183 (3-4), 377-381.
- Davison, H.C., Guy, C.S., McGarry, J.W., Guy, F., Williams, D.J., Kelly, D.F., Trees, A.J., 2001. Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. *Res. Vet. Sci.* 70 (2), 163-168.
- De Marez, T., Liddell, S., Dubey, J.P., Jenkins, M.C., Gasbarre, L., 1999. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. *Int. J. Parasitol.* 29 (10), 1647-1657.
- 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. *Int. J. Parasitol.* 38 (12), 1455-1463.
- Debache, K., Alaeddine, F., Guionaud, C., Monney, T., Müller, J., Strohmusch, M., Leib, S.L., 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. *Int. J. Parasitol.* 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, C.E., Hemphill, A., 2011a. Experimental treatment of *Neospora caninum*-infected mice with the arylimidamide DB750 and the thiazolide nitazoxanide. *Exp. Parasitol.* 129 (2), 95-100.
- Debache, K., Kropf, C., Schutz, C.A., Harwood, L.J., Kauper, P., Monney, T., Rossi, N., Laue, C., McCullough, K.C., Hemphill, A., 2011b. Vaccination of mice with chitosan nanogel-associated recombinant NcPDI against challenge infection with *Neospora caninum* tachyzoites. *Parasite Immunol.* 33 (2), 81-94.
- Debache, K., Hemphill, A., 2012a. Intra-cisternal vaccination induces high-level protection against *Neospora caninum* infection in mice. *Vaccine* 30 (28), 4209-4215.
- Debache, K., Hemphill, A., 2012b. 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., 2013. Differential effects of intranasal vaccination with recombinant NcPDI in different mouse models of *Neospora caninum* infection. *Parasite Immunol.* 35, 11–20
- Degen, W.G.J., Jansen, T., Schijns, V.E.J.C., 2003. Vaccine adjuvant technology: from mechanistic concepts to practical applications. *Expert Rev. Vaccines* 2 (2), 327-335.
- Dijkstra, T., Barkema, H.W., Eysker, M., Wouda, W., 2001. Evidence of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. *Int. J. Parasitol.* 31 (2), 209-215.
- Dijkstra, T., Barkema, H.W., Eysker, M., Hesselink, J.W., Wouda, W., 2002a. Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle. *Vet. Parasitol.* 105 (2), 99-104.
- Dijkstra, T., Barkema, H.W., Hesselink, J.W., Wouda, W., 2002b. Point source exposure of cattle to *Neospora caninum* consistent with periods of common housing and feeding and related to the introduction of a dog. *Vet. Parasitol.* 105 (2), 89-98.
- Dubey, J.P., Carpenter, J.L., Speer, C.A., Topper, M.J., Uggla, A., 1988a. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 192 (9), 1269-1285.
- Dubey, J.P., Hattel, A.L., Lindsay, D.S., Topper, M.J., 1988b. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 193 (10), 1259-1263.
- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., 1993. Neosporosis. *Parasitol. Today* 9 (12), 452-457.
- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet. Parasitol.* 67 (1-2), 1-59.
- Dubey, J.P., Abbitt, B., Topper, M.J., Edwards, J.F., 1998a. Hydrocephalus associated with *Neospora caninum* infection in an aborted bovine fetus. *J. Comp. Pathol.* 118 (2), 169-173.

- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Speer, C.A., 1998b. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.* 11 (2), 267-299.
- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., 2000. Gerbils (*Meriones unguiculatus*) are highly susceptible to oral infection with *Neospora caninum* oocysts. *Parasitol. Res.* 86 (2), 165-168.
- Dubey, J.P., Barr, B.C., Barta, J.R., Bjerkås, I., Björkman, C., Blagburn, B.L., Bowman, D.D., Buxton, D., Ellis, J.T., Gottstein, B., Hemphill, A., Hill, D.E., Howe, D.K., Jenkins, M.C., Kobayashi, Y., Koudela, B., Marsh, A.E., Mattsson, J.G., McAllister, M.M., Modry, D., Omata, Y., Sibley, L.D., Speer, C.A., Trees, A.J., Uggla, A., Upton, S.J., Williams, D.J., Lindsay, D.S., 2002. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *Int. J. Parasitol.* 32 (8), 929-946.
- Dubey, J.P., 2003. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J. Parasitol.* 41 (1), 1-16.
- Dubey, J.P., 2005. Neosporosis in cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 21 (2), 473-483.
- Dubey, J.P., Schares, G., 2006. Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet. Parasitol.* 140 (1-2), 1-34.
- Dubey, J.P., Buxton, D., Wouda, W., 2006. Pathogenesis of bovine neosporosis. *J. Comp. Pathol.* 134 (4), 267-289.
- Dubey, J.P., Schares, G., Ortega-Mora, L.M., 2007. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin. Microbiol. Rev.* 20 (2), 323-367.
- Dubey, J.P., Schares, G., 2011. Neosporosis in animals-The last five years. *Vet. Parasitol.* 180 (1-2), 90-108.
- Dubey, J.P., Jenkins, M.C., Rajendran, C., Miska, K., Ferreira, L.R., Martins, J., Kwok, O.C., Choudhary, S., 2011. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 181 (2-4), 382-387.
- Dubremetz, J.F., Achbarou, A., Bermudes, D., Joiner, K.A., 1993. Kinetics and pattern of organelle exocytosis during *Toxoplasma gondii*/host-cell interaction. *Parasitol. Res.* 79 (5), 402-408.
- Dunn, J.D., Ravindran, S., Kim, S.K., Boothroyd, J.C., 2008. The *Toxoplasma gondii* dense granule protein GRA7 is phosphorylated upon invasion and forms an unexpected association with the rhoptry proteins ROP2 and ROP4. *Infect. Immun.* 76 (12), 5853-5861.
- Eiras, C., Arnaiz, I., Álvarez-García, G., Ortega-Mora, L.M., Sanjuanl, M.L., Yus, E., Dieguez, F.J., 2011. *Neospora caninum* seroprevalence in dairy and beef cattle from the northwest region of Spain, Galicia. *Prev. Vet. Med.* 98 (2-3), 128-132.
- Eissa, M.M., Amer, E.I., 2012. *Giardia lamblia*: a new target for miltefosine. *Int. J. Parasitol.* 42 (5), 443-452.

- Ellis, J.T., Luton, K., Baverstock, P.R., Brindley, P.J., Nimmo, K.A., Johnson, A.M., 1994. The phylogeny of *Neospora caninum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 64 (2), 303-311.
- Ellis, J.T., Ryce, C., Atkinson, R., Balu, S., Jones, P., Harper, P.A., 2000. Isolation, characterization and expression of a GRA2 homologue from *Neospora caninum*. *Parasitology* 120 (Pt 4), 383-390.
- Ellis, J.T., Miller, C., Quinn, H., Ryce, C., Reichel, M.P., 2008. Evaluation of recombinant proteins of *Neospora caninum* as vaccine candidates (in a mouse model). *Vaccine* 26 (47), 5989-5996.
- Entrican, G., 2002. Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. *J. Comp. Pathol.* 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 Immunol.* 21 (5), 225-236.
- Esposito, M., Stettler, R., Moores, S.L., Pidathala, C., Müller, N., Stachulski, A., Berry, N.G., Rossignol, J.F., Hemphill, A., 2005. *In vitro* efficacies of nitazoxanide and other thiazolides against *Neospora caninum* tachyzoites reveal antiparasitic activity independent of the nitro group. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49 (9), 3715-3723.
- Estevan, M., Irache, J.M., Grillo, M.J., Blasco, J.M., Gamazo, C., 2006. Encapsulation of antigenic extracts of *Salmonella enterica* serovar. Abortusovis into polymeric systems and efficacy as vaccines in mice. *Vet. Microbiol.* 118 (1-2), 124-132.
- Ferguson, D.J., Hutchison, W.M., Pettersen, E., 1989. Tissue cyst rupture in mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*. An immunocytochemical and ultrastructural study. *Parasitol. Res.* 75 (8), 599-603.
- Fernández-García, A., Risco-Castillo, V., Zaballo, A., Álvarez-García, G., Ortega-Mora, L.M., 2006. Identification and molecular cloning of the *Neospora caninum* SAG4 gene specifically expressed at bradyzoite stage. *Mol. Biochem. Parasitol.* 146 (1), 89-97.
- Ferre, I., Serrano-Martínez, E., Martínez, A., Osoro, K., Mateos-Sanz, A., Del-Pozo, I., Adúriz, G., Tamargo, C., Hidalgo, C.O., Ortega-Mora, L.M., 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.
- Florindo, H.F., Pandit, S., Lacerda, L., Goncalves, L.M., Alpar, H.O., Almeida, A.J., 2009. The enhancement of the immune response against *Streptococcus equi* antigens through the intranasal administration of poly-epsilon-caprolactone-based nanoparticles. *Biomaterials* 30 (5), 879-891.
- Francis, D.M., Page, R., 2010. Strategies to optimize protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Protoc. Protein Sci.* Chapter 5, Unit 5.24.1-29.

