

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo de un modelo murino gestante de la
infección por "Neospora caninum"**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Inmaculada C. López Pérez

Directores:

**Esther Collantes Fernández
Luis Miguel Ortega Mora**

Madrid, 2011

ISBN: 978-84-694-7135-7

© Inmaculada C. López Pérez, 2011

Desarrollo de un modelo
murino gestante
de la infección
por *Neospora caninum*



Tesis doctoral
Inmaculada C. López Pérez
Madrid, 2010

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Sanidad Animal**



**DESARROLLO DE UN MODELO MURINO GESTANTE
DE LA INFECCIÓN POR *Neospora caninum***

**Tesis doctoral
Dña. Inmaculada C. López Pérez
Madrid, 2010**

**Bajo la dirección de:
Dra. Esther Collantes Fernández
Dr. Luis Miguel Ortega Mora**

Memoria presentada por Dña. Inmaculada C. López Pérez para optar al grado de Doctora por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, Octubre 2010



D. **Luis Miguel Ortega Mora**, Doctor en Veterinaria y Catedrático de Universidad y
Dña. **Esther Collantes Fernández**, Doctora en Veterinaria y Profesora Ayudante Doctor,
adscritos al Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la
Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral titulada "*Desarrollo de un modelo murino gestante de la infección por Neospora caninum*" que presenta la Licenciada en Química Dña. **Inmaculada C López Pérez**, para optar al grado de Doctora por la Universidad Complutense de Madrid con mención europea, ha sido realizada en las dependencias del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid bajo nuestra supervisión y cumple todas las condiciones exigidas para su presentación y defensa.

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

En Madrid, a 11 de Octubre de 2010,

Fdo. Dr. Luis Miguel Ortega Mora
Catedrático de Universidad

Fdo. Dra. Esther Collantes Fernández
Profesora Ayudante Doctor

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la financiación del Ministerio de Ciencia y Tecnología a través del proyecto de investigación CICYT (AGL2001-1362): "*Patogenia de la Neosporosis bovina en el feto y en modelos experimentales. Estudio de las variaciones intraespecíficas en la virulencia*". Durante este trabajo he sido beneficiaria de una beca concedida por dicho Ministerio perteneciente al programa de Formación del Personal Investigador (FP-2001-1133) y de una beca asociada a un artículo 83 entre la Facultad de Veterinaria y Laboratorios HIPRA, S.A.

A Jose y a Marcos

No hay soledad más triste
que la de un hombre sin amigos,
sin los cuales el mundo es un desierto:
quien sea incapaz de sentir amistad,
tiene más de bestia que de hombre.

Barón de Verulam, Francis Bacon (1561-1626)
filósofo y político inglés

Si la amistad desapareciera de la vida,
sería lo mismo que si se apagara el sol,
porque nada mejor ni más deleitoso
hemos recibido de los dioses inmortales.

Cicerón, Marcus Tullius Cicero (106-43 a. C.)
político y escritor latino

Agradecimientos:

Para mí, la principal conclusión de esta tesis no es un modelo murino gestante que funciona. Lo más importante es toda la gente que he tenido la oportunidad de conocer y de la que aprender. Tanta, que es difícil de ordenar a quien debes más y a quien algo menos.

Desde luego hay que empezar por Luis, el jefe, que se arriesgó al confiar en una química que trabajaba con ratas para hacer un trabajo de veterinario con ratones. Una persona que hace que te esfuerces cada día porque cuando más hablas con él, más te das cuenta de lo mucho que te queda por aprender. Gracias por no dejarme bajar nunca la guardia. Mis neutrófilos te lo agradecen.

Esther: que empezó siendo una compañera de laboratorio que me enseñaba el mundo de la patogenia y que se ha terminado convirtiéndose en la jefa. Me has dedicado mucho mucho tiempo y mucha muchísima paciencia. Me has aguantado a pesar de mi "dulce y sincero" carácter y me has dado la oportunidad de acabar esta tesis. Después de todos nuestros momentos de crisis, puedo decir que más que una jefa, lo que me llevo en el corazón es una amiga para toda la vida.

Gema: qué bonitos fueron esos primeros días que cuidabas de mí y cómo han cambiado las cosas desde entonces. ¡Quién nos lo iba a decir! Gracias por enseñarme el mundo de la parasitología y por esas "luchas" a todas horas que, al final, han fortalecido el "débil" carácter con el que entré.

Vanesa: gracias por prepararme las innumerables dosis de infección para los ratoncillos, que no han sido pocas. Pero sobretodo, gracias por el tiempo que hemos pasado dentro y fuera del laboratorio, por nuestras interminables conversaciones y por estar siempre ahí cuando te he necesitado, en los buenos y malos momentos.

Silvia: la otra jefa. Gracias por enseñarme que siempre hay que esforzarse un poquito más. Por escuchar todas mis penas y por dejarme escuchar tus inquietudes y descubrir que no estoy sola en esto de la tesis. Por tener siempre una palabra amable y una sonrisa para todo el mundo.

Susana: mi aliada química en un mundo de veterinarios. Siempre dando un toque de sensatez al gallinero. Aunque no lo creas, nos has dejado de enseñarme cosas desde el primer día que volví de mi estancia, allá por el año... Gracias por acogerme en "la madriguera" en mis últimos meses en el mundo saluветiano, por tu apoyo constante y por no dejar que me rinda.

Auro: ¿Qué se puede decir de la persona que te abre puertas sin concertarte? Gracias por darme la oportunidad de conocer a todos mis compañeros. Por enseñarme que siempre hay que intentar superarse, ser una mejor persona y darse a los demás sin esperar nada a cambio.

Fran: qué miedo tenía cada vez que te veía aparecer por la puerta para preguntarme como habían ido las "cuantitas". Pero solo hay que escarbar un poquito para ver la gran persona que hay debajo de ese manojo de nervios. Creo que después de leer esto, comprobarás que la puerta siempre ha estado abierta.

Lobito: ese chico segoviano de la ESO que ya me descolocó el primer día preguntándome quién era Paulin. Difícil carácter cuando no se le conoce, pero gran corazón cuando hablas con él. Gracias por ese punto de vista tan peculiar.

Verónica: por las interminables discusiones acerca de todo y de nada y por hacer que me esfuerce cada día para seguir tu ritmo.

Sonia Rodríguez, la Choni: por "calarme" desde el primer día y defenderme delante de todos. Por tu cariño constante y por ese buen humor que te caracteriza.

Al resto del laboratorio: Javier, Adriana, Virginia, Fran, Ignacio, Cinta, Belén Ofelia, Claudia y Javier Moreno: gracias por vuestro cariño y por aceptarme tal y como soy.

Por estar ahí siempre que he necesitado algo y por compartir tantos días de laboratorio. En especial, gracias al hombre-taquilla por esa visión tan especial de las cosas. A Elena, Jesús Alberto y Carmen, recientes adquisiciones del grupo, pero no por ello menos importantes. Ya sabéis que se dice: lo breve, si bueno...

Enrique, Raquel Expósito y Rinaldo: que, con la excusa de enseñaros la extracción de ADN y la PCR, os exploté un poquito para adelantar un montón de trabajo. Gracias, sobretodo a Enriquito que, a pesar de estar a miles de kilómetros, sigues haciéndome sonreír.

Mercedes: por resolver todas mis dudas acerca del maravilloso mundo de la parasitología.

Chema e Isabel: por esos monólogos acerca de todo, que siempre logran arrancarme una sonrisa cada vez que aparecéis en el laboratorio.

Juana Pereira: por tu constante dedicación para que yo tuviera mis resultados y por estar ahí cuando te he necesitado.

Valentín Pérez y Antonio Rodríguez: por sumergirme en el mundo de la anatomía patológica y por hacerme entender un poco más (aunque no del todo) todas esas incomprensibles lesiones.

Ángel Zaballos: por tu inagotable paciencia para resolver mis dudas acerca de la RT-PCR y los deltas Cts.

Ricardo García Mata, del Centro de Cálculo de la UCM: gracias por tu paciencia con mis interminables tablas de datos, con tantos grupos y factores. Gracias por sumergirme en el maravilloso mundo de la estadística.

Elisabeth Innes, Steve Wright, Paul Bartley, Louise Gibbard and all the people from the Moredun Research Institute: I'm deeply in debt because you took care of me during my stage in Scotland. I thank you for the worthy and joyful time I shared with all of you.

I'm very grateful to Dr. Helder Cortes and again to Dr. Elisabeth Innes as external expert readers of my doctoral thesis.

Mis padres: por cuidar de mí y permitirme hacer siempre "lo que más me gusta", que es estar en el laboratorio, aunque estuviera viviendo del cuento durante algún tiempo. Gracias por dejarme todas las puertas abiertas y poder tomar mis decisiones.

A Marcos: que te presentaste sin avisar y que me has cambiado la vida. Aunque me ha costado un poco hacerme a esta nueva etapa, cuanto más me sonríes, más me doy cuenta de lo que realmente tiene que ser importante.

A Jose, mi chu: por iluminar mi irracionalidad, por estar siempre cerca de mí y quererme, a pesar de todo. *"The smile on your face lets me know that you need me. There's a truth in your eyes saying you'll never leave me. The touch of your hand says you'll catch me whenever I fall. You say it best when you say nothing at all".*

Lista de Publicaciones.

El desarrollo de esta tesis ha dado lugar a la publicación, en revistas científicas, de los siguientes artículos:

1. **López-Pérez IC, V Risco-Castillo, E Collantes-Fernández y LM Ortega-Mora.** Comparative effect of *Neospora caninum* infection in BALB/c mice at three different gestation periods. *The Journal of Parasitology*, 92 (6): 1286-1291, 2006.
2. **López-Pérez IC, E Collantes-Fernández, A Aguado-Martínez, A Rodríguez-Bertos y LM Ortega-Mora.** Influence of *Neospora caninum* infection in BALB/c mice during pregnancy in post-natal development. *Veterinary Parasitology*, 155 (3-4): 175-183, 2008.
3. **López-Pérez IC, E Collantes-Fernández, S Rojo-Montejo, V Navarro-Lozano, V Risco-Castillo, V Pérez-Pérez, J Pereira-Bueno y LM Ortega-Mora.** Effects of *Neospora caninum* infection at mid-gestation on placenta in a pregnant mouse model. *The Journal of Parasitology*, 96 (5): 1017-1020, 2010.
4. **López-Pérez IC, E Collantes-Fernández, S Rojo-Montejo, V Navarro-Lozano, V Risco-Castillo, V Pérez-Pérez, J Pereira-Bueno y LM Ortega-Mora.** Pathological and immunological findings on placenta from pregnant BALB/c mice infected with *Neospora caninum* at early and late gestation. *Acta Parasitologica*, enviado.

Índice

Listado de abreviaturas.....	v
Listado de figuras.....	vii
Listado de tablas.....	xi

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

1. <i>Neospora caninum</i> Y NEOSPOROSIS BOVINA.....	3
1.1. Taxonomía.....	4
1.2. Estadios parasitarios.....	5
Taquizoítos.....	5
Bradizoítos.....	5
Esporozoítos.....	6
1.3. Ciclo biológico.....	6
Ciclo sexual.....	6
Ciclo asexual.....	7
1.4. Transmisión.....	8
1.5. Patogenia.....	9
1.5.1. Fase de la gestación.....	11
1.5.2. Exposición previa y modo de transmisión de la infección.....	12
1.5.3. Aislado del parásito.....	13
1.6. Respuesta inmunitaria.....	13
1.7. Signos clínicos y lesiones.....	14
1.8. Diagnóstico.....	15
1.9. Control.....	16
2. LA NEOSPOROSIS EN EL MODELO MURINO EXPERIMENTAL.....	17
2.1. Modelo murino no gestante.....	17
2.1.1. Patogenia.....	20
Fase aguda.....	20
Fase crónica.....	22
2.1.2. Respuesta inmunitaria.....	22
Celular.....	22
Humoral.....	24
2.2. Modelo murino gestante.....	24
2.2.1. Patogenia.....	24
Mortalidad fetal.....	24
Transmisión vertical.....	27
Gestaciones sucesivas.....	27
2.2.2. Respuesta inmunitaria.....	27
3. IMPORTANCIA DE LA PLACENTA EN LA PATOGENIA DE LA INFECCIÓN.....	28
3.1. Estructura y función.....	29
3.2. Placenta y neosporosis.....	30
3.3. Respuesta inmunitaria.....	31
4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	33

CAPÍTULO II. COMPARATIVE EFFECT OF *Neospora caninum* INFECTION IN BALB/c MICE AT THREE DIFFERENT GESTATION PERIODS

Abstract.....	37
1. Introduction	38
2. Materials and methods.....	39
2.1. Mice.....	39
2.2. Parasite and preparation of inoculum	39
2.3. Experimental design	39
2.4. Parameters evaluated.....	40
2.5. Samples from dams and offspring	40
2.6. DNA extraction and nested PCR detection.....	41
2.7. Real-time PCR.....	41
2.8. Analysis of data.....	41
3. Results.....	42
3.1. <i>Neospora caninum</i> infection in dams.....	42
Morbidity	42
Presence of parasite DNA in dams sample	42
3.2. Evaluation of <i>N. caninum</i> infection in progeny.....	43
Foetal mortality, stillbirth, and litter size	43
Neonatal mortality and morbidity	44
Vertical transmission and parasite burden	46
4. Discussion.....	47
5. Acknowledgments	49
6. Literature cited	50

CAPÍTULO III. INFLUENCE OF *Neospora caninum* INFECTION IN BALB/c MICE DURING PREGNANCY IN POST-NATAL DEVELOPMENT

Abstract.....	55
1. Introduction	56
2. Materials and methods.....	57
2.1. Mice.....	57
2.2. Parasite and preparation of inoculum	57
2.3. Experimental design and samples	57
2.4. Parameters evaluated.....	58
2.5. DNA extraction and nested PCR detection.....	58
2.6. Histopathological analysis	58
2.7. Serum IgG analysis	58
2.8. Analysis of data.....	59
3. Results.....	59
3.1. Post-natal morbidity.....	59
3.2. Body weight	60
3.3. Post-natal mortality.....	60
3.4. Vertical transmission.....	61
3.5. Histopathological lesions	62
3.6. Serum IgG in neonates.....	63
4. Discussion.....	63
5. Acknowledgements	66
6. Literature cited	66

CAPÍTULO IV. EFFECTS OF *Neospora caninum* INFECTION AT MID-GESTATION ON PLACENTA IN A PREGNANT MOUSE MODEL

Abstract.....	71
1. Introduction.....	72
2. Materials and methods	72
2.1. Mice.....	72
2.2. Experimental design and samples	72
2.3. Detection and quantification of <i>N. caninum</i> DNA.....	73
2.4. Total RNA extraction and real-time RT-PCR.....	73
2.5. Histopathological studies	73
2.6. Analysis of data.....	73
3. Results	74
3.1. <i>N. caninum</i> infection in dams	74
3.2. Foetal mortality.....	74
3.3. <i>N. caninum</i> DNA presence and parasite load	75
3.4. Cytokine expression.....	76
3.5. Histopathological lesions in foetal placenta.....	76
4. Discussion	77
5. Acknowledgements.....	79
6. Literature cited.....	79

CAPÍTULO V. PATHOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL FINDINGS ON PLACENTA FROM PREGNANT BALB/c MICE INFECTED WITH *Neospora caninum* AT EARLY AND LATE STAGES OF GESTATION

Abstract.....	85
1. Introduction.....	86
2. Materials and methods	87
2.1. Mice	87
2.2. Parasite and preparation of inoculum.....	87
2.3. Experimental design and samples.....	87
2.4. Detection and quantification of <i>N. caninum</i> DNA	88
2.5. Total RNA extraction and real-time RT-PCR.....	88
2.6. Histopathological studies	89
2.7. Analysis of data	89
3. Results	89
3.1. Foetal mortality	89
3.2. <i>N. caninum</i> DNA presence and parasite load.....	90
3.3. Cytokine expression	91
3.4. Histopathological lesions in foetal placenta.....	93
4. Discussion	94
5. Acknowledgements.....	97
6. Literature cited.....	97

CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN GENERAL	103
CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	115
RESUMEN/SUMMARY	119
BIBLIOGRAFÍA	125

Listado de abreviaturas

°C: grados centígrados
ADN/DNA: ácido desoxirribonucleico
ANOVA: análisis de la varianza
ARN/RNA: ácido ribonucleico
BALB/c *nu/nu*: BALB/c atímicos
BSA: albúmina sérica bovina (del inglés: *bovine serum albumine*)
BVDV: virus de la diarrea vírica bovina (del inglés: *bovine viral diarrhoea virus*)
c.c.: cultivos celulares
cDNA: ADN complementario (del inglés: *complementary DNA*)
CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad
CO₂: dióxido de carbono
Ct: ciclo umbral (del inglés: *cycle threshold*)
CY: ciclofosfamida
dg: días de gestación
EDTA: ácido etilendiaminotetracético
ELISA: Ensayo Inmunoenzimático
g: fuerza de la gravedad
gr: gramo
i.g.: vía intragástrica
i.p.: vía intraperitoneal
i.v.: vía intravenosa
IFI: Inmunofluorescencia Indirecta
IFN- γ : interferón- γ
IgG1, IgG2: inmunoglobulinas del isotipo 1, 2
IHQ: inmunohistoquímica
IL-: interleuquina
iNOS2: enzima oxido nítrico sintasa inducible
ITS1: espacio de transcripción interna-1 (del inglés: *internal transcribed spacer I*)
k: número de grupos
Kg: kilogramo
mg: miligramo
mm: milímetro
MPA: acetato de metil-prednisolona (del inglés: *methyl-prednisolone acetate*)
n.e.: no especificado
n.d.: no detectado
ng: nanogramo
NK: células asesinas (del inglés: *Natural Killer*)
nm: nanómetro
No./no.: número
NO: óxido nítrico
o.: vía oral
PBS: tampón fosfato salino (del inglés: *phosphate-buffered saline*)
PBS-T-BSA: tampón fosfato salino-tween-albúmina sérica bovina (del inglés: *phosphate-buffered saline-tween-bovine serum albumine*)
PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés: *polymerase chain reaction*)
PI: post-infección
PP: post-parto
rRNA: ARN ribosómico (del inglés: *ribosomic RNA*)

RT-PCR: transcripción reversa-reacción de la cadena de polimerasa (del inglés: *reverse transcription polymerase chain reaction*)

s.c.: vía subcutánea

SCID-Bg: deficiente en células T y B funcionales y en un 50% en células asesinas

SE: error estándar (del inglés: *standard error*)

SNC/CNS: Sistema Nervioso Central/*Central Nervous System*

TLR-4: receptor toll 4 (del inglés: *toll-like receptor 4*)

TNF- α : factor de necrosis tumoral- α (del inglés: *tumour necrosis factor alfa*)

TNFR2: receptor 2 del factor de necrosis tumoral (del inglés: *tumour necrosis factor receptor 2*)

UV: ultravioleta

v.o.: vía oral

Vin: vinblastina

β 2M: receptor beta 2 microglobulina

μ g: microgramo

μ l: microlitros

μ m: micrometro

μ MT: deficiente en células B

Listado de Figuras

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Figura 1. Tasa de prevalencia individual de la infección por *N. caninum* en rebaños bovinos de leche en Europa.

Figura 2. Clasificación taxonómica de *Neospora caninum*.

Figura 3. Estadios en el ciclo biológico de *N. caninum*. (A) Taquizoítos del asilado Nc-1 en cultivo celular (Microscopía electrónica). (B) Quiste tisular con bradizoítos (Inmunohistoquímica, x400). (C) Ooquiste esporulado con dos esporoquistes y cuatro esporozoítos cada uno (cortesía del Dr. Gereon Schares. Microscopía óptica, x1000).

Figura 4. Ciclo biológico de *Neospora caninum* (adaptado de Dubey et al., 2007). El cuadro azul engloba el ciclo sexual del parásito, mientras que el cuadro verde incluye el ciclo asexual.

Figura 5. Transmisión de la neosporosis bovina (adaptado de Trees y Williams, 2005).

Figura 6. Estructura de la placenta en vacas y en ratones en función de la clasificación histológica de Grosser y morfológica de Strahl (adaptado de Ruberte et al., 2009; Teisaire et al., 2010).

Figura 7. Posible desenlace de la gestación en función del tipo de respuesta inmune desarrollada por la madre tras la infección con *N. caninum* durante la gestación (adaptada de Quinn et al., 2002b). Una respuesta dominante de tipo 1 en el sistema inmunitario materno podría dar lugar a la sobreproducción de citoquinas inflamatorias, que favorecen el control de la infección pero que son perjudiciales para la supervivencia del feto. Por el contrario, una respuesta dominante de tipo 2 permite el desarrollo del feto, pero no puede controlar adecuadamente la infección por el parásito, causando un aumento de la carga parasitaria en la madre y facilitando la transmisión transplacentaria del parásito.

CAPÍTULO II. COMPARATIVE EFFECT OF *Neospora caninum* INFECTION IN BALB/c MICE AT THREE DIFFERENT GESTATION PERIODS

Figure 1. Graph showing the mean body weight of neonates on day 1 and 7 post-partum (PP) for infected (white bars) and uninfected mice (black bars). (*: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$).

Figure 2. Box-plot graph representing the lower and upper quartiles and median values for lung and brain parasite burden in infected pups at day 1 and 7 post-partum (PP).

CAPÍTULO III. INFLUENCE OF *Neospora caninum* INFECTION DURING PREGNANCY IN POST-NATAL DEVELOPMENT IN BALB/c MICE

Figure 1. Body weight of neonates born from dams infected on days 0, 7 and 14 of gestation with 2×10^6 tachyzoites (groups A, B1 and C, respectively) and on day 7 of pregnancy with 2×10^5 tachyzoites (group B2). Each point represents the mean of the body weight of all animals per group. PP: post-partum.

Figure 2. Kaplan-Meier survival curves for neonates born from dams infected on day 0, 7 and 14 of gestation with 2×10^6 tachyzoites (groups A, B1 and C, respectively) and on day 7 of gestation with 2×10^5 tachyzoites (group B2). Curves represent the percentage of animals surviving. Vertical steps downward correspond to days PP when a death was observed. Symbols (■, ◆, ▲, •, ▼) indicate censored observations. The number of dead mice was registered daily. PP: post-partum.

Figure 3. ELISA anti-*N. caninum* IgG from neonates sacrificed on days 30 and 60 PP from dams infected on days 0, 7 and 14 of gestation with 2×10^6 tachyzoites (groups A, B1 and C, respectively) and on day 7 of gestation with 2×10^5 tachyzoites (group B2). Bars represent the mean absorbance and error bars are the standard deviations for each group. Antibody levels that were significantly higher than those from the non-infected group are denoted by asterisks (***) : $P < 0.0001$). PP: post-partum.

CAPÍTULO IV. EFFECTS OF *Neospora caninum* INFECTION AT MID-GESTATION ON PLACENTA IN A PREGNANT MOUSE MODEL

Figure 1. The parasite load in resorptions, placenta, foetuses, and foeto-placental units following infection of dams with 2×10^6 Nc-1 tachyzoites on day 7 of gestation. The data are represented as individual points for the parasite load in each sample, and they were horizontally spread out for ease of visualizing overlapping values. The horizontal line corresponds to the mean value. Considering the fact that the *N. caninum* detection limit by real-time PCR is 10^{-1} parasites (Collantes-Fernández et al., 2002), all of the positive samples had ≥ 0.1 parasites, while the negative samples (0 parasites) are represented on the log scale as < 0.1 parasites.

Figure 2. The cytokine expression in the spleen and foetal placentas from the infected dams compared to the uninfected animals. β -actin was used as an endogenous reference for each corresponding sample. Each determination was performed in triplicate, and the results of real time RT-PCR are given by $-\Delta\Delta Ct$. The $-\Delta\Delta Ct$ value for the control group is zero. The bars represent the mean of cytokine expression and the standard error. The asterisks represent the significant differences between the infected and uninfected dams using the Student's *t*-test (**: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$).

Figure 3. TNF- α expression in the nested-PCR-positive and negative placentas from the infected dams. The data are represented as individual points in each sample, and the horizontal line corresponds to the median value.

CAPÍTULO V. PATHOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL FINDINGS ON PLACENTA FROM PREGNANT BALB/c MICE INFECTED WITH *Neospora caninum* AT EARLY AND LATE STAGES OF GESTATION

Figure 1. Parasite load in foetoplacental units, placentas, foetuses, and resorptions following infection of dams with 2×10^6 Nc-1 tachyzoites on day 0 (group 1) or day 14 of gestation (group 2). Dams from group 1 were sacrificed on days 7 and 14 of gestation, and dams from group 2 were sacrificed on day 17 of gestation. Each point represents the parasite load of a single sample, and the points were horizontally spread out for ease of visualizing overlapping values. Horizontal lines correspond to mean value for each type of sample. Because the *N. caninum* detection limit by real-time PCR is 10^{-1} parasites (Collantes-Fernández et al., 2002), all positive samples had ≥ 0.1 parasites, while negative samples (0 parasites) were represented on the log scale as having < 0.1 parasites.

Figure 2. Cytokine expression in spleens and foetal placentas from infected and uninfected dams. β -actin was employed as an endogenous reference for each corresponding sample, and each determination was performed in triplicate. The relative n-fold change in expression of each target cytokine was normalized to the endogenous reference (β -actin) and calculated relative to the control group to produce the $-\Delta\Delta C_t$ value (Livak y Schmittgen, 2001). The $-\Delta\Delta C_t$ value for control group was zero. Data were horizontally spread out for ease of visualizing overlapping values. The bars represent the mean values of cytokine expression and the standard error. The asterisks represent significant differences between infected and uninfected dams by the Student *t*-test (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$).

Figure 3. IFN- γ , IL-10 and TNF- α expression in PCR-positive and -negative placentas from group 1. The data are represented as individual points in each sample, and the horizontal line corresponds to the median value.

Figure 4. Placental lesions associated with *N. caninum* infection. Zones of necrosis were observed in both foetal and maternal placental tissues in group 1 (panel A), whereas necrotic areas, surrounded by a slight mononuclear inflammatory infiltrate, were only found in maternal placental tissue from group 2 (panel B). Scale bar = 10 μ m.

Listado de Tablas

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Tabla 1. Consecuencias de la infección por *N. caninum* en función del momento de gestación.

Tabla 2. Modelos murinos no gestantes de la infección por *N. caninum* según la estirpe de ratón, el aislado, la dosis y la vía de inoculación empleados.

Tabla 3. Modelos murinos de la infección por *N. caninum* en ratones defectivos.

Tabla 4. Modelos murinos gestantes de la infección por *N. caninum* en función del periodo de gestación en el que se realiza la infección.

Tabla 5. Estructura y características de las placentas de los rumiantes y roedores según la clasificación morfológica de Strahl e histológica de Grosser (adaptado de Entrican, 2002).

CAPÍTULO II. COMPARATIVE EFFECT OF *Neospora caninum* INFECTION IN BALB/c MICE AT THREE DIFFERENT GESTATION PERIODS

Table 1. Detection of *N. caninum* in tissues of dams infected on day 0 (group A), day 7 (group B), and day 14 (group C) of gestation.

Table 2. Effect of *N. caninum* infection in dams infected on day 0 (group A), day 7 (group B), and day 14 (group C) of gestation on foetal mortality, stillbirth, and littermate size.

Table 3. Vertical transmission of *N. caninum* in dams infected on day 0 (group A), day 7 (group B), and day 14 (group C) of gestation on days 1 and 7 post-partum (PP).

CAPÍTULO III. INFLUENCE OF *Neospora caninum* INFECTION DURING PREGNANCY IN POST-NATAL DEVELOPMENT IN BALB/c MICE

Table 1. Vertical transmission of *N. caninum* in dams infected on days 0, 7 and 14 of gestation with 2×10^6 tachyzoites (groups A, B1 and C, respectively) and on day 7 of gestation with 2×10^5 tachyzoites (group B2).

CAPÍTULO IV. EFFECTS OF *Neospora caninum* INFECTION AT MID-GESTATION ON PLACENTA IN A PREGNANT MOUSE MODEL

Table 1. Effect on the foetal mortality of *Neospora caninum* infection in dams infected on day 7 of gestation and sacrificed on day 14 of gestation (7 days PI).

Table 2. Detection of *N. caninum* DNA by nested-PCR in foetoplacental units, fetuses, resorptions and placentas from mice infected on day 7 of gestation with 2×10^6 Nc-1 tachyzoites and sacrificed on days 10 (3 days PI) and 14 of gestation (7 days PI).

CAPÍTULO V. PATHOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL FINDINGS ON PLACENTA FROM PREGNANT BALB/c MICE INFECTED WITH *Neospora caninum* AT EARLY AND LATE STAGES OF GESTATION

Table 1. Effect of infection with *Neospora caninum* on day 0 (group 1) of gestation on the foetal mortality. Dams were sacrificed on day 14 of gestation.

Table 2. Detection of *N. caninum* DNA by nested-PCR in foetoplacental units, foetuses, resorptions and placentas from mice infected on days 0 (group 1) and 14 (group 2) of gestation with 2×10^6 Nc-1 tachyzoites. Dams from group 1 were sacrificed on days 7 and 14 of gestation and dams from group 2 were sacrificed on day 17 of gestation.

Capítulo I

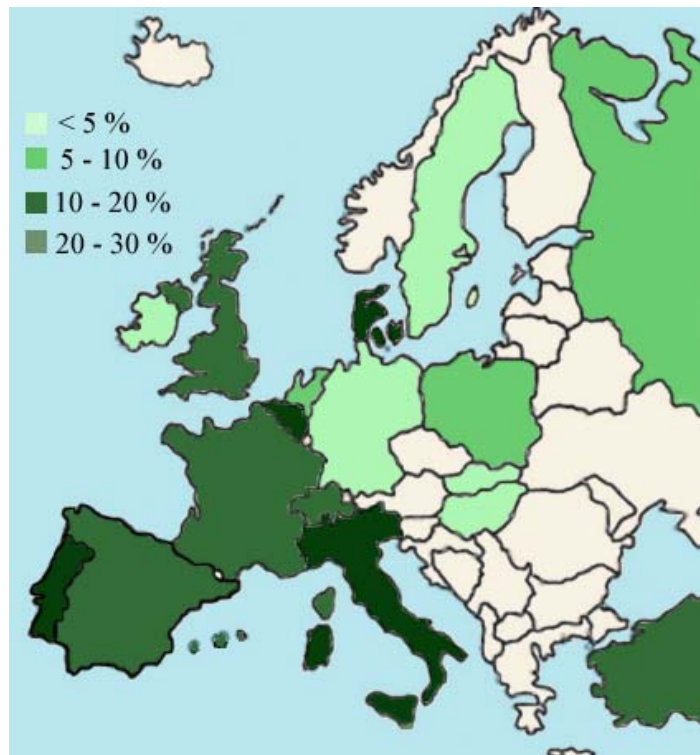
Antecedentes y Objetivos

1. *Neospora caninum* Y NEOSPOROSIS BOVINA

Neospora caninum es un protozoo parásito considerado como el agente etiológico de la neosporosis bovina, enfermedad que cursa con aborto, mortalidad neonatal y nacimiento de terneros con signos clínicos neuromusculares. En 1989 se describió por primera vez a *N. caninum* como agente causante de aborto bovino (Thilsted y Dubey, 1989) y estudios posteriores demostraron que este parásito tiene una distribución cosmopolita y es una de las principales causas de fallo reproductivo en esta especie doméstica (Anderson et al., 1991; Barr et al., 1991a; Thornton et al., 1991). Sin embargo, también puede afectar a otras especies animales de relevancia veterinaria como la oveja (Dubey et al., 1990a), la cabra (Barr et al., 1992), el caballo (Hamir et al., 1998; Marsh et al., 1996) y el perro (Cheadle et al., 1999).

En la actualidad, la neosporosis bovina está considerada como una enfermedad parasitaria de distribución cosmopolita, que ocasiona importantes pérdidas económicas. Numerosos estudios serológicos indican que la infección tiene lugar tanto en el ganado bovino de leche como en el de carne y, en algunos casos, el número de animales infectados en un rebaño puede aproximarse al 100 % (Dubey y Schares, 2006a). En la Figura 1, se muestra la tasa de prevalencia individual en rebaños de leche en Europa. Entre los países europeos incluidos en un estudio comparativo, en España se han observado un 16,2 % de prevalencia en el ganado lechero, con más del 10 % de los rebaños con valores de seroprevalencia intrarrebaño entre 50 y 100 % (Bartels et al., 2006), siendo uno de los países con una tasa de prevalencia más alta.

Figura 1. Tasa de prevalencia individual de la infección por *N. caninum* en rebaños bovinos de leche en Europa.



La frecuencia de la infección fetal por *N. caninum* también es elevada. En un estudio realizado sobre un total de 80 fetos procedentes de la zona norte y centro de España, la tasa de infección fetal varió entre 10,7 y 38,8 %, dependiendo de la técnica diagnóstica empleada (Pereira-Bueno et al., 2003). En otros países europeos como Suiza (Sager et al., 2001) o Francia (Pitel et al., 2001), la frecuencia de infección fetal por *N. caninum* es también alta. Además, las vacas infectadas tienen un riesgo de aborto entre 2 y 3 veces superior respecto a los animales seronegativos (Paré et al., 1997; Pfeiffer et al., 2002; Wouda et al., 1998).

1.1. Taxonomía

Neospora caninum es un coccidio formador de quistes que se incluye en el phylum Apicomplexa, clase Sporozoea, subclase Coccidia, orden Eucoccidia, suborden Eimeriina y familia Sarcocystidae. Esta familia incluye los géneros *Toxoplasma*, *Hammondia*, *Besnoitia*, *Cystoisospora*, *Sarcocystis* y *Frenkelia* (Dubey et al., 1988a; Dubey et al., 2002) (Figura 2). Esta clasificación ha sido confirmada mediante diversos estudios de genética molecular (Guo y Johnson, 1995; Holmdahl y Mattson, 1996; Holmdahl et al., 1997; Marsh et al., 1995) y con la redescrición de *N. caninum* como una especie distinta a otras ya descritas de la familia Sarcocystidae (Dubey et al., 2002).

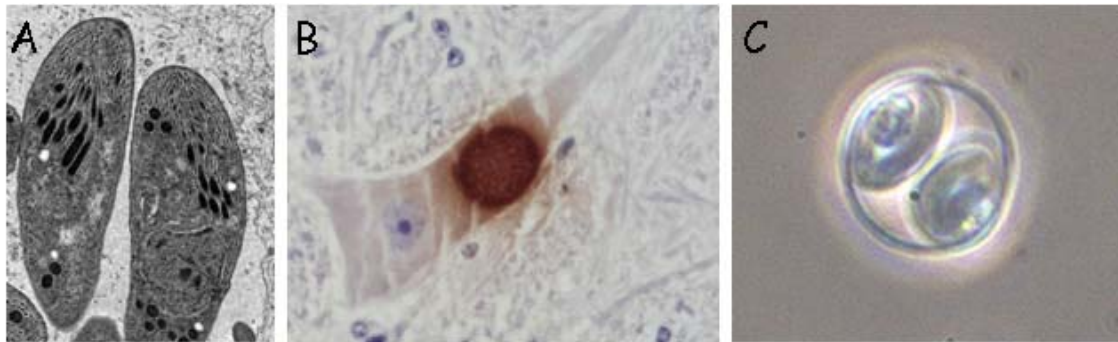
Figura 2. Clasificación taxonómica de *Neospora caninum*.

Reino	Eukaryota
Subreino	Protozoa
Phylum	Apicomplexa
Clase	Sporozoea
Subclase	Coccidia
Orden	Eucoccidiida
Suborden	Eimeriina
Familia	Sarcocystiidae
Genero	<i>Toxoplasma</i>
	<i>Cystoisospora</i>
	<i>Sarcocystis</i>
	<i>Neospora</i>
	<i>Frenkelia</i>
	<i>Besnoitia</i>
	<i>Hammondia</i>

1.2. Estadios parasitarios

En el ciclo biológico de *N. caninum* se pueden distinguir tres estadios parasitarios: taquizoíto, bradizoíto y esporozoíto (Figura 3). Los taquizoítos y los bradizoítos son estadios de proliferación asexual que se encuentran en los tejidos de los hospedadores infectados intermedios, mientras que los esporozoítos están localizados dentro de los ooquistes esporulados (Dubey et al., 2006b; McAllister et al., 1998).

Figura 3. Estadios en el ciclo biológico de *N. caninum*. (A) Taquizoítos del asilado Nc-1 en cultivo celular (Microscopía electrónica). (B) Quiste tisular con bradizoítos (Inmunohistoquímica, x400). (C) Ooquiste esporulado con dos esporoquistes y cuatro esporozoítos cada uno (cortesía del Dr. Gereon Schares. Microscopía óptica, x1000).



Taquizoítos

Los taquizoítos son las formas de multiplicación rápida del parásito durante la fase aguda de la infección (Lindsay et al., 1992; Speer et al., 1999). Pueden ser ovoides, lunares o globulares y miden entre 3 y 7 μm de largo y 1 y 5 μm de ancho (Dubey et al., 1988a; Dubey et al., 2002; Lindsay et al., 1993; Speer et al., 1999). Estructuralmente, poseen todas las organelas características de los parásitos pertenecientes al phylum Apicomplexa: dos anillos apicales, un anillo polar, un conoide, una película y una membrana interna doble, microtúbulos subpeliculares, micronemas, roptrias y un poro posterior (Speer et al., 1999).

Bradizoítos

Los bradizoítos son las formas de multiplicación lenta del parásito, típicas de la fase crónica de la infección y se encuentran dentro de los quistes tisulares (Dubey, 1999a). Hasta la fecha, la presencia de quistes parasitarios sólo ha sido descrita en el Sistema Nervioso Central (SNC) y en el tejido muscular (Dubey y Lindsay, 1996; Dubey, 2003; Peters et al., 2001). Los quistes tienen forma redondeada u ovalada, miden entre 50 y 107 μm de longitud

(Dubey, 1999b; Dubey et al., 2006b) y contienen de 20 a 100 bradizoítos en su interior (Speer et al., 1999). Los bradizoítos miden entre 6 y 8 μm de largo y 1 y 1,5 μm de ancho (Dubey et al., 1988a; Speer et al., 1999) y contienen las mismas organelas que los taquizoítos, aunque tienen menor número de roptrias y más gránulos de amilopectina (Jardine, 1996; Speer y Dubey, 1989).

Esporozoítos

Los esporozoítos se encuentran dentro de los ooquistes esporulados. Los ooquistes son eliminados sin esporular en las heces por el hospedador definitivo después de la ingestión de tejidos infectados, son casi esféricos y miden entre 10 y 11 μm de diámetro (McAllister et al., 1998; McAllister, 1999). Después de esporular en el ambiente se observan dos esporoquistes elipsoidales (8,4 x 6,1 μm) en su interior, con cuatro esporozoítos (6,5 x 2,0 μm) cada uno y un cuerpo residual esporoquístico (Dubey et al., 2002; Lindsay et al., 1999a). Aunque los ooquistes son las formas de resistencia del parásito poco se sabe acerca de su supervivencia en el ambiente.

1.3. Ciclo biológico

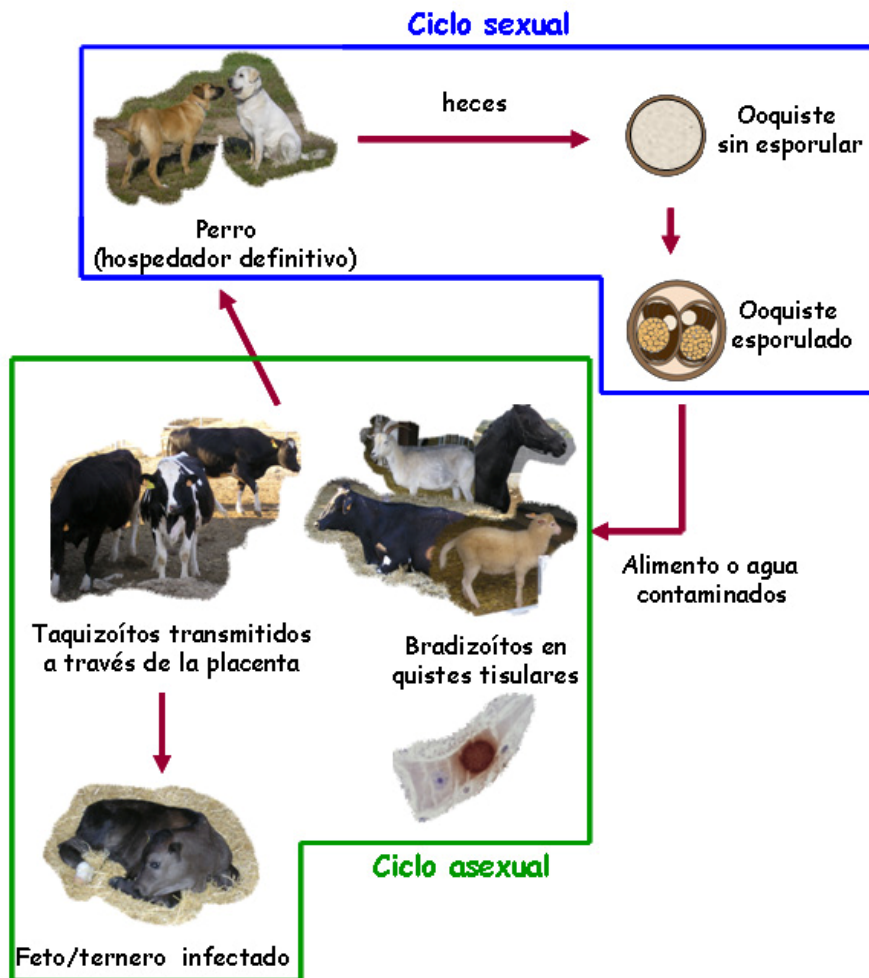
Neospora caninum tiene un ciclo biológico heteroxeno facultativo (Dubey et al., 2006b) (Figura 4), en el que un gran número de especies domésticas y silvestres pueden actuar como hospedadoras. Hasta el momento, sólo el perro (McAllister et al., 1998), el coyote (Gondim et al., 2004a) y el dingo australiano (King et al., 2010) han sido identificados como hospedadores definitivos, habiéndose detectado la presencia de ooquistes en sus heces. Por otro lado, el ganado bovino y un amplio espectro de animales homeotermos, incluidos los cánidos, pueden actuar como hospedadores intermediarios (Dubey et al., 2007; Gondim, 2006).

Ciclo sexual

El ciclo sexual tiene lugar en el hospedador definitivo, demostrándose experimentalmente la eliminación de ooquistes en el perro cuando ingiere tejidos de hospedadores intermediarios infectados, como el ganado vacuno (Dijkstra et al., 2001a; Gondim et al., 2002; Gondim et al., 2004a), búfalos de agua (Rodrigues et al., 2004) y ciervos de cola blanca (Gondim et al., 2004b) con infección natural, así como ratones infectados experimentalmente (Lindsay et al., 1999b; McAllister et al., 1998). Sin embargo, se conoce poco acerca de las posibles fuentes de infección y la eliminación de ooquistes en perros con infección natural sólo se ha descrito en pocos casos (Basso et al., 2001; McGarry et al., 2003; Šlapeta et al., 2002). Aunque aún no se ha demostrado la reproducción sexual del parásito, ésta se produciría en las células epiteliales del intestino del hospedador definitivo, donde tendrían lugar las fases de gametogonia y singamia así como la producción de ooquistes (Williams et al., 2009).