- French, N.P., Clancy, D., Davison, H.C., Trees, A.J., 1999. Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle: transmission and options for control. *Int. J. Parasitol.* 29 (10), 1691-1704.
- Frenkel, J.K., Escajadillo, A., 1987. Cyst rupture as a pathogenic mechanism of toxoplasmic encephalitis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36 (3), 517-522.
- Frossling, J., Nodtvedt, A., Lindberg, A., Björkman, C., 2008. Spatial analysis of *Neospora caninum* distribution in dairy cattle from Sweden. *Geospat. Health* 3 (1), 39-45.
- Gibney, E.H., Kipar, A., Rosbottom, A., Guy, C.S., Smith, R.F., Hetzel, U., Trees, A.J., Williams, D.J., 2008. The extent of parasite-associated necrosis in the placenta and foetal tissues of cattle following *Neospora caninum* infection in early and late gestation correlates with foetal death. *Int. J. Parasitol.* 38 (5), 579-588.
- Gondim, L.F., Saeki, H., Onaga, H., Haritani, M., Yamane, I., 1999. Maintenance of *Neospora caninum* tachyzoites using Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *N. Z. Vet. J.* 47, 36.
- Gondim, L.F., Pinheiro, A.M., Santos, P.O., Jesus, E.E., Ribeiro, M.B., Fernandes, H.S., Almeida, M.A., Freire, S.M., Meyer, R., McAllister, M.M., 2001. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. *Vet. Parasitol.* 101 (1), 1-7.
- Gondim, L.F., Laski, P., Gao, L., McAllister, M.M., 2004a. Variation of the internal transcribed spacer 1 sequence within individual strains and among different strains of *Neospora caninum*. *J. Parasitol.* 90 (1), 119-122.
- Gondim, L.F., McAllister, M.M., Mateus-Pinilla, N.E., Pitt, W.C., Mech, L.D., Nelson, M.E., 2004b. Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. *J. Parasitol.* 90 (6), 1361-1365.
- Gondim, L.F., McAllister, M.M., Pitt, W.C., Zemlicka, D.E., 2004c. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 34 (2), 159-161.
- Goodswen, S., Kennedy, P., Ellis, J.T., 2013. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present. *Infect. Genet. Evol.* 3, 133-150.
- Gottstein, B., Razmi, G.R., Ammann, P., Sager, H., Müller, N., 2005. Toltrazuril treatment to control diaplacental *Neospora caninum* transmission in experimentally infected pregnant mice. *Parasitology* 130, 41-48.
- Guo, Z.G., Johnson, A.M., 1995. Genetic comparison of *Neospora caninum* with *Toxoplasma* and *Sarcocystis* by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. *Parasitol. Res.* 81 (5), 365-370.

- Guionaud, C., Hemphill, A., Mevissen, M., Alaeddine, F., 2010. Molecular characterization of *Neospora caninum* MAG1, a dense granule protein secreted into the parasitophorous vacuole, and associated with the cyst wall and the cyst matrix. *Parasitology* 137 (11), 1605-1619.
- Guy, C.S., Williams, D.J.L., Kelly, D.F., McGarry, J.W., Guy, F., Björkman, C., Smith, R.F., Trees, A.J., 2001. *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows: spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody. *Vet. Rec.* 149 (15), 443-449.
- Habib, K.E., Gold, P.W., Chrousos, G.P., 2001. Neuroendocrinology of stress. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 30 (3), 695-728
- Haldorson, G.J., Mathison, B.A., Wenberg, K., Conrad, P.A., Dubey, J.P., Trees, A.J., Yamane, I., Baszler, T.V., 2005. Immunization with native surface protein NcSRS2 induces a Th2 immune response and reduces congenital *Neospora caninum* transmission in mice. *Int. J. Parasitol.* 35 (13), 1407-1415.
- Hall, C.A., Reichel, M.P., Ellis, J.T., 2005. *Neospora* abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. *Vet. Parasitol.* 128 (3-4), 231-241.
- Harper, J.M., Zhou, X.W., Pszeny, V., Kafsack, B.F.C., Carruthers, V.B., 2004. The novel coccidian micronemal protein MIC11 undergoes proteolytic maturation by sequential cleavage to remove an internal propeptide. *Int. J. Parasitol.* 34 (9), 1047-1058.
- Hasler, B., Stark, K.D., Sager, H., Gottstein, B., Reist, M., 2006. Simulating the impact of four control strategies on the population dynamics of *Neospora caninum* infection in Swiss dairy cattle. *Prev. Vet. Med.* 77 (3-4), 254-283.
- Hasler, B., Stark, K., Gottstein, B., Reist, M., 2008. [Epidemiological and financial considerations for the control of *Neospora caninum* on Swiss dairy farms]. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 150 (6), 273-280.
- Heldens, J.G.M., Patel, J.R., Chanter, N., ten Thij, G.J., Gravendijck, M., Schijns, V.E.J.C., Langen, A., Schetters, T.P.M., 2008. Veterinary vaccine development from an industrial perspective. *Vet. J.* 178 (1), 7-20.
- Hemphill, A., Felleisen, R., Connolly, B., Gottstein, B., Hentrich, B., Müller, N., 1997. Characterization of a cDNA-clone encoding Nc-p43, a major *Neospora caninum* tachyzoite surface protein. *Parasitology* 115 (Pt 6), 581-590.
- Hemphill, A., Gajendran, N., Sonda, S., Fuchs, N., Gottstein, B., Hentrich, B., Jenkins, M., 1998. Identification and characterisation of a dense granule-associated protein in *Neospora caninum* tachyzoites. *Int. J. Parasitol.* 28 (3), 429-438.
- Hemphill, A., 1999. The host-parasite relationship in neosporosis. *Adv. Parasitol.* 43 (0065-308), 47-104.

- Hemphill, A., Fuchs, N., Sonda, S., Hehl, A., 1999. The antigenic composition of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 29 (8), 1175-1188.
- Hemphill, A., Vonlaufen, N., Naguleswaran, A., 2006. Cellular and immunological basis of the host-parasite relationship during infection with *Neospora caninum*. *Parasitology* 133, 261-278.
- Hernández, J., Risco, C., Donovan, A., 2001. Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 219 (5), 632-635.
- Hiasa, J., Kohara, J., Nishimura, M., Xuan, X., Tokimitsu, H., Nishikawa, Y., 2012. ELISAs based on rNcGRA7 and rNcSAG1 antigens as an indicator of *Neospora caninum* activation. *Vet. Parasitol.* 187 (3-4), 379-385.
- Hill, R.D., Gouffon, J.S., Saxton, A.M., Su, C., 2012. Differential gene expression in mice infected with distinct *Toxoplasma* strains. *Infect. Immun.* 80 (3), 968-974.
- Hoane, J.S., Yeargan, M.R., Stamper, S., Saville, W.J., Morrow, J.K., Lindsay, D.S., Howe, D.K., 2005. Recombinant NhSAG1 ELISA: a sensitive and specific assay for detecting antibodies against *Neospora hughesi* in equine serum. *J. Parasitol.* 91 (2), 446-452.
- Hobson, J.C., Duffield, T.F., Kelton, D., Lissemore, K., Hietala, S.K., Leslie, K.E., McEwen, B., Cramer, G., Peregrine, A.S., 2002. *Neospora caninum* serostatus and milk production of Holstein cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 221 (8), 1160-1164.
- Holmdahl, O.J., Mattsson, J.G., 1996. Rapid and sensitive identification of *Neospora caninum* by *in vitro* amplification of the internal transcribed spacer 1. *Parasitology* 112 (Pt 2), 177-182.
- Homan, W.L., Limper, L., Verlaan, M., Borst, A., Vercammen, M., van Knapen, F., 1997. Comparison of the internal transcribed spacer, ITS 1, from *Toxoplasma gondii* isolates and *Neospora caninum*. *Parasitol. Res.* 83 (3), 285-289.
- Huang, C.C., Yang, C.H., Watanabe, Y., Liao, Y.K., Ooi, H.K., 2004. Finding of *Neospora caninum* in the wild brown rat (*Rattus norvegicus*). *Vet. Res.* 35 (3), 283-290.
- Hughes, J.M., Williams, R.H., Morley, E.K., Cook, D.A., Terry, R.S., Murphy, R.G., Smith, J.E., Hide, G., 2006. The prevalence of *Neospora caninum* and co-infection with *Toxoplasma gondii* by PCR analysis in naturally occurring mammal populations. *Parasitology* 132, 29-36.
- Hurková-Hofmannová, L., Vaclavek, P., Skoric, M., Fictum, P., Modry, D., 2007. Multimammate rat (*Mastomys natalensis*), Tristram's jird (*Meriones tristrami*) and Wagner's gerbil (*Gerbillus dasyurus*) as laboratory models of acute neosporosis. *Res. Vet. Sci.* 82 (3), 377-381.
- Innes, E.A., Panton, W.R., Marks, J., Trees, A.J., Holmdahl, J., Buxton, D., 1995. Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum*, as shown by incorporation of 3H uracil. *J. Comp. Pathol.* 113 (1), 95-100.

- Innes, E.A., 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. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 916, 93-101.
- Innes, E.A., Wright, S.E., Maley, S., Rae, A., Schock, A., Kirvar, E., Bartley, P., Hamilton, C., Carey, I.M., Buxton, D., 2001. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *Int. J. Parasitol.* 31 (13), 1523-1534.
- Innes, E.A., Andrianarivo, A.G., Björkman, C., Williams, D.J., Conrad, P.A., 2002. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends Parasitol.* 18 (11), 497-504.
- Innes, E.A., Wright, S., Bartley, P., Maley, S., Macaldowie, C., Esteban-Redondo, I., Buxton, D., 2005. The host-parasite relationship in bovine neosporosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 108 (1-2), 29-36.
- Innes, E.A., Vermeulen, A.N., 2006. Vaccination as a control strategy against the coccidial parasites *Eimeria*, *Toxoplasma* and *Neospora*. *Parasitology* 133 Suppl, S145-S168.
- Innes, E.A., Mattsson, J.G., 2007. *Neospora caninum* emerges from the shadow of *Toxoplasma gondii*. *Trends Parasitol.* 23 (2), 43-44.
- Innes, E.A., Bartley, P.M., Rocchi, M., Benavidas-Silvan, J., Burrells, A., Hotchkiss, E., Chianini, F., Canton, G., Katzer, F., 2011. Developing vaccines to control protozoan parasites in ruminants: dead or alive? *Vet. Parasitol.* 180 (1-2), 155-163.
- Irache, J.M., 2008. Nanomedicine: nanoparticles with medical applications. *An Sist. Sanit. Navar* 31 (1), 7-10.
- Irache, J.M., Esparza, I., Gamazo, C., Agüeros, M., Espuelas, S., 2011. Nanomedicine: Novel approaches in human and veterinary therapeutics. *Vet. Parasitol.* 180 (1-2), 47-71.
- Jenkins, M.C., Wouda, W., Dubey, J.P., 1997. Serological response over time to recombinant *Neospora caninum* antigens in cattle after a neosporosis-induced abortion. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 4 (1071-412; 3), 270-274.
- Jenkins, M.C., Parker, C., Tuo, W., Vinyard, B., Dubey, J.P., 2004. Inclusion of CpG adjuvant with plasmid DNA coding for NcGRA7 improves protection against congenital neosporosis. *Infect. Immun.* 72 (3), 1817-1819.
- Johansen, P., Mohanan, D., Martinez-Gomez, J.M., Kundig, T.M., Gander, B., 2010. Lympho-geographical concepts in vaccine delivery. *J. Control. Release* 148 (1), 56-62.
- Jongert, E., de Craeye, S., Dewit, J., Huygen, K., 2007. GRA7 provides protective immunity in cocktail DNA vaccines against *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* 29 (9), 445-453.

- Kang, S.W., Park, S.S., Choe, S.E., Jean, Y.H., Jung, S.C., Kim, K., Van Quyen, D., 2009. Characterization of tissue distribution and histopathological lesions in *Neospora caninum* experimentally infected gerbils. *Parasitol. Res.* 104 (6), 1261-1268.
- Kano, R., Masukata, Y., Omata, Y., Kobayashi, Y., Maeda, R., Saito, A., 2005. Relationship between type 1/type 2 immune responses and occurrence of vertical transmission in BALB/c mice infected with *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 129 (1-2), 159-164.
- Kano, R., Kudo, A., Kamiya, H., Kobayashi, Y., Maeda, R., Omata, Y., 2007. C57BL/6 Mice infected with *Neospora caninum* during administration of progesterone show bias toward type 2 immune response. *J. Vet. Med. Sci.* 69 (10), 1095-1097.
- Kasper, L.H., Khan, I.A., 1998. Antigen-specific CD8+ T cells protect against lethal toxoplasmosis in mice infected with *Neospora caninum*. *Infect. Immun.* 66 (4), 1554-1560.
- Keller, N., Naguleswaran, A., Cannas, A., Vonlaufen, N., Bienz, M., Björkman, C., Bohne, W., Hemphill, A., 2002. Identification of a *Neospora caninum* microneme protein (NcMIC1) which interacts with sulfated host cell surface glycosaminoglycans. *Infect. Immun.* 70 (6), 3187-3198.
- Keller, N., Riesen, M., Naguleswaran, A., Vonlaufen, N., Stettler, R., Leepin, A., Wastling, J.M., Hemphill, A., 2004. Identification and characterization of a *Neospora caninum* microneme-associated protein (NcMIC4) that exhibits unique lactose-binding properties. *Infect. Immun.* 72 (8), 4791-4800.
- Khan, I.A., Schwartzman, J.D., Fonseka, S., Kasper, L.H., 1997. *Neospora caninum*: role for immune cytokines in host immunity. *Exp. Parasitol.* 85 (1), 24-34.
- Kim, S.K., Boothroyd, J.C., 2005. Stage-specific expression of surface antigens by *Toxoplasma gondii* as a mechanism to facilitate parasite persistence. *J. Immunol.* 174 (12), 8038-8048.
- Kim, S.K., Karasov, A., Boothroyd, J.C., 2007. Bradyzoite-specific surface antigen SRS9 plays a role in maintaining *Toxoplasma gondii* persistence in the brain and in host control of parasite replication in the intestine. *Infect. Immun.* 75 (4), 1626-1634.
- King, J.S., Slapeta, J., Jenkins, D.J., Al-Qassab, S.E., Ellis, J.T., Windsor, P.A., 2010. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 40 (8), 945-950
- Klevar, S., Kulberg, S., Boysen, P., Storset, A.K., Moldal, T., Björkman, C., Olsen, I., 2007. Natural killer cells act as early responders in an experimental infection with *Neospora caninum* in calves. *Int. J. Parasitol.* 37 (3-4), 329-339.
- Kobayashi, T., Narabu, S., Yanai, Y., Hatano, Y., Ito, A., Imai, S., Ike, K., 2013. Gene cloning and characterization of the protein encoded by the *Neospora caninum* bradyzoite-specific antigen gene bag1. *J. Parasitol.* In Press.

- 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. *J. Parasitol.* 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*. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 1 (1), 4.
- Kul, O., Kabakci, N., Yildiz, K., Ocal, N., Kalender, H., Ilkme, N.A., 2009. *Neospora caninum* associated with epidemic abortions in dairy cattle: the first clinical neosporosis report in Turkey. *Vet. Parasitol.* 159 (1), 69-72.
- Lally, N., Jenkins, M., Liddell, S., Dubey, J.P., 1997. A dense granule protein (NCDG1) gene from *Neospora caninum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 87 (2), 239-243.
- Larson, R.L., Hardin, D.K., Pierce, V.L., 2004. Economic considerations for diagnostic and control options for *Neospora caninum*-induced abortions in endemically infected herds of beef cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 224 (10), 1597-1604.
- Lee, E.G., Kim, J.H., Shin, Y.S., Shin, G.W., Suh, M.D., Kim, D.Y., Kim, Y.H., Kim, G.S., Jung, T.S., 2003. Establishment of a two-dimensional electrophoresis map for *Neospora caninum* tachyzoites by proteomics. *Proteomics* 3 (12), 2339-2350.
- Lee, E.G., Kim, J.H., Shin, Y.S., Shin, G.W., Kim, Y.R., Palaksha, K.J., Kim, D.Y., Yamane, I., Kim, Y.H., Kim, G.S., Suh, M.D., Jung, T.S., 2005. Application of proteomics for comparison of proteome of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *J Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 815 (1-2), 305-314.
- Lee, L.A., Wang, Q., 2006. Adaptations of nanoscale viruses and other protein cages for medical applications. *Nanomedicine* 2 (3), 137-149.
- Leepin, A., Studli, A., Brun, R., Stephens, C.E., Boykin, D.W., Hemphill, A., 2008. Host cells participate in the *in vitro* effects of novel diamidine analogues against tachyzoites of the intracellular apicomplexan parasites *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52 (6), 1999-2008.
- Lemoine, D., Francois, C., Kedzierewicz, F., Preat, V., Hoffman, M., Maincent, P., 1996. Stability study of nanoparticles of poly (epsilon-caprolactone), poly (D,L-lactide) and poly (D,L-lactide-co-glycolide). *Biomaterials* 17 (22), 2191-2197.
- Liddell, S., Lally, N.C., Jenkins, M.C., Dubey, J.P., 1998. Isolation of the cDNA encoding a dense granule associated antigen (NCDG2) of *Neospora caninum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 93 (1), 153-158.
- Liddell, S., Jenkins, M.C., Collica, C.M., Dubey, J.P., 1999a. Prevention of vertical transfer of *Neospora caninum* in BALB/c mice by vaccination. *J. Parasitol.* 85 (6), 1072-1075.