En el ambiente, en condiciones óptimas, los ooquistes esporularían a las 24 horas de su eliminación (Lindsay et al., 1999b), resultando infecciosos a los tres días de haber sido eliminados (McAllister et al., 1998). Aunque nada se sabe acerca de la supervivencia de los ooquistes de *N. caninum* en el ambiente, se ha sugerido que éstos pueden ser la fuente de infección para otros perros (Barber y Trees, 1998; Gondim et al., 2002) y para los bovinos (Bartels et al., 1999; De Marez et al., 1999; Gondim et al., 2002; Gondim et al., 2004c; Lindsay et al., 1999c; Sawada et al., 1998; Wouda et al., 1999).

Figura 4. Ciclo biológico de *Neospora caninum* (adaptado de Dubey et al., 2007). El cuadro azul engloba el ciclo sexual del parásito, mientras que el cuadro verde incluye el ciclo asexual.



Ciclo asexual

Los taquizoítos y los bradizoítos son los estadios invasivos que se multiplican asexualmente en el hospedador intermediario. Después de la ingestión de los ooquistes esporulados, se produciría la liberación de los esporozoítos en el intestino delgado, parasitando en primer lugar el epitelio intestinal, transformándose en taquizoítos y

multiplicándose, posiblemente, en los ganglios linfáticos mesentéricos (Dubey et al., 2006b; Lindsay et al., 1999c). Desde aquí, los taquizoítos podrían alcanzar el torrente sanguíneo produciéndose la diseminación orgánica del parásito (Dubey et al., 2006b). Durante la fase aguda de la infección, los taquizoítos se multiplican intracelularmente por endodiogenia en diversos tipos celulares (Bjerkås y Presthus, 1989; Dubey et al., 1988a; Hemphill, 1999; Speer y Dubey, 1989). En la fase crónica, la respuesta inmunitaria del hospedador favorece que los taquizoítos se diferencien en bradizoítos dando lugar a los quistes tisulares, que se localizan principalmente en el tejido nervioso (Barr et al., 1992; Dubey et al., 1988b; Kobayashi et al., 2001), aunque también pueden encontrarse en el tejido muscular esquelético (Peters et al., 2001). Los bradizoítos en el interior del quiste tisular conservan su capacidad infectante durante periodos de tiempo prolongados (Lindsay y Dubey, 1990). Aunque no se conoce el tiempo que pueden permanecer en el SNC del hospedador, en ratones inoculados experimentalmente son viables después de un año (McGuire et al., 1997). Durante la gestación, se puede producir la reactivación de los bradizoítos que se diferenciarían en taquizoítos, cruzarían la placenta e infectarían al feto en desarrollo (Williams et al., 2009).

1.4. Transmisión

Los modos de transmisión en el ganado bovino incluyen: el vertical transplacentario (infección congénita) y el horizontal, mediante la ingestión de agua o alimento contaminados con ooquistes de *N. caninum* (infección post-natal) (Dubey et al., 2006b). Recientemente, se han propuesto los términos de transmisión transplacentaria endógena y exógena para describir con mayor precisión el origen de la infección en el feto (Trees y Williams, 2005) (Figura 5). Así, la transmisión transplacentaria exógena tiene lugar después de la primoinfección de la madre por la ruta orofecal, cuando el animal se infecta por la ingestión de ooquistes esporulados. Una vez que el parásito alcanza el torrente circulatorio es capaz de atravesar la placenta e infectar al feto (Dubey, 2003; Dubey et al., 2007; Williams et al., 2009). La transmisión transplacentaria endógena ocurre en animales persistentemente infectados después de la reactivación de la infección crónica durante la gestación (Trees y Williams, 2005). Las consecuencias, tanto de la primoinfección como de la reactivación en una vaca gestante, pueden ser: el aborto, el nacimiento de terneros con sintomatología neuromuscular o el nacimiento de terneros clínicamente sanos pero persistentemente infectados (Dubey et al., 2006b; Williams et al., 2009).

La transmisión endógena es el principal modo de infección en el ganado bovino y parece jugar un papel relevante en la propagación y mantenimiento de la enfermedad (Anderson et al., 2000). Numerosos trabajos basados en la realización de serología precalostrual en terneros demuestran su eficacia en la naturaleza, observándose porcentajes de transmisión que varían entre 44 % (Bergeron et al., 2000) y 95 % (Davison et al., 1999). El ganado bovino permanece infectado de por vida y puede transmitir la infección en gestaciones consecutivas (Barr et al., 1993; Piergili et al., 2003) o intermitentemente (Boulton et al., 1995; Guy et al., 2001; Wouda et al., 1998), siendo un factor importante en el mantenimiento de la infección en el rebaño (Anderson et al., 1997; Björkman et al., 1996; Davison et al., 1999; Hietala y Thurmond, 1999; Paré et al., 1996). Por otro lado, la tasa de transmisión transplacentaria endógena puede ir disminuyendo en gestaciones sucesivas (Dijkstra et al., 2003), lo que sugeriría que los animales pueden desarrollar cierto grado de inmunidad (Anderson et al., 1995; Dijkstra et al., 2003; Romero y Frankena, 2003).

A pesar de la eficacia de la transmisión vertical, existen modelos matemáticos que sugieren que la transmisión endógena por sí misma no es suficiente para mantener la infección en el rebaño (French et al., 1999). Es más, diferentes estudios epidemiológicos (Dijkstra et al., 2001b; Dijkstra et al., 2002; Dijkstra et al., 2008; Wouda et al., 1999) y experimentales (De Marez et al., 1999; Gondim et al., 2004c; McCann et al., 2007; Trees et al., 2002) confirman la existencia de transmisión horizontal. Algunas observaciones importantes a este respecto son los brotes de aborto asociados a *N. caninum* que podrían sugerir una exposición puntual al parásito (McAllister et al., 1996; McAllister et al., 2000; Sager et al., 2005; Yaeger et al., 1994), el aumento con la edad de la seroprevalencia en los animales (Dyer et al., 2000) y la falta de concordancia entre la serología de las madres y de las crías en un rebaño infectado (Dijkstra et al., 2001b; Dyer et al., 2000; Mainar-Jaime et al., 1999; Thurmond et al., 1997; Waldner et al., 1999). Además, diversas evidencias epidemiológicas sugieren que el origen de los abortos epidémicos es una infección post-natal y que la presencia de perros en las granjas aumenta el riesgo de que ocurran estos brotes (Bartels et al., 1999; Hobson et al., 2005; Schares et al., 2004). Por otro lado, otros autores han descrito que la frecuencia de infección post-natal es muy baja (alrededor del 1 % del ganado por año) (Davison et al., 1999; Hietala y Thurmond, 1999) y parece que raramente contribuye a la perpetuación de la infección en el ganado bovino (Reichel y Ellis, 2009).

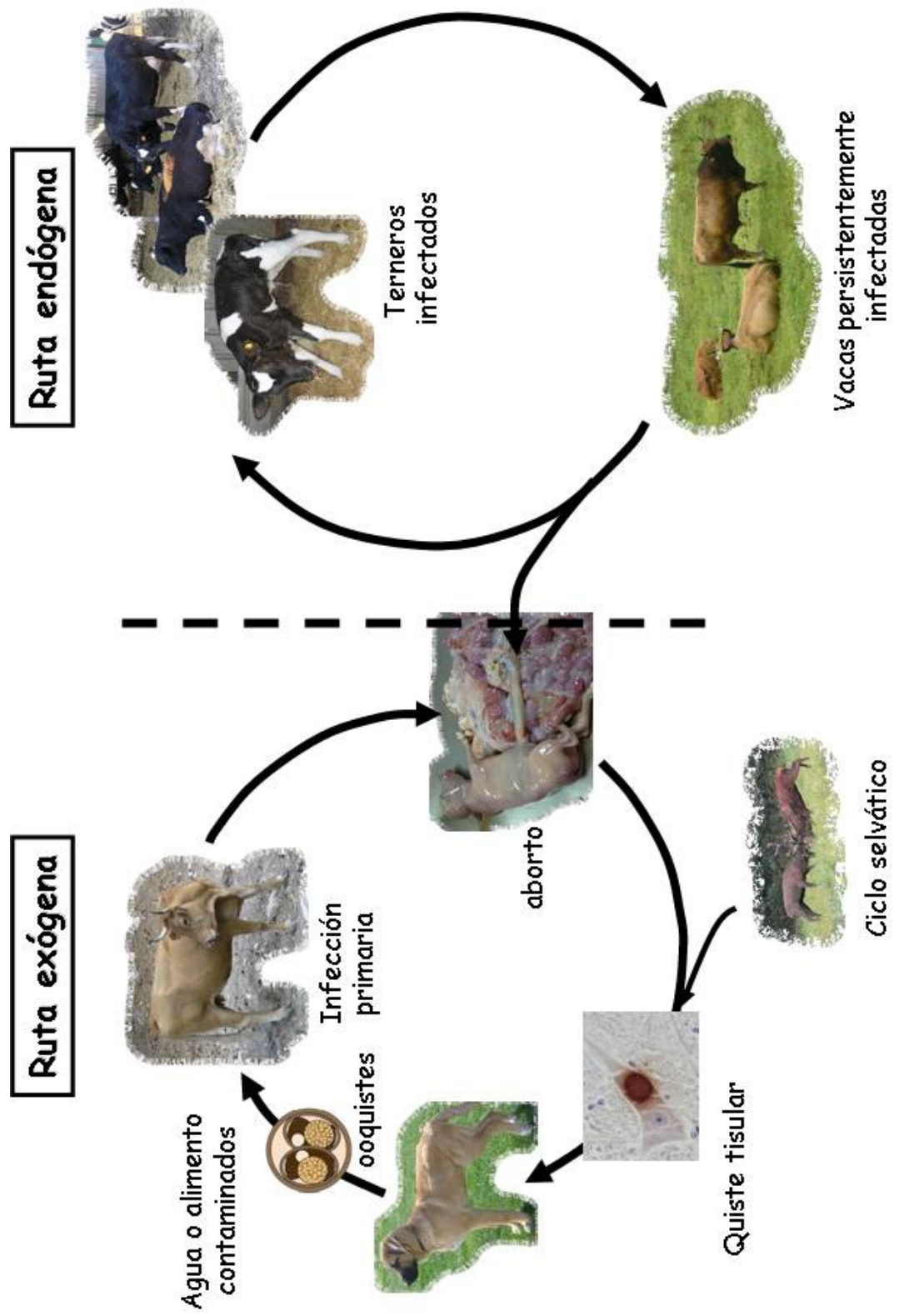
Otras formas de transmisión post-natal, como la ingestión de calostro o leche contaminados, se han demostrado experimentalmente (Davison et al., 2001; Uggla et al., 1998), pero no se ha logrado la infección de terneros después de la administración de leche o calostro procedente de un animal con infección natural (Davison et al., 2001). Por ello, aunque la transmisión galactófora puede ocurrir bajo condiciones experimentales, no parece ser importante en la propagación del parásito en la naturaleza.

Por último, la presencia de ADN de *N. caninum* en muestras de semen fresco y congelado procedente de toros (Ferre et al., 2005; Ortega-Mora et al., 2003; Serrano-Martínez et al., 2007a), sugiere la posibilidad de transmisión venérea. Sin embargo, la baja carga parasitaria encontrada en el semen de toros con infección natural (Ferre et al., 2005) y experimental (Serrano-Martínez et al., 2007a) y la elevada dosis de taquizoítos requerida para infectar novillas por vía intrauterina (Serrano-Martínez et al., 2007b) sugieren que la transmisión venérea de la neosporosis es poco probable.

1.5. Patogenia

La patogenia de la neosporosis en las hembras gestantes es compleja y depende de múltiples factores que, en la actualidad, no se conocen totalmente. Sin embargo, cualquiera que sea el origen de la infección en la madre (reactivación de una infección persistente o ingestión de ooquistes esporulados), es razonable asumir que la infección originaría una parasitemia y la posterior infección del feto (Innes et al., 2000; Innes et al., 2002). Las consecuencias de la infección varían dependiendo del periodo de gestación en que ésta se produce, la inmunidad materna, la susceptibilidad del hospedador, el aislado del parásito y la forma de transmisión (endógena o exógena) (Barr et al., 1994; Buxton et al., 2002; Collantes-Fernández et al., 2006a; Collantes-Fernández et al., 2006b; Conrad et al., 1993a; Innes et al., 2000; Innes et al., 2002; Rojo-Montejo et al., 2009a; Williams et al., 2000; Williams et al., 2009).

Figura 5. Transmisión de la neosporosis bovina (adaptado de Trees y Williams, 2005).



1.5.1. Fase de la gestación

Los resultados obtenidos en infecciones naturales y experimentales han demostrado que la fase de la gestación determina el desenlace de la infección, demostrándose que cuanto más temprano se produzca la infección durante la gestación más graves son las consecuencias para el feto (Barr et al., 1994; Buxton et al., 1998; Collantes-Fernández et al., 2006b; Macaldowie et al., 2004; Maley et al., 2003; Williams et al., 2000) ya que la supervivencia del mismo depende del estado de madurez de su sistema inmunitario y de su capacidad para hacer frente a la infección (Dubey et al., 2006b; Osburn et al., 1982) (Tabla 1).

En estudios experimentales se ha demostrado que cuando la infección tiene lugar antes de la gestación no se produce la transmisión del parásito y se observa el nacimiento de terneros seronegativos (Innes et al., 2001; Williams et al., 2000). Esto podría ser debido a que no hay un número suficiente de taquizoítos que lleguen a la placenta o al feto para provocar la infección del mismo (López-Gatius et al., 2004). La inoculación del parásito en el primer tercio de la gestación (días 70 - 85) ocasiona una rápida muerte del feto (Barr et al., 1994; Dubey et al., 1992a; Gibney et al., 2007; Macaldowie et al., 2004; Williams et al., 2000; Williams et al., 2003), observándose lesiones tanto en la placenta como en el feto y detectándose el parásito mediante inmunohistoquímica y PCR en los tejidos fetales (Barr et al., 1994; Dubey et al., 1992a; Macaldowie et al., 2004).

Cuando la infección se produce en el segundo tercio de la gestación (días 120 - 140) se puede observar la muerte fetal (Barr et al., 1994; Dubey et al., 1992a) o el nacimiento de terneros congénitamente infectados (Innes et al., 2001). Los fetos abortados muestran lesiones histopatológicas compatibles con *Neospora* y el parásito se detecta en los tejidos fetales mediante inmunohistoquímica (Barr et al., 1994; Dubey et al., 1992a). Los fetos nacidos a término presentan un título precalostrado de anticuerpos elevado y el parásito se pone en evidencia por PCR en diferentes órganos (Innes et al., 2001). En este caso, el feto podría ser capaz de desarrollar una respuesta inmunitaria incompleta frente a la infección (Almería et al., 2003; Andrianarivo et al., 2001; Bartley et al., 2004; Innes et al., 2005) que podría ser suficiente, en algunos casos, para garantizar su supervivencia (Dubey et al., 2006b). Algunos estudios han demostrado que los fetos bovinos de 120 - 160 días de gestación poseen cierta capacidad de desarrollar una respuesta inmunitaria mediada por células (Hein et al., 1988; Higgins et al., 1983; Jensen et al., 1988), aunque existe una importante variabilidad individual (Jensen et al., 1988). Esta respuesta inmunitaria mostrada por el feto parece ser suficiente para evitar el aborto y la pérdida fetal, pero no para evitar la transmisión transplacentaria (Williams et al., 2009).

Por último, si la inoculación del parásito se efectúa en el último tercio de la gestación (día 210) raramente se observa muerte fetal, predominando la transmisión vertical del parásito y el nacimiento de terneros sanos pero congénitamente infectados (Barr et al., 1994; Innes et al., 2001; Maley et al., 2003; Williams et al., 2000). Los linfocitos obtenidos de fetos bovinos de esta edad (días 188 y 253 de gestación) ya son capaces de responder a mitógenos y a la estimulación por antígeno de la misma manera que lo hacen en un animal adulto (Tierney y Simpson-Morgan, 1997a; Tierney y Simpson-Morgan, 1997b). Por ello, en el tercer trimestre, el feto ya se considera inmunocompetente (Osburn et al., 1982) y podría controlar la multiplicación del parásito y limitar el desarrollo de lesiones (Dubey et al., 2006b; Innes et al., 2002). En estos animales, la infección intrauterina induce la producción de títulos elevados de anticuerpos específicos precalostrales (Innes et al., 2001). Cabe destacar que el nacimiento de terneros sanos pero congénitamente infectados es el hecho más frecuente en el ganado bovino con infección natural (Paré et al., 1996).

Tabla 1. Consecuencias de la infección por *N. caninum* en función del momento de gestación.

Infección	Sistema inmunitario fetal	Resultado	Referencias
antes de la gestación	----	ternero seronegativo	Innes et al., 2001 Williams et al., 2000
primer tercio (días 70 - 85)	sin desarrollar	mortalidad embrionaria o muerte fetal	Barr et al., 1994 Dubey et al., 1992a Macaldowie et al., 2004 Rojo-Montejo et al., 2009a Williams et al., 2000
segundo tercio-mitad (días 120 - 140)	incompleto	muerte fetal o ternero congénitamente infectado	Barr et al., 1994 Dubey et al., 1992a Innes et al., 2001
tercer tercio (día 210)	en desarrollo	ternero congénitamente infectado (también muerte fetal, ternero con signos clínicos o ternero seronegativo)	Barr et al., 1994 Innes et al., 2001 Maley et al., 2003 Paré et al., 1996 Williams et al., 2000

1.5.2. Exposición previa y modo de transmisión de la infección

Las consecuencias de la infección dependen también de la inmunidad desarrollada por el hospedador y de la forma de transmisión (endógena o exógena). Se ha descrito que el ganado bovino infectado experimentalmente antes de la gestación es capaz de prevenir el aborto y la transmisión transplacentaria del parásito, cuando se reinfecta de nuevo durante la gestación (Innes et al., 2001; Williams et al., 2007). En infecciones naturales, los animales con evidencias de una exposición previa al parásito tienen menos probabilidades de abortar que aquellos con una infección reciente (McAllister et al., 2000). Estas observaciones parecen indicar, que el animal desarrolla un cierto grado de inmunidad protectora lo que reduciría el número de parásitos que infectarían al feto. Sin embargo, en animales con infección congénita, se produce la reactivación del parásito durante la gestación lo que podría dar lugar al nacimiento de un ternero congénitamente infectado o a un aborto, por lo que la inmunidad desarrollada parece que no es lo suficientemente eficaz para prevenir la reactivación del parásito.

Por otro lado y en relación con la forma de transmisión, cuando en granjas libres de neosporosis se produce por primera vez la infección de los animales por la vía horizontal, se

origina un brote epidémico de abortos. En estos fetos, las cargas parasitarias son mayores en los órganos y las lesiones más graves que en abortos producidos en granjas endémicas, lo que indicaría que un mayor número de parásitos cruzarían la barrera placentaria e infectarían al feto, debido a la falta de una respuesta inmunitaria materna que limite la multiplicación de los taquizoítos (Collantes-Fernández et al., 2006a; Wouda et al., 1999). Cabe también destacar que, en estos animales infectados por la vía horizontal, la transmisión vertical exógena sólo parece producirse durante la primera gestación y en una menor proporción de animales (Dijkstra et al., 2008), no observándose la transmisión transplacentaria endógena en las siguientes (McCann et al., 2007). En granjas con neosporosis endémica, los animales congénitamente infectados son inmunes frente a una infección exógena, ya que no se ha observado la presencia de abortos en vacas persistentemente infectadas después de la infección experimental con ooquistes en el primer tercio de gestación (Williams et al., 2003). Por el contrario, en estos animales se ha observado el nacimiento de terneros congénitamente infectados en la segunda y tercera gestación por una recrudescencia de la infección persistente (Williams et al., 2003), y si se producen abortos, las cargas parasitarias en el feto son bajas y el parásito se detecta principalmente en el cerebro (Collantes-Fernández et al., 2006b; Wouda et al., 1999) indicando de nuevo, que existe una inmunidad materna previa que limitaría parcialmente la diseminación del parásito en la madre y reduciría el número de taquizoítos que llegaran al feto.

1.5.3. Aislado del parásito

El aislado de *N. caninum* tiene una gran influencia en la presentación de los signos clínicos y en la gravedad de la infección. En este sentido, se ha observado cierta diversidad biológica entre algunos de los aislados del parásito en infecciones experimentales en ratón (Atkison et al., 1999; Collantes-Fernández et al., 2006c; Lindsay et al., 1995; Pereira-García de Melo et al., 2010; Pérez-Zaballos, 2004) y en estudios *in vitro* (Pérez-Zaballos, 2005; Shock et al., 2001). En el ganado bovino, después de la infección en el día 70 de gestación con taquizoítos de los aislados virulentos Nc-Liverpool (Barber et al., 1993; Barber et al., 1995) y Nc-1 (Dubey et al., 1988b) se observa muerte fetal a partir de la tercera semana post-infección (PI) (Gibney et al., 2007; Macaldowie et al., 2004; Rojo-Montejo et al., 2009a; Williams et al., 2000; Williams et al., 2003; Williams et al., 2007). Sin embargo, la infección con un aislado de virulencia reducida como Nc-Spain 1H (Rojo-Montejo et al., 2009b) no produjo muerte fetal en ninguno de los animales (Rojo-Montejo et al., 2009a).

1.6. Respuesta inmunitaria

Aunque el ganado vacuno infectado con *N. caninum* responde con la producción de anticuerpos específicos, la localización intracelular del parásito sugiere que una respuesta medida por células es el componente más importante para la protección (Hemphill, 1999; Innes et al., 2000). En este sentido, varios autores han observado la producción de interferón γ (IFN- γ) y una respuesta de anticuerpos basada en las inmunoglobulinas del isotipo IgG2

después de la infección experimental de vacas no gestantes (De Marez et al., 1999; Lundén et al., 1998; Marks et al., 1998) y gestantes (Andrianarivo et al., 2001; Innes et al., 2001; Rojo-Montejo et al., 2009a; Williams et al., 2000). 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- γ tiene gran importancia en la resistencia del hospedador, ya que se ha demostrado que el IFN- γ inhibe el crecimiento intracelular del parásito *in vitro* (Innes et al., 1995; Yamane et al., 2000) e *in vivo* (Baszler et al., 1999; Khan et al., 1997; Ritter et al., 2002). En un estudio previo, se ha demostrado que las células asesinas, junto con los linfocitos CD4+ y CD8+ colaboran en la producción de IFN- γ en los estadios iniciales de la infección, mientras que sólo los CD4+ predominan en las fases más avanzadas (Klevar et al., 2007; Marks et al., 1998; Tuo et al., 2005). Las células T CD4+ procedentes de animales infectados pueden proliferar cuando se las estimula con antígeno de *N. caninum* (Andrianarivo et al., 2001) y pueden mediar la lisis directa de células autólogas infectadas (Staska et al., 2003). También se ha detectado un aumento en el porcentaje de células T CD8+ 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* es todavía poco claro (Staska et al., 2003; Tanaka et al., 2000a).

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., 1993b; Guy et al., 2001; Paré et al., 1997; Pereira-Bueno et al., 2003; Quintanilla-Gozalo et al., 1999; Stenlund et al., 1999).

1.7. Signos clínicos y lesiones

La manifestación clínica más importante de la infección por *N. caninum* en el ganado bovino es el aborto en vacas gestantes (Buxton et al., 2002). En infecciones naturales, el aborto puede ocurrir a partir del tercer mes de gestación, aunque la mayoría de los abortos ocurren entre los meses 5 y 7 (Anderson et al., 1991; Bildfell et al., 1994; Duivenvoorden y Lusia, 1995; Hall et al., 2005; Hattel et al., 1998; Moen et al., 1998; Nietfeld et al., 1992; Obendorf et al., 1995). Los fetos abortados suelen estar autolíticos y, en determinadas circunstancias, puede producirse su momificación (Dubey, 2005). En los rebaños infectados por *N. caninum*, los abortos tienen lugar en cualquier época del año y pueden presentarse de forma esporádica, endémica o epidémica (Anderson et al., 2000; Schares et al., 1999; Thurmond et al., 1997; Wouda et al., 1997).

Lo más frecuente es el nacimiento de terneros clínicamente sanos pero congénitamente infectados y con altos títulos de anticuerpos precalostrales (Anderson et al., 2000). En terneros menores de 2 meses, ocasionalmente se ha descrito la presencia de signos clínicos neuromusculares, apareciendo a los 4 - 5 días después del parto, aunque éstos pueden retrasarse hasta transcurridas dos semanas del nacimiento (Dubey y Lahunta, 1993; Dubey, 1999b; Duivenvoorden y Lusia, 1995). Se ha observado desde una ligera incoordinación hasta una parálisis completa, debilidad y dificultad para levantarse (Dubey et al., 1992b; Gunning et al., 1994). Las extremidades pueden aparecer hiperextendidas, aunque a veces pueden flexionarse al realizar presión manual (Bryan et al., 1994; Dubey y Lahunta, 1993; Gunning et al., 1994). Otros signos neurológicos que pueden aparecer con frecuencia son ataxia, reflejos

disminuidos, pérdida de coordinación, exoftalmia y apariencia asimétrica de los ojos (Barr et al., 1993; Bryan et al., 1994; Dubey, 1999b). Estas condiciones pueden empeorar hasta la total parálisis y muerte del animal (Dubey et al., 1992b; Gunning et al., 1994). En los casos más graves se puede observar malformaciones en la espina dorsal, estrechamiento de la médula espinal, hidrocefalia y neumonía (Bryan et al., 1994; Gunning et al., 1994). Sin embargo, sólo se ha detectado un limitado número de casos de terneros infectados congénitamente que presenten desórdenes neuromusculares (De Meerschman et al., 2005) y la mayoría de los terneros congénitamente infectados permanecen clínicamente normales (Dubey et al., 2006b).

En cuanto a las lesiones histopatológicas asociadas a *N. caninum*, éstas han sido descritas en varios tejidos (Dubey et al., 2006b). En los fetos, las lesiones son más comunes en el SNC, corazón e hígado (Anderson et al., 1991; Barr et al., 1990; Barr et al., 1991a; Boger y Hattel, 2003; Dubey et al., 1990b; Dubey et al., 1998a; Hattel et al., 1998; Helman et al., 1998; Nietfeld et al., 1992; Wouda et al., 1997) y se caracterizan por múltiples focos de infiltrado no supurativo acompañados de necrosis multifocal rodeada de células inflamatorias (Collantes-Fernández et al., 2006b; Dubey et al., 2006b), siendo la encefalomiелitis la lesión más frecuente (Anderson et al., 1997; Barr et al., 1991b; De Meerschman et al., 2005; Dubey et al., 1989; Dubey et al., 1992b; Dubey y Lindsay, 1996; Magnino et al., 1999; O'Toole y Jeffrey, 1987; Parish et al., 1997; Peters et al., 2001). Por último, en los animales de más de dos meses de edad, no se ha confirmado la especificidad de las lesiones encontradas (Dubey et al., 2006b), aunque se ha observado miocarditis y miositis en animales de más de ocho meses de edad en los que se aisló el parásito (Piergili et al., 2000; Sawada et al., 2000).

1.8. Diagnóstico

El diagnóstico de la neosporosis en el ganado vacuno es complejo, debido a la falta de signos clínicos específicos que permitan diferenciar esta enfermedad de otras infecciones que también pueden causar fallo reproductivo.

El diagnóstico de la infección en los bovinos adultos se basa en la detección de anticuerpos específicos en el suero, utilizando técnicas serológicas como la inmunofluorescencia indirecta (IFI), el ensayo inmunoenzimático (ELISA) y, como prueba confirmatoria, el inmunoblot (Álvarez-García et al., 2003; Von Blumröder et al., 2004). En una explotación con sospecha de abortos causados por *N. caninum* es recomendable realizar una estimación de la tasa de seroprevalencia en un porcentaje significativo de animales. Sin embargo, la detección de anticuerpos frente a *N. caninum* en el suero es sólo indicativa de la exposición del animal a la infección (Dubey et al., 2007), siendo importante de forma complementaria el empleo de otras técnicas que permitan demostrar la infección en el feto abortado (Dubey y Schares, 2006a).

Después de un aborto, el feto junto con la placenta y el suero de la madre deben enviarse a un laboratorio para realizar el diagnóstico. Si esto no fuera posible, deben enviarse muestras de cerebro, corazón e hígado del feto. Para el diagnóstico fetal, la mejor opción es el estudio de las lesiones histopatológicas y la detección del parásito por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) o inmunohistoquímica, siendo de gran importancia no sólo la presencia del parásito, sino también la extensión y gravedad de las lesiones en el feto, la edad fetal y la prevalencia de la infección en el rebaño (Jenkins et al., 2002). El diagnóstico fetal también se complementa con la detección de anticuerpos específicos en fluidos corporales de fetos mayores de 6 meses de edad (Dubey y Schares, 2006a; Ortega-Mora et

al., 2006; Pereira-Bueno et al., 2003). Dada la pobre concordancia observada entre la histología, PCR y serología, es necesario el empleo de diferentes técnicas serológicas para aumentar la probabilidad de detectar la infección en los fetos abortados (Medina et al., 2005; Pereira-Bueno et al., 2003).

Por último, los recientes avances en el diagnóstico de la neosporosis bovina y en el conocimiento de la relación entre el parásito y el hospedador van encaminados al empleo de antígenos específicos de estadio. Estos marcadores podrían ser útiles para diferenciar entre infecciones recientes y crónicas e, incluso, para la detección de la reactivación de la infección en animales persistentemente infectados (Aguado-Martínez et al., 2008; Ortega-Mora et al., 2006). Por otro lado, las herramientas moleculares para la caracterización genética de aislados de *N. caninum* como los microsatélites (Regidor-Cerrillo et al., 2006) son otro campo de interés en el diagnóstico fetal. Estos marcadores pueden ser empleados en muestras clínicas de infecciones naturales y experimentales, con el fin de estudiar la estructura poblacional del parásito y la epidemiología molecular de la neosporosis (Al-Qassab et al., 2009; Pedraza-Díaz et al., 2009).

1.9. Control

La neosporosis es una causa más de aborto y el control de la enfermedad debe ir encaminado, fundamentalmente, a reducir la tasa de prevalencia de la infección en las explotaciones con brotes declarados y a prevenir su propagación a otras, evitando tanto la transmisión horizontal como la vertical. Con este fin, se han sugerido varias medidas: mejora de la bioseguridad en la granja, introducción de alternativas en el manejo reproductivo del rebaño, vacunación y eliminación del efectivo seropositivo (Conraths y Ortega-Mora, 2005; Conraths et al., 2007; Haddad et al., 2005; Hall et al., 2005; Larson et al., 2004; Reichel y Ellis, 2002). En las explotaciones libres de *N. caninum* se debe prevenir la introducción de animales infectados y se recomienda aplicar medidas básicas de bioseguridad (Haddad et al., 2005; Reichel y Ellis, 2009). En las explotaciones infectadas, los programas de control deben basarse en la disminución de la transmisión vertical, reduciendo el número de animales seropositivos o reduciendo el riesgo de la transmisión horizontal, principalmente mediante el control de la población de hospedadores definitivos evitando así la infección por ooquistes (Conraths y Ortega-Mora, 2005; Haddad et al., 2005; Hall et al., 2005; Larson et al., 2004; Reichel y Ellis, 2002).

Actualmente, existe una vacuna comercial frente al parásito, formulada con taquizoítos muertos de *N. caninum* (Bovilis® Neoguard, Intervet), que ha mostrado una eficacia parcial en la prevención de abortos en el ganado bovino (Romero et al., 2004). Por otro lado, aunque la vacunación con taquizoítos de un aislado de *N. caninum* de virulencia reducida (Nc-Nowra, Miller et al., 2002) ha demostrado una elevada eficacia en estudios experimentales (Williams et al., 2007), su comercialización puede ser complicada debido a su limitado tiempo de vida y a su elevado coste de producción. Por otra parte, aún está sin aclarar la seguridad de este tipo de vacunas. Estos resultados dejan una puerta abierta para la mejora de estas vacunas y el desarrollo de otras nuevas. Para ello, los modelos experimentales en ratón ofrecen un método económico y práctico ya que facilitan la selección de fórmulas vacunales frente a la infección antes de su uso en el ganado bovino.

2. LA NEOSPOROSIS EN EL MODELO MURINO EXPERIMENTAL

El modelo murino es una herramienta muy valiosa para el estudio de la patogenia de la neosporosis (Collantes-Fernández et al., 2006c; Eperon et al., 1999; Lindsay y Dubey, 1989; Nishikawa et al., 2001a) 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., 2003; Gottstein et al., 2001; Ramamoorthy et al., 2006). También ha sido empleado en pruebas de caracterización patogénica de diferentes aislados de *N. caninum* (Atkinson et al., 1999; Collantes-Fernández et al., 2006c; Pereira-García-Melo et al., 2010; Pérez-Zaballos, 2004; Stenlund et al., 1997), en la producción de quistes tisulares (McGuire et al., 1997) y en la obtención de aislados del parásito a partir de tejidos 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 que pueden proporcionar importantes avances en el conocimiento de la infección.

2.1. 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 del parásito, dosis, vía de inoculación y tratamiento con agentes inmunodepresores (Tabla 2).

La comparación entre los modelos murinos es difícil debido a las diferentes variables empleadas en cada uno de los estudios. En general, los ratones no consanguíneos como los pertenecientes a las estirpes Swiss Webster (Lindsay y Dubey, 1989), ICR (Lindsay et al., 1995), CD-1 (Khan et al., 1997) y Quackenbush (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 (Collantes-Fernández et al., 2004; Lindsay y Dubey, 1989; Lindsay et al., 1999d) y reproducir la enfermedad de forma aguda o crónica dependiendo de la dosis empleada (Lindsay y 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). Así, la infección con los aislados Nc-1 (Bartley et al., 2008; Collantes-Fernández et al., 2006c; Lindsay et al., 1995; Long et al., 1998; Pérez-Zaballos, 2004), Nc-2 (McGuire et al., 1997), NcJPA-1 (Shibahara et al., 1999), Nc-Nowra (Miller et al., 2002), Nc-Spain 7 (Pereira-García de Melo et al., 2010) y Nc-Liverpool (Atkinson et al., 1999; Collantes-Fernández et al., 2006c; Miller et al., 2002; Pérez-Zaballos, 2004) puede provocar la aparición de signos clínicos e incluso mortalidad, mientras que con otros, como por ejemplo Nc-3 (Lindsay et al., 1995), Nc-SweB1 (Atkinson et al., 1999; Pérez-Zaballos, 2004), Nc-Spain 1 H (Rojo-Montejo et al., 2009b) y con aislados sensibles a la temperatura (Lindsay et al., 1999d), los ratones no desarrollan signos clínicos apreciables. Por otro lado, otras estirpes consanguíneas como C57BL/6 (Gondim et al., 1999; Khan et al., 1997; Long et al., 1998; Ramamoorthy et al., 2007), C57BL/10 ScSn (Botelho et al., 2006; Teixeira et al., 2007), A/J (Khan et al., 1997) y B10.D2 (Long et al., 1998) son relativamente resistentes a la infección.

Tabla 2. Modelos murinos no gestantes de la infección por *N. caninum* según la estirpe de ratón, el aislado, la dosis y la vía de inoculación empleados.

Estirpe	Aislado ^a	Dosis	Vía ^b	Tratamiento ^c	Signos clínicos	Mortalidad	Referencia
A/J	Nc-1	10 ⁵	i.p.	---	no	n.e.	Khan et al., 1997
B10.D2	Nc-1	2x10 ⁵ - 2x10 ⁷	i.p.	---	n.e.	sí (dosis 2x10 ⁷)	Long et al., 1998
BALB/c	Nc-1	2x10 ⁵ - 2x10 ⁷	i.p., s.c., i.g.	---	sí (en fase aguda y crónica)	sí (en fase crónica)	Collantes-Fernández et al., 2006c Dreier et al., 1999 Khan et al., 1997 Lindsay et al., 1995 Long et al., 1998 Pérez-Zaballos, 2004
	Nc-2	4x10 ⁵ , 8x10 ⁵	s.c.	MPA	sí	sí	McGuire et al., 1997
	Nc-3, KBA	2x10 ⁵	s.c.	---	no	no	Lindsay et al., 1995 Masuda et al., 2007
	NcJPA-1	2x10 ⁵	i.p., i.v.	---	sí (en fase crónica)	sí (en fase crónica)	Gondim et al., 1999 Shibahara et al., 1999 Atkinson et al., 1999
	Nc-Liverpool	10 ⁵ - 10 ⁷	i.p., s.c.	MPA	sí (en fase aguda y crónica)	sí (en fase aguda y crónica)	Collantes-Fernández et al., 2006c Miller et al., 2002 Pérez-Zaballos, 2004
	Nc-Nowra	10 ⁴ , 10 ⁶	s.c.	---	sí	sí	Miller et al., 2002
	Nc-SweB1	10 ⁵ - 10 ⁷	i.p.	---	no	n.e.	Atkinson et al., 1999 Pérez-Zaballos, 2004
	Ncts-4, Ncts-8, Ncts-12	5x10 ⁵	s.c.	---	no	no	Lindsay et al., 1999d
	Nc-Spain 2H, Nc-Spain 3H, Nc-Spain 4H, Nc-Spain 5H, Nc-Spain 6, Nc-Spain 7, Nc-Spain 8, Nc-Spain 9	10 ⁶	i.p.	---	Sólo con Nc-Spain 7	no	Pereira-García de Melo et al., 2010
	C57BL/6	Nc-1	10 ⁵ - 10 ⁸	i.p.	---	no	sí (en fase aguda y dosis 3x10 ⁷)

Tabla 2 (continuación). Modelos murinos no gestantes de la infección por *N. caninum* según la estirpe de ratón, el aislado, la dosis y la vía de inoculación empleados.

Estirpe	Aislado ^a	Dosis	Vía ^b	Tratamiento ^c	Signos clínicos	Mortalidad	Referencia
C57BL/10 ScSn	Nc-1	5x10 ⁵ , 5x10 ⁶	i.g., i.p.	---	no	no	Botelho et al., 2006 Teixeira et al., 2006
CBA/ca	Nc-2, Nc-Liverpool	4x10 ⁵ , 8x10 ⁵	s.c.	MPA	sí	sí	McGuire et al., 1997
CD1	Nc-1	10 ⁶	i.p.	---	no	n.e.	Khan et al., 1997
ICR	Nc-1	4x10 ⁵ - 10 ⁶	i.p., s.c.	MPA, Vin, Cy	sí	sí	Collantes-Fernández et al., 2004 Lindsay et al., 1999d
	Nc-2, Nc-Liverpool	4x10 ⁵ , 8x10 ⁵	s.c.	MPA	sí	sí	McGuire et al., 1997
	Nc-3	2x10 ⁵ - 5x10 ⁵	s.c., i.p.	---	no	no	Lindsay et al., 1995
	Ncts-4, Ncts-8, Ncts-12	5x10 ⁵	s.c.	---	n.e.	sí	Lindsay et al., 1999d
	Ncts-4-37, Ncts-8-37, Ncts-12-37	5x10 ⁵	s.c.	MPA	n.e.	sí	Lindsay et al., 1999d
Quackenbush	Nc-Liverpool	10 ⁶	s.c.	---	no	---	Quinn et al., 2002a
SCID	NcJPA-1	2x10 ⁵	i.p., i.v.	---	sí (en fase aguda)	n.e.	Gondim et al., 1999
Swiss	Nc-1	2x10 ⁵	s.c.	---	no	no	Lindsay y Dubey, 1989
	Nc-1	2x10 ⁵	s.c.	MPA	sí (en fase aguda)	sí (en fase aguda)	Lindsay y Dubey, 1989
	Nc-2	2x10 ⁵	i.p., o., s.c.	MPA	solo con s.c.	no con o.	Lindsay y Dubey, 1990

a: Nc-1 (Dubey et al., 1988b); Nc-2 (Hay et al., 1990); Nc-3 (Cuddon et al., 1992); KBA (Johnson, 1999); NcJPA-1 (Yamane et al., 1996; Yamane et al., 1997); Nc-Liverpool (Barber et al., 1993; Barber et al., 1995); Nc-Nowra (Miller et al., 2002); Nc-SweB1 (Stenlund et al., 1997); Ncts-4, Ncts-8, Ncts12, Ncts-4-37, Ncts-8-37, Ncts12-37 (variedades sensibles a la temperatura y con "n" pases en cultivo celular, Lindsay et al., 1999d); Nc-Spain 2H, Nc-Spain 3H, Nc-Spain 4H, Nc-Spain 5H, Nc-Spain 6, Nc-Spain 7, Nc-Spain 8, Nc-Spain 9 (Regidor-Cerrillo et al., 2008)

b: i.p.: intraperitoneal; s.c.: subcutánea; i.g.: intragástrica; i.v.: intravenosa; o.: oral

c: tratamiento con acetato de metil-prednisolona (MPA), vinblastina (Vin) o ciclofosfamida (Cy)

n.e.: no se especifica en el estudio

Los ratones defectivos en algún componente del sistema inmunitario presentan una mayor susceptibilidad a la infección que su correspondiente cepa silvestre, por lo que se han utilizado en el estudio de diferentes aspectos de la respuesta inmunitaria del hospedador (Tabla 3). Así, los ratones de la estirpe BALB/c atímicos (*nu/nu*) (Gondim et al., 1999; Regidor-Cerrillo et al., 2008; Rojo-Montejo et al., 2009b; Shibahara et al., 1999), BALB/c defectivos en IFN- γ (Miller et al., 2002; Nishikawa et al., 2001a; Ritter et al., 2002; Schares et al., 2005; Vianna et al., 2005) y Swiss Webster defectivos en IFN- γ (Dubey et al., 1998b) son muy susceptibles a la infección por *N. caninum* y se han utilizado para el aislamiento del parásito a partir de muestras biológicas. La estirpe C57BL/6 μ MT, defectiva en linfocitos B, desarrolla signos clínicos y mortalidad durante la fase crónica (Eperon et al., 1999). Los ratones SCID/Bg, defectivos en células T y B funcionales y en un 50% en células asesinas, mueren durante la fase aguda, mientras que sus correspondientes cepas silvestres permanecen clínicamente normales (Dreier et al., 1999). También se ha estudiado el curso de la infección en ratones BALB/c defectivos en IL-10, en la enzima inducible óxido nítrico sintetasa (iNOS2), en el receptor 2 del factor de necrosis tumoral (TNFR2) y en el receptor beta 2 microglobulina (β 2M). Los ratones defectivos en IL-10 no manifestaron signos clínicos, mortalidad ni lesiones (Ritter et al., 2002), mientras que los ratones defectivos en iNOS2 son sensibles a la infección dependiendo del estudio (Ritter et al., 2002; Tanaka et al., 2000b). Por último, los ratones defectivos en β 2M y en TNFR2 mostraron mortalidad en fase aguda o crónica dependiendo del aislado (Ritter et al., 2002).