- Liddell, S., Jenkins, M.C., Dubey, J.P., 1999b. Vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice determined by polymerase chain reaction detection. *J. Parasitol.* 85 (3), 550-555.
- Liddell, S., Parker, C., Vinyard, B., Jenkins, M., Dubey, J.P., 2003. Immunization of mice with plasmid DNA coding for NcGRA7 or NcsHSP33 confers partial protection against vertical transmission of *Neospora caninum*. *J. Parasitol.* 89 (3), 496-500.
- Liew, F.Y., 2002. Th1 and Th2 cells: a historical perspective. *Nature Reviews Immunology* 2 (1).
- Lindsay, D.S., Dubey, J.P., 1989. *Neospora caninum* (Protozoa: apicomplexa) infections in mice. *J. Parasitol.* 75 (5), 772-779.
- Lindsay, D.S., Lenz, S.D., Cole, R.A., Dubey, J.P., Blagburn, B.L., 1995. Mouse model for central nervous system *Neospora caninum* infections. *J. Parasitol.* 81 (2), 313-315.
- Lindsay, D.S., Dubey, J.P., Duncan, R.B., 1999a. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 82 (4), 327-333.
- Lindsay, D.S., Lenz, S.D., Blagburn, B.L., Brake, D.A., 1999b. Characterization of temperature-sensitive strains of *Neospora caninum* in mice. *J. Parasitol.* 85 (1), 64-67.
- Long, M.T., Baszler, T.V., 1996. Fetal loss in BALB/C mice infected with *Neospora caninum*. *J. Parasitol.* 82 (4), 608-611.
- Long, M.T., Baszler, T.V., Mathison, B.A., 1998. Comparison of intracerebral parasite load, lesion development, and systemic cytokines in mouse strains infected with *Neospora caninum*. *J. Parasitol.* 84 (2), 316-320.
- Long, M.T., Baszler, T.V., 2000. Neutralization of maternal IL-4 modulates congenital protozoal transmission: comparison of innate versus acquired immune responses. *J. Immunol.* 164 (9), 4768-4774.
- López-Gatius, F., Santolaria, P., Yániz, J.L., Garbayo, J.M., Almería, S., 2005. The use of beef bull semen reduced the risk of sbortion in *Neospora*-seropositive dairy cows. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 52 (2), 88-92.
- López-Pérez, I.C., Risco-Castillo, V., Collantes-Fernández, E., Ortega-Mora, L.M., 2006. Comparative effect of *Neospora caninum* infection in BALB/c mice at three different gestation periods. *J. Parasitol.* 92 (6), 1286-1291.
- López-Pérez, I.C., Collantes-Fernández, E., Aguado-Martínez, A., Rodríguez-Bertos, A., Ortega-Mora, L.M., 2008. Influence of *Neospora caninum* infection in BALB/c mice during pregnancy in post-natal development. *Vet. Parasitol.* 155 (3-4), 175-183.
- López-Pérez, I.C., Collantes-Fernández, E., Rojo-Montejo, S., Navarro-Lozano, V., Risco-Castillo, V., Pérez-Pérez, V., Pereira-Bueno, J., Ortega-Mora, L.M., 2010. Effects of *Neospora caninum* infection at mid-gestation on placenta in a pregnant mouse model. *J. Parasitol.* 96 (5), 1017-1020.

- Louie, K., Conrad, P.A., 1999. Characterization of a cDNA encoding a subtilisin-like serine protease (NC-p65) of *Neospora caninum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 103 (2), 211-223.
- Lovett, J.L., Howe, D.K., Sibley, L.D., 2000. Molecular characterization of a thrombospondin-related anonymous protein homologue in *Neospora caninum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 107 (1), 33-43.
- Lunden, A., Marks, J., Maley, S.W., Innes, E.A., 1998. Cellular immune responses in cattle experimentally infected with *Neospora caninum*. *Parasite Immunol.* 20 (11), 519-526.
- Macaldowie, C., Maley, S.W., Wright, S., Bartley, P., Esteban-Redondo, I., Buxton, D., Innes, E.A., 2004. Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. *J. Comp. Pathol.* 131 (2-3), 142-156.
- Maley, S.W., Buxton, D., Thomson, K.M., Schriefer, C.E., Innes, E.A., 2001. Serological analysis of calves experimentally infected with *Neospora caninum*: a 1-year study. *Vet. Parasitol.* 96 (1), 1-9.
- Maley, S.W., Buxton, D., Rae, A.G., Wright, S.E., Schock, A., Bartley, P.M., Esteban-Redondo, I., Swales, C., Hamilton, C.M., Sales, J., Innes, E.A., 2003. The pathogenesis of neosporosis in pregnant cattle: inoculation at mid-gestation. *J. Comp. Pathol.* 129 (2-3), 186-195.
- Mansilla, F.C., Franco-Mahecha, O.L., Lavoria, M.A., Moore, D.P., Giraldez, A.N., Iglesias, M.E., Wilda, M., Capozzo, A.V., 2012. The immune enhancement of a novel soy lecithin/beta-glucans based adjuvant on native *Neospora caninum* tachyzoite extract vaccine in mice. *Vaccine* 30 (6), 1124-1131.
- Marks, J., Lunden, A., Harkins, D., Innes, E., 1998. Identification of *Neospora* antigens recognized by CD4+ T cells and immune sera from experimentally infected cattle. *Parasite Immunol.* 20 (7), 303-309.
- Marsh, A.E., Barr, B.C., Sverlow, K., Ho, M., Dubey, J.P., Conrad, P.A., 1995. Sequence analysis and comparison of ribosomal DNA from bovine *Neospora* to similar coccidial parasites. *J. Parasitol.* 81 (4), 530-535.
- Marsh, A.E., Barr, B.C., Packham, A.E., Conrad, P.A., 1998. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: *Sarcocystidae*). *J. Parasitol.* 84 (5), 983-991.
- Marugán-Hernández, V., Álvarez-García, G., Risco-Castillo, V., Regidor-Cerrillo, J., Ortega-Mora, L.M., 2010. Identification of *Neospora caninum* proteins regulated during the differentiation process from tachyzoite to bradyzoite stage by DIGE. *Proteomics* 10 (9), 1740-1750.
- Marugán-Hernández, V., Álvarez-García, G., Tomley, F., Hemphill, A., Regidor-Cerrillo, J., Ortega-Mora, L.M., 2011a. Identification of novel rhoptry proteins in *Neospora caninum* by LC/MS-MS analysis of subcellular fractions. *J. Proteomics* 74 (5), 629-642.

- Marugán-Hernández, V., Ortega-Mora, L.M., Aguado-Martínez, A., Álvarez-García, G., 2011b. Genetic manipulation of *Neospora caninum* to express the bradyzoite-specific protein NcSAG4 in tachyzoites. *Parasitology* 138 (4), 472-480.
- Marugán-Hernández, V., Ortega-Mora, L.M., Aguado-Martínez, A., Jiménez-Ruiz, E., Álvarez-García, G., 2011c. 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.
- Mazuz, M.L., 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. *Vet. Parasitol.* 187 (1-2), 99-104.
- McAllister, M.M., McGuire, A.M., Jolley, W.R., Lindsay, D.S., Trees, A.J., Stobart, R.H., 1996. Experimental neosporosis in pregnant ewes and their offspring. *Vet. Pathol.* 33 (6), 647-655.
- McAllister, M.M., Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Jolley, W.R., Wills, R.A., McGuire, A.M., 1998. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 28 (9), 1473-1478.
- McAllister, M.M., Björkman, C., Anderson-Sprecher, R., Rogers, D.G., 2000. Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 217 (6), 881-887.
- McCann, C.M., McAllister, M.M., Gondim, L.F., Smith, R.F., Cripps, P.J., Kipar, A., Williams, D.J., Trees, A.J., 2007. *Neospora caninum* in cattle: Experimental infection with oocysts can result in exogenous transplacental infection, but not endogenous transplacental infection in the subsequent pregnancy. *Int. J. Parasitol.* 37 (14), 1631-1639.
- McGuire, A.M., McAllister, M.M., Jolley, W.R., 1997a. Separation and cryopreservation of *Neospora caninum* tissue cysts from murine brain. *J. Parasitol.* 83 (2), 319-321.
- McGuire, A.M., McAllister, M.M., Jolley, W.R., Anderson-Sprecher, R.C., 1997b. A protocol for the production of *Neospora caninum* tissue cysts in mice. *J. Parasitol.* 83 (4), 647-651.
- McLeod, R., Estes, R.G., Mack, D.G., 1985. Effects of adjuvants and *Toxoplasma gondii* Antigen on immune response and outcome of peroral *Toxoplasma gondii* challenge. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79 (6).
- Medina-Esparza, L., Macias, L., Ramos-Parra, M., Morales-Salinas, E., Quezada, T., Cruz-Vazquez, C., 2012. Frequency of infection by *Neospora caninum* in wild rodents associated with dairy farms in Aguascalientes, Mexico. *Vet. Parasitol.* 191 (1-2), 11-14.
- Meerburg, B.G., De Craeye, S., Dierick, K., Kijlstra, A., 2012. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in brain tissue of feral rodents and insectivores caught on farms in the Netherlands. *Vet. Parasitol.* 184 (2-4), 317-320.

- Melo, M.B., Jensen, K.D., Saeij, J.P., 2011. *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. *Trends Parasitol.* 27 (11), 487-495.
- Mendez, S., Belkaid, Y., Seder, R.A., Sacks, D., 2002. Optimization of DNA vaccination against cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* 20 (31-32), 3702-3708.
- Miller, C., Quinn, H.E., Windsor, P.A., Ellis, J.T., 2002. Characterisation of the first Australian isolate of *Neospora caninum* from cattle. *Aust. Vet. J.* 80 (10), 620-625.
- Miller, C., Quinn, H., Ryce, C., Reichel, M.P., Ellis, J.T., 2005. Reduction in transplacental transmission of *Neospora caninum* in outbred mice by vaccination. *Int. J. Parasitol.* 35 (7), 821-828.
- Mineo, T.W., Oliveira, C.J., Gutierrez, F.R., Silva, J.S., 2010. Recognition by toll-like receptor 2 induces antigen-presenting cell activation and Th1 programming during infection by *Neospora caninum*. *Immunol. Cell Biol.* 88 (8), 825-833.
- Mitreă, I.L., Enăchescu, V., Radulescu, R., Ionita, M., 2012. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection on dairy cattle in farms from southern Romania. *J. Parasitol.* 98 (1), 69-72.
- Monney, T., Debache, K., Hemphill, A., 2011a. Vaccines against a major cause of abortion in cattle, *Neospora caninum* infection. *Animals* 1 (3), 306-325.
- Monney, T., Rutti, D., Schorer, M., Debache, K., Grandgirard, D., Leib, S.L., Hemphill, A., 2011b. 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, S.L., 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 *Neospora caninum* infection. *Vaccine* 30 (46), 6588-6594.
- Moore, D.P., Echaide, I., Verna, A.E., Leunda, M.R., Cano, A., Pereyra, S., Zamorano, P.I., Odeon, A.C., Campero, C.M., 2011. Immune response to *Neospora caninum* native antigens formulated with immune stimulating complexes in calves. *Vet. Parasitol.* 175 (3-4), 245-251.
- Moreno, B., Collantes-Fernandez, E., Villa, A., Navarro, A., Regidor-Cerrillo, J., Ortega-Mora, L.M., 2012. Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions. *Vet. Parasitol.* 187 (1-2), 312-318.
- Morrison, D.A., 2002. How to improve statistical analysis in parasitology research publications. *Int. J. Parasitol.* 32 (8), 1065-1070.
- Moskwa, B., Pastusiak, K., Bien, J., Cabaj, W., 2007. The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. *Parasitol. Res.* 100 (3), 633-636.