2.1.1. 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 y lesiones observadas.

Fase aguda

Durante la primera semana PI, 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., 2006c). En esta fase de la infección, los ratones muestran signos clínicos inespecíficos como dificultad respiratoria, inactividad, anorexia, apatía y erizamiento del pelo (Atkinson et al., 1999; Collantes-Fernández et al., 2006c; Eperon et al., 1999; Lindsay y Dubey, 1989; Lindsay et al., 1995; Rettigner et al., 2004a). Las lesiones se observan principalmente en pulmón y en hígado (Baszler et al., 1999; Eperon et al., 1999; Pérez-Zaballos, 2004). En el pulmón, es característica la presencia de neumonía intersticial con pequeños nódulos de células linfoides, a veces asociados a vasos sanguíneos, siendo la neumonía la principal causa de muerte en estos ratones (Collantes-Fernández et al., 2004; Lindsay y Dubey, 1989; Pérez-Zaballos, 2004). En el hígado, se ha descrito una hepatitis no supurativa con necrosis multifocal de los hepatocitos e infiltración de linfocitos (Lindsay y Dubey, 1990; Pérez-Zaballos, 2004).

Tabla 3. Modelos murinos de la infección por *N. caninum* en ratones defectivos.

Estirpe	Defectivos en ^a	Aislado ^b	Dosis	Vía ^c	Signos	Mortalidad	Referencia
BALB/c <i>nu/nu</i>	timo	NcJPA-1	2x10 ⁵	i.p.	sí (en fase aguda)	no	Gondim et al., 1999 Shibahara et al., 1999
C57BL/10 ScSr	TLR-4 y mecanismos inmunes dependientes de IL-12	Nc-1	5x10 ⁵ , 5x10 ⁶	i.p.	sí (en fase aguda)	sí (en fase aguda)	Botelho et al., 2006 Teixeira et al., 2007
C57BL/6 μ M	linfocitos B	Nc-1	10 ⁵	i.p.	sí	sí (en fase crónica)	Eperon et al., 1999
CB-17 SCID	linfocitos T y B	KBA	2x10 ⁵	i.p.	sí	sí (en fase crónica)	Masuda et al., 2007
SCID/Bg	células T y B funcionales y en un 50% en células asesinas	Nc-1	5x10 ⁶	s.c.	n.e.	sí (en fase aguda)	Dreier et al., 1999
KO iNOS2-/-	iNOS2	Nc-1, Nc-2	2-5x10 ⁶	i.p.	sí	sí	Ritter et al., 2002 Tanaka et al., 2000b
KO IFN- γ	IFN- γ	Nc-1, Nc-2	5x10 ⁶	i.p.	sí	n.e.	Ritter et al., 2002
KO IL-10	IL-10	Nc-1, Nc-2	5x10 ⁶	i.p.	sí	sí (en fase crónica)	Ritter et al., 2002
KO TNFR2	receptor 2 del factor de necrosis tumoral	Nc-1, Nc-2	5x10 ⁶	i.p.	n.e.	sí (en fase crónica)	Ritter et al., 2002
KO β 2M	linfocitos citotóxicos, reducida secreción de IFN- γ inducida por antígeno, pocas moléculas del CMH I funcionales	Nc-1, Nc-2	5x10 ⁶	i.p.	sí	sí (en fase crónica)	Ritter et al., 2002

a: TLR-4: receptor toll 4 (del inglés, *toll-like receptor 4*); IL-12: interleuquina 12; iNOS2: enzima oxido nítrico sintasa inducible; TNF: factor de necrosis tumoral (del inglés: *tumour necrosis factor*); CMH I: complejo mayor de histocompatibilidad de clase I

b: Nc-1 (Dubey et al., 1988b); Nc-2 (Hay et al., 1990); KBA (Johnson, 1999); NcJPA-1 (Yamane et al., 1996; Yamane et al., 1997)

c: i.p.: intraperitoneal; s.c.: subcutánea

n.e.: no se especifica en el estudio

Fase crónica

Aquellos ratones que sobreviven a la fase aguda desarrollan una infección crónica. En la segunda semana PI, el parásito desaparece de los pulmones y se observa una mayor carga parasitaria en el cerebro. Posteriormente, la infección se cronifica, detectándose la presencia de cargas parasitarias bajas en el SNC (Collantes-Fernández et al., 2006c). 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 (Atkinson et al., 1999; Collantes-Fernández et al., 2006c; Eperon et al., 1999; Lindsay y Dubey, 1989; Lindsay et al., 1995; Pérez-Zaballos, 2004; Rettigner et al., 2004a). Estos signos clínicos empeoran con el tiempo hasta la muerte del animal (Lindsay y Dubey, 1989). En esta fase, las lesiones más importantes se observan en el cerebro, siendo característica una meningoencefalitis no supurativa multifocal de distribución variable, con focos de necrosis y presencia de macrófagos, células de Gitter, linfocitos, gliosis y manguitos perivasculares (Collantes-Fernández et al., 2004; Eperon et al., 1999; Lindsay y Dubey, 1990; Lindsay et al., 1995; Long et al., 1998; Pérez-Zaballos, 2004). 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).

2.1.2. Respuesta inmunitaria

Durante la infección por *N. caninum*, en el ratón se activan diferentes componentes de la inmunidad celular innata como macrófagos, células asesinas y células dendríticas, las cuales responden liberando citoquinas 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 y Khan, 1998; Nishikawa et al., 2002). En general, la resistencia a la neosporosis está asociada con citoquinas de tipo 1 como el IFN- γ y la interleuquina 12 (IL-12) (Baszler et al., 1999; Khan et al., 1997; Staska et al., 2005), mientras que la susceptibilidad a la encefalitis está asociada con citoquinas de tipo 2 como la interleuquina 4 (IL-4) (Long et al., 1998; Long y Baszler, 2000).

Celular

Los macrófagos parecen tener un papel importante en la inmunidad protectora frente a la infección por *N. caninum*. Cuando son activados por el IFN- γ , muestran una actividad frente al parásito que está asociada con un aumento de la producción de óxido nítrico (NO) (Nishikawa et al., 2001a; Tanaka et al., 2000b). Esta producción de NO es un factor importante en la eliminación de los parásitos intracelulares puesto que ratones defectivos en la enzima inducible óxido nítrico sintetasa (iNOS) son más susceptibles a la infección que su correspondiente cepa salvaje (Tanaka et al., 2000b). Además, los macrófagos también

activan linfocitos T por presentación de antígenos derivados del parásito y en asociación con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Sin embargo y a pesar de la importancia de la presentación del antígeno por parte del CMH de la clase II (CMH II) en la inmunidad del hospedador, aún no se sabe su papel exacto en la infección por *N. caninum* (Tanaka et al., 2000a).

Khan y colaboradores (Khan et al., 1997) describieron que *N. caninum* induce una respuesta inmune de células T en el hospedador. En la infección aguda, los linfocitos CD8+ pueden actuar en primer lugar como células citotóxicas, limitando la diseminación del parásito (Spencer et al., 2005). Sin embargo, los linfocitos CD4+ son más importantes en la protección frente a *N. caninum*, porque los ratones tratados con un anticuerpo anti-CD4+ muestran una elevada morbilidad y mortalidad después de la infección (Nishikawa et al., 2001a; Tanaka et al., 2000a), mientras que después del tratamiento con un anticuerpo anti-CD8+, sólo se observa una mortalidad del 30 % (Tanaka et al., 2000a). Además, los linfocitos CD4+ son esenciales en la producción de anticuerpos específicos frente a *N. caninum* que tienen un papel importante en la protección del hospedador en los estadios tardíos de la infección (Tanaka et al., 2000a). Por otro lado, también se ha demostrado que ratones atímicos y ratones deficientes en células B son susceptibles a la infección (Eperon et al., 1999; Shibahara et al., 1999), lo que sugiere que tanto las células B como T tienen un papel importante en el control de la infección (Tanaka et al., 2000a).

En cuanto a la producción de citoquinas, diversos estudios han señalado el papel del IFN- γ e IL-12 en la resistencia frente a *N. caninum* durante la fase aguda de la infección (Innes et al., 1995; Nishikawa et al., 2001a; Tanaka et al., 2000a), ya que el IFN- γ es capaz de inhibir la multiplicación intracelular de *N. caninum in vitro* (Innes et al., 1995; Yamane et al., 2000) e *in vivo* (Baszler et al., 1999; Khan et al., 1997; Long et al., 1998; Ritter et al., 2002). Además, el elevado aumento en la producción de IL-12 que se produce como consecuencia de la infección, sugiere que esta citoquina es esencial en la respuesta inmune protectora frente al parásito (Khan et al., 1997). La interleuquina 10 (IL-10) parece ser necesaria para la protección de los animales frente a la infección por *Toxoplasma gondii*, ya que ratones defectivos en esta citoquina son más susceptibles y mueren por una respuesta inflamatoria descontrolada, debida a una sobreproducción de IL-12, IFN- γ y del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (Gazzinelli et al., 1996). En *N. caninum*, la IL-10 es secretada desde el día 10 PI (Khan et al., 1997) pero ratones defectivos en IL-10 son resistentes a la infección, lo que indica que no se trata de una citoquina crítica en la respuesta del hospedador frente al parásito (Ritter et al., 2002). Sin embargo, la inducción simultánea de IL-10 e IFN- γ es un hecho común en la respuesta inmune frente a parásitos intracelulares dado que la producción de IL-10 es necesaria para prevenir los efectos nocivos de las citoquinas de tipo 1 (Eperon et al., 1999; Kasper y Khan, 1998; Nishikawa et al., 2001a; Quinn et al., 2004), aumentando así su supervivencia y la del propio hospedador (Eperon et al., 1999). Por último, la sensibilidad a la infección en el modelo murino parece estar relacionada con una respuesta de tipo 2 y niveles elevados de IL-4. La resistencia natural de la estirpe B10.D2 frente a la infección por *N. caninum* se debe a la falta de producción de IL-4 en el bazo, mientras que los ratones de la estirpe BALB/c mostraron niveles más elevados de esta citoquina (Baszler et al., 1999; Long et al., 1998), que están asociados a un aumento en la gravedad de la encefalitis y en la carga parasitaria (Long et al., 1998). Por otro lado, la producción de IL-4 podría ser un factor importante en el desarrollo de una inmunidad protectora ya que la producción de anticuerpos puede contribuir al control de la carga parasitaria (Nishikawa et al., 2001b).

Humoral

En el ratón, los isotipos IgG2a e IgG1 se han asociado con un perfil de citoquinas de tipo 1 (IL-12 e IFN- γ) y tipo 2 (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 predomina el isotipo IgG2a mientras que en ratones susceptibles 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 (Collantes-Fernández et al., 2006c; Long et al., 1998).

2.2. Modelo murino gestante

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 de realizar un estudio exhaustivo de la infección que conllevaría un alto número de sacrificios), el modelo murino gestante puede ser de gran utilidad en el estudio de la neosporosis congénita. Además, muchos de los resultados 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. 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 (Tabla 4).

2.2.1. Patogenia

Mortalidad fetal

La muerte fetal en el modelo murino gestante es dependiente del periodo de gestación en el que ocurre la infección. Si la infección tiene lugar antes de la gestación no se observan pérdidas fetales aunque se ha detectado una disminución en el tamaño de la camada respecto de los animales no infectados, lo que podría indicar una disminución en el número de implantaciones (Long y Baszler, 1996; Omata et al., 2004). 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 y Baszler, 1996), mientras que en ratones no consanguíneos de la estirpe Quackenbush, no se observaron diferencias con los testigos (Quinn et al., 2002a). Cuando la infección tiene lugar entre los días 5 y 8 de gestación, se ha observado un aumento en el número de reabsorciones en los animales infectados (Long y Baszler, 1996; Quinn et al., 2002a), que podría ser incluso dependiente de la dosis empleada (Quinn et al., 2002a), mientras que no se observan pérdidas fetales cuando la infección tiene lugar al final de la gestación (Long y Baszler, 1996).

Tabla 4. Modelos murinos gestantes de la infección por *N. caninum* en función del periodo de gestación en el que se realiza la infección.

Estirpe	Infección	Aislado, dosis, vía ^a	Sacrificio ^b	Mortalidad fetal ^c	Nacimiento de crías muertas ^c	Transmisión (técnica diagnóstica) ^d	Mortalidad neonatal	Referencia
BALB/c	28-100 días antes de la gestación	Nc-7, 2x10 ⁶ , i.p.	0-1 PP	7/18 camadas con menos de 4 crías	n.e.	50 % de las camadas (PCR)	----	Omata et al., 2004
C57BL/6	14 días antes de la gestación	Nc-1, 5x10 ⁶ , i.p.	18-20 dg	menor número de fetos viables	----	90 % (PCR)	-----	Ramamoorthy et al., 2007
BALB/c	10 días antes de la gestación	Nc-1, 2x10 ⁶ , s.c.	13-19 dg	aumento no significativo de reabsorciones, disminución fetos viables (por reducción número de implantaciones)	n.e.	n.d. por IHQ	---	Long y Baszler, 1996
Swiss Webster	día 5-18 de gestación	Nc-1, 5,8 a 8,4 x10 ⁶ , s.c.	1-7 PP	n.e.	n.e.	85 % de las camadas (c.c.)	n.e.	Cole et al., 1995
BALB/c	día 5 de gestación	Nc-1, 2x10 ⁶ , s.c., i.p.	11-19 dg	aumento significativo de reabsorciones, disminución fetos viables	n.e.	n.d. por IHQ	---	Long y Baszler, 1996
Quakenbush	días 5 y 8 de gestación	Nc-Liverpool, 10 ⁶ , s.c.	14 dg, 7 PP	aumento de reabsorciones frente a controles sin diferencias en tamaño de camada	no significativo	91 % positivos en día 7 PP (PCR)	n.e.	Quinn et al., 2002a
	día 6 de gestación	Nc-Nowra, 10 ⁴ y 10 ⁶ , s.c.	7 PP	sin cambios	---	84-89 % (PCR)		Miller et al., 2002

Tabla 4 (continuación). Modelos murinos gestantes de la infección por *N. caninum* en función del periodo de gestación en el que se realiza la infección.

Estirpe	Infección	Aislado, dosis, vía ^a	Sacrificio ^b	Mortalidad fetal ^c	Nacimiento de crías muertas ^c	Transmisión (técnica diagnóstica) ^d	Mortalidad neonatal	Referencia
CBA/Ca	día 8-10 de gestación	Nc-1, 5x10 ⁵ , s.c.	1 PP	n.e.	n.e.	90 % (PCR)	n.e.	Rettigner et al., 2004b
BALB/c	día 10-12 de gestación	Nc-1, 2x10 ⁵ , i.v.	16-18 dg	camadas más pequeñas	n.e.	1 % por IHQ	---	Long y Baszler, 1996
	día 8-13 de gestación	Nc-1, 10 ⁵ , s.c.	23 PP	camadas más pequeñas cuando se infecta antes del día 11 dg	no relacionado con dosis	100 % de las camadas (PCR)	n.e.	Liddell et al., 1999
	días 7-19 de gestación	Nc-7, 2x10 ⁶ , i.p.	0-1 PP	10/24 camadas con menos de 4 crías	n.e.	76 % de las camadas (PCR)	----	Omata et al., 2004
C57BL/6	día 12-14 de gestación	Nc-1, 5x10 ⁶ , i.p.	18-20 dg	sin cambios en el número de fetos viables	----	100 % (PCR)	----	Ramamoorthy et al., 2007
BALB/c	día 15 de gestación	Nc-1, 10 ⁵ , s.c.	2, 23 PP	----	n.e.	baja a día 23 PP (PCR)	17-22 PP	Liddell et al., 1999

a: Nc-1 (Dubey et al., 1988b); Nc-Liverpool (Barber et al., 1993; Barber et al., 1995); Nc-Nowra (Miller et al., 2002); Nc-SweB1 (Stenlund et al., 1997); Nc-7 (Koyama et al., 2001); i.p.: intraperitoneal; s.c.: subcutánea; i.v.: intravenosa

b: PP: días post-parto; dg: días de gestación

d: Técnica diagnóstica: PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, *polymerase chain reaction*); IHQ: inmunohistoquímica; c.c.: cultivos celulares

n.e.: no se especifica en el estudio

n.d.: no detectado

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 y Baszler, 1996). Sin embargo, estudios más recientes donde se emplean técnicas de diagnóstico más sensibles como la PCR, han detectado una elevada tasa de transmisión vertical (Omata et al., 2004; Ramamoorthy et al., 2007). Cuando la infección tiene lugar entre los días 5 y 12 de gestación, el 100 % de las camadas transmitieron la infección a la progenie en el día 7 post-parto (PP) (Omata et al., 2004; Quinn et al., 2002a). Por otro lado, cuando la infección experimental se realiza después de la mitad de la gestación, sólo se ha detectado el ADN del parásito en un número reducido de crías en el día 23 PP (Liddell et al., 1999) y en algunos casos, no se observa transmisión en las madres infectadas entre los días 15 y 19 de gestación (Cole et al., 1995; Omata et al., 2004). Por tanto, la transmisión congénita es más elevada cuando la infección tiene lugar antes de la mitad de la gestación y variable con posterioridad. Esta variabilidad podría ser debida a la respuesta inmunitaria o al corto periodo de tiempo para la multiplicación y diseminación del parásito antes del parto (Cole et al., 1995; Liddell et al., 1999).

Gestaciones sucesivas

En los primeros estudios de la infección por *T. gondii* se describió la transmisión congénita en ratones crónicamente infectados y en gestaciones sucesivas (Beverley, 1959; De Roever-Bonnet, 1969; Remington, 1961). Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que la transmisión vertical sólo ocurre en ratones infectados por primera vez durante la gestación. Además, ratones BALB/c crónicamente infectados no transmitieron la infección a la progenie, incluso cuando son reinfectados de nuevo durante la gestación (Pezzerico et al., 2009).

En *N. caninum*, la transmisión de la infección en la segunda gestación también ha sido investigada. 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., 2004b). De hecho, en la segunda gestación, sólo el 25 % de las camadas transmitió la infección y ninguna en la tercera ni la cuarta, lo que podría ser debido a una disminución en el número de parásitos acantonados en los tejidos maternos o a un secuestro de los parásitos por parte de la madre (Cole et al., 1995; Omata et al., 2004).

2.2.2. Respuesta inmunitaria

A pesar de que una respuesta inmunitaria de tipo 1 tiene un papel protector frente a la neosporosis murina cerebral se ha sugerido que, en los animales gestantes, una respuesta de tipo 1 podría comprometer la gestación y contribuir a la muerte del feto, principalmente, si se produce en la placenta (Innes et al., 2002).

En el modelo murino gestante, aún se desconoce el mecanismo responsable de la pérdida fetal y de la transmisión vertical. Se ha observado que no se requiere la presencia del parásito en la placenta o en los tejidos fetales para que tenga lugar la muerte fetal (Long y Baszler, 1996). Por otro lado, parece que el tipo de citoquinas secretadas podría tener un papel importante en la prevención de la transmisión congénita o en la inducción de la muerte del feto, 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 y Baszler observaron una disminución en la transmisión vertical cuando los animales fueron infectados con una dosis subletal 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 (Long y Baszler, 2000). Este estudio demostró que la modulación de las citoquinas de tipo 2 antes de la gestación puede reducir la frecuencia de transmisión vertical de *N. caninum*. Sin embargo, aún 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 posteriores, se ha observado un aumento en la producción de IFN- γ , IL-12, TNF- α 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- γ y de IL-4 en suero (Kano et al., 2005). Estos resultados demuestran que no se produce una polarización hacia una respuesta de tipo 1 o 2 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 2 que permitiría el mantenimiento de la misma (Entrican, 2002; Roberts et al., 2001). Así, en ratones tratados con progesterona, se ha observado una considerable reducción en la producción de IFN- γ después de la infección por *N. caninum*, lo que apoya la idea de que la progesterona puede atenuar una respuesta de tipo 1, 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 1 (Long y Baszler, 2000) como de tipo 2 (Haldorson et al., 2005) pueden reducir la transmisión transplacentaria, lo que probablemente refleja la complicada naturaleza del problema.

3. IMPORTANCIA DE LA PLACENTA EN LA PATOGENIA DE LA INFECCIÓN

La placenta puede jugar un papel importante en la patogenia de la neosporosis. Además de ser una barrera biológica que el parásito tiene que atravesar para llegar al feto, es un sitio único desde el punto de vista inmunológico ya que, por un lado, tiene que facilitar la implantación y promover la tolerancia al feto y, por otro lado, tiene que mantener la defensa frente a posibles agentes patógenos (Rindsjö, 2008).

Si la placenta resulta dañada como resultado de la multiplicación del parásito, su capacidad de mantener la gestación puede verse comprometida. Además, el sistema inmunitario materno podría, por sí mismo, precipitar el aborto. Por ello, en la neosporosis, el papel de la placenta en la patogenia de la infección es crítico. El conocimiento de los efectos de la infección en esta interfase entre la madre y el feto, podría ayudar a comprender los factores que precipitan el aborto en algunos animales o permiten la

transmisión en otros (Maley et al., 2006). Sin embargo, antes de discutir el posible papel de la placenta durante la infección por *N. caninum*, es necesario recordar la estructura de la misma y las diferencias existentes entre las especies bovina y murina.

3.1. Estructura y función

La placenta se forma por aposición de membranas fetales y tejidos maternos, cuya principal función consiste en regular el intercambio fisiológico entre la madre y el feto, tanto para el intercambio de nutrientes como en el de productos de desecho. De forma esquemática, se compone de dos partes: la parte materna o mucosa uterina más o menos modificada y la parte fetal provista de vellosidades. Los componentes fetales de la barrera placentaria (trofoblasto, tejido conectivo fetal y endotelio fetal) se conocen con el nombre de corion. Según el número y características de las capas celulares que se interponen entre la sangre de la madre y del feto, los roedores y rumiantes presentan placentas diferentes (Entrican, 2002) (Tabla 5 y Figura 6).

Según la clasificación morfológica de Strahl, la placenta es múltiple o cotiledonaria en los rumiantes y las vellosidades del corion se encuentran agrupadas en pequeñas zonas, constituyendo cotiledones. En el caso de los roedores, la placenta es discoidal y las vellosidades están agrupadas en un área circular u ovalada. De acuerdo con la clasificación histológica de Grosser, la placenta es epiteliocorial en los bovinos porque no se observa destrucción de los tejidos maternos y el epitelio de la mucosa del útero contacta con el corion. Además, el trofoblasto está separado de las células maternas por tres capas de tejidos (trofoblasto, tejido conectivo fetal y endotelio fetal). En los ratones, la placenta es hemocorial y existe una extensa invasión fetal en los tejidos maternos. Se observa destrucción del endotelio vascular materno y el epitelio del corion se baña directamente en la sangre materna (Bainbridge, 2000; Benirschke y Kaufmann, 2000; Paniagua et al., 1997).

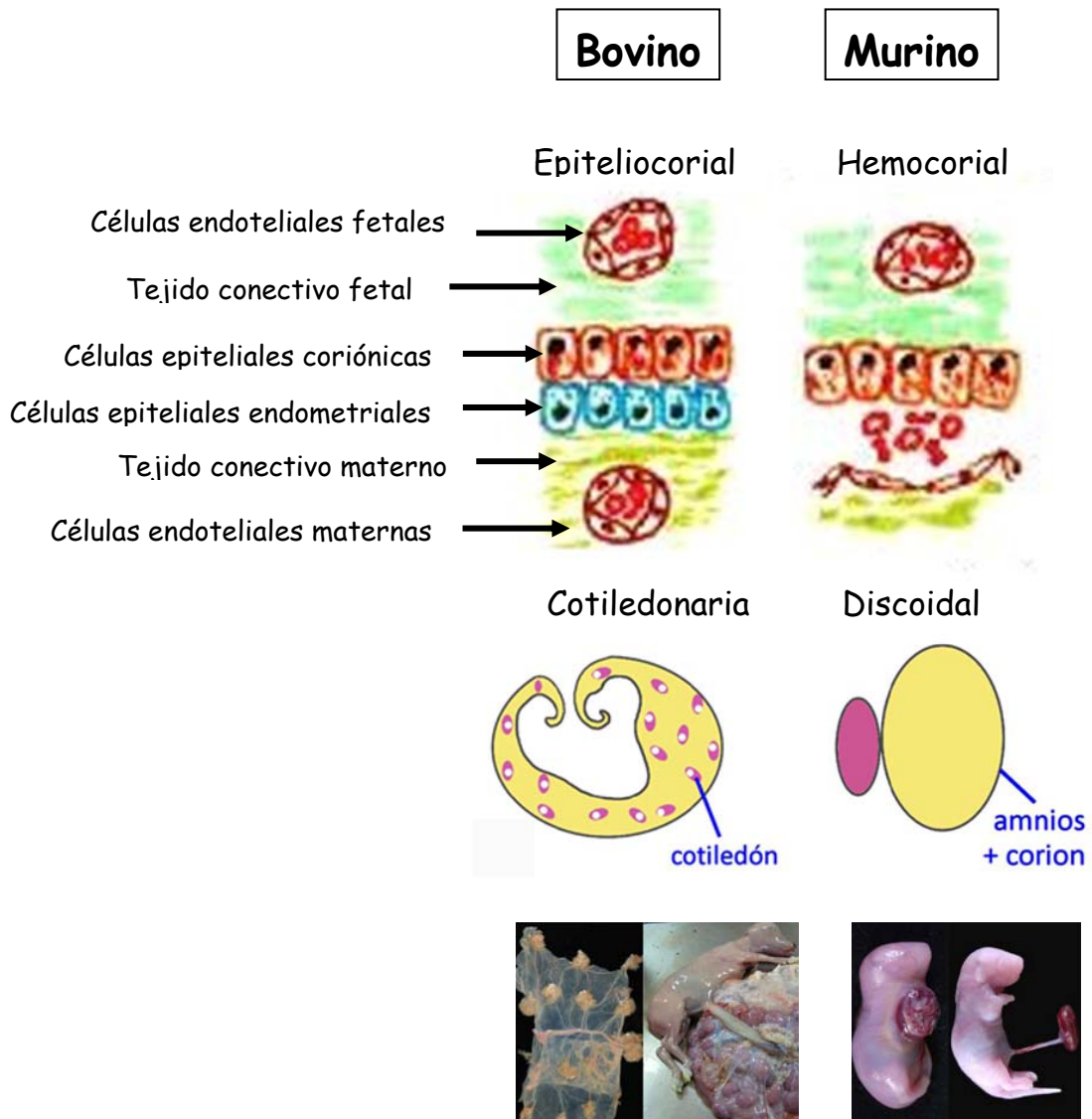
Tabla 5. Estructura y características de las placentas de los rumiantes y roedores según la clasificación morfológica de Strahl e histológica de Grosser (adaptado de Entrican, 2002).

Especie	Tipo de placenta	Características
Rumiantes	Cotiledonaria, epiteliocorial	Epitelio uterino intacto y en contacto con el corion
Roedores	Discoidal, hemocorial	Desaparecen todas las capas del endotelio materno El corion se baña directamente en la sangre de la madre

3.2. Placenta y neosporosis

Los cambios patológicos que se observan en la placenta y en el feto después de la infección experimental por *N. caninum* en el ganado bovino (Barr et al., 1994; Gibney et al., 2007; Macaldowie et al., 2004; Maley et al., 2003; Rojo-Montejo et al., 2009a; Rosbottom et al., 2008) son similares a las que se producen en infecciones naturales (Barr et al., 1994; Bergeron et al., 2001; Dubey y Lindsay, 1996; Wouda et al., 1997). En este sentido, se ha demostrado que *N. caninum* invade el útero bovino y provoca la destrucción focal del tejido materno y fetal en la interfase materna, donde se desarrolla un extensa respuesta inflamatoria no supurativa (Macaldowie et al., 2004; Maley et al., 2003; Maley et al., 2006).

Figura 6. Estructura de la placenta en vacas y en ratones en función de la clasificación histológica de Grosser y morfológica de Strahl (adaptado de Ruberte et al., 2009; Teisaire et al., 2010).



En general, las infecciones experimentales al principio de la gestación provocan la muerte del feto y producen cambios patológicos más graves tanto en el lado materno como fetal de los placentomas. En estos casos, se observa una extensa necrosis focal del epitelio y un infiltrado intersticial de células mononucleares, demostrándose una amplia distribución del parásito. También, se ha detectado su presencia en las lesiones en los fetos estudiados (Gibney et al., 2007; Macaldowie et al., 2004; Maley et al., 2006; Rosbottom et al., 2008).

La infección hacia la mitad de la gestación produce la infiltración de células polimorfonucleares y mononucleares tanto fetales como maternas. Además, se observa necrosis fetal en las carúnculas maternas y en las vellosidades fetales junto con una respuesta inflamatoria por parte de la madre y del feto. En días posteriores, las lesiones en la placenta muestran signos de resolución, indicando que la infección está siendo controlada y que puede no terminar en fallo reproductivo (Maley et al., 2003).

Por último, se han encontrado pequeños focos de necrosis y una respuesta inflamatoria mínima en la placenta de los animales infectados en el último tercio de la gestación, donde se observa la supervivencia del feto (Gibney et al., 2007; Rosbottom et al., 2008). Además, se ha observado un bajo número de parásitos en los fetos, lo que podría sugerir que la respuesta inmunitaria fetal es capaz de controlar la infección (Bartley et al., 2004; Gibney et al., 2007).

3.3. Respuesta inmunitaria

La infección por *N. caninum* durante la gestación plantea un dilema para la madre a la hora de controlar la infección. Por un lado, una respuesta del tipo 2 que es necesaria para el mantenimiento de la gestación (Wegmann et al., 1993) puede permitir la transmisión del parásito al feto por incremento de la carga parasitaria en los tejidos maternos (Entrican, 2002; Innes et al., 2002; Quinn et al., 2002b) facilitando la transmisión transplacentaria. Por otro lado, la multiplicación del parásito durante la gestación podría alterar el balance inmunológico en la interfase materno-fetal ya que patógenos intracelulares como *N. caninum* estimulan una respuesta mediada por células caracterizada por citoquinas del tipo 1 (Entrican, 2002; Innes et al., 2002; Quinn et al., 2002b). Estos mecanismos pueden jugar un papel muy importante en la reducción de la multiplicación del parásito y de la parasitemia (Quinn et al., 2002b). Sin embargo, la producción de citoquinas proinflamatorias podría comprometer la viabilidad del feto (Raghupathy, 1997) (Figura 7).

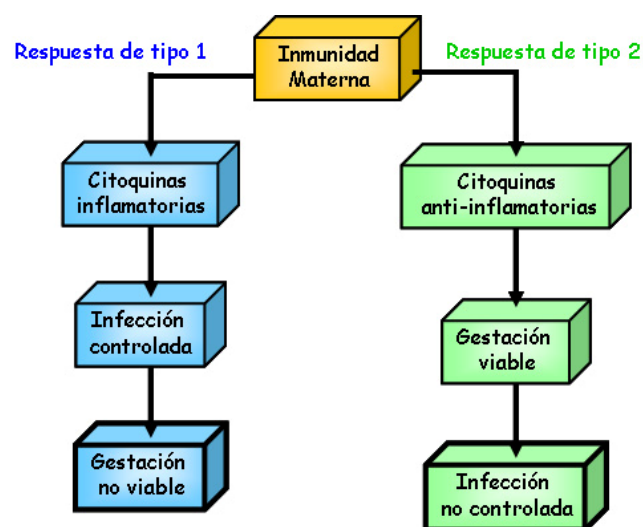
Una situación similar ocurre en la infección de ratones gestantes con *Leishmania major* donde la infección es más grave con respecto a los ratones no gestantes y provoca lesiones más extensas, ya que la capacidad de producir IFN- γ en los animales gestantes se encuentra alterada (Krishnan et al., 1996a). Por el contrario, cuando se induce una fuerte respuesta inmune de tipo 1 en los ratones gestantes se produce un aumento en el número de reabsorciones fetales en comparación con los ratones gestantes no infectados, aunque las lesiones son más pequeñas y se puede llegar a controlar la infección (Krishnan et al., 1996b). Por ello, en la infección por *N. caninum*, el carácter de la respuesta inmunitaria en la interfase materno-fetal podría ser un factor importante que determine si la infección causa la muerte del feto o su supervivencia y la transmisión congénita de la misma (Innes et al., 2002; Quinn et al., 2002b). Sin embargo, todavía no se sabe si el aborto es debido a la multiplicación de *N. caninum* o a un daño causado por la respuesta inflamatoria frente a la infección o a

ambos hechos (Almería et al., 2003; Entrican, 2002; Innes et al., 2002; Maley et al., 2003; Quinn et al., 2002b).

En infecciones experimentales en el ganado bovino en el día 70 de gestación, se han detectado niveles muy elevados de citoquinas de tipo 1 y 2 en la interfase materno-fetal en aquellos animales en los que se ha observado muerte fetal (Rosbottom et al., 2008). Por el contrario, en el animales infectados experimentalmente al final de la gestación, cuando el feto sobrevive a la misma, sólo se ha encontrado un ligero aumento en la expresión de citoquinas en la placenta (Gibney et al., 2007; Rosbottom et al., 2008). Aunque el balance entre la respuesta de tipo 1 y 2 es similar en ambos casos, la magnitud de la expresión de las citoquinas es muy diferente, observándose solo un significativo aumento en los placentomas de aquellos animales en los que se produce la muerte fetal (Rosbottom et al., 2008). Estos resultados concuerdan con estudios previos en los que se observa un aumento en la expresión de IFN- γ e IL-4 en células mononucleares sanguíneas en respuesta a la infección (Rosbottom et al., 2007).

En cuanto al modelo murino, no existen estudios donde la respuesta inmunitaria haya sido evaluada en la interfase materno fetal, a pesar de que esta especie es usada frecuentemente como modelo para la infección por *N. caninum* y, en especial, como modelo de transmisión transplacentaria (Liddell et al., 1999; Long y Baszler, 1996; Omata et al., 2004; Quinn et al., 2002a; Ramamoorthy et al., 2007).

Figura 7. Posible desenlace de la gestación en función del tipo de respuesta inmune desarrollada por la madre tras la infección por *N. caninum* durante la gestación (adaptada de Quinn et al., 2002b). Una respuesta dominante de tipo 1 en el sistema inmunitario materno podría dar lugar a la sobreproducción de citoquinas inflamatorias, que favorecen el control de la infección pero que son perjudiciales para la supervivencia del feto. Por el contrario, una respuesta dominante de tipo 2 permite el desarrollo del feto, pero no puede controlar adecuadamente la infección por el parásito, causando un aumento de la carga parasitaria en la madre y facilitando la transmisión transplacentaria del parásito.



4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Hasta la fecha, se han desarrollado varios modelos murinos gestantes en un intento de conocer los mecanismos de la pérdida fetal y la transmisión vertical inducidos por *N. caninum*. Aunque hoy sabemos que las consecuencias en el feto van a depender del periodo de gestación en el que se produce la infección, aún desconocemos la relación entre el periodo de infección, la transmisión vertical y la pérdida fetal. Además, a pesar de los diferentes ensayos llevados a cabo tanto en modelos bovinos como murinos, no hay ningún estudio donde la infección en los tres tercios de la gestación haya sido estudiada simultáneamente y tampoco existen trabajos en los que se evalúe la influencia de la infección durante la gestación en el desarrollo post-natal de la progenie. También permanece sin esclarecer si el desenlace de la gestación se debe a una invasión directa y multiplicación del parásito en el feto (Barr et al., 1990; Dubey et al., 1990b), a un aporte insuficiente de oxígeno y nutrientes debido a un daño placentario o a un cambio hacia una respuesta inmune del tipo 1 en la interfase materno-fetal, que podría provocar por sí misma la muerte fetal (Entrican, 2002; Innes et al., 2002; Quinn et al., 2002b).

El estudio de los cambios que tienen lugar en la interfase materno-fetal como consecuencia de la infección podría esclarecer alguno de los factores que precipitan el aborto o permiten la transmisión del parásito a la descendencia. En este sentido, el desarrollo de un modelo murino gestante sería de gran utilidad para estudiar los mecanismos que influyen en el aborto o en la transmisión congénita del parásito y para el desarrollo de futuras estrategias de prevención y tratamiento de la infección en los animales domésticos.

Debido a las consideraciones anteriores, en esta tesis doctoral se ha evaluado, por una parte, la influencia de la infección por *N. caninum* durante la gestación y en el periodo post-natal en un modelo murino gestante y, por otra, los cambios patológicos e inmunológicos que tienen lugar en este mismo modelo en la placenta. Para ello, se han definido y abordado los siguientes objetivos:

Objetivo 1 (Capítulo II). Efecto comparativo de la infección por *N. caninum* en ratones BALB/c en los tres tercios de la gestación.

Se ha evaluado el efecto de la infección por *N. caninum* durante los tres periodos de la gestación y los primeros días post-parto. Para ello, se ha estudiado el efecto de la infección en la progenie valorando la mortalidad fetal, el nacimiento de crías muertas y el tamaño de la camada. También se ha analizado la morbilidad y mortalidad neonatal, la transmisión vertical y la carga parasitaria en los tejidos de las crías en los días 1 y 7 PP.

Además, se ha analizado la distribución del parásito en la madre y su posible relación con el desarrollo de la gestación y la transmisión de la infección a la progenie. Por último, se ha evaluado la presencia del parásito en la glándula mamaria y en la leche para evaluar la existencia de la transmisión galactófora a los neonatos.

Objetivo 2 (Capítulo III). Influencia de la infección por *N. caninum* durante la gestación en el desarrollo post-natal en ratones BALB/c.

Se ha estudiado la influencia de la infección por *N. caninum* en los tres periodos de gestación sobre el desarrollo post-natal de las crías. Para ello, se han evaluado los signos clínicos, la mortalidad y la presencia de ADN del parásito en los neonatos hasta el día 60 post-parto. Además, se ha determinado la posible causa de mortalidad en la progenie mediante el estudio histopatológico de las lesiones en cerebro, hígado, corazón y pulmón de los neonatos. Por último, se ha estudiado el posible desarrollo de un fenómeno de inmunotolerancia en las crías como consecuencia de la exposición al parásito en el útero, después de la infección de las madres.

Objetivo 3 (Capítulos IV y V). Efecto de la infección por *N. caninum* en los días 0, 7 y 14 de gestación en la placenta en un modelo murino gestante.

Por último, dado que la infección en el día 7 de gestación tiene consecuencias más graves sobre la gestación que la infección en los días 0 y 14 de gestación, se ha estudiado la importancia de la placenta y su posible papel en la transmisión del parásito a la descendencia después de la infección de ratones gestantes en cada uno de los tercios de la gestación. Para ello, se ha evaluado la presencia del parásito y la carga parasitaria, la respuesta inmunitaria local y sistémica y las lesiones histopatológicas en la interfase materno-fetal después de la infección de las ratonas gestantes en los días 0, 7 y 14 de gestación.

Capítulo II

Comparative effect of *Neospora caninum* infection in BALB/c mice at three different gestation periods

**Inmaculada C. López-Pérez, Verónica Risco-Castillo,
Esther Collantes-Fernández, and Luis Miguel Ortega-Mora**

SALUVET Group
Animal Health Department
Veterinary Faculty
Complutense University of Madrid
28040 Madrid

The Journal of Parasitology, 92 (6): 1286-1291, 2006

Abstract

Neospora caninum has been recognized as a major cause of infectious bovine abortion worldwide. In the present study, the effect of *N. caninum* infection in mice at the three gestation periods (first, second, and third period) was investigated. In dams, tissue distribution of *N. caninum* was evaluated by nested polymerase chain reaction. In the progeny, foetal mortality, stillbirth, litter size, neonatal mortality/morbidity, vertical transmission, and parasite burden in neonatal tissues were evaluated. Pregnant BALB/c mice were infected subcutaneously with 2×10^6 Nc-1 tachyzoites on days 0, 7, or 14 of gestation. Dams from each group were sequentially killed during gestation and post-partum (PP). Pups were killed on days 1 and 7 PP. Infection on day 0 of gestation produced a high vertical transmission rate, although no changes in foetal mortality, stillbirth, and littermate size were observed. The highest level of vertical transmission, together with an increase in foetal mortality and stillbirth and a decrease in litter size, were observed when infection was done on day 7 of gestation. Finally, infection on day 14 of gestation produced the lowest vertical transmission. Furthermore, infection at any time during gestation compromised the postnatal development of pups, because neonates from infected dams showed less body weight and a delay in the hair development.

1. Introduction

Neospora caninum is a tissue cyst-forming protozoan closely related to *Toxoplasma gondii*, which has been recognized as a major cause of infectious bovine abortion worldwide (Dubey & Lindsay, 1996). In cattle, *N. caninum* can be transmitted from cows to the foetus by either endogenous or exogenous transplacental infection (Trees & Williams, 2005) together with a high proportion of chronically (congenitally) infected cows transmitting the parasite through successive pregnancies. *N. caninum* infection is generally latent and asymptomatic in nonpregnant cattle, although the consequences of either primo infection or recrudescence in a pregnant cow can be abortion, birth of a weak calf, or birth of a clinically healthy but persistently infected calf.

Previous experimental studies in cattle have demonstrated the importance of the timing of *N. caninum* infection during pregnancy. When infection occurs before gestation, the birth of full-term seronegative calves has been observed (Innes et al., 2001). Infections acquired early in pregnancy commonly cause foetal death as demonstrated by experimental infections (Macaldowie et al., 2004; Williams et al., 2000). Infection at mid-gestation may result in abortion or the birth of a persistently infected calf (Innes et al., 2001). However, cows infected during late pregnancy usually deliver healthy but congenitally infected calves (Williams et al., 2000).

Several mouse models have been developed as an attempt to study the effect of *N. caninum* infection during pregnancy. The use of mice has many advantages, i.e., for its small size, low cost, easy management, short gestation period, and litter size. In this model, the day of infection during pregnancy also seems to be a determining factor in foetal losses as well as in the rate of transmission to the offspring. In mice infected before pregnancy, no differences were present in resorptions between infected and control mice, although litter size was decreased in the infected mice (Long & Baszler, 1996). In mice inoculated during early pregnancy (day 5 or 8 of gestation), resorptions were increased in the infected mice compared with the control mice (Long & Baszler, 1996; Quinn et al., 2002). In contrast, no foetal losses were detected when dams were infected late in gestation (Long & Baszler, 1996). When infection was carried out before or early in gestation (day 5), the parasite was not detected in foetal tissues on days 13 - 19 of pregnancy (Long & Baszler, 1996). High transmission has been observed when infection occurs between days 5 and 12 of gestation (Liddell et al., 1999; Long & Baszler, 1996; Quinn et al., 2002). However, when infection occurs between days 13 and 15 of pregnancy, the parasite has been only detected in a reduced number of pups on day 23 post-partum (PP) by polymerase chain reaction (PCR) (Liddell et al., 1999).

Despite many reports on pregnant mouse models, there are no investigations where the effect of infection at the three gestation periods was investigated simultaneously and within the same experimental design. In the present study, the effect of *N. caninum* infection in mice at the three gestation periods (first, second, and third period) was investigated. In dams, tissue distribution of *N. caninum*, and its likely relationship with the outcome of gestation and transmission to offspring were evaluated. In the progeny, foetal mortality, stillbirth, litter size, neonatal mortality/morbidity, vertical transmission, and parasite burden in neonatal tissues were evaluated. In addition, the presence of the parasite in the mammary gland and milk and its relationship with its possible transmammary transmission to the progeny also was investigated.

2. Materials and methods

2.1. Mice

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 routine screening procedures performed by the manufacturer. Mice were fed *ad libitum*, in a controlled environment with 12 hour light/dark cycles. At eight weeks of age, after using the Whitten effect (Whitten, 1957), females were mated for one night, and the day 0 of gestation was determined by the presence of the vaginal mucoid plug. Fertility for this protocol was 30 %.

2.2. Parasite and preparation of inoculum

Neospora caninum Nc-1 tachyzoites were maintained in vitro by continuous passage in MARC-145 cells by using standard procedures described previously (Pérez-Zaballos et al., 2005). Cultures were scraped, and parasites were passed through a 25-gauge needle to eliminate cellular debris. Tachyzoites were centrifuged for 15 minutes at 1,350 *g* and resuspended in sterile phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4. The viability was determined by trypan blue exclusion followed by counting them using a Neubauer chamber. Parasites were resuspended at the required dose in a final volume of 200 μ l/mouse and used immediately to infect mice. Tachyzoites for PCR controls were harvested from tissue culture and washed three times in sterile PBS, pH 7.4, and separated from host cell debris by passing the mixture through a 25-gauge needle following passage through a 5- μ m polycarbonate filter. The average number of tachyzoites was determined by counting five aliquots by using a Neubauer chamber (standard error of the mean \leq 5%). An amount corresponding to 1×10^7 tachyzoites of *N. caninum* was pelleted and stored at -80 °C, until DNA extraction.

2.3. Experimental design

Pregnant animals were randomly allocated in three experimental groups. In group A, mice were infected on day 0 of gestation and killed on days 7 and 14 of gestation and on days 1 and 7 PP. In group B, infection was done on day 7 of gestation, and animals were killed on days 10 and 14 of gestation and on days 1 and 7 PP. In group C, mice were inoculated on day 14 of gestation and killed on day 17 of gestation and on days 1 and 7 PP. Infection was achieved by subcutaneous inoculation with 2×10^6 Nc-1 tachyzoites. A group of pregnant mice was inoculated with PBS and kept as an uninfected control in each point of infection. Eight infected dams and three control animals were randomly killed per group with CO₂ gas at each point detailed above. Offspring were killed on days 1 and 7 PP.

2.4. Parameters evaluated

All dams were weighed daily and observed for clinical signs compatible with neosporosis, as described in previous studies (Atkinson et al., 1999; Eperon et al., 1999; Lindsay & Dubey, 1989; Lindsay et al., 1995). The presence of *N. caninum* was detected in blood, lung, brain, and mammary gland on days mice were killed and in milk on day 6 PP, by using a nested PCR. Consequences of the infection in the outcome of gestation were evaluated by investigating foetal mortality, stillbirth, litter size, neonatal mortality/morbidity, and extent of vertical transmission. Foetal mortality (resorptions) was identified on the basis of small foetal size (≤ 3 mm) or lack of discernible foetal tissue at an implant site containing placenta tissue (Long & Baszler, 1996). Resorptions were determined on day 14 of gestation and on day 1 PP for groups A and B or on day 17 of gestation and on day 1 PP for group C. Stillbirth was evaluated as the number of full-term dead pups at birth. Litter size was defined as the number of live pups delivered per dam. Neonatal mortality was considered as the number of dead pups after birth and during the first week of life. Neonatal morbidity was evaluated, and pups were observed daily for the presence of clinical signs and weighted on days 1 and 7 PP. Vertical transmission rate was determined on each day offspring were killed (1 and 7 PP), by detecting the parasite in lung or brain by nested PCR in pups. Parasite loads were determined by real time-PCR in lung and brain of neonates.

2.5. Samples from dams and offspring

Blood samples from dams were collected by cardiac puncture at necropsy and recovered in a tube with EDTA. Peripheral blood cells were obtained by centrifugation at 3,000 *g* for 15 minutes for DNA extraction. Brain, lung, and mammary gland tissues were collected from dams in aseptic conditions and frozen at -80 °C, until DNA extraction. In mice killed on day 7 PP, a milk sample was obtained from dams on day 6 PP. For this purpose, animals were anesthetized with 50 mg/kg ketamine (Alfasan, Woerden, The Netherlands) and 2.5 mg/kg xilacine (Bayer AG, Leverkusen, Germany), both administered intraperitoneally (i.p.). Then, dams were injected i.p. with 0.3 units of oxytocin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), and milk was obtained by gentle handling and stripping the mammary glands. Samples were processed using previously described procedures (Moon et al., 1988). Briefly, milk was emulsified by addition of two volumes of saline solution and centrifuged at 20,000 *g* for one hour at 4 °C. After elimination of the lipid phase and supernatant, the pellet was processed for DNA extraction. In groups A and B, resorptions observed on days 14 of gestation and 1 PP were also recovered for PCR analysis. Resorptions observed in group C were not considered for nested PCR analysis because they might be resorpted before experimental infection. On days 1 and 7 PP, brain and lung from pups were collected separately in aseptic conditions and frozen at -80 °C, until DNA extraction.

2.6. DNA extraction and nested PCR detection

Genomic DNA was extracted using commercial kits following manufacturer's instructions. We used *Real Pure DNA Extracción ADN SSS* (Durviz, Valencia, Spain) for blood samples and *Real Pure DNA Extracción ADN genómico* for tissues. The amount of DNA in samples was measured spectrophotometrically and was diluted to a final concentration of 40 ng/μl. For detection of parasite DNA, a nested PCR based on the internal transcribed spacer 1 (ITS1) region of *N. caninum* was carried out as described previously (Buxton et al., 1998). DNA from 1×10^7 Nc-1 tachyzoites also was extracted for PCR control. The detection limit of *N. caninum* by nested-PCR was 1×10^{-2} tachyzoites and was determined by assaying serial ten-fold dilutions of parasite DNA equivalent to 1×10^{-3} to 1×10^4 tachyzoites in a background of 100 ng of mouse genomic DNA. The detection limit of nested PCR for milk samples was one tachyzoite and was achieved by infecting a background of 100 μl of milk from mice with 1×10^{-1} to 1×10^4 tachyzoites, after the sample collection.

2.7. Real-time PCR

Parasite DNA in positive PCR tissues from pups was quantified by real-time PCR (Collantes-Fernández et al., 2002) by using an *ABI 7300 Prism sequence detector machine* (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) and the commercial kit *Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG* (Invitrogen, Paisley, United Kingdom). We used primer pairs from the *N. caninum* Nc-5 sequence to quantify parasites and primers from the 28S rRNA gene to quantify host DNA. Samples were run in duplicate in separate tubes. *N. caninum* organisms were quantified by interpolation of cycle threshold (the fractional cycle number reflecting a positive PCR result) values on a standard curve from DNA equivalent to 1×10^{-1} - 1×10^4 tachyzoites. The amount of DNA per sample was normalized by quantification of the 28S rRNA gene, and a standard curve was generated with five-fold serial dilutions of mouse brain DNA quantified by UV spectrophotometry. Data were analyzed with *Sequence Detection System Software version 1.6* (Applied Biosystems). Parasite load was expressed as parasite number per microgram of host DNA. The limit of detection for the assay was 1×10^{-1} tachyzoites as described previously (Collantes-Fernández et al., 2002).

2.8. Analysis of data

A one-way analysis of variance (ANOVA) test followed by Duncan's multiple range test was used to compare the body weight and litter size. Differences in foetal mortality, stillbirth, and vertical transmission were analyzed by chi-square test. Differences in parasite burdens between groups were analyzed by a nonparametric Kruskal-Wallis test. When statistical differences were found, a nonparametric multiple comparison test was used 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 group number. Finally, to evaluate whether parasite burden correlated with body weight in neonates, regression analysis was performed to determine the Pearson correlation coefficient, r ; the strength of the relationship was expressed as r^2 . All statistical analyses were carried out using SAS software version 8.2 (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA) and Statgraphics Plus version 5.1 (StatPoint, Inc., Herndon, Virginia, USA).

3. Results

3.1. *Neospora caninum* infection in dams

Morbidity

No infected animal showed body weight changes against the control group during the experiment (data not shown). In addition, no compatible clinical signs of neosporosis were observed in dams. At necropsy, enlarged spleen and mesenteric and cervical lymph nodes were observed from day 7 PI in groups A and B and from day 3 PI onward in group C.

Presence of parasite DNA in dam samples

Detection of *N. caninum* DNA in blood, lung, brain, mammary gland, and milk is shown in Table 1. No differences were found concerning the distribution of the parasite in lung and brain between groups (lung: $P = 0.1810$, $\chi^2 = 3.42$; brain: $P = 0.6302$, $\chi^2 = 0.92$). Parasite DNA was found in the mammary glands during the first days of infection in group A (days 7 and 14 PI). In group B, it was identified from day 14 of gestation (7 PI) until the end of the experiment. In group C, *N. caninum* DNA was detected in one mouse as early as on day 17 of gestation (3 PI), although it was mainly found on day 1 PP (6 PI). No differences were found in the presence of *N. caninum* DNA in this tissue between groups ($P = 0.7575$, $\chi^2 = 0.56$). In milk samples, parasite DNA was only detected in group C in three dams on day 6 PP, and significant differences were found when groups were compared ($P = 0.0324$, $\chi^2 = 6.86$).

Table 1. Detection of *N. caninum* in tissues of dams infected on day 0 (group A), day 7 (group B), and day 14 (group C) of gestation.

Group	Sacrifice day	(PI)	Blood	Lung	Brain	Mammary gland	Milk*
A	7g†	(7 PI) ‡	0/8	8/8	0/8	2/8	
	14g	(14 PI)	0/8	5/8	7/8	1/8	
	1PP	(20 PI)	0/8	5/8	6/8	0/8	
	7PP	(26 PI)	0/8	1/8	7/8	0/8	0/8
B	10g	(3 PI)	0/8	3/8	0/8	0/8	
	14g	(7 PI)	0/8	7/8	3/8	6/8	
	1PP	(13 PI)	0/8	7/8	5/8	1/8	
	7PP	(19 PI)	0/8	4/8	7/8	3/8	0/8
C	17g	(3 PI)	0/8	6/8	0/8	1/8	
	1PP	(6 PI)	2/8	8/8	0/8	5/8	
	7PP	(12 PI)	1/8	8/8	7/8	0/8	3/8

* Samples were taken on day 6 post-partum

† Day of gestation (g: day of gestation; PP: day post-partum)

‡ Day post-infection

3.2. Evaluation of *N. caninum* infection in progeny

Foetal mortality, stillbirth, and litter size

An increase in foetal mortality, significant at the 90 % confidence level, was observed in group B versus the uninfected control group ($P = 0.058$, $\chi^2 = 3.59$) (Table 2). No differences were found between infected and uninfected control mice in groups A ($P = 0.1744$, $\chi^2 = 1.84$) and C ($P = 1$, $\chi^2 = 0$) or between infected groups ($P = 0.4052$, $\chi^2 = 1.81$). Resorptions were recovered for nested PCR analysis in groups A and B with a higher number of infected nonviable foetuses found in group A (15 of 20, 75 %) versus group B (11 of 25, 44 %). However, statistical analysis did not show a significant difference between groups ($P = 0.4580$, $\chi^2 = 0.55$). No differences in stillbirth were found between infected and control animals in group A ($P = 0.5193$, $\chi^2 = 0.42$) and group C ($P = 1$, $\chi^2 = 0$) (Table 2). In group B, infection

significantly increased the number of stillborns versus uninfected mice ($P = 0.0302$, $\chi^2 = 4.70$). In addition, stillbirth was significantly increased in group B versus A and C ($P = 0.0025$, $\chi^2 = 11.96$). We found a higher number of PCR-positive stillborns in group B (12 of 17, 71 %) versus those from group A (6 of 11, 55 %) and group C (0 of 4), although there were no significant differences ($P = 0.2479$, $\chi^2 = 2.79$). A decrease in the number of pups born alive in infected dams was detected in group B (Table 2) versus the control ($P = 0.0831$, $F = 3.33$, one-way ANOVA, Duncan's multiple range test). Furthermore, infection in group B produced the smallest litter size versus groups A and C ($P = 0.0043$, $F = 6.17$, one-way ANOVA, Duncan's multiple range test).

Table 2. Effect of *N. caninum* infection in dams infected on day 0 (group A), day 7 (group B), and day 14 (group C) of gestation on foetal mortality, stillbirth, and littermate size.

Group		Foetal mortality		Stillbirth		Littermate size*
A	Infected	20/117 (17 %) †	8 (0-19.3) ‡	11/102 (11 %) †	0 (0-14.6) ‡	6.4 ± 4.5
	Control	5/59 (9 %)	0 (0-17.5)	4/52 (8 %)	0 (0-12.5)	6.5 ± 1.1
B	Infected	24/109 (22 %)	19.1 (0-23.6)	17/80 (21 %)	5.6 (0-27.5)	4.75 ± 2.4
	Control	3/49 (6 %)	5 (0-10)	1/41 (2 %)	0 (0-0)	6.7 ± 1.4
C	Infected	15/109 (14 %)	11.8 (0-22)	4/110 (4 %)	0 (0-0)	6.7 ± 1.3
	Control	8/55 (15 %)	5.6 (0-22.2)	2/55 (4 %)	0 (0-5.6)	6.8 ± 1.3

* Average ± SE

† Number of resorptions or stillbirth /number of total viable foetuses (percentage)

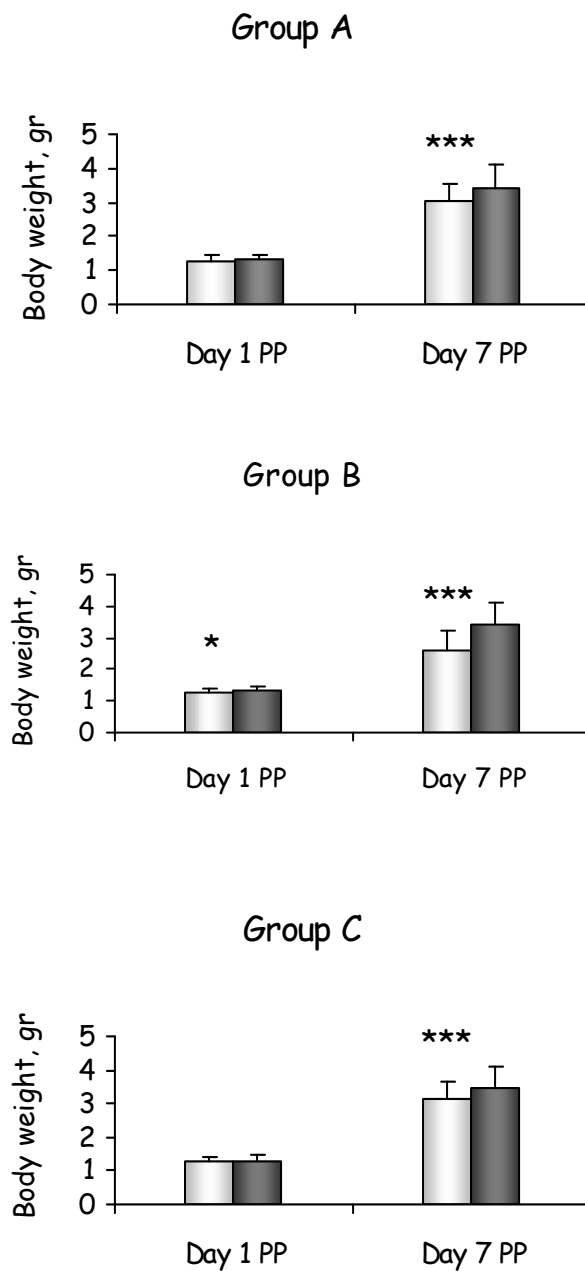
‡ Median of resorptions or stillborns per littermate (lower and upper quartiles)

Neonatal mortality and morbidity

Very low rate of neonatal mortality was found and only one pup (1/50) from group A died on day 2 PP, in which the parasite DNA was detected in brain. In group A, no differences in the body weight of the pups were observed on day 1 PP versus the control (Figure 1) ($P = 0.1729$, $F = 1.88$, one-way ANOVA, Duncan's multiple range test). However, on day 7 PP, pups from infected dams were smaller than those from the control ($P = 0.0006$, $F = 12.53$, one-way ANOVA, Duncan's multiple range test), presented less hair coat and were less active. In group B, neonates from infected animals were significantly smaller than those from the control on day 1 PP ($P = 0.0166$, $F = 5.91$, one-way ANOVA, Duncan's multiple range test), being more evident on day 7 PP ($P < 0.0001$, $F = 38.65$, one-way ANOVA, Duncan's multiple range test). They were also less active and showed a delay in the development of their hair coat. In group C, pups from infected dams showed a lower body weight on day 7 PP ($P = 0.0038$, $F = 8.72$, one-way ANOVA, Duncan's multiple range test) and all of them remained clinically normal throughout the

experiment. Pups from group B were significantly smaller than those from groups A and C on day 7 PP ($P < 0.0001$, $F = 10.15$, one-way ANOVA, Duncan's multiple range test).

Figure 1. Graph showing the mean body weight of neonates on day 1 and 7 post-partum (PP) for infected (white bars) and uninfected mice (black bars). (*: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$)



Vertical transmission and parasite burdens

Vertical transmission on day 1 and 7 PP are shown in Table 3. In group A, transplacental transmission to progeny was found on day 1 PP (29 %) and in all littermates at least one pup was *N. caninum* PCR positive. In group B, the highest vertical transmission was observed in this group (62 %) on day 1 PP, and all dams transmitted the parasite to at least one pup of the litter. In group C, transmission on day 1 PP in group C was 5.5 %, whereas 5 dams did not transmit the infection to any of their pups. Infection in group B produced the highest transmission versus groups A and C ($P < 0.0001$, $\chi^2 = 20.03$). A significant increase in vertical transmission was detected from day 1 to 7 PP in group A ($P = 0.0026$, $\chi^2 = 9.10$) and group C ($P = 0.0118$, $\chi^2 = 6.34$), whereas in group B this increase was not observed because of the high rate of transmission detected on day 1 PP ($P = 0.3930$, $\chi^2 = 0.73$). Concerning parasite burden in neonate samples, no differences between groups were detected in lung ($P = 0.1940$, $\chi^2 = 3.28$, Kruskal-Wallis) and brain ($P = 0.3347$, $\chi^2 = 0.93$, Kruskal-Wallis) on day 1 PP (Figure 2). Infection in group B produced the highest parasite burden on day 7 PP in both lung ($P < 0.0001$, $\chi^2 = 37.98$, Kruskal-Wallis) and brain ($P < 0.0001$, $\chi^2 = 32.11$, Kruskal-Wallis) with respect to groups A and C, whereas the lowest parasite burdens were found in group C. A significant increase in parasite load was found in group A (brain: $P = 0.0014$, $\chi^2 = 10.15$, Kruskal-Wallis) and B (lung: $P < 0.0001$, $\chi^2 = 33.66$; brain: $P < 0.0001$, $\chi^2 = 26.62$, Kruskal-Wallis) from day 1 to 7 PP. Regression analyses revealed an inverse relationship between parasite burden in lung ($P < 0.0001$; $r^2 = 0.28$) and brain ($P < 0.0001$; $r^2 = 0.20$) and body weight on day 7 PP.

Table 3. Vertical transmission of *N. caninum* in dams infected on day 0 (group A), day 7 (group B), and day 14 (group C) of gestation on days 1 and 7 post-partum (PP).

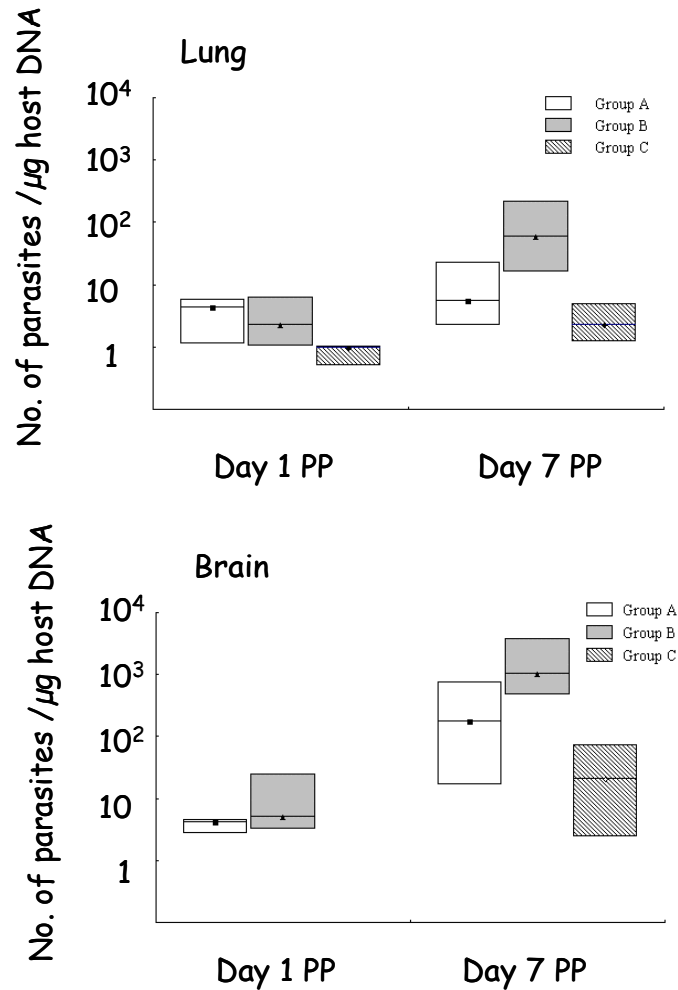
Group	Day 1 PP			Day 7 PP		
	Infected / Total (%)	Littermates with at least one positive pup / Total littermates	Median (lower and upper quartiles)	Infected / Total (%)	Littermates with at least one positive pup / Total littermates	Median (lower and upper quartiles)
A	14/49 (29 %)*	8/8†	50 (29-62)‡	47/53 (89 %)*	8/8†	100 (100-100)‡
B	28/45 (62 %)	8/8	75 (53.3-100)	31/35 (89 %)	8/8	85.7 (80-100)
C	3/55 (5.5 %)	3/8	0 (0-12.7)	16/55 (29 %)	6/8	36.5 (8.35-73.2)

* Number of infected mice / Number of total mice (percentage)

† Number of littermates with at least one positive pups/ Number of total littermates

‡ Median of transmission per littermate (lower and upper quartiles)

Figure 2. Box-plot graph representing the lower and upper quartiles and median values for lung and brain parasite burden in infected pups at day 1 and 7 post-partum (PP).



4. Discussion

Here, we have studied the relationship between time of infection, reproductive losses (foetal mortality, stillbirth, and litter size), and vertical transmission. The susceptibility of dams to infection was determined by the presence of clinical signs of neosporosis and by the detection of the parasite in lung and brain, because these organs are the target organs for *N. caninum* infection (Collantes-Fernández et al., 2006; Eperon et al., 1999; Nisikawa et al., 2001). Dams did not exhibit clinical signs of disease after infection as reported previously (Cole et al., 1995a; Omata et al., 2004). During acute infection, the parasite was detected in the lungs and during chronic infection in the brain as described previously (Collantes-Fernández et al., 2006; Nisikawa et al., 2001). No significant differences were found in parasite distribution in lung, brain, and mammary gland between groups that could explain the differences in foetal mortality, stillbirth, and transmission observed in the three gestation periods. There has been no previous report of *N. caninum* DNA in the mammary glands. We observed, however, that the parasite showed the same affinity for this tissue

as for the lung and that it was colonized during the first days PI, disappearing when infection became chronic. When infection occurred in the second (day 7) or third (day 14) period of gestation, the parasite remained in the mammary gland during the first days after birth. Furthermore, we detected the parasite DNA in milk samples on day 6 PP in group C, suggesting the possibility of the transmammary infection when infection occurs late in gestation. However, a low transmission was found on day 1 and 7 PP in those animals where parasite DNA has been detected in milk. Several reports have suggested this way as a possible route of transmission of *N. caninum* in dogs (Cole et al., 1995b), mice (Cole et al., 1995a), and cattle (Davison et al., 2001; Uggla et al., 1998), and there is a general agreement that transmammary transmission of *N. caninum* is not an important route of infection. It has been purposed that tachyzoite viability could be compromised by the gastric juices after oral intake (Uggla et al., 1998). In addition, cattle were not infected when given milk or colostrum from cows naturally infected with *N. caninum* (Davison et al., 2001). However, further experiments are required to evaluate the importance of this transmission route.

This is the first time that infection on day 0 of gestation (group A) has been investigated in a murine model for neosporosis. No increase in foetal mortality and stillbirth, as well as no changes in litter size, were observed in infected versus uninfected dams. However, inoculation on day 0 of gestation provoked a high vertical transmission. Although experimental infection took place before implantation of the embryo (day 4.5 of gestation), we might assume that a low level of parasites could invade some foetal tissues from day 4.5 to 7 of gestation (day 4.5 to 7 PI) because the parasite could be present in blood during one week PI (Collantes-Fernández et al., 2006). In a congenital rodent model for toxoplasmosis, after infection on day 1 of gestation, *T. gondii* was detected on day 7 of gestation in parasitophorous vacuoles inside trophoblast cells, which are involved in the process of embryo implantation (Ferro et al., 1999). This finding suggests that, when the embryo implants, parasites may be present in the cells responsible of this process and that the foetus could become infected.

When infection took place on day 7 of gestation (group B), an increase in foetal mortality was detected in infected dams. These findings agree with previous studies that have reported similar values for infected mice (Long & Baszler, 1996; Quinn et al., 2002). It has been suggested that this lack of reproductive efficiency might be a reflection of the maternal immune response (shift from Th1 to Th2) rather than foetal infection as no tachyzoites were found either in placental or foetal tissues as demonstrated by immunohistochemistry (Long & Baszler, 1996). A significant decrease in the litter size and an increase in stillbirth were observed in the infected group. It has been described that stillborns are not a consequence of infection, because the birth of dead pups was observed both in infected and uninfected mice (Quinn et al., 2002), or no relationship between stillbirth and the day of infection was found (Liddell et al., 1999). Nevertheless, we have detected a significant increase in stillbirth in infected versus uninfected dams as well as a high percentage of infected stillborns, pointing to a possible relationship between day of infection and stillbirth. In addition, low stillbirth within the control groups was found; we consider that the increase in stillbirth in infected dams could be due to an *in utero* infection of foetuses that could compromise the viability of these pups.

The highest transmission and parasite burden were detected in group B. Values of transmission shown here agree with results from other studies (Long & Baszler, 1996; Omata et al., 2004; Quinn et al., 2002) and tend to confirm the hypothesis that infection before mid-gestation produces a higher transmission to offspring.

Infection on day 14 of gestation (group C) did not affect foetal mortality, stillbirth, or litter size. It produced a very low level of transmission to the progeny during gestation perhaps because the time between inoculation and delivery was minimal and the

tachyzoites did not have enough time for replication to reach a load detectable by nested PCR in foetal tissues. Liddell et al. (Liddell et al., 1999) proposed that infection on day 15 of gestation produces an effective transmission of parasite to the progeny and a longer time between infection and necropsy of pups is needed for the parasite to replicate. Our results agree with these findings since transmission begins to increase after birth, showing that the parasite could have invaded foetal tissues before delivery although the parasite was not detected by nested PCR. After delivery, *N. caninum* may have more time for replication in neonate tissues increasing the parasite burden and therefore, its detectability.

The decrease in the body weight observed in seven-day-old pups from infected dams could be related to the increase in the parasite burden in lung and brain, as regression analysis has shown. Moreover, a delay in hair development also was detected in pups from dams infected on day 7 PP in groups A and B. The high parasite burden found in lung and brain from those neonates could be affecting the normal development of the infected offspring after birth because parasite load might have detrimental effects on morbidity (Collantes-Fernández et al., 2006). Previous research in murine toxoplasmosis supports our results and describes a lower body weight at weaning time of neonates exposed in uterus to *T. gondii* as opposed to uninfected neonates (Johnson, 1994), which could lead to an elevated neonatal mortality over time. This fact could be due to the immaturity of the immune system in the neonate to control parasite multiplication or the establishment of a phenomenon of immunotolerance after infection in uterus. However, this last event has not been described so far for *N. caninum* infections.

In summary, our study confirms that timing of infection during pregnancy determines foetal losses and transmission to the offspring. Infection on day 0 of gestation produced high vertical transmission and pups from infected mice showed less body weight and had a delay in hair coat development on day 7 PP. Infection on day 7 of gestation produced an increase in foetal mortality and stillbirth, a decrease in litter size, and the highest vertical transmission. Infection on day 14 of gestation produced the lowest vertical transmission. In addition, infection during gestation could be compromising the postnatal development of pups as shown by the less body weight and the delay in hair development in neonates from infected dams. Finally, we consider that this protocol could be useful in the development of new vaccines and candidate drugs against *N. caninum*. These studies could be addressed to reduce foetal mortality, stillbirth, and transmission and to improve the postnatal development in pups born from infected dams.

5. Acknowledgments

We thank Vanesa Navarro Lozano and Raquel Expósito Molina for excellent technical assistance and Ricardo García de la Mata for statistical analyses. This work has been supported by a grant from the Spanish Government (AGL2001-1362) and was part of COST-Action 854. Inmaculada C. López-Pérez has been financed by Spanish Ministry of Science and Technology.

6. Literature cited

- Atkinson R, PA Harper, C Ryce, DA Morrison, and JT Ellis. Comparison of the biological characteristics of two isolates of *Neospora caninum*. *Parasitology*, 118 (Pt 4): 363-370, 1999.
- Buxton D, SW Maley, S Wright, KM Thomson, AG Rae, and EA Innes. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. *Journal of Comparative Pathology*, 118 (4): 267-279, 1998.
- Cole RA, DS Lindsay, BL Blagburn, and JP Dubey. Vertical transmission of *Neospora caninum* in mice. *The Journal of Parasitology*, 81 (5): 730-732, 1995a.
- Cole RA, DS Lindsay, BL Blagburn, DC Sorjonen, and JP Dubey. Vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *The Journal of Parasitology*, 81 (2): 208-211, 1995b.
- Collantes-Fernández E, A Zaballos, G Álvarez-García, and LM Ortega-Mora. Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 1194-1198, 2002.
- Collantes-Fernández E, I López-Pérez, G Álvarez-García, and LM Ortega-Mora. Temporal distribution and parasite load kinetics in blood and tissues during *Neospora caninum* infection in mice. *Infection and Immunity*, 74 (4): 2491-2494, 2006.
- Davison HC, CS Guy, JW McGarry, F Guy, DJ Williams, DF Kelly, and AJ Trees. Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. *Research in Veterinary Science*, 70 (2): 163-168, 2001.
- Dubey JP and DS Lindsay. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Veterinary Parasitology*, 67 (1-2): 1-59, 1996.
- Dubey JP. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *The Korean Journal of Parasitology*, 41 (1): 1-16, 2003.
- Eperon S, K Brönnimann, A Hemphill, and B Gottstein. Susceptibility of B-cell deficient C57BL/6 (μ MT) mice to *Neospora caninum* infection. *Parasite Immunology*, 21 (5): 225-236, 1999.
- Ferro EAV, E Bevilacqua, S Favoreto-Junior, DA Silva, RA Mortara, and JR Mineo. *Calomys callosus* (Rodentia: Cricetidae) trophoblast cells as host cells to *Toxoplasma gondii* in early pregnancy. *Parasitology Research*, 85 (8-9): 647-654, 1999.
- Innes EA, SE Wright, S Maley, A Rae, A Schock, E Kirvar, P Bartley, C Hamilton, IM Carey, and D Buxton. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *International Journal for Parasitology*, 31 (13): 1523-1534, 2001.
- Johnson LL. Resistance to *Toxoplasma gondii* in mice infected as neonates or exposed *in-utero*. *Infection and Immunity*, 62 (8): 3075-3079, 1994.
- Liddell S, MC Jenkins, and JP Dubey. Vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice determined by polymerase chain reaction detection. *The Journal of Parasitology*, 85 (3): 550-555, 1999.
- Lindsay DS, and JP Dubey. In vitro development of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) from dogs. *The Journal of Parasitology*, 75 (1): 163-165, 1989.

- Lindsay DS, SD Lenz, RA Cole, JP Dubey, and BL Blagburn. Mouse model for central nervous system *Neospora caninum* infections. *The Journal of Parasitology*, 81 (2): 313-315, 1995.
- Long MT and TV Baszler. Fetal loss in BALB/C mice infected with *Neospora caninum*. *The Journal of Parasitology*, 82 (4): 608-611, 1996.
- Macaldowie C, SW Maley, S Wright, P Bartley, I Esteban-Redondo, D Buxton, and EA Innes. Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. *Journal of Comparative Pathology*, 131 (2-3): 142-156, 2004.
- Moon HW, DB Woodmansee, JA Harp, S Abel, and BL Ungar. Lactal immunity to enteric cryptosporidiosis in mice: immune dams do not protect their suckling pups. *Infection and Immunity*, 56 (3): 649-653, 1998.
- Nishikawa Y, N Inoue, X Xuan, H Nagasawa, I Igarashi, K Fujisaki, H Otsuka, and T Mikami. Protective efficacy of vaccination by recombinant vaccinia virus against *Neospora caninum* infection. *Vaccine*, 19 (11-12): 1381-1390, 2001.
- Omata Y, M Nidaira, R Kano, Y Kobayashi, T Koyama, H Furuoka, R Maeda, T Matsui, and A Saito. Vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice in both acute and chronic infection. *Veterinary Parasitology*, 121 (3-4): 323-328, 2004.
- Pérez-Zaballos FJ, LM Ortega-Mora, G Álvarez-García, E Collantes-Fernández, V Navarro-Lozano, L García-Villada, and E Costas. Adaptation of *Neospora caninum* isolates to cell-culture changes: an argument in favor of its clonal population structure *The Journal of Parasitology*, 91 (3): 507-510, 2005.
- Quinn HE, CM Miller, C Ryce, PA Windsor, and JT Ellis. Characterization of an outbred pregnant mouse model of *Neospora caninum* infection. *The Journal of Parasitology*, 88 (4): 691-696, 2002.
- Trees AJ and DJL Williams. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends in Parasitology*, 21 (12): 558-561, 2005.
- Ugla A, S Stenlund, OJ Holmdahl, EB Jakubek, P Thebo, H Kindahl, and C Björkman. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. *International Journal for Parasitology*, 28 (9): 1467-1472, 1998.
- Whitten MK. Effect of exteroceptive factors on the oestrous cycle of mice. *Nature*, 180 (4599): 1436, 1957.
- Williams DJ, CS Guy, JW McGarry, F Guy, L Tasker, RF Smith, K MacEachern, PJ Cripps, DF Kelly, and AJ Trees. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitology*, 121 (Pt 4): 347-358, 2000.

Capítulo III

Influence of *Neospora caninum* infection in BALB/c mice during pregnancy in post-natal development

**Inmaculada C. López-Pérez^a, Esther Collantes-Fernández^a,
Adriana Aguado-Martínez^a, Antonio Rodríguez-Bertos^b,
and Luis Miguel Ortega-Mora^a.**

^a SALUVET Group
Animal Health Department
Veterinary Faculty
Complutense University of Madrid
28040 Madrid

^b Pathology Service
Internal Medicine and Surgery Department
Veterinary Faculty
Complutense University of Madrid
28040 Madrid

Abstract

The influence of *Neospora caninum* infection during pregnancy on the post-natal period has been poorly investigated. In a previous study, we suggested that infection with *N. caninum* during pregnancy could affect the normal post-natal development of the offspring. For this reason, in the present work we evaluated the influence of *N. caninum* infection in pregnant BALB/c mice at days 0, 7 and 14 of gestation (groups A, B and C, respectively) on the post-natal development of the offspring from birth to day 60 post-partum (PP). Morbidity and mortality, vertical transmission, and histopathological lesions were investigated. The humoral immune response (IgG) of pups was also evaluated. Results showed that infection with *N. caninum* during pregnancy had fatal consequences for pups, especially during mid-gestation (day 7). Infection provoked a delay in the general development of neonates, clinical signs compatible with neosporosis and severe histopathological lesions. A high mortality rate was found in all infected groups. A 69 % of mortality rate was found in group A, a 100 % in group B and a 46 % in group C. Necrotizing encephalitis and multifocal hepatocellular necrosis were the most severe lesions found. All neonates, except four animals from group C, had antibodies against *N. caninum* but the immune response was not sufficient to control parasite infection. We have demonstrated that extension of the observation period after *N. caninum* infection permits a more accurate study of vertical transmission, the major route of parasite transmission, and mortality rates. We propose that infection at mid-gestation (day 7) in BALB/c mice and its study during the postnatal period constitutes a valuable experimental model for testing new chemotherapeutic agents and vaccines designed to protect against congenital neosporosis, in order to select effective protocols before its use on bovine.

1. Introduction

Neospora caninum is an obligate intracellular protozoan parasite closely related to *Toxoplasma gondii* which has been recognized as a major cause of infectious bovine abortion world-wide. The parasite can be transmitted transplacentally in several hosts and the vertical route is the major mode for transmission in cattle (Dubey et al., 2007). *N. caninum* infection is generally latent and asymptomatic in non-pregnant cattle, although the consequences of either primo infection or recrudescence in a pregnant cow can be abortion, birth of a weak calf or birth of a clinically healthy but persistently infected calf (Buxton et al., 2002; Innes et al., 2002). Clinical signs in natural hosts, other than abortion, have only been reported in naturally congenitally infected puppies (Dubey & Lindsay, 1996) and cattle younger than two months of age, and they were neuromuscular type clinical signs (Dubey et al., 2006). *N. caninum* congenitally infected neonates may present weakness, be underweight, have hind limb paralysis, ataxia and neurological signs (Dubey & Lindsay, 1996). To date, it is not clear under which circumstances neonates born from infected dams may develop clinical neosporosis.

Several *N. caninum* experimental studies developed in cattle (Almería et al., 2003; Bartley et al., 2004; Macaldowie et al., 2004; Maley et al., 2003), and mice (Kano et al., 2005; Omata et al., 2004; Quinn et al., 2002) have demonstrated the importance of the timing of the *N. caninum* infection during pregnancy. Nevertheless, the post-natal period has been poorly studied. In BALB/c mice, no morbidity and very little mortality were described from birth to day 23 post-partum (PP) after infection of dams late in gestation (day 15) with *N. caninum* Nc-1 isolate (Liddell et al., 1999).

In a previous study, we observed the successful vertical transmission of *N. caninum* infection in BALB/c mice at the three gestation periods. As a consequence of infection, neonates born from infected dams presented decreased body weight, a delay in hair coat development and were less active than pups born from control mice on day 7 PP. The decrease in body weight was related to the high parasite burden present in the lung and brain (López-Pérez et al., 2006). These results suggest that infection with *N. caninum* during pregnancy could affect the normal post-natal development of the offspring.

Therefore, we decided to evaluate the influence of *N. caninum* infection in BALB/c mice at three gestation periods (first, second, and third period) on the post-natal development of the offspring from birth to day 60 PP. Post-natal morbidity and mortality, and vertical transmission were analysed. The presence of parasite DNA and histopathological lesions in tissues from the progeny were also evaluated. In addition, the development of a specific humoral immune response (IgG) in the offspring was also studied to evaluate whether neonates might show an immune response against *N. caninum* or whether in utero infection might provoke the development of an immunotolerance phenomenon.

2. Materials and methods

2.1. Mice

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 routine screening procedures performed by the manufacturer. Mice were fed *ad libitum* in a controlled environment with 12 hour light and 12 hour dark cycles. At eight weeks of age, after using the Whitten effect (Whitten, 1957), females were mated for one night and day 0 of gestation was determined by the presence of the vaginal mucoid plug. The fertility rate for this protocol was roughly 30 % and the length of the gestation period of the mice is 19 - 20 days.

2.2. Parasite and preparation of inoculum

N. caninum Nc-1 tachyzoites were maintained *in vitro* by continuous passage in MARC-145 cells using standard procedures described previously (Pérez-Zaballos et al., 2005). Parasites were harvested and resuspended at the required dose in a final volume of 200 μ l per mouse and used immediately to infect mice. Tachyzoites for PCR controls were prepared as previously described (López-Pérez et al., 2006).

2.3. Experimental design and sample.

Pregnant BALB/c mice were randomly allocated in four experimental groups. Animals were infected subcutaneously (s. c.) with 2×10^6 Nc-1 tachyzoites on days 0, 7 or 14 of gestation (groups A, B1 and C, respectively) and with 2×10^5 Nc-1 tachyzoites on day 7 of pregnancy (group B2). Groups A, B1, B2 and C were composed by 21, 18, 17 and 14 dams, respectively. Fifteen dams were inoculated with sterile phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) and kept as uninfected controls. Progeny were evaluated from birth to day 60 PP. In order to monitor the development of infection during the observation period, eight litters in group A and five litters in the rest of the groups were randomly sacrificed with CO₂ gas on day 30 PP. The remaining litters were left until day 60 PP. On sacrifice days, blood samples from pups were collected by cardiac puncture at necropsy and serum was cryopreserved for ELISA. Brain and lung were collected in aseptic conditions and frozen at -80 °C until DNA extraction. Tissue specimens from brain, heart, liver, and lung from three dead neonates per litter were collected for routine histological methods. Some samples from dead animals could not be collected due to cannibalism by the dams.

2.4. Parameters evaluated

Neonates were observed daily for clinical signs compatible with neosporosis, as described in previous studies (Atkinson et al., 1999; Collantes-Fernández et al., 2006; Eperon et al., 1999; López-Pérez et al., 2006). Body weight was evaluated every two days from days 14 to 60 PP in order to avoid excessive handling of pups and their rejection from dams. Post-natal mortality was considered as the number of dead animals from birth to day 60 PP. Stillborns were not considered for neonatal mortality. The vertical transmission rate was determined by detecting the parasite in the lung or brain of neonates by nested-PCR. The humoral immune response (IgG) in the offspring was also evaluated on days 30 and 60 PP.

2.5. DNA extraction and nested PCR detection

Genomic DNA from lung and brain of neonates was extracted using the commercial kit *Real Pure Extracción ADN genómico* for tissues (Durviz, Valencia, Spain), following the manufacturer's instructions. For detection of parasite DNA, a nested-PCR based on the internal transcribed spacer 1 (ITS1) region of *N. caninum* was carried out as previously described (Buxton et al., 1998). DNA from Nc-1 tachyzoites was also extracted as a PCR control.