- Müller, N., Sager, H., Hemphill, A., Mehlhorn, H., Heydorn, A.O., Gottstein, B., 2001. Comparative molecular investigation of Nc5-PCR amplicons from *Neospora caninum* NC-1 and *Hammondia heydorni*-Berlin-1996. *Parasitol. Res.* 87 (10), 883-885.
- Müller, J., Hemphill, A., 2013. *In vitro* culture systems for the study of apicomplexan parasites in farm animals. *Int. J. Parasitol.* In press.
- Murillo, M., Grillo, M.J., Rene, J., Marin, C.M., Barberan, M., Goni, M.M., Blasco, J.M., Irache, J.M., Gamazo, C., 2001. A *Brucella ovis* antigenic complex bearing poly-epsilon-caprolactone microparticles confer protection against experimental brucellosis in mice. *Vaccine* 19 (30), 4099-4106.
- Murthy, S.K., 2007. Nanoparticles in modern medicine: state of the art and future challenges. *Int. J. Nanomedicine* 2 (2), 129-141.
- Naguleswaran, A., Cannas, A., Keller, N., Vonlaufen, N., Björkman, C., Hemphill, A., 2002. Vero cell surface proteoglycan interaction with the microneme protein NcMIC(3) mediates adhesion of *Neospora caninum* tachyzoites to host cells unlike that in *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 32 (6), 695-704.
- 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. *Int. J. Parasitol.* 35 (13), 1459-1472.
- Nasir, A., Ashraf, M., Khan, M.S., Javeed, A., Yaqub, T., Avais, M., Reichel, M.P., 2012. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in sheep and goats in Pakistan. *J. Parasitol.* 98 (1), 213-215.
- Nichols, B.A., Chiappino, M.L., O'Connor, G.R., 1983. Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion. *J. Ultrastruct. Res.* 83 (1), 85-98.
- Nielsen, H.V., Di Cristina, M., Beghetto, E., Spadoni, A., Petersen, E., Gargano, N., 2006. *Toxoplasma gondii*: DNA vaccination with bradyzoite antigens induces protective immunity in mice against oral infection with parasite cysts. *Exp. Parasitol.* 112 (4), 274-279.
- Nishikawa, Y., Inoue, N., Xuan, X., Nagasawa, H., Igarashi, I., Fujisaki, K., Otsuka, H., Mikami, T., 2001a. Protective efficacy of vaccination by recombinant vaccinia virus against *Neospora caninum* infection. *Vaccine* 19 (0264-410; 11-12), 1381-1390.
- Nishikawa, Y., Tragoolpua, K., Inoue, N., Makala, L., Nagasawa, H., Otsuka, H., Mikami, T., 2001b. In the absence of endogenous gamma interferon, mice acutely infected with *Neospora caninum* succumb to a lethal immune response characterized by inactivation of peritoneal macrophages. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8 (1071-412; 4), 811-816.

- Nishikawa, Y., Xuan, X., Nagasawa, H., Igarashi, I., Fujisaki, K., Otsuka, H., Mikami, T., 2001c. Prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice by recombinant vaccinia virus carrying NcSRS2 gene. *Vaccine* 19 (0264-410; 13-14), 1710-1716.
- Nishikawa, Y., Mikami, T., Nagasawa, H., 2002. Vaccine development against *Neospora caninum* infection. *J. Vet. Med. Sci.* 64 (1), 1-5.
- 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. *Vet. Parasitol.* 116 (3), 175-184.
- Nishikawa, Y., Zhang, H., Ikehara, Y., Kojima, N., Xuan, X., Yokoyama, N., 2009. Immunization with oligomannose-coated liposome-entrapped dense granule protein 7 protects dams and offspring from *Neospora caninum* infection in mice. *Clin. Vaccine Immunol.* 16 (6), 792-797.
- O'Garra, A., Vieira, P., 2007. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat. Rev. Immunol.* 7 (6), 425-428.
- O'Handley, R.M., Morgan, S.A., Parker, C., Jenkins, M.C., Dubey, J.P., 2003. Vaccination of ewes for prevention of vertical transmission of *Neospora caninum*. *Am. J. Vet. Res.* 64 (4), 449-452.
- 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. *Vet. Parasitol.* 121 (3-4), 323-328.
- Ortega-Mora, L., Regidor-Cerrillo, J., Rojo-Montejo, S., Collantes-Fernández, E., Álvarez-García, G., 2012. Vaccine development against bovine neosporosis: present situation and *in vitro* and *in vivo* models to test safety and efficacy. *Apicowplexa. Apicomplexan in farm animals congress, Lisbon.*
- Otsuki, T., Dong, J., Kato, T., Park, E.Y., 2013. Expression, purification and antigenicity of *Neospora caninum*-antigens using silkworm larvae targeting for subunit vaccines. *Vet. Parasitol.* 192 (1-3), 284-287
- Ozcan, I., Abaci, O., Uztan, A.H., Aksu, B., Boyacioglu, H., Guneri, T., Ozer, O., 2009. Enhanced topical delivery of terbinafine hydrochloride with chitosan hydrogels. *AAPS PharmSciTech* 10 (3), 1024-1031.
- Pardini, L., Maksimov, P., Herrmann, D.C., Bacigalupe, D., Rambeaud, M., Machuca, M., More, G., Basso, W., Schares, G., Venturini, M.C., 2012. Evaluation of an in-house TgSAG1 (P30) IgG ELISA for diagnosis of naturally acquired *Toxoplasma gondii* infection in pigs. *Vet. Parasitol.* .
- Pare, J., Thurmond, M.C., Hietala, S.K., 1997. *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. *J. Parasitol.* 83 (1), 82-87.

- Pastor-Fernández, I., Álvarez-García, G., Regidor-Cerrillo, J., Jiménez-Ruiz, E., García-Culebras, A., Cuevas-Martín, M.C., Hemphill, A., Ortega-Mora, L.M., 2012. Immunolocalisation dynamics of NcROP40, NcROP2, NcGRA7 and NcNTPase throughout the lytic cycle of *Neospora caninum* tachyzoites. Apicowplexa. Apicomplexan in farm animals congress, Lisbon.
- Pedraza-Díaz, S., Marugán-Hernández, V., Collantes-Fernández, E., Regidor-Cerrillo, J., Rojo-Montejo, S., Gómez-Bautista, M., Ortega-Mora, L.M., 2009. Microsatellite markers for the molecular characterization of *Neospora caninum*: application to clinical samples. Vet. Parasitol. 166 (1-2), 38-46.
- Pena, H.F., Soares, R.M., Ragozo, A.M., Monteiro, R.M., Yai, L.E., Nishi, S.M., Gennari, S.M., 2007. Isolation and molecular detection of *Neospora caninum* from naturally infected sheep from Brazil. Vet. Parasitol. 147 (1-2), 61-66.
- 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, L.M., 2010. Pathogenic characterization in mice of *Neospora caninum* isolates obtained from asymptomatic calves. Parasitology. 137, 1057–1068..
- Pereira-Bueno, J., Quintanilla-Gozaolo, A., Pérez-Pérez, V., Espi-Felgueroso, A., Álvarez, G.,G., Collantes-Fernández, E., Ortega-Mora, L.M., 2003. Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. Vet. Parasitol. 111 (2-3), 143-152.
- Pérez-Zaballos, F.J., Ortega-Mora, L.M., 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. J. Parasitol. 91 (3), 507-510.
- Peters, M., Lutkefels, E., Heckerroth, A.R., Schares, G., 2001. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. Int. J. Parasitol. 31 (10), 1144-1148.
- Pfeiffer, D.U., Williamson, N.B., Reichel, M.P., Wichtel, J.J., Teague, W.R., 2002. A longitudinal study of *Neospora caninum* infection on a dairy farm in New Zealand. Prev. Vet. Med. 54 (1), 11-24.
- Pifer, R., Yarovinsky, F., 2011. Innate responses to *Toxoplasma gondii* in mice and humans. Trends Parasitol. 27 (9), 388-393.
- Pinitkiatisakul, S., Friedman, M., Wikman, M., Mattsson, J.G., Lovgren-Bengtsson, K., Stahl, S., Lunden, A., 2007a. Immunogenicity and protective effect against murine cerebral neosporosis of recombinant NcSRS2 in different iscom formulations. Vaccine 25 (0264-410; 18), 3658-3668.