2.6. Histopathological analysis

Different sections from brain, heart, liver, and lung from three neonates per litter were processed by routine histological methods. Tissues were fixed in 10 % neutral buffered formalin and dehydrated through graded alcohols before being embedded in paraffin wax. Five micrometers sections were obtained and stained with haematoxylin and eosin. Lesions were scored according to the severity as nil (0), mild (1), moderate (2) or severe (3) (Pereira-Bueno et al., 2003).

2.7. Serum IgG analysis

N. caninum-specific serum immunoglobulin G was determined by an ELISA assay, using soluble tachyzoite antigen (Eperon et al., 1999; Long et al., 1998) (0.5 µg in 100 µl per well). *N. caninum* soluble protein antigen was prepared as previously described (Álvarez-García et al., 2002). Neonate serum samples were diluted 1:100, and the secondary antibody was a horseradish peroxidase-labelled rabbit anti-mouse IgG antibody (1:5000 in PBS-T-BSA; Sigma, St. Louis, Missouri, USA). The absorbance was measured at 405 nm in an electronic plate reader (Multiskan RC version 6.0, Thermo Labsystems, Helsinki, Finland).

2.8. Analysis of data

Post-natal morbidity and mortality were analysed by the Kaplan-Meier survival method (Bland & Altman, 1998) for estimation of the percentage of animals without clinical signs and the percentage of surviving individuals at each time point (days PP). To compare the survival curves between infected groups, the log-rank statistical test was applied (Bland & Altman, 2004). The median survival time, the day when the 50 % of pups showed clinical signs or when the 50 % of the neonates had died, was calculated (Bland & Altman, 1998). A one-way ANOVA test followed by Duncan's multiple range test was employed to compare neonate body weight and serum anti-*N. caninum* IgG. Differences in PCR detectability, and vertical transmission were analysed by Chi-square and Fisher *F*-test. The non-parametric Kruskal-Wallis test was used to analyse differences in the severity of lesions. When statistical 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 the multiple comparison test failed to find it, the results obtained by the Kruskal-Wallis test were preferred as indicated by Morrison (Morrison, 2002). All statistical analyses were carried out using Statgraphics Plus v.5.1 (StatPoint, Inc., Herndon, Virginia, USA), SAS v.8.2 (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA), and GraphPad Prism 5 v.5.01 (San Diego, California, USA) software.

3. Results

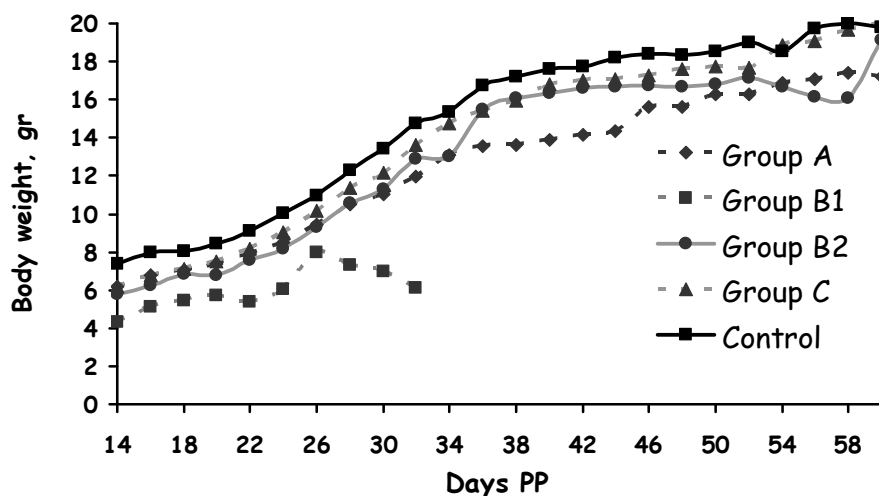
3.1. Post-natal morbidity

The clinical signs observed in neonates were a delay in hair coat development, less body weight, rough hair coat, and inactivity followed by nervous signs (rounded back, pelvic limb weakness, head tilting and walking in circles). Blindness was observed in one animal from group B1. Clinical signs were more often observed in neonates from groups B1 (91/93, 98 %) versus group A (90/132, 68 %) ($P < 0.0001$, χ^2 test) and group C (42/84, 50 %) ($P < 0.0001$, χ^2 test). No significant differences were found between groups A and C ($P > 0.05$, χ^2 test). There was a significant reduction in the frequency of clinical signs when the dose was decreased ten-fold in group B, from 98 % in group B1 to 88 % (87/99) in group B2 ($P < 0.05$, χ^2 test). The survival time was significantly lower in pups from group B1 (day 7) compared to group A (day 21) ($P < 0.0001$, log-rank test) and group C (day 42) ($P < 0.0001$, log-rank test). Significant differences in survival time were also found between groups A and C ($P < 0.001$, log-rank test). A significant decrease in the median survival was also found between groups B1 and B2 (14 days) ($P < 0.0001$, log-rank test). Control neonates remained clinically normal until the end of the experiment.

3.2. Body weight

Figure 1 shows the body weight of animals from days 14 to 60 post-partum (PP). Offspring from the infected groups showed a significantly decreased body weight compared to control throughout the experiment ($P < 0.01 - 0.0001$, one-way ANOVA). From days 14 to 32 PP, neonates from group B1 were significantly smaller than those from groups A, C, B2, and control pups ($P < 0.0001$, one-way ANOVA, Duncan's multiple range test). The body weight of offspring from group A was significantly lower than those from the uninfected group on days 14 - 18, 24, 34 - 52, 56 - 60 PP, and from group C on days 34 - 44, 58 - 60 PP ($P < 0.01 - 0.0001$, one-way ANOVA, Duncan's multiple range test). Mice born from dams of group C were significantly smaller than controls only on days 14 - 18 PP ($P < 0.0001$, one way ANOVA, Duncan's multiple range test). The body weight of pups from group B2 was statistically lower than controls on days 14 - 24, 34, 56 - 58 PP ($P < 0.01 - 0.0001$, one-way ANOVA, Duncan's multiple range test).

Figure 1. Body weight of neonates born from dams infected on days 0, 7 and 14 of gestation with 2×10^6 tachyzoites (groups A, B1 and C, respectively) and on day 7 of pregnancy with 2×10^5 tachyzoites (group B2). Each point represents the mean of the body weight of all animals per group. PP: post-partum.

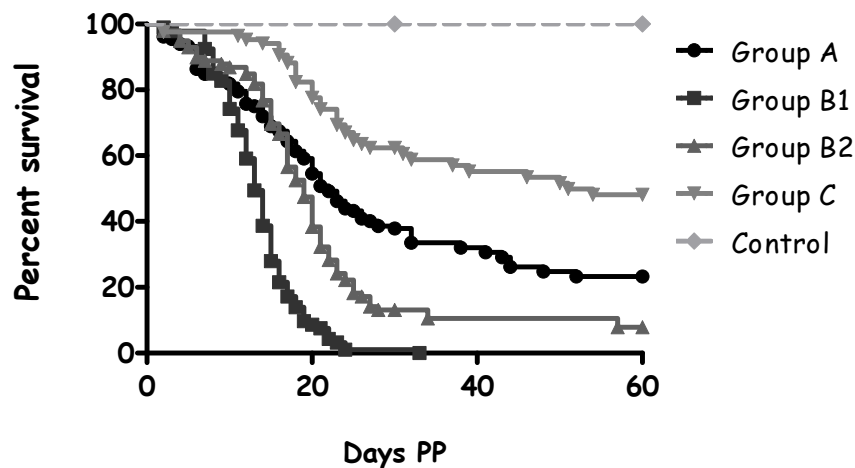


3.3. Post-natal mortality

A high mortality rate was found in all infected groups (Figure 2). In group A, 69 % (91/132) of mice were found dead and animals began to die from day 2 after birth. In group B1, most mice died from days 5 to 24 PP, except one animal that survived until day 33 after birth, leading to 100 % (93/93) mortality. The lowest rate of mortality was observed in group C, in which 46 % (39/84) of mice died mainly from day 10 PP onwards. Infection in group B1 provoked the highest mortality rate versus groups A ($P < 0.0001$, χ^2 test) and C ($P < 0.0001$, χ^2 test). Significant differences were also found between groups A and C ($P <$

0.01, χ^2 test). In addition, there was a significant reduction in mortality when the dose was decreased ten-fold in group B, from 100 % in group B1 to 88 % (87/99) in group B2 ($P < 0.01$, χ^2 test). The median survival time for group B1 (13 days) was significantly lower than that for groups A (22 days) ($P < 0.0001$, log-rank test), C (51 days) ($P < 0.0001$, log-rank test) and B2 (19 days) ($P < 0.0001$, log-rank test). Significant differences were also found between groups A and C ($P < 0.0001$, log-rank test). No post-natal mortality was recorded in control animals.

Figure 2. Kaplan-Meier survival curves for neonates born from dams infected on day 0, 7 and 14 of gestation with 2×10^6 tachyzoites (groups A, B1 and C, respectively) and on day 7 of gestation with 2×10^5 tachyzoites (group B2). Curves represent the percentage of animals surviving. Vertical steps downward correspond to days PP when a death was observed. Symbols (■, ◆, ▲, •, ▼) indicate censored observations. The number of dead mice was registered daily. PP: post-partum



3.4. Vertical transmission

Vertical transmission rates are shown in Table 1. All dams transmitted the infection to at least one of the pups in the litter, except for three dams from group C where transmission was not detected. Infection in group B1 produced the highest transmission rate (97 %) compared to groups A (75 %) ($P < 0.001$, χ^2 test), C (47 %) ($P < 0.0001$, χ^2 test) and B2 (79 %) ($P < 0.01$, χ^2 test). Significant differences were also found between groups A and C ($P < 0.001$, χ^2 test). Parasite DNA was found in a high percentage of dead animals in groups A (91 %), B1 (97 %) and C (89 %), although significant differences were not found between groups ($P > 0.05$, χ^2 test). A significant decrease in the number of PCR-positive dead animals between groups B1 and B2 (83 %) was observed ($P < 0.05$, χ^2 test). On day 30 PP, there were no statistical differences in parasite detectability between groups A (50 %), and C (39 %) ($P > 0.05$, Fisher *F*-test). The 63 % of neonates from group B2 were PCR positive. On day 60 PP, parasite DNA was significantly more often detected in pups from group A (59 %) compared to group C (7 %) ($P < 0.01$, Fisher *F*-test). Only one animal from group B2 (33 %) was positive by nested PCR.

Table 1. Vertical transmission of *N. caninum* in dams infected on days 0, 7 and 14 of gestation with 2×10^6 tachyzoites (groups A, B1 and C, respectively) and on day 7 of gestation with 2×10^5 tachyzoites (group B2)

	Group A	Group B1	Group B2	Group C
Positive-PCR animals ^a	72/96 (75 %)	59/61 (97 %)	64/81 (79 %)	34/73 (47 %)
Dead animals ^a	50/55 (91 %)	59/61 (97 %)	58/70 (83 %)	25/28 (89 %)
Day 30 PP	12/24 (50 %)	---	5/8 (63 %)	7/18 (39 %)
Day 60 PP	10/17 (59 %)	---	1/3 (33 %)	2/27 (7 %)
Litters transmitting ^b	20/21	18/18	17/17	11/14
Median ^c	83 (57-100)	100 (100-100)	83 (67-100)	50 (17-80)

PP: post-partum

^a Number of infected offspring/number of total animals analysed (percentage). Some samples could not be collected due to cannibalism by the dams and vertical transmission was calculated for the samples analysed

^b Number of litter with at least one positive pup/number of total litters infected. Samples from one litter in group A could not be collected, due to cannibalism of the dams

^c Median of transmission per litter (lower and upper quartiles)

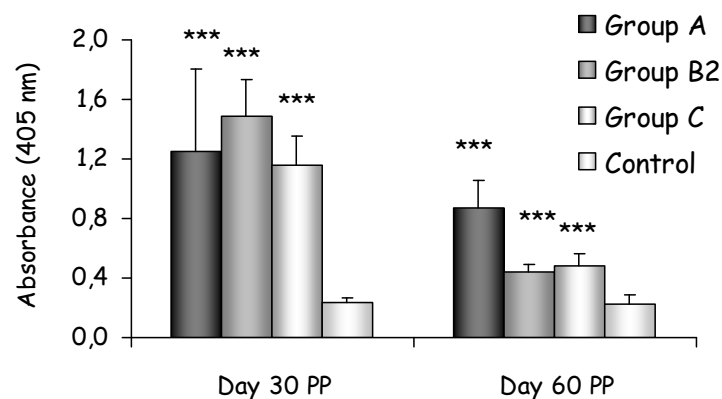
3.5. Histopathological lesions

The most severe lesions observed were necrotizing encephalitis, multifocal hepatocellular necrosis and chronic reactive hepatitis, followed by shock lung and interstitial pneumonia. Myocarditis, suppurative meningoencephalitis and lymphocytic meningitis represented the less severe lesions detected ($P < 0.001$, non-parametric multiple comparison test). In dead animals, histopathological lesions were more severe than in neonates sacrificed on days 30 and 60 PP ($P < 0.0001$, non-parametric multiple comparison test) and the most important lesions were necrotizing encephalitis, multifocal hepatocellular necrosis and chronic reactive hepatitis ($P < 0.01$, non-parametric multiple comparison test). Comparing groups, multifocal hepatocellular necrosis ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis) was more severe in dead animals from group A versus B1 and C, and chronic reactive hepatitis ($P < 0.001$, non-parametric multiple comparison test) was more severe in group B1. In sacrificed offspring, lesions in group A were more severe than in group C on days 30 ($P < 0.01$, Kruskal-Wallis) and 60 PP ($P < 0.01$, Kruskal-Wallis). In offspring from group A, chronic reactive hepatitis and interstitial pneumonia were the most severe lesions on day 30 PP, while necrotizing encephalitis and lymphocytic meningitis were more severe on day 60 PP. No differences in lesion severity were found in any tissue between groups B1 and B2 ($P > 0.05$, Kruskal-Wallis). Free groups of parasites in liver and brain were scarcely observed in six animals from group A.

3.6. Serum IgG in neonates.

N. caninum antibody data for offspring sacrificed on days 30 and 60 PP are shown in Figure 3. Serum samples from group B1 could not be collected because most animals died mainly before day 30 PP. All sacrificed pups had antibodies against *N. caninum*, except four animals from group C on day 60 PP. When neonates born from infected dams were compared with those born from control mice, a significant increase in IgG levels was detected both on day 30 PP ($P < 0.0001$, one-way ANOVA, Duncan's multiple range test) and on day 60 PP ($P < 0.0001$, one-way ANOVA, Duncan's multiple range test).

Figure 3. ELISA anti-*N. caninum* IgG from neonates sacrificed on days 30 and 60 PP from dams infected on days 0, 7 and 14 of gestation with 2×10^6 tachyzoites (groups A, B1 and C, respectively) and on day 7 of gestation with 2×10^5 tachyzoites (group B2). Bars represent the mean absorbance and error bars are the standard deviations for each group. Antibody levels that were significantly higher than those from the non-infected group are denoted by asterisks (***: $P < 0.0001$). PP: post-partum.



4. Discussion

To date, there are no reports regarding the influence of congenitally acquired *N. caninum* infection on the post-natal development of neonates. In a previous study in our laboratory, we suggested that the post-natal development of pups after *in utero* infection with *N. caninum* might be compromised due to the decreased body weight and delay in hair coat development observed in neonates born from infected dams on day 7 PP (López-Pérez et al., 2006). Here, we studied offspring from birth to day 60 PP, after infection of dams on days 0, 7 and 14 of gestation. The results observed in the present study confirm that *N. caninum* infection at the three periods of murine pregnancy affects the survival of neonates. The differences found in all parameters analysed revealed that the consequences of *N. caninum* infection during pregnancy depend on the gestation period. Infection at midgestation (day 7) leads to higher morbidity, mortality and vertical

transmission rates than infection at early or late gestation, even when the infection dose was ten-fold lower. It is important to note that the percentage of surviving mice in groups A and C is misleading because some of the pups sacrificed on day 60 PP showed clinical signs and they may have died as a consequence of the severity of illness if the observation period was extended.

Our results agree with previous reports in mice where infection in the second third of gestation with *T. gondii* caused high neonatal mortality and severe clinical signs in pups (Johnson, 1994; Stahl et al., 2002; Stahl et al., 2004). On the other hand, after *N. caninum* infection in late gestation with a lower infectious dose, no clinical signs of neosporosis were described in neonates sacrificed on day 23 PP, although the death of four neonates was observed in the same litter on days 17 and 22 PP (Liddell et al., 1999).

However, in previous experimental infections of cattle at late gestation, cows gave birth to apparently clinically healthy but persistently infected calves, and no mortality data were recorded (Innes et al., 2001; Williams et al., 2000). Differences observed between cattle and mice experimental model could be due to the structure of the placenta, since the haemochorial placenta in mice permits closer contact between foetal cells and maternal tissues, while in bovine epitheliochorial placenta there is no interaction between foetal and maternal blood (Entrican, 2002). On the other hand, the infectious doses employed in mice were comparatively higher than those used in cattle, and a higher number of parasites were able to reach the placental and foetal tissues.

Pathological findings might help to clarify the likely cause of the high morbidity and mortality rates observed, since the most severe lesions were found in dead animals. Most of the neonates succumbed before day 30 PP because of the severity of the histopathological lesions found in both the liver and central nervous system (CNS). The massive hepatic necrosis observed would induce a severe hepatic insufficiency. This failure, together with the severe necrotizing encephalitis observed, may have caused the death of the neonate. However, after *in utero* parasite infection, some foetuses may survive, but be severely affected for their post-natal life. In a previous report, after infection of dams with *T. gondii* on day 7 of gestation, pups surviving the prenatal period developed a progressive disease syndrome characterized by cerebral, hepatic and renal histopathological lesions together with developmental defects (Stahl et al., 2004). It is unclear whether the histopathological lesions are a direct consequence of parasite invasion of the foetal tissues during pregnancy or whether they are a consequence of an insufficient oxygen/nutrition supply, secondary to the placental damage caused by parasite. In non-pregnant adult mice, lesions such as necrotizing encephalitis, multifocal hepatocellular necrosis, interstitial pneumonia and myocarditis have been previously described after infection with *N. caninum* (Collantes-Fernández et al., 2004; Lindsay & Dubey, 1989), and they might be attributable to the direct action of parasites in neonates. Nevertheless, the wide areas of necrosis both in the brain and liver of neonates might also be the result of a hypoxia phenomenon during gestation, as a consequence of placental damage after parasite infection.

The differences found among pregnancy periods could be a consequence of the degree of placenta development. When infection was performed at early gestation (day 0), *N. caninum* may not reach the foetus because implantation has not yet occurred and the placenta is not present. The maternal immune system could clear the infection from tissues, and only a low number of parasites could reach the foetus after implantation. After infection at mid-gestation (day 7), as the embryo is already implanted (day 4.5) and the placenta is not completely developed, most of the inoculated parasites might reach the foetus, leading to greater damage. When infection occurred at late gestation (day 14), the placenta is completely developed, acting as a barrier against infection. Only very few

parasites might infect foetuses, and a wider period of time after infection is necessary to evaluate any potential effects. In this case, the parasite could cause alterations in the placental supply to the foetuses but with less severity compared to the second third of gestation, explaining why mortality of offspring from dams infected at the third period of gestation appeared later in time than in groups A and B. Moreover, neonates from group C could be immunocompetent before experimental infection, since the first cells synthesizing immunoglobulins were demonstrated at day 10 of gestation (Melchers & Von Boehmer, 1975).

On the other hand, mortality could also be due to the immaturity of the neonate immune system to control the parasite multiplication or to the establishment of an immunotolerance phenomenon after *in utero* infection. It has been widely described that if infection occurs when the immune system is compromised, such as in the immunological immature foetus, infection with the parasite can have very serious consequences for the foetus (Innes et al., 2002). The presence of pathogens prior to immune system competence may lead to pathogen persistence and immune tolerance (Osburn et al., 1982), in which the immune system is unable to effectively distinguish some pathogens, like bovine viral diarrhoea virus (BVDV) (Peterhans et al., 2003). To date, immunotolerance to *N. caninum* has only been suggested (Barber & Trees, 1998; Sager et al., 2001). In order to investigate the establishment of an immunotolerance phenomenon, we studied the humoral immune response (IgG) in neonates, together with nested-PCR in brain and lung. It has been described that most of the immunoglobulins transmitted in colostrum in mice from dams to foetus are maintained in the circulation of the neonates around 40 days PP (Appleby & Catty, 1983). For this reason, we could consider the level of IgGs against *N. caninum* on day 30 PP to be from both maternal and neonatal sources, while those antibodies present on day 60 PP are from the offspring. In the present study, we did not find any PCR-positive animals without antibodies against *N. caninum* in groups A and C. In group B, we cannot discard the possibility of immunotolerant neonates, because no serum samples could be analysed due to the high mortality. However, this fact seems unlikely, as neonates from group B2 developed *N. caninum* antibodies. The remaining neonates from infected dams had *N. caninum* antibodies on day 30 PP, and the levels of these antibodies decreased on day 60 PP. The remaining antibodies on day 60 PP indicate that neonates had been exposed *in utero* to *N. caninum* and they had mounted an immune response against the parasite that persisted over the observation period. However, the immune response developed by offspring was not enough to control the replication of the parasite, and neonates died during the observation period.

To summarize, *N. caninum* infection during pregnancy had fatal consequences for pups born from infected dams, leading to a delay in the general development of neonates, clinical signs compatible with neosporosis and histopathological lesions that are compromising the post-natal life of animals, leading to a high mortality rate over the course of time. Even a ten-fold reduction in the infectious dose used for group B still had fatal consequences for neonates, although a significant decrease in morbidity and mortality was observed. To date, experimental infections using *N. caninum* in pregnant mice have only been evaluated in the early days after birth. However, we have demonstrated that extension of the observation period permits a more accurate study of vertical transmission, the major route of parasite transmission, and mortality rates. In conclusion, we propose that infection at midgestation (day 7) and its study during the post-natal period is a valuable tool for testing new chemotherapeutic agents and vaccines against congenital neosporosis, before its use on bovine, in order to reduce the high mortality and transmission rates observed. In addition, differences in virulence among *N. caninum* isolates could be also evaluated.

5. Acknowledgements

We would like to thank Vanesa Navarro, Eva Ortiz and Belén Antonio for their excellent technical assistance and Ricardo García de la Mata for statistical analyses. This work has been supported by a grant from the Spanish Government (AGL2001-1362) and was part of COST Action 854. Inmaculada C López Pérez has been financed by Spanish Ministry of Science and Technology.

6. Literature cited

- Almería S, T De Marez, H Dawson, R Araujo, JP Dubey, and LC Gasbarre. Cytokine gene expression in dams and foetuses after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. *Parasite Immunology*, 25 (7): 383-392, 2003.
- Álvarez-García G, J Pereira-Bueno, M Gómez-Bautista, and LM Ortega-Mora. Pattern of recognition of *Neospora caninum* tachyzoite antigens by naturally infected pregnant cattle and aborted foetuses. *Veterinary Parasitology*, 107 (1-2): 15-27, 2002.
- Appleby P and D Catty. Transmission of immunoglobulin to fetal and neonatal mice. *Journal of Reproductive Immunology*, 5 (4): 203-213, 1983.
- Atkinson R, PA Harper, C Ryce, DA Morrison, and JT Ellis. Comparison of the biological characteristics of two isolates of *Neospora caninum*. *Parasitology*, 118 (Pt 4): 363-370, 1999.
- Barber JS and AJ Trees. Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *International Journal for Parasitology*, 28 (1): 57-64, 1998.
- Bartley PM, E Kirvar, S Wright, C Swales, I Esteban-Redondo, D Buxton, SW Maley, A Schock, AG Rae, C Hamilton, and EA Innes. Maternal and fetal immune responses of cattle inoculated with *Neospora caninum* at mid-gestation. *Journal of Comparative Pathology*, 130 (2-3): 81-91, 2004.
- Bland JM and DG Altman. Survival probabilities (the Kaplan-Meier method). *British Medical Journal*, 317 (7172): 1572, 1998.
- Bland JM and DG Altman. The log-rank test. *British Medical Journal*, 328 (7447): 1412, 2004.
- Buxton D, SW Maley, S Wright, KM Thomson, AG Rae, and EA Innes. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. *Journal of Comparative Pathology*, 118 (4): 267-279, 1998.
- Buxton D, MM McAllister, and JP Dubey. The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends in Parasitology*, 18 (12): 546-552, 2002.
- Collantes-Fernández E, G Álvarez-García, V Pérez-Pérez, J Pereira-Bueno, and LM Ortega-Mora. Characterization of pathology and parasite load in outbred and inbred mouse models of chronic *Neospora caninum* infection. *The Journal of Parasitology*, 90 (3): 579-583, 2004.

- Collantes-Fernández E, I López-Pérez, G Álvarez-García, and LM Ortega-Mora.** Temporal distribution and parasite load kinetics in blood and tissues during *Neospora caninum* infection in mice. *Infection and Immunity*, 74 (4): 2491-2494, 2006.
- Dubey JP and DS Lindsay.** A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Veterinary Parasitology*, 67 (1-2): 1-59, 1996.
- Dubey JP, D Buxton, and W Wouda.** Pathogenesis of bovine neosporosis. *Journal of Comparative Pathology*, 134 (4): 267-289, 2006.
- Dubey JP, G Schares, and LM Ortega-Mora.** Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clinical Microbiology Reviews*, 20 (2): 323-367, 2007.
- Entrican G.** Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. *Journal of Comparative Pathology*, 126 (2-3): 79-94, 2002.
- Eperon S, K Brönnimann, A Hemphill, and B Gottstein.** Susceptibility of B-cell deficient C57BL/6 (μ MT) mice to *Neospora caninum* infection. *Parasite Immunology*, 21 (5): 225-236, 1999.
- Innes EA, SE Wright, S Maley, A Rae, A Schock, E Kirvar, P Bartley, C Hamilton, IM Carey, and D Buxton.** Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *International Journal for Parasitology*, 31 (13): 1523-1534, 2001.
- Innes EA, AG Andrianarivo, C Björkman, DJ Williams, and PA Conrad.** Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends in Parasitology*, 18 (11): 497-504, 2002.
- Johnson LL.** Resistance to *Toxoplasma gondii* in mice infected as neonates or exposed *in-utero*. *Infection and Immunity*, 62 (8): 3075-3079, 1994.
- Kano R, Y Masukata, Y Omata, Y Kobayashi, R Maeda, and A Saito.** Relationship between type 1/type 2 immune responses and occurrence of vertical transmission in BALB/c mice infected with *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*, 129 (1-2): 159-164, 2005.
- Liddell S, MC Jenkins, and JP Dubey.** Vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice determined by polymerase chain reaction detection. *The Journal of Parasitology*, 85 (3): 550-555, 1999.
- Lindsay DS and JP Dubey.** *Neospora caninum* (Protozoa: apicomplexa) infections in mice. *The Journal of Parasitology*, 75 (5): 772-779, 1989.
- Long MT, TV Baszler, and BA Mathison.** Comparison of intracerebral parasite load, lesion development, and systemic cytokines in mouse strains infected with *Neospora caninum*. *The Journal of Parasitology*, 84 (2): 316-320, 1998.
- López-Pérez I, V Risco-Castillo, E Collantes-Fernández, and LM Ortega-Mora.** Comparative effect of infection with *Neospora caninum* at the three gestation periods. *The Journal of Parasitology*, 92 (6): 1286-1291, 2006.
- Macaldowie C, SW Maley, S Wright, P Bartley, I Esteban-Redondo, D Buxton, and EA Innes.** Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. *Journal of Comparative Pathology*, 131 (2-3): 142-156, 2004.
- Maley SW, D Buxton, AG Rae, SE Wright, A Schock, PM Bartley, I Esteban-Redondo, C Swales, CM Hamilton, J Sales, and EA Innes.** The pathogenesis of neosporosis in pregnant cattle: inoculation at mid-gestation. *Journal of Comparative Pathology*, 129 (2-3): 186-195, 2003.

- Melchers F and HPR Von Boehmer.** B-lymphocyte subpopulation in the mouse. Organ distribution and ontogeny of immunoglobulin-synthesis and of mitogen-sensitive cells. *Transplantation Reviews*, 25: 26-58, 1975.
- Morrison D.** How to improve statistical analysis in parasitology research publications. *International Journal for Parasitology*, 32 (8): 1065-1070, 2002.
- Omata Y, M Nidaira, R Kano, Y Kobayashi, T Koyama, H Furuoka, R Maeda, T Matsui, and A Saito.** Vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice in both acute and chronic infection. *Veterinary Parasitology*, 121 (3-4): 323-328, 2004.
- Osburn BI, NJ MacLachlan, and TG Terrell.** Ontogeny of the immune-system. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 181 (10): 1049-1052, 1982.
- Pereira-Bueno J, A Quintanilla-Gozal, V Pérez-Pérez, A Espi-Felgueroso, G Álvarez-García, E Collantes-Fernández, and LM Ortega-Mora.** Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. *Veterinary Parasitology*, 111 (2-3): 143-152, 2003.
- Pérez-Zaballos FJ, LM Ortega-Mora, G Álvarez-García, E Collantes-Fernández, V Navarro-Lozano, L García-Villada, and E Costas.** Adaptation of *Neospora caninum* isolates to cell-culture changes: an argument in favor of its clonal population structure. *The Journal of Parasitology*, 91 (3): 507-510, 2005.
- Peterhans E, TW Jungi, and M Schweizer.** BVDV and innate immunity. *Biologicals*, 31 (2): 107-112, 2003.
- Pérez-Zaballos FJ, LM Ortega-Mora, G Álvarez-García, E Collantes-Fernández, V Navarro-Lozano, L García-Villada, and E Costas.** Adaptation of *Neospora caninum* isolates to cell-culture changes: an argument in favor of its clonal population structure. *The Journal of Parasitology*, 91 (3): 507-510, 2005.
- Quinn HE, CM Miller, C Ryce, PA Windsor, and JT Ellis.** Characterization of an outbred pregnant mouse model of *Neospora caninum* infection. *The Journal of Parasitology*, 88 (4): 691-696, 2002.
- Sager H, I Fischer, K Furrer, M Strasser, A Waldvogel, P Boerlin, L Audigé, and B Gottstein.** A Swiss case-control study to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. *Veterinary Parasitology*, 102 (1-2): 1-15, 2001.
- Stahl W, M Sekiguchi, and Y Kaneda.** Cerebellar anomalies in congenital murine toxoplasmosis. *Parasitology Research*, 88 (6): 507-512, 2002.
- Stahl W, M Sekiguchi, and Y Kaneda.** Multiple organ dysfunction in congenital murine toxoplasmosis. *The Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 29 (2): 53-63, 2004.
- Whitten MK.** Effect of exteroceptive factors on the oestrous cycle of mice. *Nature*, 180 (4599): 1436, 1957
- Williams DJ, CS Guy, JW McGarry, F Guy, L Tasker, RF Smith, K MacEachern, PJ Cripps, DF Kelly, and AJ Trees.** *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitology*, 121 (Pt 4): 347-358, 2000.

Capítulo IV

Effects of *Neospora caninum* infection at mid-gestation on placenta in a pregnant mouse model

**Inmaculada C. López-Pérez^a, Esther Collantes-Fernández^a,
Silvia Rojo-Montejo^a, Vanesa Navarro-Lozano^a,
Verónica Risco-Castillo^a, Valentín Pérez-Pérez^b,
Juana Pereira-Bueno^b, and Luis Miguel Ortega-Mora^a**

^a SALUVET Group
Animal Health Department
Veterinary Faculty
Complutense University of Madrid
28040 Madrid

^b Animal Health Department
Veterinary Faculty
University of León
24071 León

Abstract

Neospora caninum is one of the more-efficient transplacentally-transmitted organisms. The goal of the present study was to investigate the pathologic and immunologic changes that occur at the materno-foetal interphase in pregnant BALB/c mice infected with *N. caninum* at mid-gestation. Parasite DNA was detected in foeto-placental units 3 days post-infection (PI). On day 7 PI, the DNA detection level and parasite burden were significantly higher in the placentas than in the foetuses, which may indicate that the parasite is mainly multiplying in the placenta during the initial infection. In the spleens of infected dams, we observed an increase in IFN- γ , IL-10, and IL-4. However, only IL-4 was upregulated in placentas from the infected dams; this may enhance susceptibility to *N. caninum* at the materno-foetal interphase and favour transmission to the progeny. Finally, an increase in TNF- α expression in nested-PCR-positive placentas combined with necrosis may compromise the viability of the foetuses.

1. Introduction

Neospora caninum is one of the more-efficient transplacentally-transmitted organisms, and vertical transmission is responsible for the spread of infection from an infected dam to her offspring during pregnancy (Dubey et al., 2006). The timing of placental and fetal infections during gestation is an important factor in determining the disease outcome in both mice (Long & Baszler, 1996; López-Pérez et al., 2006; Quinn et al., 2002) and in experimental bovine infections (Innes et al., 2001; Williams et al., 2000). In a previous study, we observed the successful vertical transmission of *N. caninum* infection in BALB/c mice during three gestation periods. We demonstrated that infection at midgestation had the most severe consequences for the pups when compared to infection in early or late gestation, and leads to the highest rate of vertical transmission, foetal mortality, stillbirth, and a decrease in litter size (López-Pérez et al., 2006; López-Pérez et al., 2008). Therefore, the aim of this study was to investigate the pathologic and immunologic changes that occur at the materno-foetal interphase in pregnant BALB/c mice infected with *N. caninum* on day 7 of gestation.

2. Materials and methods

2.1. Mice

Eight-week-old female BALB/c mice (Harlan Interfauna Ibérica, Barcelona, Spain) were mated for one night, and day 0 of gestation was determined by the presence of the vaginal mucoid plug (López-Pérez et al., 2006; López-Pérez et al., 2008).

2.2. Experimental design and samples

Pregnant BALB/c mice were infected subcutaneously with 2×10^6 Nc-1 tachyzoites on day 7 of gestation. A group of pregnant mice was inoculated with PBS on day 7 of gestation and kept as an uninfected control group. Eight infected dams and four control animals were killed, at random, with CO₂ gas at each time point. On day 10 of gestation (3 days PI), the complete foetoplacental unit was collected, while on day 14 of gestation (7 days PI), the foetuses, resorptions, placentas, and maternal spleens were recovered. The foetal mortality (resorptions) was determined on day 14 of gestation on the basis of small foetal size (≤ 3 mm) or lack of discernible foetal tissue at an implant site containing placenta tissue (Long & Baszler, 1996). The percent of resorption per dam was calculated as $R/(R + V) \times 100$ in every dam, where R is the number of resorbing foetuses and V is the number of viable foetuses per animal (Krishnan et al., 1996). The foeto-placental units, foetuses, and resorptions were individually processed for PCR analysis. All of the collected

placentas were divided in two portions: one-half was always assayed using PCR analysis, and the other half was processed for either cytokine expression or histological analysis. Finally, the spleens from dams were collected for cytokine expression analysis.

2.3. Detection and quantification of *N. caninum* DNA

A nested PCR was performed, as previously described, to detect parasite DNA in the tissue samples (Buxton et al., 1998; López-Pérez et al., 2006). In nested-PCR-positive samples, the *N. caninum* load was quantified by real-time PCR (Collantes-Fernández et al., 2002).

2.4. Total RNA extraction and real-time RT-PCR

Cytokine expression was evaluated by real-time RT-PCR. Total RNA was obtained by the commercial product *TRI REAGENT* (Sigma, St. Louis, Missouri, USA), and synthesis of cDNA was performed with *SuperScript II Reverse Transcriptase* (Invitrogen, Paisley, United Kingdom). The primer sequences for cDNA amplification of interferon γ (IFN- γ), interleukin 10 (IL-10), interleukin 4 (IL-4), and β -actin have been previously published (Varona et al., 2005). The primer sequences for tumor necrosis factor α (TNF- α) gene were as follows: forward "CTGTAGCCCACGTCTGTAGC" and reverse "TTGAGATCCATGCCGTTG" (R. Varona, personal communication). The relative n-fold changes of each target cytokine expression ($-\Delta\Delta Ct$) were normalized to the endogenous reference (β -actin) and related to the control group (Livak & Schmittgen, 2001).

2.5. Histopathological studies

Routine histological methods were performed on formalin-fixed and paraffin-embedded placenta tissue sections. The analysis was based on the observation of lesions characteristic of or consistent with *N. caninum* infection (Long & Baszler, 1996). Local immune response and histological analyses were performed only in placentas containing live fetuses because, due to their small foetal size, resorptions were only recovered for parasite DNA detection.

2.6. Analysis of data

The Chi-square and Fisher *F*-tests were used to compare foetal mortality and the rates of parasite detection. The Mann-Whitney *U*-test was employed to analyze differences in the percent of resorption among infected and uninfected dams. The differences in the parasite burden were analyzed by a nonparametric Kruskal-Wallis test.

When statistical differences were found, a Dunn's multiple comparison test was employed to examine all possible pairwise comparisons. The Student's *t*-test was used to compare the differences in cytokine expression between infected and uninfected dams. All of the statistical analyses were performed using GraphPad Prism v.5.02 software (San Diego, California, USA).

3. Results

3.1. *N. caninum* infection in dams

The infected dams showed no body weight changes when compared to the control group (data not shown), and no clinical signs that were compatible with neosporosis were observed.

3.2. Foetal mortality

The consequences of infection on the outcome of gestation were evaluated by investigating the foetal mortality in infected animals compared to uninfected dams (Table 1). On day 14 of gestation, resorptions were observed in 6 of 8 infected dams and in 3 of 4 uninfected dams. We found an increase in foetal mortality ($P = 0.671$, $\chi^2 = 0.18$) and a higher percent of resorption per mouse ($P = 0.255$, $U = 6.00$, Mann-Whitney *U*-test), in the infected animals compared to uninfected dams, although no significant differences were found.

Table 1. Effect on the foetal mortality of *Neospora caninum* infection in dams infected on day 7 of gestation and sacrificed on day 14 of gestation (7 days PI).

Group	Foetal mortality	
Infected dams	12/75 (16.0 %)*	20.0 (4.6 - 21.7)†
Control dams	3/37 (8.1 %)	10.0 (10.0 - 11.0)

* Number of resorptions/number total viable foetuses (percentage)

† Median of the percentage of resorptions per litter (lower and upper quartiles)

3.3. *N. caninum* DNA presence and parasite load

To analyze the pattern of parasite transmission from dams to fetuses when infection occurred at mid-gestation, the presence of *N. caninum* DNA (Table 2) and parasite load (Figure 1) were evaluated in the placentas and foeto-placental units or fetuses. *Neospora caninum* DNA was detected in foeto-placental units at 3 days PI (day 10 of gestation) and in the placentas and fetuses at 7 days PI (day 14 of gestation), with all of the dams showing at least one positive placenta. On day 14 of gestation, there was a significantly higher *N. caninum* detection ($P < 0.0001$, $\chi^2 = 31.22$, χ^2 test) and parasite load ($P < 0.0001$, $\chi^2 = 68.98$, Dunn's multiple comparison test) in the placentas compared to the fetuses. No differences in the parasite presence ($P = 1$, Fisher F -test) and parasite load ($P > 0.05$, $\chi^2 = 68.98$, Dunn's multiple comparison test) were observed among the viable fetuses and resorptions. Finally, parasite DNA was more-often detected ($P < 0.0001$, $\chi^2 = 38.12$) and a higher parasite burden was observed ($P < 0.0001$, $\chi^2 = 68.98$, Dunn's multiple comparison test) in the placentas compared to the foetoplacental units. No parasite DNA was detected in foeto-placental units, placentas, or fetuses from control mice.

Table 2. Detection of *N. caninum* DNA by nested-PCR in foetoplacental units, fetuses, resorptions and placentas from mice infected on day 7 of gestation with 2×10^6 Nc-1 tachyzoites and sacrificed on days 10 (3 days PI) and 14 of gestation (7 days PI).

Samples collected	Nested-PCR	
	no. samples*	per litter†
Foetoplacental units	4/71 (5.6 %)	5.0 (0.0-1.1)
Viable foetus	4/63 (6.3 %)	0.0 (0.0-13.9)
Resorptions	1/12 (8.3 %)	0.0 (0.0-0.0)
Placentas	35/60 (58.3 %)	50.0 (44.4-83.0)

* Number of positive samples/ total of samples analyzed (percentage)

† Median of positive samples per litter (minimum and maximum values).

Figure 2. The cytokine expression in the spleen and foetal placentas from the infected dams compared to the uninfected animals. β -actin was used as an endogenous reference for each corresponding sample. Each determination was performed in triplicate, and the results of real time RT-PCR are given by $-\Delta\Delta Ct$. The $-\Delta\Delta Ct$ value for the control group is zero. The bars represent the mean of cytokine expression and the standard error. The asterisks represent the significant differences between the infected and uninfected dams using the Student's *t*-test (**: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$).

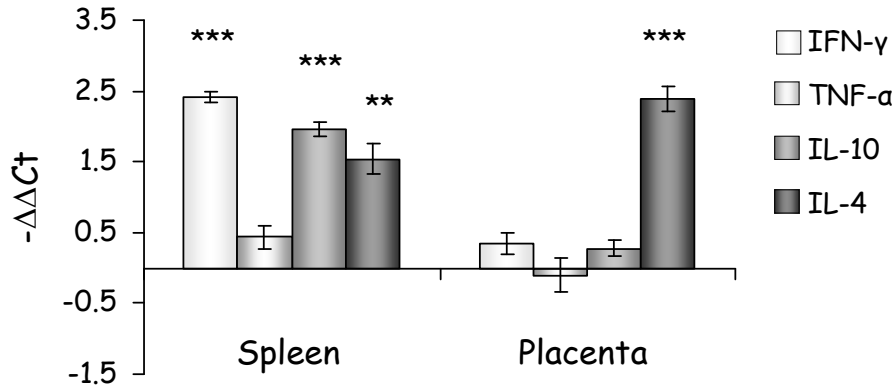
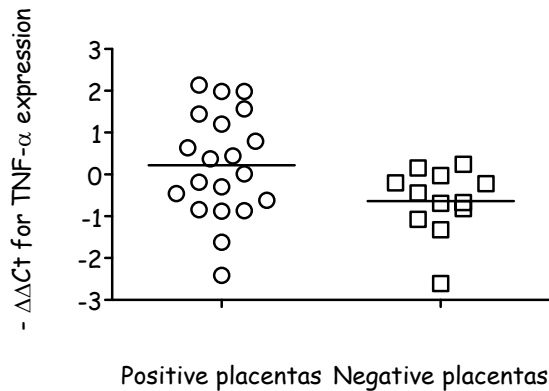


Figure 3. TNF- α expression in the nested-PCR-positive and negative placentas from the infected dams. The data are represented as individual points in each sample, and the horizontal line corresponds to the median value.



4. Discussion

The placenta may play a key role in the pathogenesis of neosporosis; in addition to being the natural barrier through which the parasite must cross to reach the foetus, the placenta can exhibit mechanisms of defence. However, relatively little is known about the role of the placenta during *N. caninum* infection in mice. Our data have demonstrated the presence of parasites in foeto-placental units as early as 3 days PI (day 10 of gestation).

Nevertheless, it is unknown if the parasite reached the materno-foetal interphase before day 3 PI because no mice were killed before this time. On day 14 of gestation (7 days PI), *N. caninum* DNA was detected in both the placentas and the foetuses. We found *N. caninum* DNA in a higher number of the placentas than in the foetuses, and the parasite burden in the placentas was also significantly higher than in the foetuses. Furthermore, parasite DNA was more-often detected in the placenta compared to the foeto-placental units, where an increase in the parasite load was also observed. In previous reports, in mice infected at late mid-gestation (day 10 of gestation), *N. caninum* tachyzoites were identified by immunohistochemistry in the placenta and foetus on days 6 - 8 days PI (Long & Baszler, 1996; Rettigner et al., 2004). In a guinea pig model of *Toxoplasma gondii* infection, the placental parasite load was also time-dependent, and a higher parasite burden was found in the placenta compared to the foetuses in the early stages of the infection (Flori et al., 2003). Taken together, these findings may indicate that the parasite is mainly multiplying in the placenta during the initial infection. Although the parasite was detected in very few foetuses (6 %) at this stage, the infection of a higher number of foetuses is likely to occur later in gestation because of the high vertical transmission detected previously on days 7 (López-Pérez et al., 2006) and 60 post-partum (López-Pérez et al., 2008).

The maintenance of a healthy pregnancy is associated with the secretion of anti-inflammatory cytokines. We attempted to determine if parasite infection at mid-gestation disrupts the materno-foetal immunological balance. We detected a significant increase in IFN- γ , IL-10, and IL-4 mRNA expression in the spleens from infected dams compared to uninfected animals. Previous reports have also described an increase in both Th1 and Th2 cytokine expression in *N. caninum* infection (Eperon et al., 1999; Kano et al., 2005; Khan et al., 1997; Quinn et al., 2004). In supernatants from mouse spleen cells stimulated with *N. caninum* antigen, an increase in IFN- γ , IL-12, TNF- α , and IL-10 production was observed (Quinn et al., 2004), while an increase in IFN- γ and IL-4 was detected in the serum (Kano et al., 2005) of pregnant mice. However, a different pattern of cytokine expression was observed in the placenta, where only IL-4 expression was upregulated in placentas from infected dams. IL-4 has been related to disease susceptibility in *N. caninum*-infected mice (Baszler et al., 1999; Long et al., 1998) and may favor the multiplication of parasites at the materno-foetal interphase (Innes et al., 2005; Quinn et al., 2004), leading to the high vertical transmission that has been previously observed after infection of dams at mid-gestation (López-Pérez et al., 2006; López-Pérez et al., 2008). In addition, the increase in IL-4 expression might reduce the harmful effects of an antiparasitic proinflammatory immune response, which has been reported to be potentially deleterious for pregnancy maintenance (Raghupathy, 1997). We found a higher TNF- α mRNA levels in the nested-PCR-positive placentas, indicating that this cytokine may be produced in response to infection with *N. caninum*. TNF- α has been shown to be harmful to the maintenance of pregnancy in mice (Chaouat et al., 1990; Gazzinelli et al., 1996; Raghupathy, 2001), and given the high permeability of the blood-brain barrier during pregnancy, it may compromise the viability of the developing foetuses by causing brain damage (Michie, 1998). In addition, placental necrosis, which is likely to exacerbate as gestation progresses, could also be implicated in the high rates of stillbirth and neonatal mortality that have been previously observed (López-Pérez et al., 2006; López-Pérez et al., 2008), as a consequence of an insufficient supply of oxygen-nutrition by the placenta (Buxton et al., 1982).

A minimal non-suppurative infiltrate was found in placentas from infected dams containing live foetuses. Previous reports have also demonstrated necrosis with few infiltrating inflammatory cells in placentas from pregnant mice infected on day 10 of gestation (Long & Baszler, 1996). In *N. caninum*-infected cattle carrying live foetuses and in pregnant control cattle, there was no evidence of infection of the placenta and

consequently no inflammatory response (Maley et al., 2006). Altogether, these results suggest that the study of the inflammatory response in the placentas containing dead foetuses could more-precisely clarify the pathogenesis of *N. caninum* in pregnant mice.

In a previous study in cattle, a strong cytokine expression profile was observed in the placentomes of the cattle whose foetuses were killed as a result of infection (Rosbottom et al., 2008). However, we cannot discard the idea that a strong, type-1 immune response was responsible for the observed foetal resorptions because analysis of the local immune response was performed only in placentas containing live foetuses. Thus, further experiments are required to evaluate the importance of local and systemic immune response in foetal mortality.

In summary, this is the first report that describes the simultaneous analysis of parasite presence and load, the immune response, and the histopathological lesions in the placenta in BALB/c mice infected with *N. caninum* at mid-gestation.

5. Acknowledgements

This work has been supported by a grant from the Spanish Government (AGL2001-1362). Inmaculada C. López-Pérez has been financed by the Spanish Ministry of Education and Science. This experiment complied with the current local animal protection laws of the European Union.

6. Literature cited

Baszler TV, MT Long, TF McElwain, and BA Mathison. Interferon-gamma and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. *International Journal for Parasitology*, 29 (10): 1635-1646, 1999.

Buxton D, JS Gilmour, KW Angus, DA Blewett, and JK Miller. Perinatal changes in lambs infected with *Toxoplasma gondii*. *Research in Veterinary Science*, 32 (2): 170-176, 1982.

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

Chaouat G, E Menu, DA Clark, M Dy, M Minkowski, and TG Wegmann. Control of fetal survival in CBA x DBA/2 mice by lymphokine therapy. *Journal of Reproduction and Fertility*, 89 (2): 447-458, 1990.

Collantes-Fernández E, Á Zaballos, G Álvarez-García, and LM Ortega-Mora. Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (4): 1194-1198, 2002.

Dubey JP, D Buxton, and W Wouda. Pathogenesis of bovine neosporosis. *Journal of Comparative Pathology*, 134 (4): 267-289, 2006.

- Eperon S, K Brönnimann, A Hemphill, and B Gottstein. Susceptibility of B-cell deficient C57BL/6 (μ MT) mice to *Neospora caninum* infection. *Parasite Immunology*, 21 (5): 225-236, 1999.
- Flori P, J Hafid, V Thonier, B Bellete, H Raberin, and SR Tran Manh. Parasite load in guinea pig foetus with real time PCR after maternofetal transmission of *Toxoplasma gondii*. *Parasite*, 10 (2): 133-140, 2003.
- Gazzinelli RT, M Wysocka, S Hieny, T Schariton-Kersten, A Cheever, R Kühn, W Müller, G Trinchieri, and A Sher. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *The Journal of immunology*, 157 (2): 798-805, 1996.
- Innes EA, SE Wright, S Maley, A Rae, A Schock, E Kirvar, P Bartley, C Hamilton, IM Carey, and D Buxton. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *International Journal for Parasitology*, 31 (13): 1523-1534, 2001.
- Innes EA, S Wright, P Bartley, S Maley, C Macalodowie, I Esteban-Redondo, and D Buxton. The host-parasite relationship in bovine neosporosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 108 (1-2): 29-36, 2005.
- Kano R, Y Masukata, Y Omata, Y Kobayashi, R Maeda, and A Saito. Relationship between type 1/type 2 immune responses and occurrence of vertical transmission in BALB/c mice infected with *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*, 129 (1-2): 159-164, 2005.
- Khan IA, JD Schwartzman, S Fonseka, and LH Kasper. *Neospora caninum*: role for immune cytokines in host immunity. *Experimental Parasitology*, 85 (1): 24-34, 1997.
- Krishnan L, LJ Guilbert, TG Wegmann, M Belosevic, and TR Mosmann. T helper 1 response against *Leishmania major* in pregnant C57BL/6 mice increases implantation failure and fetal resorptions. Correlation with increased IFN-gamma and TNF and reduced IL-10 production by placental cells. *The Journal of Immunology*, 156 (2): 653-662, 1996.
- Livak K and TD Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25 (4): 402-408, 2001.
- Long MT and TV Baszler. Fetal loss in BALB/C mice infected with *Neospora caninum*. *The Journal of Parasitology*, 82 (4): 608-611, 1996.
- Long MT, TV Baszler, and BA Mathison. Comparison of intracerebral parasite load, lesion development, and systemic cytokines in mouse strains infected with *Neospora caninum*. *The Journal of Parasitology*, 84 (2): 316-320, 1998.
- López-Pérez IC, V Risco-Castillo, E Collantes-Fernández, and LM Ortega-Mora. Comparative effect of *Neospora caninum* infection in BALB/c mice at three different gestation periods. *The Journal of Parasitology*, 92 (6): 1286-1291, 2006.
- López-Pérez IC, E Collantes-Fernández, A Aguado-Martínez, A Rodríguez-Bertos, and LM Ortega-Mora. Influence of *Neospora caninum* infection in BALB/c mice during pregnancy in post-natal development. *Veterinary Parasitology*, 155 (3-4): 175-183, 2008.
- Maley SW, D Buxton, CN Macalodowie, IE Anderson, SE Wright, PM Bartley, I Esteban-Redondo, CM Hamilton, AK Storset, and EA Innes. Characterization of the immune response in

the placenta of cattle experimentally infected with *Neospora caninum* in early gestation. *Journal of Comparative Pathology*, 135 (2-3): 130-141, 2006.

Michie C. Th1 and Th2 cytokines in pregnancy, from a fetal viewpoint. *Immunology Today*, 19 (7): 333-334, 1998.

Quinn HE, CM Miller, C Ryce, PA Windsor, and JT Ellis. Characterization of an outbred pregnant mouse model of *Neospora caninum* infection. *The Journal of Parasitology*, 88 (4): 691-696, 2002.

Quinn HE, CM Miller, and JT Ellis. The cell-mediated immune response to *Neospora caninum* during pregnancy in the mouse is associated with a bias towards production of interleukin-4. *International Journal for Parasitology*, 34 (6): 723-732, 2004.

Raghupathy R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunology Today*, 18 (10): 478-482, 1997.

Raghupathy R. Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. *Seminars in Immunology*, 13 (4): 219-227, 2001.

Rettigner C, F De Meerschman, C Focant, A Vanderplasschen, and B Losson. 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 (Pt 2): 149-160, 2004.

Rosbottom A, EH Gibney, CS Guy, A Kipar, RF Smith, P Kaiser, AJ Trees, and DJ Williams. An upregulation of cytokines is detected in the placentas of cattle infected with *Neospora caninum* and is more marked early in gestation when fetal death is observed. *Infection and Immunity*, 76 (6): 2352-2361, 2008.

Varona R, V Cadenas, L Gómez, A Martínez, and G Márquez. CCR6 regulates CD4+ T-cell-mediated acute graft-versus-host disease responses. *Blood*, 106 (1): 18-26, 2005.

Williams DJ, CS Guy, JW McGarry, F Guy, L Tasker, RF Smith, K MacEachern, PJ Cripps, DF Kelly, and AJ Trees. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitology*, 121 (Pt 4): 347-358, 2000.

Capítulo V

Pathological and immunological findings in placentas from pregnant BALB/c mice infected with *Neospora caninum* at early and late stages of gestation

**Inmaculada C. López-Pérez^a, Esther Collantes-Fernández^a,
Silvia Rojo-Montejo^a, Vanesa Navarro-Lozano^a,
Verónica Risco-Castillo^a, Valentín Pérez-Pérez^b,
Juana Pereira-Bueno^b, and Luis Miguel Ortega-Mora^a**

^a SALUVET Group
Animal Health Department
Veterinary Faculty
Complutense University of Madrid
28040 Madrid

^b Animal Health Department
Veterinary Faculty
University of León
24071 León

Abstract

Neospora caninum is transmitted from a cow to its foetus by vertical transmission and the timing of infection in gestation is an important factor in determining the disease outcome. Few studies have explored the role of the placenta in the outcome of *N. caninum* infection during pregnancy. Here, we described the *N. caninum* presence, parasite load, local immune response, and histopathological lesions at the materno-foetal interface after infection of BALB/c mice at early and late stages of gestation. In mice infected at early gestation, *N. caninum* DNA was detected in foetoplacental units 7 days post-infection (PI) and in the placenta, but not in viable foetuses on day 14 PI, indicating that the parasite was multiplying primarily in the placental tissues without reaching the foetus. Moreover, parasite DNA was detected in resorptions, suggesting that foetal death could be a consequence of infection. An increase in IFN- γ , TNF- α and IL-10 expression was observed in *N. caninum* PCR-positive placentas, which could favour *N. caninum* foetal transmission and be harmful to both the placenta and the foetus. Histopathological analysis revealed necrosis affecting both the maternal and foetal sides of the placenta. At late gestation, transmission occurred rapidly following infection (day 3 days PI), but parasite were rarely found. In addition, an increase in cytokine expression was observed in spleen and placental tissues from infected animals, while a downregulation in IL-4 expression was only observed in the spleen. Finally, necrosis in the placenta was limited to the maternal side, suggesting that the parasite is mainly multiplying in the placental tissue at this stage. Thus, the results of the present study indicate that the placenta may be actively involved in *N. caninum* pathogenesis.

1. Introduction

Neospora caninum is a protozoan parasite that causes abortion in cattle worldwide (Dubey & Lindsay, 1996). The parasite can be transmitted from a cow to its foetus by either endogenous or exogenous transplacental infection (Trees & Williams, 2005). In addition, vertical transmission contributes to the persistence of the parasite in the herd by propagating the infection to successive generations (Dubey et al., 2006).

Foetal immunocompetence develops gradually through gestation, and the timing of infection in gestation is an important factor in determining the disease outcome (Maley et al., 2006; Rosbottom et al., 2008). In cattle, inoculation with tachyzoites during early gestation induces foetal death (Barr et al., 1994; Dubey et al., 1992; Macalodowie et al., 2004; Williams et al., 2000; Williams et al., 2003), whereas infections occurring later in pregnancy usually result in the birth of congenitally infected but clinically normal calves (Barr et al., 1994; Innes et al., 2001; Maley et al., 2003; Williams et al., 2000). The placenta may play a key role in the pathogenesis of neosporosis. During pregnancy, the immune system is modulated, and the expression of Th2-type cytokines predominates (Raghupathy, 1997; Wegmann et al., 1993). This bias is evident locally at the foeto-maternal interface (Lin et al., 1993). *N. caninum* multiplication during pregnancy may increase Th1-type cytokines, which could contribute to foetal death due to immune-mediated pathological alterations (Innes et al., 2002; Quinn et al., 2002a); however, few studies have explored this hypothesis. In cattle, *N. caninum* infection in early gestation, which results in foetal death, has been found to be associated with a much greater increase in placental Th1- and Th2-type cytokine expression, placental necrosis, and inflammatory cell infiltration compared to cattle infected later in gestation, when the foetus survives (Rosbottom et al., 2008).

In-depth studies to understand the immunological and pathological mechanisms involved in *N. caninum* infection in cattle are difficult due to practical constraints. Thus, pregnant mouse models have been developed to study the effect of *N. caninum* infection during pregnancy. The day of infection during pregnancy seems to be a determining factor in foetal losses and in the rate of transmission to the offspring. Mice inoculated at early gestation show an increase in resorptions and a high vertical transmission rate; in contrast, no foetal losses and low transmission rates are detected when dams are infected late in gestation (Liddell et al., 1999; Long & Baszler, 1996; 1999; López Pérez et al., 2006; López Pérez et al., 2008; Quinn et al., 2002b). We previously developed a pregnant mouse model to further explore the pathogenesis of *N. caninum* infection during gestation (López Pérez et al., 2006; López Pérez et al., 2010). In this model, we detected an increase in IL-4 expression in placentas from mice infected at mid-gestation, which might favour the multiplication of the parasite and facilitate its transmission to the foetus across the placenta. Furthermore, during the initial infection, when the parasite is mainly multiplying in the placenta, we observed an increase in TNF- α expression in *N. caninum* PCR-positive placentas, which could be associated with embryotoxic effects (López-Pérez et al., 2010).

The aim of this work was to evaluate the role of the placenta in the outcome of pregnancy after infection with *N. caninum* at early and late gestation. Thus, we investigated the parasite presence, parasite load, local and systemic immune response, and the lesion severity at the materno-foetal interface.

2. Materials and methods

2.1. Mice

Seven-week-old female BALB/c mice were obtained from a commercial supplier (Harlan Interfauna Ibérica, Barcelona, Spain). These mice were free of common viral, parasitic, 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 light/dark cycles of twelve hours. At eight weeks of age and after using the Whitten effect (Whitten, 1957), females were mated for one night. Day 0 of gestation was determined by the presence of the vaginal mucoid plug.

2.2. Parasite and preparation of inoculum

N. caninum Nc-1 tachyzoites were maintained in vitro by continuous passage in MARC-145 cells, as described previously (Pérez-Zaballos et al., 2005). Cultures were scraped and parasites were passed through a 25-gauge needle to break up cells and release tachyzoites. The parasites were then centrifuged for 15 minutes at 1,350 *g* and re-suspended in sterile phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4). Viability was determined by Trypan blue exclusion, followed by counting with a Neubauer chamber. Parasites were re-suspended in sterile PBS at the required dose in a final volume of 200 μ l/mouse and used immediately to infect mice.

2.3. Experimental design and samples

Pregnant BALB/c mice were infected subcutaneously with 2×10^6 Nc-1 tachyzoites on days 0 (early gestation, group 1) and 14 (late gestation, group 2) of gestation. A group of pregnant mice was inoculated with PBS on days 0 and 14 of gestation and kept as an uninfected control group. Eight infected dams and four control animals were sacrificed with CO₂ gas, at random, at each time point. Animals from group 1 were sacrificed on days 7 and 14 post-infection (PI). Mice from group 2 were sacrificed on day 17 of gestation. Different samples were taken depending on the day of sacrifice. In group 1, the complete foetoplacental unit was collected on day 7 of gestation (7 days PI), while on day 14 of gestation (14 days PI), the foetuses, resorptions, placentas, and maternal spleen from each dam were recovered. In group 2, brain and lung were collected separately on day 17 of gestation (3 days PI) from foetuses together with placentas and maternal spleen from each dam. In group 1, foetal mortality (resorptions) was determined on day 14 of gestation (day 14 PI) on the basis of small foetal size (≤ 3 mm) or lack of discernible foetal tissue at an implant site containing placenta tissue (Long & Baszler, 1996). The percent of resorption per dam was calculated as $R/(R + V) \times 100$ in every dam, where R is the number of resorbed foetuses and V is the number of viable foetuses per animal (Krishnan et al., 1996). Resorptions observed on day 17 of gestation (3 days PI) in group 2 were not considered for PCR

analysis, as these could have occurred prior to experimental infection. Foetoplacental units, foetuses, and resorptions were individually processed for PCR analysis. All of the collected placentas were divided into two portions: one-half used for PCR analysis, and the other half was processed for either cytokine expression or histological analysis. Finally, spleens from dams were collected for cytokine expression analysis. Placentas containing live foetuses were subjected to local immune response and histological analyses, whereas resorptions were only used for parasite DNA detection due to their small foetal size.

2.4. Detection and quantification of *N. caninum* DNA

Genomic DNA was extracted using the commercial kit *Real Pure DNA Extracción ADN genómico* (Durviz, Valencia, Spain) according to the manufacturer's instructions. For parasite DNA detection, a nested PCR reaction to amplify the internal transcribed spacer 1 (ITS1) region of *N. caninum* was performed as previously described (Buxton et al., 1998). Parasite DNA in PCR-positive tissues was quantified by real-time PCR (Collantes-Fernández et al., 2002) using an *ABI PRISM™ 7300 Sequence Detector Machine* (PE Applied Biosystems, Foster City, California, USA) and the commercial kit *Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG* (Invitrogen, Paisley, United Kingdom). We used primer pairs from the *N. caninum* Nc-5 sequence to quantify parasites and primers from the 28S rRNA gene to quantify host DNA. Samples were run in duplicate in separate tubes. *N. caninum* organisms were quantified by interpolation of cycle threshold (the fractional cycle number reflecting a positive PCR result) values on a standard curve of DNA equivalent to 1×10^{-1} - 1×10^4 tachyzoites. The amount of DNA per sample was normalised by quantification of the 28S rRNA gene, and a standard curve was generated with five-fold serial dilutions of mouse brain DNA quantified by UV spectrophotometry. Data were analysed with *Sequence Detection System Software v.1.6* (PE Applied Biosystems) and parasite load was expressed as the number of tachyzoites/ μ g host DNA. The detection limit for the assay was 1×10^{-1} tachyzoites, as described previously (Collantes-Fernández et al., 2002).

2.5. Total RNA extraction and real-time RT-PCR

Cytokine expression was evaluated by real-time RT-PCR. Spleen and foetal placentas were placed in *TRI REAGENT* (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) and disrupted using a *Polytron PT1600E homogeniser* (Kinematica, AG, Lucerne, Switzerland). Total RNA was extracted according to the manufacturer's instructions, and RNA integrity was checked via agarose gel electrophoresis. Synthesis of cDNA was performed with *SuperScript II Reverse Transcriptase* (Invitrogen), according to the manufacturer's recommendations. The primer sequences used in this study for cDNA amplification of IFN- γ , IL-10, IL-4, and β -actin were previously published (López-Pérez et al., 2010; Varona et al., 2005). β -actin was employed as an endogenous reference for each corresponding sample. Placentas from the control group were analysed simultaneously with placentas from the infected group. The amount of cDNA was determined by real-time PCR on an *ABI PRISM™ 7300 Sequence Detector Machine* (PE Applied Biosystems) with the commercial kit *Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG* (Invitrogen). Each determination was performed in triplicate, and the cycle threshold

(Ct) value was obtained using *Sequence Detection System Software v.1.6* (PE Applied Biosystems). For relative quantification of gene expression, the comparative threshold cycle method was used. The relative n-fold changes in expression of each target cytokine was normalised to the endogenous reference (β -actin) and calculated relative to the control group, producing the $-\Delta\Delta C_t$ value (Livak & Schmittgen, 2001). The local immune response was analysed exclusively in foetal placentas containing live foetuses; resorptions were only recovered for parasite DNA detection due to their small foetal size.

2.6. Histopathological studies

Foetal placentas were processed by routine histological methods. Tissues were fixed in 10 % neutral buffered formalin and dehydrated with graded alcohols prior to being embedded in paraffin wax, and stained with haematoxylin and eosin (Pereira-Bueno et al., 2003). Analysis was based on the identification of characteristic *N. caninum* lesions in the placenta, as previously described (Dubey et al., 2006; Long & Baszler, 1996).

2.7. Analysis of data

The Chi-square and Fisher F tests were used to compare foetal mortality and rates of parasite detection. The Mann-Whitney U -test was employed to analyse differences in the percent of resorption between infected and uninfected dams. Differences in parasite burden were analysed by a nonparametric Kruskal-Wallis test. When statistical differences were found, a Dunn's multiple comparison test was employed to examine all possible pairwise comparisons. When statistically significant differences were obtained using the Kruskal-Wallis test, but the multiple comparison test did not yield significance, the results obtained by the Kruskal-Wallis test were preferred, as suggested by Morrison (Morrison, 2002). The Student's t -test was used to compare the differences in cytokine expression between infected and uninfected dams. All of the statistical analyses were performed using GraphPad Prism v.5.02 (San Diego, California, USA) software.

3. Results

3.1. Foetal mortality

The consequences of the infection in the outcome of gestation were evaluated by investigating the foetal mortality rate (Table 1). In group 1, resorptions were observed in 5 out of 8 infected dams and in 3 out of 4 of uninfected animals that were sacrificed on day 14 of gestation (day 14 PI). No differences in foetal mortality ($P = 0.7464$, $\chi^2 = 0.10$) or percent of resorption per mouse ($P = 0.730$, $U = 13.50$, Mann-Whitney U -test) were found between infected and uninfected dams.

Table 1. Effect of infection with *Neospora caninum* on day 0 (group 1) of gestation on the foetal mortality. Dams were sacrificed on day 14 of gestation.

		Foetal mortality	
Group 1	Infected dams	7/75 (9.3 %)*	9.4 (0.0 - 20.8)†
	Control dams	4/43 (9.3 %)	11.0 (2.3 - 31.8)

* Number of resorptions/ total number of viable foetuses (percentage)

† Median of resorptions per litter (lower and upper quartiles)

3.2. *N. caninum* DNA presence and parasite load

To analyse the pattern of parasite transmission from dams to the foetus, *N. caninum* DNA presence (Table 2) and parasite load (Figure 1) were evaluated in foetoplacental units, foetuses, and placentas. In group 1, *N. caninum* DNA was present in foetoplacental units at day 7 of gestation (7 PI), when the foetus and the placenta were recovered together. On day 14 PI (day 14 of gestation), when the two samples were collected separately, parasite DNA was only detected in placentas and resorptions, but not in viable foetuses. *N. caninum* presence was more often detected in resorptions than in foetoplacental units ($P = 0.0135$, Fisher F -test). Parasite burden was significantly higher in placenta and resorptions ($P = 0.0066$, $\chi^2 = 14.24$, Dunn's multiple comparison test) compared to foetoplacental units. In group 2, parasite DNA was found in placentas and in one foetus at 3 days PI (day 17 of gestation). Parasite DNA was more often detected ($P < 0.014$, $\chi^2 = 6.10$) and a higher parasite burden was observed in the placentas compared the foetuses ($P < 0.0001$, $U = 20.0$, Mann-Whitney U -test).

Table 2. Detection of *N. caninum* DNA by nested-PCR in foetoplacental units, foetuses, resorptions and placentas from mice infected on days 0 (group 1) and 14 (group 2) of gestation with 2×10^6 Nc-1 tachyzoites. Dams from group 1 were sacrificed on days 7 and 14 of gestation and dams from group 2 were sacrificed on day 17 of gestation.

		Nested-PCR	
Samples collected		no. samples*	per litter†
Group 1	Foetoplacental units ^a	11/83 (13.3 %)	10.6 (2.5-21.7)
	Viable foetus ^b	0/68 (0.0 %)	0.0 (0.0-0.0)
	Resorptions ^b	4/7 (57.1 %)	0.0 (0.0-87.5)
	Placentas ^b	24/68 (35.3 %)	31.0 (11.2-56.2)
Group 2	Viable foetus ^c	1/55 (1.8 %)	0.0 (0.0 - 0.0)
	Placentas ^c	11/64 (17.2 %)	5.0 (0.0 33.6)

* Number of positive samples/total number of samples analyzed (percentage)

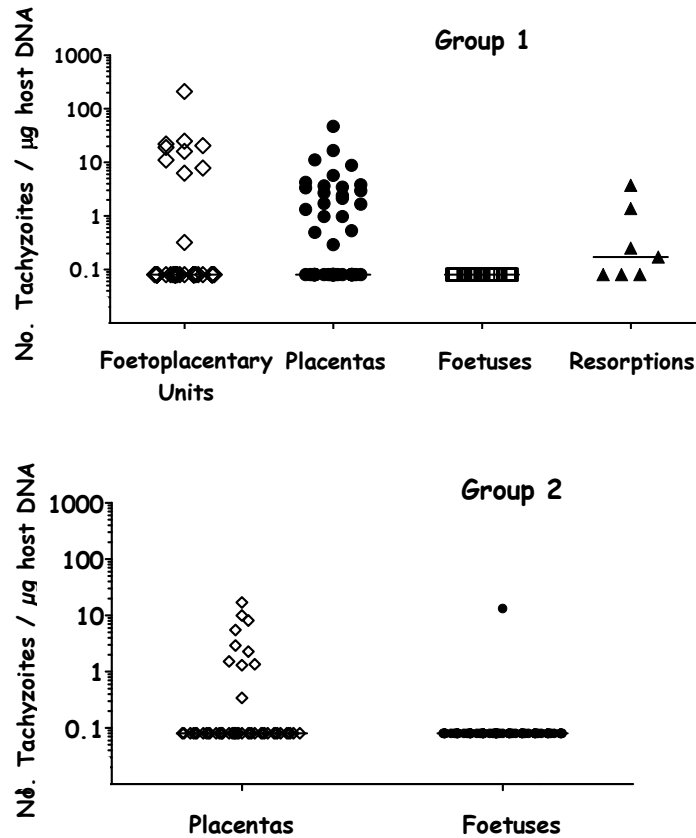
† Median of positive samples per litter (minimum and maximum values)

^a Foetoplacental units collected on day 7 of gestation (7 PI)

^b Samples collected on day 14 of gestation (14 PI)

^c Samples collected on day 17 of gestation (3 PI)

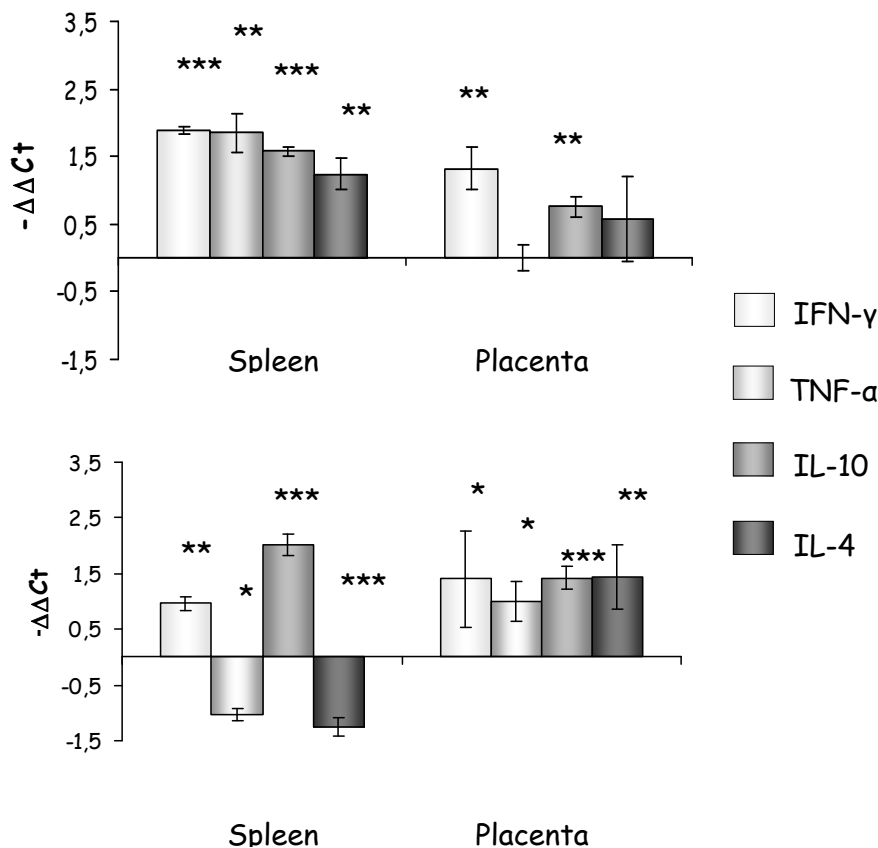
Figure 1. Parasite load in foetoplacental units, placentas, foetuses, and resorptions following infection of dams with 2×10^6 Nc-1 tachyzoites on day 0 (group 1) or day 14 of gestation (group 2). Dams from group 1 were sacrificed on days 7 and 14 of gestation, and dams from group 2 were sacrificed on day 17 of gestation. Each point represents the parasite load of a single sample, and the points were horizontally spread out for ease of visualizing overlapping values. Horizontal lines correspond to mean value for each type of sample. Because the *N. caninum* detection limit by real-time PCR is 10^{-1} parasites (Collantes-Fernández et al., 2002), all positive samples had ≥ 0.1 parasites, while negative samples (0 parasites) were represented on the log scale as having < 0.1 parasites.



3.3. Cytokine expression.

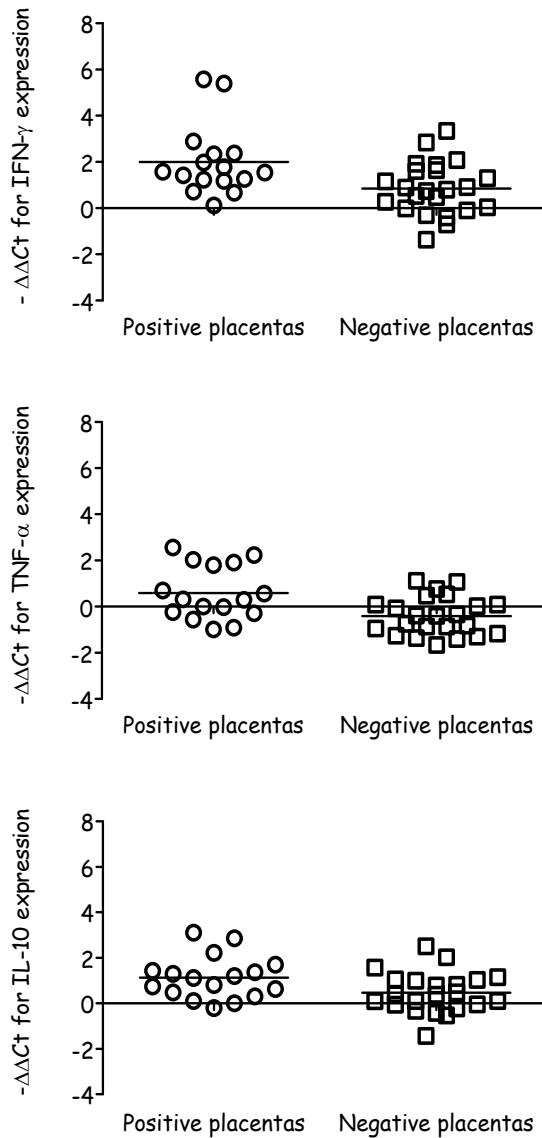
We evaluated patterns of cytokine expression in the spleen and placenta to determine whether the local and systemic immune responses differed (Figure 2). In group 1, we observed a significant increase in the expression of IFN- γ , TNF- α , IL-10 and IL-4 in spleens from infected dams compared to the control group ($P < 0.004 - 0.0001$, $t = 3.7 - 11.5$, Student t -test). In placentas, we found that only IFN- γ and IL-10 expression was significantly upregulated in the infected group ($P < 0.002 - 0.006$, $t = 2.8 - 3.3$, Student t -test). In group 2, an upregulation of IFN- γ and IL-10 expression was observed in the spleens of infected dams ($P < 0.01 - 0.0001$, $t = 4.0 - 6.8$, Student t -test), while TNF- α and IL-4 were significantly downregulated ($P < 0.02 - 0.0004$, $t = 2.8 - 4.7$, Student t -test). In foetal placenta, an increase in the expression of IFN- γ , TNF- α , IL-10, and IL-4 was observed in infected dams compared to the uninfected animals ($P < 0.02 - 0.0002$, $t = 2.5 - 4.4$, Student t -test).

Figure 2. Cytokine expression in spleens and foetal placentas from infected and uninfected dams. β -actin was employed as an endogenous reference for each corresponding sample, and each determination was performed in triplicate. The relative n-fold change in expression of each target cytokine was normalized to the endogenous reference (β -actin) and calculated relative to the control group to produce the $-\Delta\Delta Ct$ value (Livak & Schmittgen, 2001). The $-\Delta\Delta Ct$ value for control group was zero. Data were horizontally spread out for ease of visualizing overlapping values. The bars represent the mean values of cytokine expression and the standard error. The asterisks represent significant differences between infected and uninfected dams by the Student *t*-test (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$).



We also compared the patterns of cytokine expression in the PCR-positive and -negative placentas from infected mice (Figure 3). In group 1, we observed significantly higher levels of IFN- γ , IL-10 and TNF- α expression in PCR-positive compared to PCR-negative placentas ($P = 0.0346 - 0.003$, $t = 2.2 - 3.1$, Student *t*-test); however, no differences were found in IL-4 mRNA levels ($P = 0.34$, $t = 0.853$, Student *t*-test). As placentas were randomly assigned to either cytokine expression analysis or histopathological analysis, only one nested PCR-positive placenta was assessed for cytokine expression in group 2. Thus, we did not analyse the differences between PCR-positive and -negative placentas for this group.

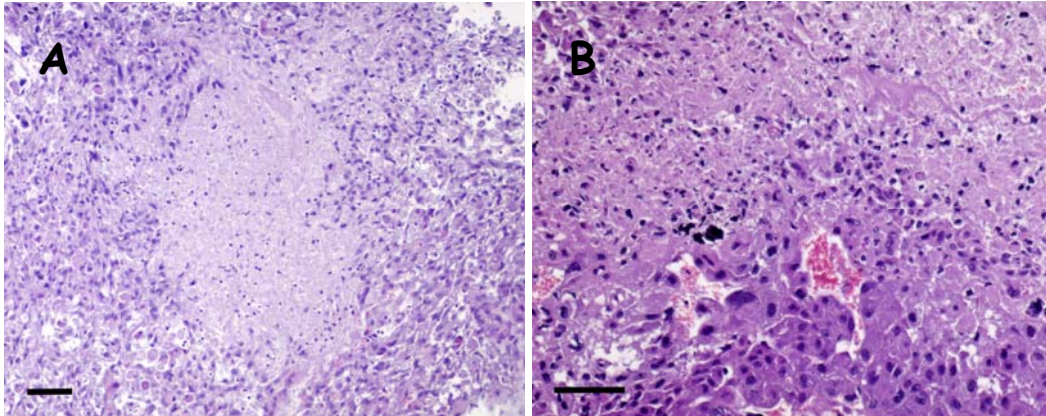
Figure 3. IFN- γ , IL-10 and TNF- α expression in PCR-positive and -negative placentas from group 1. The data are represented as individual points in each sample, and the horizontal line corresponds to the median value.



3.4. Histopathological lesions in foetal placentas

The main lesions found were necrosis accompanied by a slight inflammatory infiltrate, which was diffusely distributed in relation to necrosis. In group 1, these multifocal areas of necrosis affected both the maternal and foetal sides of the placenta, while in group 2, necrosis was mainly found on the maternal side of the placenta and was surrounded by a slight mononuclear inflammatory infiltrate. Necrosis was found in 59 % (13/22) of placentas from group 1 and 75 % (12/16) of placentas from group 2; inflammatory infiltration was observed in 18 % (4/22) of placentas from group 1 and 50 % of placentas (8/16) from group 2.

Figure 4. Placental lesions associated with *N. caninum* infection. Zones of necrosis were observed in both foetal and maternal placental tissues in group 1 (panel A), whereas necrotic areas, surrounded by a slight mononuclear inflammatory infiltrate, were only found in maternal placental tissue from group 2 (panel B). Scale bar = 10 μ m.



4. Discussion

To date, most experimental mouse models of *N. caninum* infection have been developed to study vertical transmission, foetal mortality and the systemic immune response (Cole et al., 1995; Kano et al., 2005; Liddell et al., 1999; Long & Baszler, 1996; Lopez-Pérez et al., 2006; Omata et al., 2004; Quinn et al., 2002b; Quinn et al., 2004). Despite the importance of transplacental transmission, few studies in mice have addressed the possible role of placenta in the outcome of pregnancy. We previously detected parasite DNA at the materno-foetal interface after infection of dams at mid-gestation. A significantly higher parasite burden was found in the placenta compared to the foetuses, suggesting that *N. caninum* primarily multiplies in the placenta during the initial stages of infection. Moreover, the upregulation of IL-4 in placentas of infected dams may enhance *N. caninum* susceptibility at the materno-foetal interface and favour transmission to the progeny (López-Pérez et al., 2010). In addition, we also previously reported that infection at the three pregnancy periods produced different foetal and neonatal mortality and transmission rates to the offspring (López-Pérez et al., 2006; López-Pérez et al., 2008). Thus, in the present study, we investigated the presence of *N. caninum*, parasite load, local immune response and histopathological lesions at the foeto-maternal interface in BALB/c mice infected at early and late gestation.

After infection at early gestation (group 1), we found parasite DNA in foetoplacental units on day 7 of gestation. We previously suggested that, even when experimental infection took place before implantation of the embryo (day 4.5 of gestation), *N. caninum* could invade some foetoplacental units from day 4.5 to 7 of gestation, ensuring successful transmission of infection (López-Pérez et al., 2006). Furthermore, parasite DNA was detected in resorptions on day 14 of gestation, suggesting

that the foetoplacental units invaded by *N. caninum* may have been resorbed as a consequence of infection. On the other hand, the presence of parasite in foetal placenta but not in foetuses on day 14 of gestation in group 1 could indicate that the parasite was mainly multiplying in the placental tissues without reaching the foetus. Similar findings have also been reported in studies of other intracellular pathogens, such as *Chlamydomphila abortus* (Buendía et al., 1998) and *Toxoplasma gondii* (Ferro et al., 2002), in which the organisms probably reached the foetus from day 16 of pregnancy onwards. At that point, parasite multiplication in the placenta may cause foetal death (resorption). However, as gestation progresses, the parasite may reach the tissues of viable foetuses without causing death, leading to a moderate vertical transmission at birth (López-Pérez et al., 2006). Finally, we observed a significant increase in parasite burden from foetoplacental units to placenta. Similarly, in a previous study of mice infected with *T. gondii* on day 7 of gestation, the parasite load increased between day 11 to day 18 of gestation (He et al., 1997), and more recent studies have found higher parasite loads in the placenta than in foetal organs (Flori et al., 2003).

An increase in cytokine expression in both spleen and foetal placentas from dams infected at early gestation was observed. A clear predominance of a type 1 or type 2 immune response was not observed in the spleen. However, IFN- γ and IL-10 expression was significantly up-regulated in placentas from infected animals. Furthermore, we observed an increase in IFN- γ , TNF- α , and IL-10 expression in *N. caninum* PCR-positive placentas compared to negative ones from infected mice. Resolution of *N. caninum* infection requires IFN- γ (Innes et al., 1995), which can be harmful for pregnancy. Both IFN- γ and TNF- α have been shown to have potentially embryotoxic effects, affecting the development of murine foetuses and causing foetal resorption (Chaouat et al., 1998). In addition, in malaria, high mRNA and protein levels of TNF- α in placenta were associated with low birth weight (Moormann et al., 1999). In a previous results, we observed a high neonatal mortality after infection of dams in the first term of gestation (López-Pérez et al., 2008), which could be associated with placental damage due to IFN- γ and TNF- α . Indeed histopathological analysis revealed necrosis affecting both the maternal and foetal sides of the placenta. Thus, the placental necrosis observed after infection at early gestation, which is likely exacerbated by the local immune response due to the presence of the parasite, might be responsible for the high neonatal mortality reported previously (López-Pérez et al., 2008). In *N. caninum* infection in cattle, it has been suggested that infection early in gestation can trigger a type 1 immune response in the placenta, as IFN- γ mRNA was detected by *in situ* hybridisation in infiltrating cells from placentas containing dead foetuses (Maley et al., 2006). Here, we analysed the local immune response only in placentas containing live foetuses. Resorptions were only recovered for parasite DNA detection due to their small foetal size. Thus, we cannot exclude the possibility that strong IFN- γ expression causes foetal resorptions.