- Pinitkiatisakul, S., Mattsson, J.G., Lunden, A., 2007b. Quantitative analysis of parasite DNA in the blood of immunized and naive mice after infection with *Neospora caninum*. *Parasitology* 135 (2), 175-182.
- Quinn, H.E., Miller, C.M., Ryce, C., Windsor, P.A., Ellis, J.T., 2002. Characterization of an outbred pregnant mouse model of *Neospora caninum* infection. *J. Parasitol.* 88 (4), 691-696.
- Quinn, H.E., Miller, C.M., Ellis, J.T., 2004. The cell-mediated immune response to *Neospora caninum* during pregnancy in the mouse is associated with a bias towards production of interleukin-4. *Int. J. Parasitol.* 34 (6), 723-732.
- Quintanilla-Gonzalo, A., Pereira-Bueno, J., Tabares, E., Innes, E.A., Gonzalez-Paniello, R., Ortega-Mora, L.M., 1999. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Spain. *Int. J. Parasitol.* 29 (8), 1201-1208.
- Rafi-Janajreh, A., Tongren, J.E., Kensil, C., Hackett, C., Candal, F., Lal, A., Udhayakumar, V., 2002. Influence of adjuvants in inducing immune responses to different epitopes included in a multiepitope, multivalent, multistage *Plasmodium falciparum* candidate vaccine (FALVAC-1) in outbred mice. *Exp. Parasitol.* 101 (1), 3-12.
- Raghupathy, R., 1997. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol. Today* 18 (10), 478-482.
- Ramamoorthy, S., Sriranganathan, N., Lindsay, D.S., 2005. Gerbil model of acute neosporosis. *Vet. Parasitol.* 127 (2), 111-114.
- Ramamoorthy, S., Lindsay, D.S., Schurig, G.G., Boyle, S.M., Duncan, R.B., Vemulapalli, R., Sriranganathan, N., 2006. Vaccination with gamma-irradiated *Neospora caninum* tachyzoites protects mice against acute challenge with *N. caninum*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 53 (2), 151-156.
- Ramamoorthy, S., Duncan, R., Lindsay, D.S., Sriranganathan, N., 2007a. Optimization of the use of C57BL/6 mice as a laboratory animal model for *Neospora caninum* vaccine studies. *Vet. Parasitol.* 145 (3-4), 253-259.
- Ramamoorthy, S., Sanakkayala, N., Vemulapalli, R., Duncan, R.B., Lindsay, D.S., Schurig, G.S., Boyle, S.M., 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. *Int. J. Parasitol.* 37 (13), 1521-1529.
- Ramamoorthy, S., Sanakkayala, N., Vemulapalli, R., Jain, N., Lindsay, D.S., Schurig, G.S., Boyle, S.M., Sriranganathan, N., 2007c. Prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in C57BL/6 mice vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51 expressing *N. caninum* protective antigens. *Int. J. Parasitol.* 37 (13), 1531-1538.

- Regidor-Cerrillo, J., Pedraza-Díaz, S., Gómez-Bautista, M., Ortega-Mora, L.M., 2006. Multilocus microsatellite analysis reveals extensive genetic diversity in *Neospora caninum*. *J. Parasitol.* 92 (3), 517-524.
- Regidor-Cerrillo, J., Gómez-Bautista, M., Pereira-Bueno, J., Adúriz, G., Navarro-Lozano, V., Risco-Castillo, V., Fernández-García, A., Pedraza-Díaz, S., Ortega-Mora, L.M., 2008. Isolation and genetic characterization of *Neospora caninum* from asymptomatic calves in Spain. *Parasitology* 135 (14), 1651-1659.
- Regidor-Cerrillo, J., Gómez-Bautista, M., Del Pozo, I., Jiménez-Ruiz, E., Aduriz, G., Ortega-Mora, L.M., 2010. Influence of *Neospora caninum* intra-specific variability in the outcome of infection in a pregnant BALB/c mouse model. *Vet. Res.* 41 (4), 52.
- Regidor-Cerrillo, J., Gomez-Bautista, M., Sodupe, I., Aduriz, G., Alvarez-Garcia, G., Del Pozo, I., Ortega-Mora, L.M., 2011. *In vitro* invasion efficiency and intracellular proliferation rate comprise virulence-related phenotypic traits of *Neospora caninum*. *Vet. Res.* 42 (1), 41.
- Regidor-Cerrillo, J., Alvarez-Garcia, G., Pastor-Fernandez, I., Marugan-Hernandez, V., Gomez-Bautista, M., Ortega-Mora, L.M., 2012a. Proteome expression changes among virulent and attenuated *Neospora caninum* isolates. *J. Proteomics* 75 (8), 2306-2318.
- Regidor-Cerrillo, J., Díez-Fuertes, F., García-Culebras, A., Moore, D.P., González-Warleta, M., Cuevas, C., Schares, G., Katzer, F., Pedraza-Díaz, S., Mezo, M., Ortega-Mora, L.M., 2012b. Genetic diversity and geographic population structure of bovine *Neospora caninum* determined by microsatellite genotyping analysis. *Apicowplexa. Apicomplexan in farm animals congress*, Lisbon.
- Regidor-Cerrillo, J., Díez-Fuertes, F., García-Culebras, A., Moore, D.P., González-Warleta, M., Cuevas, C., Schares, G., Katzer, F., Pedraza-Díaz, S., Mezo, M., Ortega-Mora, L.M., Enviado. Genetic diversity and geographic population structure of bovine *Neospora caninum* determined by microsatellite genotyping analysis. *PloS one*.
- Reichel, M.P., Ellis, J.T., 2006. If control of *Neospora caninum* infection is technically feasible does it make economic sense? *Vet. Parasitol.* 142 (1-2), 23-34.
- Reichel, M.P., Ellis, J.T., 2009. *Neospora caninum*--how close are we to development of an efficacious vaccine that prevents abortion in cattle? *Int. J. Parasitol.* 39 (11), 1173-1187.
- Reid, A.J., Vermont, S.J., Cotton, J.A., Harris, D., Hill-Cawthorne, G.A., Konen-Waisman, S., Latham, S.M., Mourier, T., Norton, R., Quail, M.A., Sanders, M., Shanmugam, D., Sohal, A., Wasmuth, J.D., Brunk, B., Grigg, M.E., Howard, J.C., Parkinson, J., Roos, D.S., Trees, A.J., Berriman, M., Pain, A., Wastling, J.M., 2012. Comparative genomics of the apicomplexan parasites *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*: Coccidia differing in host range and transmission strategy. *PLoS Pathog.* 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. *Vet. Res.* 35 (2), 225-232.
- Ribeiro, D.P., Freitas, M.M., Cardoso, M.R., Pajuaba, A.C., Silva, N.M., Mineo, T.W., Silva, J.S., Mineo, J.R., Silva, D.A., 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, L.M., 2004. Comparative analysis of stress agents in a simplified *in vitro* system of *Neospora caninum* bradyzoite production. *J. Parasitol.* 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, L.M., 2007. Molecular characterisation of BSR4, a novel bradyzoite-specific gene from *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 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, L.M., 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, 1832–1842.
- Ritter, D.M., Kerlin, R., Sibert, G., Brake, D., 2002. Immune factors influencing the course of infection with *Neospora caninum* in the murine host. *J. Parasitol.* 88 (2), 271-280.
- Roberts, C.W., Walker, W., Alexander, J., 2001. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clin. Microbiol. Rev.* 14 (3), 476-488.
- Rojo-Montejo, S., Collantes-Fernández, E., Blanco-Murcia, J., Rodríguez-Bertos, A., Risco-Castillo, V., Ortega-Mora, L.M., 2009a. Experimental infection with a low virulence isolate of *Neospora caninum* at 70 days gestation in cattle did not result in foetopathy. *Vet. Res.* 40 (5), 49-59.
- 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, L.M., 2009b. Isolation and characterization of a bovine isolate of *Neospora caninum* with low virulence. *Vet. Parasitol.* 159 (1), 7-16.
- Rojo-Montejo, S., Zabala-Martínez, J., Vázquez-Moreno, E., Collantes-Fernández, E., Loste-Montoya, J.M., Ortega-Mora, L.M., 2009c. Relevancia de la transmisión horizontal de *Neospora*

- caninum* en rebaños bovinos españoles. XIV Congreso Internacional ANEMBE de Medicina Bovina. La Coruña, España.
- Rojo-Montejo, S., Collantes-Fernandez, E., Regidor-Cerrillo, J., Rodriguez-Bertos, A., Prenafeta, A., Gomez-Bautista, M., Ortega-Mora, L.M., 2011a. Influence of adjuvant and antigen dose on protection induced by an inactivated whole vaccine against *Neospora caninum* infection in mice. *Vet. Parasitol.* 175 (3-4), 220-229.
- Rojo-Montejo, S., Collantes-Fernandez, E., Rodriguez-Marcos, S., Perez-Zaballos, F., Lopez-Perez, I., Prenafeta, A., Ortega-Mora, L.M., 2011b. Comparative efficacy of immunization with inactivated whole tachyzoites versus a tachyzoite-bradyzoite mixture against neosporosis in mice. *Parasitology* 138 (11), 1372-1383.
- Rojo-Montejo, S., Collantes-Fernandez, E., Lopez-Perez, I., Risco-Castillo, V., Prenafeta, A., Ortega-Mora, L.M., 2012. Evaluation of the protection conferred by a naturally attenuated *Neospora caninum* isolate against congenital and cerebral neosporosis in mice. *Vet. Res.* 43 (1), 62
- Romero, J.J., 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. *Vet. Parasitol.* 123 (3-4), 149-159.
- Rosbottom, A., Guy, C.S., Gibney, E.H., Smith, R.F., Valarcher, J.F., Taylor, G., Williams, D.J., 2007. Peripheral immune responses in pregnant cattle following *Neospora caninum* infection. *Parasite Immunol.* 29 (4), 219-228.
- Saeij, J.P., Boyle, J.P., Collier, S., Taylor, S., Sibley, L.D., Brooke-Powell, E.T., Ajioka, J.W., Boothroyd, J.C., 2006. Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. *Science* 314 (5806), 1780-1783.
- Saeij, J.P., Collier, S., Boyle, J.P., Jerome, M.E., White, M.W., Boothroyd, J.C., 2007. *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. *Nature* 445 (7125), 324-327.
- Saeij, J.P., Arrizabalaga, G., Boothroyd, J.C., 2008. A cluster of four surface antigen genes specifically expressed in bradyzoites, SAG2CDXY, plays an important role in *Toxoplasma gondii* persistence. *Infect. Immun.* 76 (6), 2402-2410.
- Salas-Calvo, J., Alvarez-Garcia, G., Aguado-Martínez, A., Gomez-Bautista, M., Arnaiz-Seco, I., Ortega-Mora, L.M., 2005. Desarrollo de un ELISA para la detección de anticuerpos en leche frente a *Neospora caninum* en el ganado bovino. Congreso de Avedila. Palma de Mallorca, España.

- Salman, H.H., Gomez, S., Gamazo, C., Martins, R.C., Zabaleta, V., Irache, J.M., 2008. Micro-organism-like nanoparticles for oral antigen delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 18 (1).
- Salman, H.H., Irache, J.M., Gamazo, C., 2009. Immunoadjuvant capacity of flagellin and mannosamine-coated poly(anhydride) nanoparticles in oral vaccination. *Vaccine* 27 (35), 4784-4790.
- Samuel, B.U., Hearn, B., Mack, D., Wender, P., Rothbard, J., Kirisits, M.J., Mui, E., Wernimont, S., Roberts, C.W., Muench, S.P., Rice, D.W., Prigge, S.T., Law, A.B., McLeod, R., 2003. Delivery of antimicrobials into parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (24), 14281-14286.
- Schares, G., Peters, M., Wurm, R., Barwald, A., Conraths, F.J., 1998. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. *Vet. Parasitol.* 80 (2), 87-98.
- Schares, G., Barwald, A., Staubach, C., Sondgen, P., Rauser, M., Schroder, R., Peters, M., Wurm, R., Selhorst, T., Conraths, F.J., 2002a. p38-avidity-ELISA: examination of herds experiencing epidemic or endemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Vet. Parasitol.* 106 (4), 293-305.
- Schares, G., Heydorn, A.O., Cuppers, A., Mehlhorn, H., Geue, L., Peters, M., Conraths, F.J., 2002b. In contrast to dogs, red foxes (*Vulpes vulpes*) did not shed *Neospora caninum* upon feeding of intermediate host tissues. *Parasitol. Res.* 88 (1), 44-52.
- Schijns, V.E.J.C., 2001. Induction and direction of immune responses by vaccine adjuvants. *Crit. Rev. Immunol.* 21 (1-3).
- Schijns, V.E.J.C., 2003. Mechanisms of vaccine adjuvant activity: initiation and regulation of immune responses by vaccine adjuvants. *Vaccine* 21 (9-10), 829-831.
- Schock, A., Innes, E.A., Yamane, I., Latham, S.M., Wastling, J.M., 2001. Genetic and biological diversity among isolates of *Neospora caninum*. *Parasitology* 123, 13-23.
- Serrano-Martínez, E., Ferre, I., Martínez, A., Osoro, K., Mateos-Sanz, A., Del-Pozo, I., Adúriz, G., Tamargo, C., Hidalgo, C.O., Ortega-Mora, L.M., 2007a. Experimental neosporosis in bulls: parasite detection in semen and blood and specific antibody and interferon-gamma responses. *Theriogenology* 67 (6), 1175-1184.
- Serrano-Martínez, E., Ferre, I., Osoro, K., Adúriz, G., Mota, R.A., Martínez, A., Del-Pozo, I., Hidalgo, C.O., Ortega-Mora, L.M., 2007b. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers and cows using contaminated semen with different numbers of tachyzoites. *Theriogenology* 67 (4), 729-737.
- Shibahara, T., Kokuho, T., Eto, M., Haritani, M., Hamaoka, T., Shimura, K., Nakamura, K., Yokomizo, Y., Yamane, I., 1999. Pathological and immunological findings of athymic nude and

- congenic wild type BALB/c mice experimentally infected with *Neospora caninum*. *Vet. Pathol.* 36 (4), 321-327.
- Shivaprasad, H.L., Ely, R., Dubey, J.P., 1989. A *Neospora*-like protozoon found in an aborted bovine placenta. *Vet. Parasitol.* 34 (1-2), 145-148.
- Singh, M., O'Hagan, D.T., 2003. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *Int. J. Parasitol.* 33 (5-6).
- Singh, M., Manikandan, S., Kumaraguru, A.K., 2011. Nanoparticles: a new technology with wide applications. *Res. J. Nanosci. Nanotechnol.* 1 (1), 1-11.
- Sinha, V.R., Bansal, K., Kaushik, R., Kumria, R., Trehan, A., 2004. Poly-epsilon-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *Int. J. Pharm.* 278 (1), 1-23.
- Slobbe, L., Medlicott, N., Lockhart, E., Davies, N., Tucker, I., Razzak, M., Buchan, G., 2003. A prolonged immune response to antigen delivered in poly (epsilon-caprolactone) microparticles. *Immunol. Cell Biol.* 81 (3), 185-191.
- Smith, J.E., 1995. A ubiquitous intracellular parasite: the cellular biology of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 25 (11), 1301-1309.
- Sonda, S., Fuchs, N., Gottstein, B., Hemphill, A., 2000. Molecular characterization of a novel microneme antigen in *Neospora caninum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 108 (1), 39-51.
- Sousa, S., Ajzenberg, D., Vilanova, M., Costa, J., Darde, M.L., 2008. Use of GRA6-derived synthetic polymorphic peptides in an immunoenzymatic assay to serotype *Toxoplasma gondii* in human serum samples collected from three continents. *Clin. Vaccine Immunol.* 15 (9), 1380-1386.
- Speer, C.A., Dubey, J.P., 1989. Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum*. *J. Protozool.* 36 (5), 458-463.
- Spencer, J.A., Witherow, A.K., Blagburn, B.L., 2000. A random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction technique that differentiates between *Neospora* species. *J. Parasitol.* 86 (6), 1366-1368.
- Srinivasan, S., Mueller, J., Suana, A., Hemphill, A., 2007. Vaccination with microneme protein NcMIC4 increases mortality in mice inoculated with *Neospora caninum*. *J. Parasitol.* 93 (5), 1046-1055.
- Stanisic, D.I., Martin, L.B., Good, M.F., 2003. The role of the 19-kDa region of merozoite surface protein 1 and whole-parasite-specific maternal antibodies in directing neonatal pups' responses to rodent malaria infection. *J. Immunol.* 171 (10), 5461-5469.

- Staska, L.M., McGuire, T.C., Davies, C.J., Lewin, H.A., Baszler, T.V., 2003. *Neospora caninum*-infected cattle develop parasite-specific CD4<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes. *Infect. Immun.* 71 (6), 3272-3279.
- Staska, L.M., Davies, C.J., Brown, W.C., McGuire, T.C., Suarez, C.E., Park, J.Y., Mathison, B.A., Abbott, J.R., Baszler, T.V., 2005. Identification of vaccine candidate peptides in the NcSRS2 surface protein of *Neospora caninum* by using CD4<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes and gamma interferon-secreting T lymphocytes of infected holstein cattle. *Infect. Immun.* 73 (3), 1321-1329.
- Steinfeldt, T., Konen-Waisman, S., Tong, L., Pawlowski, N., Lamkemeyer, T., Sibley, L.D., Hunn, J.P., Howard, J.C., 2010. Phosphorylation of mouse immunity-related GTPase (IRG) resistance proteins is an evasion strategy for virulent *Toxoplasma gondii*. *PLoS Biol.* 8 (12), e1000576.
- Stenlund, S., Björkman, C., Holmdahl, O.J., Kindahl, H., Uggla, A., 1997. Characterization of a Swedish bovine isolate of *Neospora caninum*. *Parasitol. Res.* 83 (3), 214-219.
- 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*. *Vet. Parasitol.* 85 (4), 227-234.
- Straub, K.W., Cheng, S.J., Sohn, C.S., Bradley, P.J., 2009. Novel components of the Apicomplexan moving junction reveal conserved and coccidia-restricted elements. *Cell. Microbiol.* 11 (4), 590-603.
- Strohbusch, M., Müller, N., Hemphill, A., Krebber, R., Greif, G., Gottstein, B., 2009a. Toltrazuril treatment of congenitally acquired *Neospora caninum* infection in newborn mice. *Parasitol. Res.* 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 Immunol.* 31 (7), 366-372.
- Tabbara, K.S., Peters, N.C., Afrin, F., Mendez, S., Bertholet, S., Belkaid, Y., Sacks, D.L., 2005. Conditions influencing the efficacy of vaccination with live organisms against *Leishmania major* infection. *Infect. Immun.* 73 (8), 4714-4722.
- Tanaka, T., Hamada, T., Inoue, N., Nagasawa, H., Fujisaki, K., Suzuki, N., Mikami, T., 2000. The role of CD4(+) or CD8(+) T cells in the protective immune response of BALB/c mice to *Neospora caninum* infection. *Vet. Parasitol.* 90 (3), 183-191.
- Taylor, S., Barragan, A., Su, C., Fux, B., Fentress, S.J., Tang, K., Beatty, W.L., Hajj, H.E., Jerome, M., Behnke, M.S., White, M., Wootton, J.C., Sibley, L.D., 2006. A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Science* 314 (5806), 1776-1780.