Despite the observed associations between cytokine production in the present model, the precise mechanisms that compromise pregnancy or permit the vertical transmission of *N. caninum* remain to be elucidated. It is possible that TNF- α produced by splenocytes and foetal cells could induce maternal *natural killer* (NK) cells to produce IFN- γ , which could in turn may increase trophoblastic phagocytosis of the parasite. It has been reported that IFN- γ may increase the phagocytic properties of trophoblast cells (Amarante-Paffaro et al., 2004), facilitating *T. gondii* internalisation without neutralisation (Abou-Bacar et al., 2004). Moreover, studies on the human BeWo trophoblast cell line suggest that IFN- γ is necessary for adhesion of *T. gondii*-infected monocytes, thereby increasing materno-foetal transmission (Pfaff et al., 2005). Then, trophoblast cells are not able to limit *T. gondii* multiplication when stimulated by IFN- γ , in contrast to other cell types (Pfaff et al., 2005). In addition, an upregulation of IL-10 expression was observed in placenta. It is known that

IL-10 is a regulatory cytokine that can control IFN- γ and TNF- α responses and block immunopathology (Eperon et al., 1999; Quinn et al., 2004). However, IL-10 might also enhance *N. caninum* invasion rates and intracellular replication, as this cytokine has been implicated in increasing the susceptibility of trophoblast cells to *T. gondii* (Barbosa et al., 2008). Therefore, IFN- γ and IL-10 could favour foetal transmission of *N. caninum*. However, more studies are needed to determine the roles of these cytokines on *N. caninum* infection during pregnancy.

At late gestation (group 2), transmission occurs rapidly following infection, although only a few placentas and only one foetus were positive by PCR on day 3 PI. However, the infection of a higher number of foetuses is likely to occur because we previously detected the successful transmission of 49 % of pups on day 60 post-partum (López-Pérez et al., 2008). This discrepancy could be due to the minimal amount of time between *N. caninum* infection at late gestation and sample recovery, as an increase in time between infection and necropsy permits the detection of a higher vertical transmission rate (Liddell et al., 1999; López-Pérez et al., 2008). In this group, necrosis was limited to the maternal side of placenta, which would suggest that the parasite is mainly replicating in the placental tissue at this stage.

Different patterns of cytokine expression were also found between spleen and foetal placenta tissue from group 2, even considering time elapsed between infection and sacrifice. IL-4 and IFN- γ compete for the binding of IFN- γ activation sequence motifs in macrophages, interacting in a functional manner (Ohmori and Hamilton, 1997). Thus, in the presence of constant levels of IFN- γ , decreasing IL-4 levels may have the same effect on macrophage activation as increasing IFN- γ levels (Long & Baszler, 2000). Therefore, the decrease in the IL-4 mRNA levels in spleen at late gestation may be able to limit further *N. caninum* multiplication in maternal tissues and subsequent parasitaemia (Long & Baszler, 2000). A small number of parasites may be able to reach the placenta and foetus, reducing the vertical transmission to progeny, as previously observed (López-Pérez et al., 2006; López-Pérez et al., 2008). In addition, a clear predominance of a type 1 or type 2 immune response was not evident in the placenta. Perhaps the increase in type 1 cytokines as a consequence of the infection during late gestation may have occurred too late to affect an existing well-established type 2 immune response at the materno-foetal interface (Williams et al., 2000).

In summary, in mice infected at early gestation *N. caninum* DNA was detected in foetoplacental units 7 days PI and in the placenta but not in viable foetuses on day 14 PI, indicating that the parasite might primarily multiply in the placental tissues without still reaching the foetus. Moreover, parasite DNA was detected in resorptions, which could be a consequence of infection. An increase in IFN- γ , TNF- α and IL-10 expression was observed in *N. caninum* PCR-positive placentas which could favour foetal transmission and could be harmful to both the placenta and the foetus. Histopathological analysis revealed necrosis affecting both maternal and foetal sides of the placenta. At late gestation, transmission occurs rapidly following infection (3 days PI) but parasites were rarely found. In addition, an increase in cytokine expression was observed in spleen and placental tissues from infected animals, while a downregulation in IL-4 expression was only observed in spleen. Finally, necrosis was limited to the maternal side of placenta, suggesting that the parasite is mainly replicating in the placenta tissue at this stage. Although comparisons between groups are inappropriate because the groups were not matched for time post-infection or pregnancy stages, the pathological and immunological changes in the placenta suggest that this tissue may be actively involved in *N. caninum* pathogenesis. However, further studies are necessary to clarify the relationship between the immune response and parasite transmission at the materno-foetal interface.

5. Acknowledgements

We would like to thank Raquel Expósito for their excellent technical assistance, and Ricardo García Mata for statistical analyses. We express our gratitude to Dr. Ángel Zaballos and Dra. Rosa Varona for their helpful comments to the manuscript. This work has been supported by a grant from the Spanish Government (AGL2001-1362). Inmaculada C López Pérez has been financed by Spanish Ministry of Education and Science. This experiment complied with the current local laws of animal protection in the European Union.

6. Literature cited

- Abou-Bacar A, AW Pfaff, S Georges, V Letscher-Bru, D Filisetti, O Villard, E Antoni, JP Klein, and E Candolfi. Role of NK cells and gamma interferon in transplacental passage of *Toxoplasma gondii* in a mouse model of primary infection. *Infection and Immunity*, 72 (3): 1397-1401, 2004.
- Amarante-Paffaro A, GS Queiroz, ST Corrêa, B Spira, and E Bevilacqua. Phagocytosis as a potential mechanism for microbial defense of mouse placental trophoblast cells. *Reproduction*, 128 (2): 207-218, 2004.
- Barbosa BF, DA Silva, IN Costa, JR Mineo, and EA Ferro. BeWo trophoblast cell susceptibility to *Toxoplasma gondii* is increased by interferon-gamma, interleukin-10 and transforming growth factor-beta 1. *Clinical and Experimental Immunology*, 151 (3): 536-545, 2008.
- Barr BC, JD Rowe, SK Sverlow, RH BonDurant, AA Ardans, MN Oliver, and PA Conrad. Experimental reproduction of bovine fetal *Neospora* infection and death with a bovine *Neospora* isolate. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 6 (2): 207-215, 1994.
- Buendía AJ, J Sánchez, MC Martínez, P Cámara, JA Navarro, A Rodolakis, and J Salinas. Kinetics of infection and effects on placental cell populations in a murine model of *Chlamydia psittaci*-induced abortion. *Infection and Immunity*, 66 (5): 2128-2134, 1998.
- Buxton D, SW Maley, S Wright, KM Thomson, AG Rae, and EA Innes. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. *Journal of Comparative Pathology*, 118 (4): 267-279, 1998.
- Chaouat G, E Menu, DA Clark, M Dy, M Minkowski, and TG Wegmann. Control of fetal survival in CBA x DBA/2 mice by lymphokine therapy. *Journal of Reproduction and Fertility*, 89 (2): 447-458, 1990.
- Cole RA, DS Lindsay, BL Blagburn, and JP Dubey. Vertical transmission of *Neospora caninum* in mice. *The Journal of Parasitology*, 81 (5): 730-732, 1995.
- Collantes-Fernández E, Á Zaballos, G Álvarez-García, and LM Ortega-Mora. Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (4): 1194-1198, 2002.

- Dubey JP, DS Lindsay, ML Anderson, SW Davis, and SK Shen. Induced transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 201 (5): 709-713, 1992.
- Dubey JP and DS Lindsay. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Veterinary Parasitology*, 67 (1-2): 1-59, 1996.
- Dubey JP, D Buxton, and W Wouda. Pathogenesis of bovine neosporosis. *Journal of Comparative Pathology*, 134 (4): 267-289, 2006.
- Eperon S, K Brönnimann, A Hemphill, and B Gottstein. Susceptibility of B-cell deficient C57BL/6 (μ MT) mice to *Neospora caninum* infection. *Parasite Immunology*, 21 (5): 225-236, 1999.
- Ferro EA, DA Silva, E Bevilacqua, and JR Mineo. Effect of *Toxoplasma gondii* infection kinetics on trophoblast cell population in *Calomys callosus*, a model of congenital toxoplasmosis. *Infection and Immunity*, 70 (12): 7089-7094, 2002.
- Flori P, J Hafid, V Thonier, B Bellete, H Raberin, and SR Tran Manh. Parasite load in guinea pig foetus with real time PCR after maternofetal transmission of *Toxoplasma gondii*. *Parasite*, 10 (2): 133-140, 2003.
- He N, F Aosai, WT Luo, M Ueda, TH Yang, K Yamashita, S Sekiya, and A Yano. Parasite load in pregnant mice infected by *Toxoplasma gondii* assayed by quantitative competitive-PCR. *Parasitology International*, 46 (2): 143-147, 1997.
- Innes EA, WR Panton, J Marks, AJ Trees, J Holmdahl, and D Buxton. Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum*, as shown by incorporation of 3H uracil. *Journal of Comparative Pathology*, 113 (1): 95-100, 1995.
- Innes EA, SE Wright, S Maley, A Rae, A Schock, E Kirvar, P Bartley, C Hamilton, IM Carey, and D Buxton. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *International Journal for Parasitology*, 31 (13): 1523-1534, 2001.
- Innes EA, AG Andrianarivo, C Björkman, DJ Williams, and PA Conrad. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends in Parasitology*, 18 (11): 497-504, 2002.
- Kano R, Y Masukata, Y Omata, Y Kobayashi, R Maeda, and A Saito. Relationship between type 1/type 2 immune responses and occurrence of vertical transmission in BALB/c mice infected with *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*, 129 (1-2): 159-164, 2005.
- Krishnan L, LJ Guilbert, TG Wegmann, M Belosevic, and TR Mosmann. T helper 1 response against *Leishmania major* in pregnant C57BL/6 mice increases implantation failure and fetal resorptions. Correlation with increased IFN-gamma and TNF and reduced IL-10 production by placental cells. *The Journal of Immunology*, 156 (2): 653-662, 1996.
- Liddell S, MC Jenkins, and JP Dubey. Vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice determined by polymerase chain reaction detection. *The Journal of Parasitology*, 85 (3): 550-555, 1999.
- Lin H, TR Mosmann, L Guilbert, S Tuntipopipat, and TG Wegmann. Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. *Journal of Immunology*, 151 (9): 4562-4573, 1993.
- Livak K and TD Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25 (4): 402-408, 2001.

- Long MT and TV Baszler.** Fetal loss in BALB/C mice infected with *Neospora caninum*. *The Journal of Parasitology*, 82 (4): 608-611, 1996.
- Long MT and TV Baszler.** Neutralization of maternal IL-4 modulates congenital protozoal transmission: comparison of innate versus acquired immune responses. *The Journal of Immunology*, 164 (9): 4768-4774, 2000.
- López-Pérez I, V Risco-Castillo, E Collantes-Fernández, and LM Ortega-Mora.** Comparative effect of infection with *Neospora caninum* at the three gestation periods. *The Journal of Parasitology*, 92 (6): 1286-1291, 2006.
- López-Pérez IC, E Collantes-Fernández, A Aguado-Martínez, A Rodríguez-Bertos, and LM Ortega-Mora.** Influence of *Neospora caninum* infection in BALB/c mice during pregnancy in post-natal development. *Veterinary Parasitology*, 155 (3-4): 175-183, 2008.
- López-Pérez IC, E Collantes-Fernández, S Rojo-Montejo, V Navarro-Lozano, V Risco-Castillo, V Pérez-Pérez, J Pereira-Bueno, and LM Ortega-Mora.** Effects of *Neospora caninum* infection at mid-gestation on placenta in a pregnant mouse model. *The Journal of Parasitology*, 96 (5): 1017-1020, 2010.
- Macaldowie C, SW Maley, S Wright, P Bartley, I Esteban-Redondo, D Buxton, and EA Innes.** Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. *Journal of Comparative Pathology*, 131 (2-3): 142-156, 2004.
- Maley SW, D Buxton, AG Rae, SE Wright, A Schock, PM Bartley, I Esteban-Redondo, C Swales, CM Hamilton, J Sales, and EA Innes.** The pathogenesis of neosporosis in pregnant cattle: inoculation at mid-gestation. *Journal of Comparative Pathology*, 129 (2-3): 186-195, 2003.
- Maley SW, D Buxton, CN Macaldowie, IE Anderson, SE Wright, PM Bartley, I Esteban-Redondo, CM Hamilton, AK Storset, and EA Innes.** Characterization of the immune response in the placenta of cattle experimentally infected with *Neospora caninum* in early gestation. *Journal of Comparative Pathology*, 135 (2-3): 130-141, 2006.
- Moormann AM, D Sullivan, RA Rochford, SW Chensue, PJ Bock, T Nyirenda and SR Meshnick.** Malaria and pregnancy: placental cytokine expression and its relationship to intrauterine growth retardation. *The Journal of Infectious Diseases*, 180 (6): 1987-1993, 1999.
- Morrison D.** How to improve statistical analysis in parasitology research publications. *International Journal for Parasitology*, 32 (8): 1065-1070, 2002.
- Ohmori Y and TA Hamilton.** IL-4-induced STAT6 suppresses IFN-gamma-stimulated STAT1-dependent transcription in mouse macrophages. *Journal of Immunology*, 159 (11): 5474-5482, 1997.
- Omata Y, M Nidaira, R Kano, Y Kobayashi, T Koyama, H Furuoka, R Maeda, T Matsui, and A Saito.** Vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice in both acute and chronic infection. *Veterinary Parasitology*, 121 (3-4): 323-328, 2004.
- Pereira-Bueno J, A Quintanilla-Gozal, V Pérez-Pérez, A Espi-Felgueroso, G Álvarez-García, E Collantes-Fernández, and LM Ortega-Mora.** Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. *Veterinary Parasitology*, 111 (2-3): 143-152, 2003.
- Pérez-Zaballos FJ, LM Ortega-Mora, G Álvarez-García, E Collantes-Fernández, V Navarro-Lozano, L García-Villada, and E Costas.** Adaptation of *Neospora caninum* isolates to cell-culture

- changes: an argument in favor of its clonal population structure *The Journal of Parasitology*, 91 (3): 507-510, 2005.
- Pfaff AW, O Villard, JP Klein, M Mousli, and E Candolfi.** Regulation of *Toxoplasma gondii* multiplication in BeWo trophoblast cells: cross-regulation of nitric oxide production and polyamine biosynthesis. *International Journal for Parasitology*, 35 (14): 1569-1576, 2005.
- Quinn HE, JT Ellis, and NC Smith.** *Neospora caninum*: a cause of immune-mediated failure of pregnancy? *Trends in Parasitology*, 18 (9):391-394, 2002a.
- Quinn HE, CM Miller, C Ryce, PA Windsor, and JT Ellis.** Characterization of an outbred pregnant mouse model of *Neospora caninum* infection. *The Journal of Parasitology*, 88 (4): 691-696, 2002b.
- Quinn HE, CM Miller, and JT Ellis.** The cell-mediated immune response to *Neospora caninum* during pregnancy in the mouse is associated with a bias towards production of interleukin-4. *International Journal for Parasitology*, 34 (6): 723-732, 2004.
- Raghupathy R.** Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunology Today*, 18 (10): 478-482, 1997.
- Rosbottom A, EH Gibney, CS Guy, A Kipar, RF Smith, P Kaiser, AJ Trees, and DJ Williams.** An upregulation of cytokines is detected in the placentas of cattle infected with *Neospora caninum* and is more marked early in gestation when fetal death is observed. *Infection and Immunity*, 76 (6): 2352-2361, 2008.
- Trees AJ and DJL Williams.** Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends in Parasitology*, 21 (12): 558-561, 2005.
- Varona R, V Cadenas, L Gómez, A Martínez, and G Márquez.** CCR6 regulates CD4+ T-cell-mediated acute graft-versus-host disease responses. *Blood*, 106 (1): 18-26, 2005.
- Wegmann TG, H Lin, L Guilbert, and TR Mosmann.** Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunology Today*, 14 (7): 353-356, 1993.
- Whitten MK.** Effect of exteroceptive factors on the oestrous cycle of mice. *Nature*, 180 (4599): 1436, 1957.
- Williams DJ, CS Guy, JW McGarry, F Guy, L Tasker, RF Smith, K MacEachern, PJ Cripps, DF Kelly, and AJ Trees.** *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitology*, 121 (Pt 4): 347-358, 2000.
- Williams DJ, CS Guy, RF Smith, F Guy, JW McGarry, JS McKay, and AJ Trees.** First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection. *International Journal for Parasitology*, 33 (10): 1059-1065, 2003.

Capítulo VI

Discusión General

En esta tesis doctoral se ha desarrollado y caracterizado un modelo murino gestante que permite investigar las consecuencias de la infección en los tres tercios de la gestación en la madre y en los primeros momentos de la gestación y en el periodo postnatal en la progenie. Además, se han estudiado los cambios patológicos e inmunológicos que tienen lugar en la placenta.

La mayor parte del conocimiento sobre la patogenia de la neosporosis se debe a la información obtenida de las infecciones experimentales en el modelo murino (Baszler et al., 1999; Eperon et al., 1999; Khan et al., 1997; Long et al., 1998; Shibahara et al., 1999; Tanaka et al., 2000a) y el desenlace de la infección por *N. caninum* en este modelo parece depender de múltiples factores asociados al parásito y al hospedador (Collantes-Fernández et al., 2004; Long et al., 1998; Pérez-Zaballos, 2004). Por ello, una de las principales cuestiones que nos planteamos al principio de este estudio fue seleccionar adecuadamente la estirpe murina, la dosis y la vía de inoculación. En el modelo murino, la estirpe del ratón es un factor importante que determina el desarrollo de la infección por *N. caninum* (Lindsay et al., 1995; Long et al., 1998). En este estudio se empleó la estirpe BALB/c la cual es más susceptible a la infección que otras estirpes consanguíneas como la C57BL/6 (Long et al., 1998) o no consanguíneas, en las cuales se requiere la utilización de un tratamiento inmunodepresor para inducir la infección (Collantes-Fernández et al., 2004; Lindsay et al., 1989). En lo que concierne a la dosis de infección, se han descrito signos clínicos y mortalidad en ratones BALB/c, cuando se emplearon dosis superiores a 5×10^6 taquizoítos del aislado Nc-1, mientras que con dosis inferiores no se ha observado mortalidad (Atkinson et al., 1999; Collantes-Fernández et al., 2004; Collantes-Fernández et al., 2006c; Long et al., 1998; Pérez-Zaballos, 2004). Por ello, consideramos que la dosis de 2×10^6 taquizoítos del aislado Nc-1 podría ser suficiente para estudiar la transmisión vertical del parásito sin causar una mortalidad excesiva. En cuanto a la vía de administración, las vías más utilizadas han sido la intraperitoneal y la subcutánea (Atkinson et al., 1999; Eperon et al., 1999; Gottstein et al., 2001; Nisikawa et al., 2001a). Sin embargo, en estudios previos en nuestro laboratorio, la ruta de inoculación del parásito no produjo diferencias significativas en los resultados obtenidos (Collantes-Fernández et al., 2004). En este sentido, se seleccionó la vía subcutánea frente a la intraperitoneal, ya que las consecuencias de la administración intraperitoneal pueden ser más graves porque la exposición de los fetos al parásito es más rápida y directa. Además, empleando la vía intraperitoneal, existe un elevado riesgo de que se produzca la inoculación intrauterina del parásito.

En cuanto a la infección por *N. caninum* durante la gestación, se eligieron los días 0, 7 y 14 de la misma. El día 0 de gestación fue elegido para evaluar las consecuencias de la infección durante el primer tercio de la gestación y en los primeros momentos de la implantación del embrión (día 4,5 de gestación). En el día 7 de gestación, la implantación del embrión ya ha tenido lugar, aunque la placenta y el feto no están completamente desarrollados. Por último, en el día 14 de gestación, la placenta es un órgano con estructura definida y podría actuar como una barrera más eficaz y el sistema inmune del feto podría ser capaz de responder a la infección, aunque su desarrollo no haya finalizado. Además, en la interfase materno-fetal, existe un entorno inmunológico que varía según el periodo de gestación. Durante el primer tercio, predomina una respuesta de tipo 1 que facilita el control de la invasión de la decidua materna por parte del trofoblasto. En el segundo tercio, por el contrario, predomina una respuesta antiinflamatoria (tipo 2) que permitiría el crecimiento del feto en desarrollo. Por último, durante el último tercio, de nuevo se genera una respuesta proinflamatoria, que facilitaría la expulsión del feto y el parto (Raghupathy, 1998). De este modo, el estudio de la respuesta inmunológica en la placenta podría ser importante para determinar si la infección por *N. caninum* dará lugar a la muerte del feto o a la transmisión congénita de la infección (Innes et al., 2002; Quinn et al., 2002b).

En el primer objetivo, se planteó el estudio del efecto de la infección en función del tercio de gestación analizando la mortalidad fetal y la transmisión vertical. La muerte fetal en el modelo murino se determinó analizando el número de reabsorciones, el nacimiento de crías muertas y el tamaño de la camada. La evaluación de la mortalidad fetal tomando como referencia el número de reabsorciones observadas constituye un método fiable para el estudio de las pérdidas fetales en especies multíparas, ya que éstas podrían ser consideradas como el primer signo de pérdida fetal (Long y Baszler, 1996; Quinn et al., 2002a). El estudio del tamaño de la camada proporcionó información sobre el número de implantaciones y el número de nacidos muertos fue indicativo de la muerte fetal en periodos más tardíos, cuando no se produce la reabsorción debido al tamaño del feto en el momento de su muerte. En el presente trabajo, no se observaron diferencias en estos parámetros en los grupos infectados al principio o al final de la gestación, respecto del grupo testigo. Sin embargo, la inoculación experimental en el segundo tercio produjo un aumento en el número de reabsorciones y en el nacimiento de crías muertas así como una disminución en el tamaño de la camada respecto del grupo testigo. Otros autores también han descrito un aumento en el número de reabsorciones después de la infección durante la gestación (Long et al., 1996; Quinn et al., 2002a). Por otro lado, se ha sugerido que el nacimiento de crías muertas no puede considerarse como una consecuencia de la infección porque se han observado mortinatos tanto en las camadas de las madres infectadas como en los animales no infectados (Quinn et al., 2002a) o porque no se encontró una relación entre este parámetro y el día de infección (Liddell et al., 1999). Sin embargo, en el presente trabajo, se ha observado un elevado número de crías nacidas muertas en las que se detectó la presencia del parásito, indicando que la infección de los fetos durante la gestación sería la causa de la muerte. Además, se ha detectado la presencia del parásito tanto en las unidades fetoplacentarias como en los fetos no viables, por lo que el aumento en la mortalidad fetal podría deberse a la diseminación del parásito después de la infección. Por tanto, estos resultados indicarían que la inoculación del parásito en el día 7 de gestación induce mortalidad fetal.

En este objetivo también evaluamos la transmisión congénita del parásito y para ello se analizó la presencia del parásito en los órganos de las crías en los días 1 y 7 PP. La infección en cualquiera de los tercios de la gestación produjo la transmisión del parásito a la progenie. Sin embargo, los valores más elevados se observaron después de la infección en el segundo tercio, lo que concuerda con lo observado por otros autores (Long y Baszler, 1996; Omata et al., 2004; Quinn et al., 2002a). Por otro lado, ésta es la primera vez que la infección se ha realizado en el día 0 de gestación. En este grupo, todas las madres transmitieron la infección al menos a una de las crías de la camada, dando lugar a una transmisión moderada. Por último, la menor tasa de transmisión se encontró en el grupo infectado en el tercer tercio. No podemos descartar que este hecho concreto pueda ser debido al corto periodo de tiempo transcurrido entre la infección y el sacrificio, ya que hemos observado un aumento en la tasa de transmisión congénita desde el día 1 al 7 PP, lo que sugiere que *N. caninum* pudo haber invadido los tejidos fetales durante la gestación y, después del nacimiento, el parásito tendría más tiempo para multiplicarse en los tejidos de las crías, de forma que aumenta la carga parasitaria y, por tanto, su detectabilidad como también se ha sugerido en estudios anteriores (Liddell et al., 1999; Quinn et al., 2002a). Sin embargo, la menor tasa de transmisión detectada en el tercer tercio también podría deberse a que el número de parásitos transmitidos a las crías es menor o que el sistema inmunitario del feto está más desarrollado y es capaz de controlar la multiplicación del parásito.

Por otra parte, también se estudió el peso de las crías, así como la morbilidad y mortalidad neonatal en los primeros días después del parto con el objetivo de evaluar la influencia de la infección congénita en el desarrollo de la progenie. En este sentido, se

observó que los neonatos nacidos de madres infectadas en el primer y segundo tercio de la gestación eran menos activos, tenían un menor peso corporal y mostraban un retraso en el crecimiento del pelo con respecto a las crías nacidas de las madres no infectadas. Aunque estos signos clínicos se detectaron principalmente en el día 7 PP, fueron evidentes en el día 1 PP en el grupo infectado en el segundo tercio. Por otro lado, la infección en el tercer tercio también provocó una reducción en el peso corporal, aunque los neonatos permanecieron clínicamente sanos hasta su sacrificio. Además, se ha encontrado una relación entre la carga parasitaria en las crías y su peso en el día 7 PP, de modo que, después del parto, el parásito parecía estar multiplicándose activamente, afectando al desarrollo normal de la progenie. Por otro lado, todos los experimentos desarrollados hasta ahora en el modelo murino se han centrado en las consecuencias de la infección sobre la progenie, no existiendo trabajos en los que se estudie la patogenia de la infección en las madres y su posible influencia en el desarrollo de la gestación o en la transmisión de la infección a la progenie. Podría existir una relación entre la tasa de transmisión a la progenie y la diseminación del parásito en la madre. Además, el periodo de gestación en el que se encuentre el animal influye en la respuesta inmunitaria materna, pudiendo aumentar de esta manera la susceptibilidad a la infección. Con el fin de evaluar la susceptibilidad de las madres a la infección en función del periodo de gestación, se estudió la distribución del parásito, así como la aparición de signos clínicos compatibles con la infección. Sin embargo, las madres no desarrollaron signos clínicos durante el curso del experimento, al igual que lo observado por otros autores (Cole et al., 1995; Omata et al., 2004). Los resultados obtenidos en relación con la distribución orgánica del parásito no mostraron ninguna diferencia significativa entre los tres periodos de gestación, que puedan explicar las diferencias observadas en la progenie. Tampoco se observaron variaciones con respecto al modelo murino no gestante, ya que el parásito fue detectado en el pulmón durante la fase aguda y en el cerebro en la crónica (Collantes-Fernández et al., 2006c). Por tanto, podríamos sugerir que la preñez y el periodo de gestación no parecen incrementar la susceptibilidad de las madres a la infección y las consecuencias más graves se observan en la progenie.

Como ya se ha mencionado anteriormente, se observó una mayor morbilidad y mortalidad, así como un aumento de la carga parasitaria desde el día 1 hasta el 7 PP. Para analizar si este hecho podía deberse a la transmisión galactófora de la infección, se evaluó la presencia del parásito en la glándula mamaria y en la leche de las madres relacionándolo con los valores de transmisión vertical observados en cada grupo. El parásito se detectó tanto en la glándula mamaria como en la leche, lo que sugiere la posibilidad de la transmisión del parásito a los neonatos a través de la leche. Sin embargo, sólo se encontró el parásito en la leche de un animal perteneciente al grupo infectado en el último tercio de gestación, en el que se observó una baja tasa de transmisión en sus crías. Estos resultados sugieren que la transmisión galactófora no es importante en el modelo murino gestante. Además, la viabilidad del parásito después de su ingestión oral puede verse comprometida por la acción de los jugos gástricos (Lindsay et al., 1990; Uggla et al., 1998), aunque los taquizoítos podrían ser infecciosos cuando el calostro es ingerido en las primeras horas de vida debido a la baja producción de ácido clorhídrico y de enzimas en el sistema digestivo de los neonatos (Uggla et al., 1998). Por otro lado, en la infección natural, podría existir una amplia variación en el número de parásitos presentes en la leche, de modo que los neonatos podrían resultar infectados por esta vía cuando grandes cantidades de taquizoítos estuvieran presentes en la leche o el calostro (Davison et al., 2001). En cualquier caso, aunque se ha detectado ADN del parásito en el calostro (Moskwa et al., 2007) y la leche (Moskwa et al., 2003) en el ganado bovino con infección natural, la transmisión galactófora no se considera importante en la transmisión de la infección.

Los resultados obtenidos en el primer objetivo de esta tesis doctoral indican que, como consecuencia de la infección por *N. caninum* en el útero la supervivencia de los neonatos podría verse comprometida, ya que estos mostraban un menor peso corporal y un retraso en el crecimiento. Por lo tanto, en el segundo objetivo se estudió el periodo post-natal extendiéndolo hasta el día 60 PP, con el fin de realizar un examen más exhaustivo de los neonatos nacidos con infección congénita. Los resultados obtenidos confirman que la infección por *N. caninum* durante la gestación afecta a la supervivencia de la progenie ya que los signos clínicos observados fueron agravándose según avanzaba el periodo post-natal hasta la muerte de las crías. Las diferencias encontradas en todos los parámetros analizados indican que las consecuencias de la infección dependen del periodo de gestación. La infección en el primer y último tercio de la gestación produce un retraso en el desarrollo de las crías, signos clínicos compatibles con la neosporosis y graves lesiones histopatológicas. Sin embargo, es la infección en el segundo tercio la que causa las mayores tasas de morbilidad, mortalidad y transmisión vertical, incluso cuando la dosis es 10 veces menor, confirmando los resultados obtenidos en el primer objetivo. Esto podría ser debido a que en el día 7 de gestación el feto ya se ha implantado, aunque la placenta no está completamente desarrollada. Así, se produciría la transmisión de un mayor número de parásitos, causando efectos más graves en la descendencia tanto durante la gestación como en el periodo postnatal.

La mayoría de los modelos murinos gestantes desarrollados hasta la fecha sólo han investigado la transmisión de la infección durante la gestación o en los primeros días de vida y no existen estudios donde se haya evaluado la influencia de la infección en el desarrollo post-natal de las crías. Únicamente, se ha descrito la muerte de cuatro neonatos de la misma camada en los días 17 y 22 PP (Liddell et al., 1999). Esta baja tasa de morbilidad y mortalidad puede ser debida a la menor dosis infecciosa empleada en dicho experimento. En otros estudios relacionados en ratones gestantes infectados en el día 11 con *T. gondii*, parásito perteneciente a la misma familia que *N. caninum*, se ha observado que los neonatos presentan un menor peso corporal respecto a los animales no infectados, encontrándose un 50 % de mortalidad en el día 30 PP (Johnson, 1994). En estudios más recientes, la infección por *T. gondii* en el segundo tercio de la gestación produce la aparición de signos clínicos y el 70 % de las crías no consiguieron sobrevivir durante el primer mes de vida (Stahl et al., 2004). En el ganado bovino, sólo se han observado signos clínicos en infecciones naturales en terneros congénitamente infectados de menos de dos meses de edad (Dubey, 2003), en cachorros de perro (Cuddon et al., 1992; Dubey et al., 1995; Dubey et al., 2007; Ugglia et al., 1989) y en corderos (Dubey et al., 1990a). Los neonatos infectados congénitamente por *N. caninum* pueden presentar debilidad, bajo peso, parálisis del tercio posterior, ataxia y signos neurológicos. También se ha observado hidrocefalia y estrechamiento de la médula espinal en algunos animales (Dubey, 2003). Sin embargo, en infecciones experimentales, se observa el nacimiento de terneros congénitamente infectados sin signos clínicos y no se ha descrito mortalidad neonatal (Innes et al., 2001; Williams et al., 2000). Se desconocen las circunstancias bajo las cuales los neonatos nacidos de madres infectadas pueden desarrollar neosporosis clínica (Heckerroth y Tenter, 2007), aunque ésta podría estar relacionada con la virulencia del parásito, la edad gestacional del feto o el estado inmunológico de la madre en el momento de la infección (Dubey y Lindsay, 1996). En cuanto a las diferencias entre los modelos experimentales murino y bovino, éstas podrían deberse a la estructura de la placenta ya que, en ratones, la placenta permite un contacto más directo entre las células maternas y fetales (placenta hemocorial), mientras que en el ganado bovino no existe interacción entre ambos (placenta epiteliocorial) (Entrican, 2002). Además, la dosis infectante empleada en el modelo murino es comparativamente superior a la usada en el ganado bovino y un mayor número de parásitos podrían alcanzar la interfase materno-fetal.

Dada la elevada mortalidad y morbilidad observadas, se estudió la frecuencia y gravedad de las lesiones en los neonatos. Las lesiones más graves se observaron en el hígado y en el SNC de los neonatos nacidos de madres infectadas en el segundo tercio de la gestación. En estudios previos, después de la infección de ratones con *T. gondii* en el día 7 de gestación, los neonatos desarrollan un síndrome progresivo caracterizado por lesiones cerebrales, renales y hepáticas que afectan al desarrollo (Stahl et al., 2004). Además, la muerte de los neonatos se ha asociado a una elevada carga parasitaria en el hígado debida a una multiplicación incontrolada de *T. gondii* (Flori et al., 2002). En el caso de *N. caninum*, como consecuencia de la infección en el útero, los fetos que sobreviven pueden verse seriamente afectados en su vida post-natal y la mortalidad y morbilidad observadas pueden ser un reflejo de las lesiones encontradas en el hígado y en el SNC. De este modo, la necrosis hepática masiva observada podría inducir una insuficiencia hepática grave que, junto con la encefalitis necrotizante observada, causaría la muerte del neonato. Sin embargo, se desconoce si las lesiones observadas en las crías son una consecuencia directa de la invasión de los tejidos por el parásito o de un insuficiente aporte de nutrientes y oxígeno como consecuencia de un daño placentario producido por la infección. Las lesiones encontradas han sido previamente descritas en ratones adultos no gestantes infectados con *N. caninum* (Collantes-Fernández et al., 2004; Lindsay y Dubey, 1989) y podrían ser atribuibles a una acción directa del parásito. Sin embargo, las amplias áreas de necrosis encontradas en el hígado y en el SNC en los neonatos también podrían ser el resultado de un fenómeno de hipoxia durante la gestación, debido a un daño placentario por la multiplicación del parásito (Buxton et al., 1998; Buxton et al., 2002).

La elevada mortalidad neonatal también podría ser debida al establecimiento de un fenómeno de inmunotolerancia después de la infección en el útero, como ocurre con el virus de la diarrea vírica bovina (Peterhans et al., 2003). La inmunotolerancia se define como la ausencia específica de respuesta inmune frente a un antígeno, ya sea propio o extraño, inducida por un contacto previo con dicho antígeno (Iáñez, 2010). En estos casos, si la infección con el parásito ocurre cuando el sistema inmune del feto no está desarrollado, éste no sería capaz de distinguir eficientemente entre los antígenos propios y los pertenecientes al patógeno (Osburn et al., 1982). Aunque se ha sugerido que la infección por *N. caninum* durante la gestación podría inducir inmunotolerancia en el feto (Barber et al., 1998; Sager et al., 2001), no existe ningún estudio experimental al respecto que resuelva esta cuestión. Para investigar este hecho, se ha estudiado la respuesta inmune humoral y la presencia del parásito en los neonatos. Se ha descrito que la transferencia de inmunoglobulinas de la madre al feto tiene lugar desde el día 15 de gestación, aunque la mayoría de los anticuerpos son transferidos a través del calostro. Los anticuerpos maternos son mantenidos en la circulación de los neonatos hasta el día 40 PP (Appleby y Catty, 1983). Por ello, las inmunoglobulinas encontradas en el día 60 PP pueden considerarse de origen exclusivamente neonatal. Los niveles de anticuerpos encontrados en las crías frente al parásito indicarían que los neonatos han estado expuestos en el útero a la infección y que han desarrollado una respuesta inmune frente al parásito, que persistiría durante el periodo de estudio. Cuando la infección tiene lugar en el primer y último tercio de la gestación, no se ha encontrado ningún animal en el que se detectara la presencia de *N. caninum* en sus tejidos y que no presentara anticuerpos frente al parásito. Sin embargo, no podemos descartar la posible existencia de neonatos inmunotolerantes después de la infección en el segundo tercio de la gestación, ya que no se pudieron analizar muestras de sueros de los neonatos dada la elevada mortalidad. Sin embargo, este hecho parece poco probable porque los neonatos infectados en el segundo tercio con una dosis diez veces menor, desarrollaron anticuerpos frente al parásito. Además, el resto de neonatos muestran anticuerpos a día 30 PP cuyo nivel disminuye en el día 60 PP. Sin embargo, parece que la respuesta inmunitaria

desarrollada por las crías no es suficiente para controlar la replicación del parásito y éstas mueren durante el periodo de estudio, lo que explicaría los resultados obtenidos en el periodo post-natal. Por tanto, la infección congénita por *N. caninum* no parece inducir una inmunotolerancia en la progenie.

En el tercer objetivo de esta tesis, se estudió el posible papel de la placenta en la patogenia de la infección por *N. caninum* durante la gestación. Estudios recientes confirman la importancia de la placenta en la neosporosis y su posible papel en permitir o limitar la diseminación de la infección al feto. La placenta actúa como una interfase entre el medio fetal y materno, siendo necesaria para el intercambio de gases, nutrientes y productos de desecho entre ambos. Asimismo, es una importante fuente de hormonas asociadas a la gestación y factores de crecimiento y está involucrada en la protección inmunológica del feto (Rossant y Cross, 2001). Por ello, cualquier alteración en la interfase materno-fetal podría dar lugar a una insuficiencia placentaria, un retraso en el desarrollo fetal e, incluso, su pérdida. En este sentido, la infección experimental del ganado bovino al principio de la gestación ocasiona graves lesiones en los placentomas que dan lugar a la muerte del feto (Macaldowie et al., 2004), mientras que las lesiones son más leves si la infección ocurre hacia la mitad de la gestación, permitiendo la supervivencia del feto (Maley et al., 2003). Por ello, el estudio del papel que desempeña la placenta podría ser de gran ayuda para entender la patogenia de la neosporosis. En el tercer objetivo, se analizaron los efectos de la infección en la placenta y, para ello, evaluamos el patrón de transmisión del parásito en la interfase materno-fetal, así como la respuesta inmunitaria y las lesiones histopatológicas desarrolladas en la placenta como consecuencia de la infección.

En lo referente al patrón de distribución del parásito en la interfase materno-fetal, se observó que después de la infección al principio de la gestación, el parásito está presente en las unidades fetoplacentarias en el día 7 de gestación. Aunque la infección experimental se produce antes de la implantación del embrión (día 4,5 de gestación), el parásito podría invadir las unidades fetoplacentarias entre los días 4,5 y 7 de gestación, puesto que el periodo de parasitemia tiene lugar principalmente durante la primera semana PI (Collantes-Fernández et al., 2006c). En un modelo de toxoplasmosis congénita, donde la infección se realizó en el día 1 de gestación, se encontraron vacuolas parasitóforas en el interior de los trofoblastos en el día 7 PI (Ferro et al., 1999). Estos resultados sugieren que cuando el embrión se está implantando, el parásito puede estar presente en las células responsables de éste proceso y de la formación de la placenta. Por otro lado, en el día 14 de gestación, se detectó el parásito en un elevado número de reabsorciones pero no en los fetos viables, lo que podría indicar que el parásito invadiría primero el tejido placentario. Asimismo, se ha detectado un aumento significativo de la carga parasitaria en las placentas respecto a las unidades fetoplacentarias, que podría reflejar una multiplicación del parásito en este tejido. La transmisión a los fetos podría tener lugar en días posteriores, al igual que ocurre con otros patógenos como *Chlamydomphila abortus* (Buendía et al., 1998) y *T. gondii* (Ferro et al., 2002). En el primer caso, después de la infección durante la gestación, *Chlamydomphila* probablemente invade el feto hacia el día 18 de gestación (Buendía et al., 1998), mientras que después de la inoculación con *T. gondii* en el día 1 de gestación, la transmisión del parásito al feto no ocurre hasta el día 16 de gestación (Ferro et al., 2002). En el caso de *N. caninum*, la infección del feto se produciría entre el día 14 de gestación y el parto ya que en los dos primeros estudios de esta tesis observamos el nacimiento de crías congénitamente infectadas en este grupo y el parásito se transmitió al menos a una de las crías de la camada. La multiplicación de *N. caninum* en la placenta podría causar la muerte de alguno de los fetos (reabsorciones) y, según avanza la gestación, el parásito invadiría los fetos viables, dando lugar al nacimiento de crías congénitamente infectadas.

Después de la infección en el segundo tercio de gestación, se ha detectado la presencia de *N. caninum* en las unidades fetoplacentarias en el día 3 PI (día 10 de gestación). Sin embargo, no podemos descartar que el parásito alcance la interfase maternofetal en un periodo anterior, ya que no se han sacrificado animales antes de este momento. En el día 7 PI (14 de gestación), se ha detectado el parásito tanto en la placenta como en los fetos viables y se ha encontrado un mayor número de placentas infectadas con mayor carga parasitaria en comparación con las unidades fetoplacentarias y los fetos. En ratones infectados con *N. caninum* en el día 10 de gestación, también se detectaron taquizoítos en la placenta y en los fetos a los 6 - 8 días PI (Long y Baszler, 1996; Rettigner et al., 2004b). Además, en un modelo de infección de *T. gondii* en cobaya, se observó un aumento en la carga parasitaria en placenta con el tiempo y se encontraron mayores cargas parasitarias en la placenta que en los fetos en las fases tempranas de la infección (Flori et al., 2003). En ratones infectados con *T. gondii*, la carga parasitaria en la placenta aumentó desde el día 11 de gestación hasta el 18 (He et al., 1997) y se ha demostrado que la carga parasitaria en este órgano es mayor que la encontrada en los tejidos fetales (Flori et al., 2003). Todos estos resultados podrían indicar que el parásito se está multiplicando principalmente en la placenta durante las primeras fases de la infección. Cuando la infección experimental tiene lugar en el día 7 de gestación, ya se ha producido la implantación y el parásito podría invadir el feto durante los primeros días después de la infección, llegando mayor cantidad de parásitos y produciéndose la transmisión a un mayor número de unidades fetoplacentarias. Por otra parte, se ha detectado la presencia del parásito en las unidades fetoplacentarias y en los fetos no viables.

Por último, después la infección en el último tercio de la gestación, el parásito se detectó esporádicamente en la placenta y en un feto al tercer día PI. En el caso de *T. gondii*, la inoculación en el día 14 de gestación causa una elevada transmisión transplacentaria, siendo incluso mayor que después de la infección al principio de la gestación (Pfaff et al., 2007). Sin embargo, en el caso de *N. caninum*, es probable que el parásito necesite un mayor intervalo de tiempo para su multiplicación ya que el número de fetos infectados en el día 17 de gestación es muy reducido en comparación con la tasa de transmisión vertical observada en el periodo post-natal.