- Thilsted, J.P., Dubey, J.P., 1989. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1 (3), 205-209.
- Thornton, R.N., Gajadhar, A., Evans, J., 1994. *Neospora* abortion in a dairy herd. *N. Z. Vet. J.* 42 (5), 190-191.
- Thurmond, M.C., Hietala, S.K., 1996. Culling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 57 (11), 1559-1562.
- Thurmond, M.C., Hietala, S.K., 1997a. Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first-lactation dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 210 (5), 672-674.
- Thurmond, M.C., Hietala, S.K., 1997b. Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. *Am. J. Vet. Res.* 58 (12), 1381-1385.
- Tiwari, A., VanLeeuwen, J.A., Dohoo, I.R., Stryhn, H., Keefe, G.P., Haddad, J.P., 2005. Effects of seropositivity for bovine leukemia virus, bovine viral diarrhoea virus, *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, and *Neospora caninum* on culling in dairy cattle in four Canadian provinces. *Vet. Microbiol.* 109 (3-4), 147-158.
- Trees, A.J., Davison, H.C., Innes, E.A., Wastling, J.M., 1999. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. *Int. J. Parasitol.* 29 (8), 1195-1200.
- Trees, A.J., Williams, D.J.L., 2005. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends Parasitol.* 21 (12), 558-561.
- Tripathy, S., Das, S., Chakraborty, S.P., Sahu, S.K., Pramanik, P., Roy, S., 2012. Synthesis, characterization of chitosan-tripolyphosphate conjugated chloroquine nanoparticle and its *in vivo* anti-malarial efficacy against rodent parasite: A dose and duration dependent approach. *Int. J. Pharm.* 434 (1-2), 292-305.
- Tuo, W., Fetterer, R., Jenkins, M., Dubey, J.P., 2005a. Identification and characterization of *Neospora caninum* cyclophilin that elicits gamma interferon production. *Infect. Immun.* 73 (8), 5093-5100.
- Tuo, W., Fetterer, R.H., Davis, W.C., Jenkins, M.C., Dubey, J.P., 2005b. *Neospora caninum* antigens defined by antigen-dependent bovine CD4+ T cells. *J. Parasitol.* 91 (3), 564-568.
- Tuo, W., Zhao, Y., Zhu, D., Jenkins, M.C., 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.
- Uggla, A., Stenlund, S., Holmdahl, O.J., Jakubek, E.B., Thebo, P., Kindahl, H., Björkman, C., 1998. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. *Int. J. Parasitol.* 28 (9), 1467-1472.
- Van de Ven, H., Paulussen, C., Feijens, P.B., Matheussen, A., Rombaut, P., Kayaert, P., Van den Mooter, G., Weyenberg, W., Cos, P., Maes, L., Ludwig, A., 2012. PLGA nanoparticles and

- nanosuspensions with amphotericin B: Potent *in vitro* and *in vivo* alternatives to Fungizone and AmBisome. *J. Control. Release* 161 (3), 795-803.
- Van, T.T., Kim, S.K., Camps, M., Boothroyd, J.C., Knoll, L.J., 2007. The BSR4 protein is up-regulated in *Toxoplasma gondii* bradyzoites, however the dominant surface antigen recognised by the P36 monoclonal antibody is SRS9. *Int. J. Parasitol.* 37 (8-9), 877-885.
- Vemulapalli, R., Sanakkayala, N., Gulani, J., Schurig, G.G., Boyle, S.M., Lindsay, D.S., 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. *Vet. Parasitol.* 148 (3-4), 219-230.
- von Blumröder, D., Schares, G., Norton, R., Williams, D.J., Esteban-Redondo, I., Wright, S., Björkman, C., Frossling, J., Risco-Castillo, V., Fernández-García, A., Ortega-Mora, L.M., Sager, H., Hemphill, A., van Maanen, C., Wouda, W., Conraths, F.J., 2004. Comparison and standardisation of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in bovines. *Vet. Parasitol.* 120 (1-2), 11-22.
- Vonlaufen, N., Naguleswaran, A., Gianinazzi, C., Hemphill, A., 2007. Characterization of the fetuin-binding fraction of *Neospora caninum* tachyzoites and its potential involvement in host-parasite interactions. *Parasitology* 134 (Pt 6), 805-817.
- Walsh, C.P., Vemulapalli, R., Sriranganathan, N., Zajac, A.M., Jenkins, M.C., Lindsay, D.S., 2001. Molecular comparison of the dense granule proteins GRA6 and GRA7 of *Neospora hughesi* and *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 31 (3), 253-258.
- Webster, D., Umar, I., Kolyvas, G., Bilbao, J., Guiot, M.C., Duplisea, K., Qvarnstrom, Y., Visvesvara, G.S., 2012. Treatment of granulomatous amoebic encephalitis with voriconazole and miltefosine in an immunocompetent soldier. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 87 (4), 715-718.
- Wege, A.K., Florian, C., Ernst, W., Zimara, N., Schleicher, U., Hanses, F., Schmid, M., Ritter, U., 2012. *Leishmania major* infection in humanized mice induces systemic infection and provokes a nonprotective human immune response. *PLoS Negl Trop. Dis.* 6 (7), e1741.
- Wei, C., Wei, W., Morris, M., Kondo, E., Gorbounov, M., Tomalia, D.A., 2007. Nanomedicine and drug delivery. *Med. Clin. North Am.* 91 (5), 863-870.
- Weston, J.F., Heuer, C., Williamson, N.B., 2012. Efficacy of a *Neospora caninum* killed tachyzoite vaccine in preventing abortion and vertical transmission in dairy cattle. *Prev. Vet. Med.* 103 (2-3), 136-144.
- Whitten, M.K., 1957. Effect of exteroceptive factors on the oestrous cycle of mice. *Nature* 180 (4599), 1436.
- Williams, D.J., Guy, C.S., McGarry, J.W., Guy, F., Tasker, L., Smith, R.F., MacEachern, K., Cripps, P.J., Kelly, D.F., Trees, A.J., 2000. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of

- experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitology* 121 (Pt 4), 347-358.
- Williams, D.J., Guy, C.S., Smith, R.F., Guy, F., McGarry, J.W., McKay, J.S., Trees, A.J., 2003. First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection. *Int. J. Parasitol.* 33 (10), 1059-1065.
- Williams, D.J., Guy, C.S., Smith, R.F., Ellis, J., Björkman, C., Reichel, M.P., Trees, A.J., 2007. Immunization of cattle with live tachyzoites of *Neospora caninum* confers protection against fetal death. *Infect. Immun.* 75 (3), 1343-1348.
- Williams, D.J., Hartley, C.S., Björkman, C., Trees, A.J., 2009. Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* - how the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease. *Parasitology* 136 (14), 1895-1900.
- 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. *J. Vet. Med. Sci.* 62 (3), 347-351.
- Zhang, H., Compaore, M.K., Lee, E.G., Liao, M., Zhang, G., Sugimoto, C., Fujisaki, K., Nishikawa, Y., Xuan, X., 2007a. Apical membrane antigen 1 is a cross-reactive antigen between *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*, and the anti-NcAMA1 antibody inhibits host cell invasion by both parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* 151 (2), 205-212.
- Zhang, H., Lee, E.G., Liao, M., Compaore, M.K., Zhang, G., Kawase, O., Fujisaki, K., Sugimoto, C., Nishikawa, Y., Xuan, X., 2007b. Identification of ribosomal phosphoprotein P0 of *Neospora caninum* as a potential common vaccine candidate for the control of both neosporosis and toxoplasmosis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 153 (2), 141-148.
- 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. *Exp. Parasitol.* 125 (2), 130-136.
- Zhao, J.C., Zhao, Z.D., Wang, W., Gao, X.M., 2005. Prokaryotic expression, refolding, and purification of fragment 450-650 of the spike protein of SARS-coronavirus. *Protein Expr. Purif.* 39 (2), 169-174.
- Zhao, Z., Ding, J., Liu, Q., Wang, M., Yu, J., Zhang, W., 2009. Immunogenicity of a DNA vaccine expressing the *Neospora caninum* surface protein NcSRS2 in mice. *Acta Vet. Hung.* 57 (1), 51-62.
- Zimmermann, S., Dalpke, A., Heeg, K., 2008. CpG oligonucleotides as adjuvant in therapeutic vaccines against parasitic infections. *Int. J. Med. Microbiol.* 298 (1-2), 39-44.