Permanece sin esclarecer si los efectos de la infección en la descendencia se deben a una invasión directa y multiplicación del parásito, a un insuficiente aporte de oxígeno y nutrientes debido a un daño placentario o a un cambio hacia una respuesta inmunitaria del tipo 1 en la interfase materno-fetal, que podría provocar por sí misma la muerte fetal (Entrican, 2002; Innes et al., 2002; Quinn et al., 2002b). En infecciones experimentales en el ganado bovino, se ha sugerido que una respuesta inmunitaria materna podría ser la responsable de la muerte fetal (Innes et al., 2002; Williams et al., 2000), dado que se ha detectado la expresión de IFN- γ en el infiltrado celular en la placenta bovina que contenía fetos muertos (Maley et al., 2006) y se ha observado un aumento en la expresión de citoquinas de tipo 1 y 2 en la placenta cuando se observa muerte fetal (Rosbottom et al., 2008). Por otro lado, es importante aclarar que, en nuestro trabajo, sólo se ha analizado la respuesta inmunitaria en las placentas que contenían fetos vivos, ya que las reabsorciones únicamente se analizaron para estudiar la presencia del parásito debido a su pequeño tamaño. Por ello, no podemos descartar que una fuerte respuesta inmunitaria de tipo 1 haya sido la responsable de las reabsorciones encontradas.

La infección en el día 0 de gestación produjo un aumento en la expresión de IFN- γ , TNF- α y IL-10 tanto en el bazo como en la interfase materno-fetal en los animales infectados. También se ha detectado un aumento en la expresión de IFN- γ , TNF- α e IL-10 en las placentas donde se había detectado la presencia del parásito frente a las negativas en el grupo inoculado con el parásito. Se ha descrito que el IFN- γ es de gran importancia en

el control de la infección por *N. caninum* (Innes et al., 1995). Sin embargo, tanto IFN- γ como TNF- α podrían tener un efecto embriotóxico, afectando al desarrollo normal de los fetos y causando las reabsorciones fetales (Chaouat et al., 1990). En las investigaciones realizadas sobre malaria, se han descrito elevados niveles de RNA mensajero y proteína de TNF- α en la placenta que podrían asociarse con un bajo peso de las crías en el momento del parto (Moormann et al., 1999).

Se ha descrito en *T. gondii* que el IFN- γ podría aumentar las propiedades fagocíticas del trofoblasto (Amarante-Paffaro et al., 2004), aumentando la internalización del parásito sin su posterior neutralización (Abou-Bacar et al., 2004). En estudios en la línea celular de trofoblastos BeWo se ha observado que el IFN- γ sería necesario para la adhesión de los monocitos infectados por *T. gondii*, facilitando por tanto, la transmisión materno-fetal (Pfaff et al., 2005). Asimismo, las células del trofoblasto no son capaces de limitar la multiplicación de *T. gondii* cuando son estimuladas con más IFN- γ , en contraposición con otros tipos celulares (Pfaff et al., 2005). Por otro lado, se ha observado un aumento en la expresión de IL-10, citoquina reguladora que puede controlar la expresión de IFN- γ y TNF- α y limitar su efecto inmunopatológico (Eperon et al., 1999; Quinn et al., 2004). Sin embargo, la IL-10 también podría incrementar la tasa de invasión por *N. caninum* así como su multiplicación intracelular, ya que, en el caso de *T. gondii*, esta citoquina ha sido involucrada en la susceptibilidad del trofoblasto a la infección (Barbosa et al., 2008). Por ello, tanto el IFN- γ como la IL-10 podrían favorecer la transmisión de *N. caninum* al feto, aunque se requieren más estudios para determinar la influencia de estas dos citoquinas.

Después de la infección en el segundo tercio, se ha detectado un aumento significativo en la expresión de IFN- γ , IL-10 e IL-4 en el bazo de los animales infectados en comparación con el grupo testigo. Sin embargo, en la placenta sólo se observó un aumento en la expresión de la IL-4. Este hecho puede sugerir una predominancia de una respuesta inmune de tipo 2 en la interfase materno-fetal que podría favorecer la multiplicación del parásito (Innes et al., 2005; Quinn et al., 2002b), dando lugar a una elevada transmisión vertical. Este aumento en la expresión de IL-4 podría ser el resultado de una mayor producción de citoquinas de tipo 2 con el fin de evitar una posible respuesta local de tipo 1 que podría afectar a la viabilidad de los fetos (Raghupathy, 1997; Wegmann et al., 1993). En otros estudios, se ha observado un aumento en la producción de IL-4 en el sobrenadante de células de bazo estimuladas con antígeno del parásito y que ha sido asociado con un aumento en la susceptibilidad frente a la infección (Baszler et al., 1999; Long et al., 1998). Al igual que en grupo inoculado en el primer tercio, se detectó un aumento en la expresión de TNF- α en las placentas donde se detectó la presencia del parásito, lo que indicaría que esta citoquina podría haber sido producida en respuesta a la infección por *N. caninum* y podría comprometer la viabilidad de los fetos y los neonatos en desarrollo, provocando un daño cerebral, dada la elevada permeabilidad de la barrera hematoencefálica de los fetos (Michie, 1998).

La infección en el último tercio da lugar a un patrón diferente en la expresión de citoquinas en el bazo y en la placenta, a pesar del corto periodo de tiempo entre la infección y el sacrificio de los animales. En el bazo se ha observado una disminución en los valores de expresión de la IL-4. Esta citoquina y el IFN- γ compiten por la misma secuencia de activación del IFN- γ en los macrófagos (Ohmori y Hamilton, 1997). Por tanto, en presencia de niveles constantes de IFN- γ , la disminución en la expresión de IL-4 podría tener los mismos efectos que un aumento en la expresión de IFN- γ (Long y Baszler, 2000). De este modo, una disminución en la expresión de la IL-4 podrían limitar la multiplicación del parásito, reduciendo su presencia en los tejidos maternos y la consiguiente parasitemia (Long y Baszler, 2000), limitando la transmisión del parásito a la progenie. Por otro lado, no se ha observado una predominancia de una respuesta de tipo 1 o 2 en la placenta. Quizá, un aumento en la

respuesta de tipo 1 después de la infección al final de la gestación podría haber ocurrido demasiado tarde para afectar a una respuesta inmunitaria de tipo 2 establecida en la interfase materno-fetal (Williams et al., 2000).

En cuanto a los resultados histopatológicos, éstos mostraron una necrosis multifocal que afecta tanto al lado materno como al fetal de la placenta después de la infección en el primer y segundo tercio de la gestación, mientras que después de la infección en el último tercio, se observó la presencia de necrosis pero sólo en el lado materno. La necrosis placentaria observada, que podría agravarse según avanza la gestación como consecuencia de la respuesta inmunitaria desarrollada frente al parásito, podría ser la responsable de la elevada mortalidad fetal y neonatal observada después de la infección en el primer y segundo tercio de la gestación en comparación con la infección al final de la gestación.

En resumen, en esta tesis doctoral se ha caracterizado un modelo murino gestante en el que se ha demostrado que el periodo de gestación en el que tiene lugar la infección determina las consecuencias en la progenie. La infección en el día 7 de gestación junto con el estudio del periodo post-natal constituye un valioso modelo experimental para probar nuevos productos vacunales y farmacológicos (Aguado-Martinez et al., 2009; Debache et al., 2009) y para estudios comparativos de virulencia entre los diferentes aislados de *N. caninum* (Regidor-Cerrillo et al., 2010; Rojo-Montejo et al., 2009b). Actualmente, aún permanece sin esclarecer cuál es el mecanismo celular básico por el que *N. caninum* es capaz de transmitirse desde la madre hasta el feto. Por otro lado, aunque se ha demostrado que la respuesta inmunitaria materna en la placenta podría influir en el desenlace de la infección, un estudio más exhaustivo del perfil de citoquinas y de las células responsables de su secreción en la interfase materno-fetal, así como de la respuesta inmunitaria desencadenada por el feto en desarrollo, podrían ayudar al entendimiento de la relación que existe entre la respuesta inmunitaria y el parásito.

Capítulo VII

Conclusiones/Conclusions

1. Conclusiones

Primera. En el modelo murino gestante, el periodo de gestación en que tiene lugar la infección por *N. caninum* determina el desenlace de la misma. La infección en el segundo tercio provoca los efectos más graves observándose un aumento en la mortalidad fetal y mayor tasa de transmisión vertical con respecto a la infección en el primer y último tercio de la gestación.

Segunda. En este mismo modelo, la infección por *N. caninum* durante la gestación tiene consecuencias fatales en el periodo post-natal, provocando un retraso en el desarrollo general de las crías, graves signos clínicos y lesiones que comprometen la vida de los neonatos. Las mayores tasas de morbilidad y mortalidad neonatal y transmisión vertical se observan después de la infección en el segundo tercio de la gestación, incluso cuando se reduce logarítmicamente la dosis infectante.

Tercera. La extensión del periodo de estudio de la infección por *N. caninum* en el modelo murino gestante a la etapa post-natal permite un análisis más preciso de las consecuencias de la infección sobre la progenie y de la tasa de transmisión vertical. Concretamente, la infección en el segundo tercio de la gestación junto con su estudio en el periodo post-natal constituye un valioso modelo experimental de la neosporosis.

Cuarta. La transmisión galactófora de *N. caninum* en el modelo murino gestante parece poco probable debido a la reducida presencia del parásito en la glándula mamaria y en la leche.

Quinta. La infección por *N. caninum* en los tres tercios de la gestación estudiados no induce inmunotolerancia en la progenie ya que no se ha encontrado ningún animal en el que se detectara la presencia de *N. caninum* en sus tejidos y que no presentara anticuerpos frente al parásito.

Sexta. Los resultados obtenidos demuestran que la placenta, su grado de desarrollo y la respuesta inmunitaria local en función del periodo de gestación influyen de forma importante en la patogenia de la infección en el feto y en el periodo post-natal.

2. Conclusions

First. In the pregnant mouse model, the timing of infection with *N. caninum* during gestation determines the outcome of pregnancy. Infection of dams at mid-gestation produced the most severe effects. In addition, an increase in foetal mortality and the highest vertical transmission rate was observed at this stage compared to infection at early and late stages of gestation.

Second. In this model, the infection with *N. caninum* during gestation affects the post-natal development of offspring, leading to a delay in the general development of pups, severe clinical signs and histopathological lesions that are compromising the survival of neonates. The highest neonatal morbidity, mortality and vertical transmission rates were observed after infection of dams at mid-gestation, even when the infection dose is logarithmically reduced.

Third. The extension of the observation period after *N. caninum* infection in the pregnant mouse model allows for a more accurate study of its consequences and the vertical transmission rate. Specifically, infection at mid-gestation and its study during the post-natal period becomes a valuable experimental model of neosporosis.

Forth. The transmammary transmission of *N. caninum* in the pregnant mouse model is not an important route of infection since the presence of the parasite in the mammary gland and in the milk is rare.

Fifth. Infection with *N. caninum* in the three selected terms of gestation does not induce immunotolerance in the progeny because all neonates in which the parasite presence was detected in their tissues, showed antibodies against *N. caninum*.

Sixth. The findings in the present work indicate that the placenta, its degree of development and the local immune response in each pregnancy period may influence the pathogenesis of infection in the foetus and in the post-natal period.

Resumen/Summary

1. Resumen.

Neospora caninum es un protozoo parásito perteneciente al phylum Apicomplexa que ha sido reconocido como una de las principales causas de aborto en el ganado bovino. La transmisión vertical transplacentaria es el principal modo de infección y parece jugar un papel relevante en la propagación y mantenimiento de la enfermedad en el ganado bovino. Las consecuencias de la primoinfección o la recrudesencia de la infección en un animal gestante pueden ser el aborto, nacimiento de terneros débiles o el nacimiento de terneros sanos, pero congénitamente infectados. Aunque el modelo murino ha sido de gran utilidad en el esclarecimiento de la patogenia de la neosporosis, no hay estudios donde la infección en los tres periodos de la gestación haya sido investigada simultáneamente. Por otro lado, no se conoce el efecto que la infección podría tener en el desarrollo de los animales infectados congénitamente durante el periodo post-natal. Por último, aunque *N. caninum* es uno de los organismos que se transmite más eficientemente por vía transplacentaria, aún no se conoce bien la importancia de la placenta durante la gestación y su posible papel en la infección del feto. Por ello, el objetivo del presente trabajo ha sido el desarrollo de un modelo murino gestante con el fin de evaluar la influencia de la infección por *N. caninum* durante la gestación.

En el primer objetivo se estudió la infección de animales gestantes en los tres periodos de gestación. La infección en el día 0 (primer tercio) produce una moderada transmisión vertical, aunque no se han observado cambios en la mortalidad fetal. La infección en el día 7 de gestación (segundo tercio) provoca un aumento en la mortalidad fetal y elevada transmisión vertical. La menor tasa de transmisión vertical se observó cuando la infección se realizó en el día 14 de gestación (tercer tercio). Por otro lado, se ha detectado la presencia del parásito en la glándula mamaria y en la leche de las madres, aunque la transmisión galactófora de la infección parece poco probable.

En el segundo objetivo se estudió la influencia que la infección por *N. caninum* tiene en el desarrollo post-natal de las crías desde el nacimiento hasta el día 60 post-parto. Los resultados muestran que la infección con *N. caninum* durante la gestación tiene graves efectos en la progenie y las diferencias encontradas en todos los parámetros analizados indican que las consecuencias de la infección dependen del periodo de gestación, observándose una elevada tasa de mortalidad en todos los grupos, que puede ser de hasta el 100 % cuando la infección tiene lugar en el segundo tercio de la gestación. Las lesiones más graves se observaron en el hígado y sistema nervioso central de los neonatos muertos. La infección en el primer y último tercio de la gestación produce un retraso en el desarrollo de las crías, signos clínicos compatibles con la neosporosis y graves lesiones hitopatológicas. Sin embargo, es la infección en el segundo tercio la que causa las mayores tasas de morbilidad, mortalidad y transmisión vertical, incluso cuando la dosis es diez veces menor, confirmando los resultados obtenidos en el primer objetivo. Por su parte, también se estudió si la infección en el útero podría inducir el desarrollo de inmunotolerancia en los neonatos. Sin embargo, no se ha encontrado ningún animal en el que se detectara la presencia de *N. caninum* en sus tejidos y que no presentara anticuerpos frente al parásito. Por tanto, la infección por *N. caninum* durante la gestación no parece inducir inmunotolerancia en la progenie y la respuesta inmunitaria desarrollada por los neonatos parece ser ineficaz en el control de la infección, lo que explicaría los resultados obtenidos en el periodo postnatal.

El tercer objetivo consistió en el estudio de los cambios patológicos e inmunológicos que ocurren en la interfase materno-fetal tras la infección por *N. caninum* durante la gestación. La infección de la placenta y del feto así como la respuesta inmunitaria

desarrollada dependen del periodo de gestación. Después de la infección en el primer tercio, el parásito es detectado en la placenta a los 7 días post-infección, mientras que la transmisión al feto se produce a partir del día 14. Además, el aumento observado en la expresión de IFN- γ , TNF- α e IL-10 en la placenta podría facilitar la transmisión del parásito al feto y tener efectos tóxicos sobre la placenta y el feto. Cuando la infección tiene lugar en el segundo tercio se detecta la presencia del parásito en el feto y en la placenta a los tres días post-infección. El aumento observado en la expresión de IL-4 en la placenta podría favorecer la multiplicación incontrolada del parásito y una mayor transmisión transplacentaria. Además, el aumento detectado en la expresión de TNF- α en las placentas positivas por PCR, junto con la necrosis observada, podría explicar la elevada morbilidad y mortalidad observadas en los neonatos nacidos de madres infectadas en el segundo tercio de gestación. Por último, después de la infección en el tercer tercio, el parásito ha sido detectado de forma esporádica en la placenta y el feto. La reducción en la expresión de IL-4 en el bazo podría contribuir al control de la multiplicación del parásito en los tejidos maternos, reduciendo el número de parásitos en la interfase materno-fetal.

En conclusión, el modelo murino gestante aquí desarrollado confirma que el periodo de gestación en el que tiene lugar la infección determina la mortalidad fetal y la transmisión vertical a la progenie. También pone de manifiesto que la infección con *N. caninum* en cualquiera de los tres tercios de la gestación tiene graves consecuencias para la progenie, provocando mortalidad fetal y neonatal, un retraso en el desarrollo general de las crías, signos clínicos de neosporosis y graves lesiones histopatológicas. Además, la infección durante la gestación induce cambios en la respuesta inmune en la interfase maternofetal, demostrando su importancia en el desarrollo de la gestación. Por último, la infección en el segundo tercio de la gestación junto con el estudio del periodo post-natal constituye un valioso modelo experimental para el desarrollo de nuevas vacunas y agentes quimioterapéuticos frente a la infección congénita y para la selección de protocolos eficaces para su posterior uso en el modelo bovino. También puede ser empleado para estudios comparativos de virulencia entre los diferentes aislados de *N. caninum*.

2. Abstract.

Neospora caninum is a protozoan parasite belonging to the Apicomplexa phylum which has been recognized as a major cause of infectious bovine abortion world-wide. Transplacental vertical transmission is the principal route of transmission in cattle and significantly contributes to the persistence of *N. caninum* infection in a herd by propagating the infection to successive generations. The consequences of either primo infection or recrudescence in a pregnant cow can be abortion, birth of a weak calf, or birth of a clinically healthy but persistently infected calf. Despite the mouse model has been widely employed in the understanding of the pathogenesis of parasite, there are no investigations where the effect of infection at the three gestation periods was investigated simultaneously. In addition, there is still unknown the influence of congenitally acquired *N. caninum* infection on the post-natal development of neonates. Finally, even though this parasite is one of the more-efficient transplacentally transmitted organisms, relatively little is known about the role of the placenta infection during gestation and its possible role in the foetal infection. Thus, the aim of this work is the development of a pregnant mouse model in order to evaluate the influence of *N. caninum* infection during gestation.

First, the effect of *N. caninum* infection in mice at the three gestation periods was investigated. Infection on day 0 of gestation (first period) produced a high vertical transmission rate, although no changes in foetal mortality were observed. Infection on day 7 (second period) of gestation provoked an increase in foetal mortality and the highest level of vertical transmission. The lowest vertical transmission rate was observed when infection was done on day 14 of gestation (third period). Furthermore, infection at any time during gestation compromised the postnatal development of pups. Finally, parasite DNA was detected in both the mammary gland and milk from some dams, although it seems that transmammary transmission of *N. caninum* is not an important route of infection.

Second, the influence that infection could have on the post-natal development of the offspring from birth to day 60 post-partum was investigated. Results showed that infection with *N. caninum* during pregnancy had fatal consequences for pups and the differences observed depend on the timing of infection during gestation. A high mortality rate was found in all infected groups, which could reach the 100 % of neonatal mortality when infection was done on day 7 of gestation. The most severe lesions were found in liver and central nervous system from dead pups. Infection at early and late gestation provoked a delay in the general development of neonates, clinical signs compatible with neosporosis and severe histopathological lesions. However, the highest morbidity, mortality and vertical transmission rates were found after infection of dams in the second period of gestation. Even a reduction in the infectious dose still had fatal consequences for neonates, although a significant decrease in morbidity and mortality was observed. Finally, we investigated whether in utero infection might provoke an immunotolerance phenomenon in neonates. However, we did not observe the birth of neonates without antibodies against *N. caninum* in which parasite presence was detected in their tissues. Thus, *N. caninum* infection during gestation do not induce the development of immunotolerance in neonates and the immune response observed in pups was not enough to control the infection, explaining results during the post-natal period.

Third, pathological and immunological changes occurring at the materno-foetal interface in pregnant BALB/c mice infected with *N. caninum* were evaluated. Placenta and foetal infection as well as the immune response depend on the gestation period. After infection at early gestation (day 0), parasite required 7 days to infect the placenta, while

transmission to the foetus required more than 14 days. Furthermore, higher parasite loads were observed in placentas compared to foetuses. In addition, IFN- γ and IL-10 expression was significantly up-regulated in infected animals, which could favour *N. caninum* foetal transmission and be harmful to both the placenta and the foetus. When infection occurs on the second third of gestation, parasite DNA was detected in foeto-placental units 3 days post-infection. The upregulation of IL-4 expression in placenta may enhance susceptibility to parasite at the materno-foetal interface and favor transmission to the progeny. Finally, an increase in TNF- α expression in nested-PCR-positive placentas combined with necrosis may compromise the viability of the foetuses. Finally, infection at late gestation (day 14) resulted in rare detection of *N. caninum* DNA in foetuses and placentas. The downregulation observed in the IL-4 expression in spleen in dams infected at late gestation could contribute to reduce parasite multiplication in maternal tissues, reducing the number of parasite at the materno-foetal interface.

In conclusion, our study confirms that timing of infection during pregnancy determines foetal losses and transmission to the offspring. Furthermore, *N. caninum* infection at the three pregnancy periods had fatal consequences for pups born from infected dams, leading to a delay in the general development of neonates, clinical signs compatible with neosporosis and histopathological lesions. In addition, infection during gestation induces changes in the immune response at the materno-foetal interface, demonstrating its importance in the outcome of gestation. Finally, we propose that infection at midgestation (day 7) and its study during the post-natal period is a valuable tool for testing new chemotherapeutic agents and vaccines against congenital neosporosis, before its use on bovine, in order to reduce the high mortality and transmission rates observed. In addition, differences in virulence among *N. caninum* isolates could be also evaluated.

Bibliografía

- Abou-Bacar A, AW Pfaff, S Georges, V Letscher-Bru, D Filisetti, O Villard, E Antoni, JP Klein, and E Candolfi.** Role of NK cells and gamma interferon in transplacental passage of *Toxoplasma gondii* in a mouse model of primary infection. *Infection and Immunity*, 72 (3): 1397-1401, 2004.
- Aguado-Martínez A, G Álvarez-García, A Fernández-García, V Risco-Castillo, V Marugan-Hernández, and LM Ortega-Mora.** Failure of a vaccine using immunogenic recombinant proteins rNcSAG4 and rNcGRA7 against neosporosis in mice. *Vaccine*, 27 (52): 7331-7338, 2009.
- Aguado-Martínez A, G Álvarez-García, A Fernández-García, V Risco-Castillo, I Arnáiz-Seco, X Rebordosa-Trigueros, V Navarro-Lozano, and LM Ortega-Mora.** Usefulness of rNcGRA7- and rNcSAG4-based ELISA tests for distinguishing primo-infection, recrudescence, and chronic bovine neosporosis. *Veterinary Parasitology*, 157 (3-4): 182-195, 2008.
- Almería S, T De Marez, H Dawson, R Araujo, JP Dubey, and LC Gasbarre.** Cytokine gene expression in dams and fetuses after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. *Parasite Immunology*, 25 (7): 383-392, 2003.
- Al-Qassab S, MP Reichel, A Ivens, and JT Ellis.** Genetic diversity amongst isolates of *Neospora caninum*, and the development of a multiplex assay for the detection of distinct strains. *Molecular and Cellular Probes*, 23 (3-4): 132-139, 2009.
- Álvarez-García A, E Collantes-Fernández, E Costas, X Rebordosa, and LM Ortega-Mora.** Influence of age and purpose for testing on the cut-off selection of serological methods in bovine neosporosis. *Veterinary Research*, 34 (3): 341-352, 2003.
- Amarante-Paffaro A, GS Queiroz, ST Correa, B Spira, and E Bevilacqua.** Phagocytosis as a potential mechanism for microbial defense of mouse placental trophoblast cells. *Reproduction*, 128 (2): 207-218, 2004.
- Anderson ML, PC Blanchard, BC Barr, JP Dubey, RL Hoffman, and PA Conrad.** *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 198 (2): 241-244, 1991.
- Anderson ML, CW Palmer, MC Thurmond, JP Picanso, PC Blanchard, RE Breitmeyer, AW Layton, M McAllister, B Daft, H Kinde, DH Read, JP Dubey, PA Conrad and BC Barr.** Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 207 (9): 1206-1210, 1995.
- Anderson ML, JP Reynolds, JD Rowe, KW Sverlow, AE Packham, BC Barr, and PA Conrad.** Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp infection in dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 210 (8): 1169-1172, 1997.
- Anderson ML, AG Andrianarivo, and PA Conrad.** Neosporosis in cattle. *Animal Reproduction Science*, 60-61: 417-431, 2000.
- Andrianarivo AG, BC Barr, ML Anderson, JD Rowe, AE Packham, KW Sverlow, and PA Conrad.** Immune responses in pregnant cattle and bovine fetuses following experimental infection with *Neospora caninum*. *Parasitology Research*, 87 (10): 817-825, 2001.
- Appleby P and D Catty.** Transmission of immunoglobulin to fetal and neonatal mice. *Journal of Reproductive Immunology*, 5 (4): 203-213, 1983.
- Atkinson R, PA Harper, C Ryce, DA Morrison, and JT Ellis.** Comparison of the biological characteristics of two isolates of *Neospora caninum*. *Parasitology*, 118 (Pt 4): 363-370, 1999.

- Bainbridge DR.** Evolution of mammalian pregnancy in the presence of the maternal immune system. *Reviews of Reproduction*, 5 (2): 67-74, 2000.
- Barber J, AJ Trees, M Owen, and B Tennant.** Isolation of *Neospora caninum* from a British dog. *The Veterinary Record*, 133 (21): 531-532, 1993.
- Barber JS, OJ Holmdahl, MR Owen, F Guy, A Ugglä, and AJ Trees.** Characterization of the first European isolate of *Neospora caninum* (Dubey, Carpenter, Speer, Topper and Ugglä). *Parasitology*, 111 (Pt 5): 563-568, 1995.
- Barber JS and AJ Trees.** Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *International Journal for Parasitology*, 28 (1): 57-64, 1998.
- Barbosa BF, DA Silva, IN Costa, JR Mineo, and EA Ferro.** BeWo trophoblast cell susceptibility to *Toxoplasma gondii* is increased by interferon-gamma, interleukin-10 and transforming growth factor-beta1. *Clinical and Experimental Immunology*, 151 (3): 536-545, 2008.
- Barr BC, ML Anderson, PC Blanchard, BM Daft, H Kinde, and PA Conrad.** Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections. *Veterinary Pathology*, 27 (5): 354-361, 1990.
- Barr BC, ML Anderson, JP Dubey, and PA Conrad.** *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. *Veterinary Pathology*, 28 (2): 110-116, 1991a.
- Barr BC, PA Conrad, JP Dubey, and ML Anderson.** *Neospora*-like encephalomyelitis in a calf: pathology, ultrastructure, and immunoreactivity. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 3 (1): 39-46, 1991b.
- Barr BC, ML Anderson, LW Woods, JP Dubey, and PA Conrad.** *Neospora*-like protozoal infections associated with abortion in goats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 4 (3): 365-367, 1992.
- Barr BC, PA Conrad, R Breitmeyer, K Sverlow, ML Anderson, J Reynolds, AE Chauvet, JP Dubey, and AA Ardans.** Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora*-infected fetuses: four cases (1990-1992). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 202 (1): 113-117, 1993.
- Barr BC, JD Rowe, SK Sverlow, RH BonDurant, AA Ardans, MN Oliver, and PA Conrad.** Experimental reproduction of bovine fetal *Neospora* infection and death with a bovine *Neospora* isolate. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 6 (2): 207-215, 1994.
- Bartels CJ, W Wouda, and YH Schukken.** Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology*, 52 (2): 247-257, 1999.
- Bartels CJM, JI Arnáiz-Seco, A Ruiz-Santa-Quitera, C Björkman, J Frössling, D von Blumröder, FJ Conraths, G Schares, C van Maanen, W Wouda, and LM Ortega-Mora.** Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, The Netherlands, Spain and Sweden. *Veterinary Parasitology*, 137 (1-2): 17-27, 2006.
- Bartley PM, E Kirvar, S Wright, C Swales, I Esteban-Redondo, D Buxton, SW Maley, A Schock, AG Rae, C Hamilton, and EA Innes.** Maternal and fetal immune responses of cattle inoculated with *Neospora caninum* at mid-gestation. *Journal of Comparative Pathology*, 130 (2-3): 81-91, 2004.

- Bartley PM, S Wright, F Chianini, D Buxton, and EA Innes.** Inoculation of BALB/c mice with live attenuated tachyzoites protects against a lethal challenge of *Neospora caninum*. *Parasitology*, 135 (Pt 1): 13-21, 2008.
- Basso W, L Venturini, MC Venturini, DE Hill, OC Kwok, SK Shen, and JP Dubey.** First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. *The Journal of Parasitology*, 87 (3): 612-618, 2001.
- Baszler TV, MT Long, TF McElwain, and BA Mathison.** Interferon-gamma and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. *International Journal for Parasitology*, 29 (10): 1635-1646, 1999.
- Benirschke K and P Kaufmann.** Pathology of the human placenta. Editorial Springer, Cuarta edición, Nueva York, 2000.
- Bergeron N, Fecteau G, J Paré, R Martineau, and A Villeneuve.** Vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* in dairy herds in Québec. *The Canadian Veterinary Journal*, 41 (6): 464-467, 2000.
- Bergeron N, C Girard, J Paré, G Fecteau, J Robinson, and P Baillargeon.** Rare detection of *Neospora caninum* in placentas from seropositive dams giving birth to full-term calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 13 (2): 173-175, 2001.
- Beverley JK.** Congenital transmission of toxoplasmosis through successive generations of mice. *Nature*, 183 (4671): 1348-1349, 1959.
- Bildfell R, J Davidson, and JP Dubey.** *Neospora*-induced protozoal bovine abortion in Prince Edward Island. *The Canadian Veterinary Journal*, 35 (2): 122, 1994.
- Bjerkås I and J Presthus.** The neuropathology in toxoplasmosis-like infection caused by a newly recognized cyst-forming sporozoan in dogs. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 97 (5): 459-468, 1989.
- Björkman C, O Johansson, S Stenlund, OJ Holmdahl, and A Uggla.** *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 208 (9): 1441-1444, 1996.
- Boger LA and AL Hattel.** Additional evaluation of undiagnosed bovine abortion cases may reveal fetal neosporosis. *Veterinary Parasitology*, 113 (1): 1-6, 2003.
- Botelho AS, L Teixeira, JM Correia-da-Costa, AM Faustino, AG Castro, and M Vilanova.** *Neospora caninum*: High susceptibility to the parasite in C57BL/10ScCr mice. *Experimental Parasitology*, 115 (1): 68-75, 2006.
- Boulton JG, PA Gill, RW Cook, GC Fraser, PA Harper, and JP Dubey.** Bovine *Neospora* abortion in north-eastern New South Wales. *Australian Veterinary Journal*, 72 (3): 119-120, 1995.
- Bryan LA, AA Gajadhar, JP Dubey, and DM Haines.** Bovine neonatal encephalomyelitis associated with a *Neospora* sp. protozoan. *The Canadian Veterinary Journal*, 35 (2): 111-113, 1994.
- Buendía AJ, J Sánchez, MC Martínez, P Cámara, JA Navarro, A Rodolakis, and J Salinas.** Kinetics of infection and effects on placental cell populations in a murine model of *Chlamydia psittaci*-induced abortion. *Infection and Immunity*, 66 (5): 2128-2134, 1998.

- Buxton D, SW Maley, S Wright, KM Thomson, AG Rae, and EA Innes.** The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. *Journal of Comparative Pathology*, 118 (4): 267-279, 1998.
- Buxton D, MM McAllister, and JP Dubey.** The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends in Parasitology*, 18 (12): 546-552, 2002.
- Cannas A, A Naguleswaran, N Müller, S Eperon, B Gottstein, and A Hemphill.** Vaccination of mice against experimental *Neospora caninum* infection using NcSAG1- And NcSAG2-based recombinant antigens and DNA vaccines. *Parasitology*, 126 (Pt 4): 303-312, 2003.
- Chaouat G, E Menu, DA Clark, M Dy, M Minkowski, and TG Wegmann.** Control of fetal survival in CBA x DBA/2 mice by lymphokine therapy. *Journal of Reproduction and Fertility*, 89 (2): 447-458, 1990.
- Cheadle MA, DS Lindsay, and BL Blagburn.** Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs. *Veterinary Parasitology*, 85 (4): 325-330, 1999.
- Cole RA, DS Lindsay, BL Blagburn, and JP Dubey.** Vertical transmission of *Neospora caninum* in mice. *The Journal of Parasitology*, 81 (5): 730-732, 1995.
- Collantes-Fernández E, A Zaballos, G Álvarez-García, and LM Ortega-Mora.** Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted foetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 1194-1198, 2002.
- Collantes-Fernández E, G Álvarez-García, V Pérez-Pérez, J Pereira-Bueno, and LM Ortega-Mora.** Characterization of pathology and parasite load in outbred and inbred mouse models of chronic *Neospora caninum* infection. *The Journal of Parasitology*, 90 (3): 579-583, 2004.
- Collantes-Fernández E, I Arnáiz-Seco, BM Burgos, A Rodríguez-Bertos, G Aduriz, A Fernández-García, and LM Ortega-Mora.** Comparison of *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions between epidemic and endemic bovine abortion cases. *Veterinary Parasitology*, 142 (1-2): 187-191, 2006a.
- Collantes-Fernández E, A Rodríguez-Bertos, I Arnáiz-Seco, B Moreno, G Aduriz, and LM Ortega-Mora.** Influence of the stage of pregnancy on *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions in aborted bovine foetuses. *Theriogenology*, 65 (3): 629-641, 2006b.
- Collantes-Fernández E, I López-Pérez, G Álvarez-García, and LM Ortega-Mora.** Temporal distribution and parasite load kinetics in blood and tissues during *Neospora caninum* infection in mice. *Infection and Immunity*, 74 (4): 2491-2494, 2006c.
- Conrad PA, BC Barr, KW Sverlow, M Anderson, B Daft, H Kinde, JP Dubey, L Munson, and A Ardans.** *In vitro* isolation and characterization of a *Neospora sp.* from aborted bovine foetuses. *Parasitology*, 106 (Pt 3): 239-249, 1993a.
- Conrad PA, K Sverlow, M Anderson, J Rowe, R BonDurant, G Tuter, R Breitmeyer, C Palmer, M Thurmond, A Ardans, JP Dubey, G Duhamel, and B Barr.** Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 5 (4): 572-578, 1993b.
- Conraths FJ and LM Ortega-Mora.** Options for control of protozoal abortion in ruminants: practical experience. Conclusions, p. 229. Workshop Session T. 20th International Conference of World Association of Advances in Veterinary Parasitology. Christchurch, New Zealand, 2005.

- Conraths FJ, G Schares, and LM Ortega-Mora.** Control measures: neosporosis, p. 279-287. *In* LM Ortega-Mora, B Gottstein, FJ Conraths, and D Buxton (ed.), Protozoal abortion in farm ruminants. Guidelines for diagnosis and control. CAB International, Oxfordshire, United Kingdom, 2007.
- Cuddon P, DS Lin, DD Bowman, DS Lindsay, TK Miller, ID Duncan, AD Lahunta, J Cummings, M Suter, B Cooper, JM King, and JP Dubey.** *Neospora caninum* infection in English Springer Spaniel littermates. Diagnostic evaluation and organism isolation. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 6 (6): 325-332, 1992.
- Davison HC, A Otter, and AJ Trees.** Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *International Journal for Parasitology*, 29 (10): 1683-1689, 1999.
- Davison HC, CS Guy, JW McGarry, F Guy, DJ Williams, DF Kelly, and AJ Trees.** Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. *Research in Veterinary Science*, 70 (2): 163-168, 2001.
- Debache K, F Alaeddine, C Guionaud, T Monney, J Müller, M Strohbusch, SL Leib, D Grandgirard, and A Hemphill.** Vaccination with recombinant NcROP2 combined with recombinant NcMIC1 and NcMIC3 reduces cerebral infection and vertical transmission in mice experimentally infected with *Neospora caninum* tachyzoites. *International Journal for Parasitology*, 39 (12): 1373-1384, 2009.
- De Marez T, S Liddell, JP Dubey, MC Jenkins, and L Gasbarre.** Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. *International Journal for Parasitology*, 29 (10): 1647-1657, 1999.
- De Meerschman F, C Focant, J Detry, C Rettigner, D Cassart, and B Losson.** Clinical, pathological and diagnostic aspects of congenital neosporosis in a series of naturally infected calves. *The Veterinary Record*, 157 (4): 115-118, 2005.
- De Roever-Bonnet H.** Congenital *Toxoplasma* infections in mice and hamsters infected with avirulent and virulent strains. *Tropical and Geographical Medicine*, 21 (4): 443-450, 1969.
- Dijkstra T, M Eysker, G Schares, FJ Conraths, W Wouda, and HW Barkema.** Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. *International Journal for Parasitology*, 31 (8): 747-752, 2001a.
- Dijkstra T, HW Barkema, M Eysker, and W Wouda.** Evidence of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. *International Journal for Parasitology*, 31 (2): 209-215, 2001b.
- Dijkstra T, HW Barkema, C Björkman, and W Wouda.** A high rate of seroconversion for *Neospora caninum* in a dairy herd without an obvious increased incidence of abortions. *Veterinary Parasitology*, 109 (3-4): 203-211, 2002.
- Dijkstra T, HW Barkema, M Eysker, ML Beiboer, and W Wouda.** Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. *Veterinary Parasitology*, 110 (3-4): 161-169, 2003.
- Dijkstra T, TJGM Lam, CJM Bartels, M Eysker, and W Wouda.** Natural postnatal *Neospora caninum* infection in cattle can persist and lead to endogenous transplacental infection. *Veterinary Parasitology*, 152 (3-4): 220-225, 2008.

- Dreier KJ, LW Stewarter, RL Kerlin, DM Ritter, and DA Brake.** Phenotypic characterisation of a *Neospora caninum* temperature-sensitive strain in normal and immunodeficient mice. *International Journal for Parasitology*, 29 (10): 1627-1634, 1999.
- Dubey JP, JL Carpenter, CA Speer, MJ Topper, and A Uggla.** Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 192 (9): 1269-1285, 1988a.
- Dubey JP, AL Hattel, DS Lindsay, and MJ Topper.** Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 193 (10): 1259-1263, 1988b.
- Dubey JP, CW Leathers, and DS Lindsay.** *Neospora caninum*-like protozoan associated with fatal myelitis in newborn calves. *The Journal of Parasitology*, 75 (1): 146-148, 1989.
- Dubey JP, WJ Hartley, DS Lindsay, and MJ Topper.** Fatal congenital *Neospora caninum* infection in a lamb. *The Journal of Parasitology*, 76 (1): 127-130, 1990a.
- Dubey JP, S Miller, DS Lindsay, and MJ Topper.** *Neospora caninum*-associated myocarditis and encephalitis in an aborted calf. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2 (1): 66-69, 1990b.
- Dubey JP, DS Lindsay, ML Anderson, SW Davis, and SK Shen.** Induced transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 201 (5): 709-713, 1992a.
- Dubey JP, EB Janovitz, and AJ Skowronek.** Clinical neosporosis in a 4-week-old Hereford calf. *Veterinary Parasitology*, 43 (1-2): 137-141, 1992b.
- Dubey JP and AD Lahunta.** Neosporosis associated congenital limb deformities in a calf. *Applied Parasitology*, 34 (4): 229-233, 1993.
- Dubey JP, FL Metzger Jr, AL Hattel, DS Lin, and DL Fritz.** Case report: Canine Cutaneous Neosporosis: Clinical improvement with Clydamycin. *Veterinary Dermatology*, 6 (1): 37-43, 1995.
- Dubey JP and DS Lindsay.** A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Veterinary Parasitology*, 67 (1-2): 1-59, 1996.
- Dubey JP, B Abbitt, MJ Topper, and JF Edwards.** Hydrocephalus associated with *Neospora caninum* infection in an aborted bovine fetus. *Journal of Comparative Pathology*, 118 (2): 169-173, 1998a.
- Dubey JP, KR Dorough, MC Jenkins, S Liddell, CA Speer, OC Kwok, and SK Shen.** Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. *International Journal for Parasitology*, 28 (8): 1293-1304, 1998b.
- Dubey JP.** Neosporosis-the first decade of research. *International Journal for Parasitology*, 29 (10): 1485-1488, 1999a.
- Dubey JP.** Neosporosis in cattle: biology and economic impact. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 214 (8): 1160-1163, 1999b.
- Dubey JP, BC Barr, JR Barta, I Bjerkås, C Björkman, BL Blagburn, DD Bowman, D Buxton, JT Ellis, B Gottstein, A Hemphill, DE Hill, DK Howe, MC Jenkins, Y Kobayashi, B Koudela, AE Marsh, JG Mattsson, MM McAllister, D Modrý, Y Omata, LD Sibley, CA Speer, AJ Trees,**

- A Uggla, SJ Upton, DJL Williams, and DS Lindsay.** Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *International Journal for Parasitology*, 32 (8): 929-946, 2002.
- Dubey JP.** Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *The Korean Journal of Parasitology*, 41 (1): 1-16, 2003.
- Dubey JP.** Neosporosis in cattle. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 21 (2): 473-483, 2005.
- Dubey JP and G Schares.** Diagnosis of bovine neosporosis. *Veterinary Parasitology*, 140 (1-2): 1-34, 2006a.
- Dubey JP, D Buxton, and W Wouda.** Pathogenesis of bovine neosporosis. *Journal of Comparative Pathology*, 134 (4): 267-289, 2006b.
- Dubey JP, G Schares, and LM Ortega-Mora.** Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clinical Microbiology Reviews*, 20 (2): 323-367, 2007.
- Duivenvoorden J and P Lulis.** *Neospora* abortions in eastern Ontario dairy herds. *The Canadian Veterinary Journal*, 36 (10): 623, 1995.
- Dyer RM, MC Jenkins, OC Kwok, LW Douglas, and JP Dubey.** Serologic survey of *Neospora caninum* infection in a closed dairy cattle herd in Maryland: risk of serologic reactivity by production groups. *Veterinary Parasitology*, 90 (3): 171-181, 2000.
- Entrican G.** Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. *Journal of Comparative Pathology*, 126 (2-3): 79-94, 2002.
- Eperon S, K Brönnimann, A Hemphill, and B Gottstein.** Susceptibility of B-cell deficient C57BL/6 (μ MT) mice to *Neospora caninum* infection. *Parasite Immunology*, 21 (5): 225-236, 1999.
- Ferre I, G Aduriz, I Del Pozo, J Regidor-Cerrillo, R Atxaerandio, E Collantes-Fernández, A Hurtado, C Ugarte-Garagalza, and LM Ortega-Mora.** Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. *Theriogenology*, 63 (5): 1504-1518, 2005.
- Ferro EAV, E Bevilacqua, S Favoreto, DAO Silva, RA Mortara, and JR Mineo.** *Calomys callosus* (Rodentia : Cricetidae) trophoblast cells as host cells to *Toxoplasma gondii* in early pregnancy. *Parasitology Research*, 85 (8-9): 647-654, 1999.
- Ferro EA, DA Silva, E Bevilacqua, and JR Mineo.** Effect of *Toxoplasma gondii* infection kinetics on trophoblast cell population in *Calomys callosus*, a model of congenital toxoplasmosis. *Infection and Immunity*, 70 (12): 7089-7094, 2002.
- Flori P, J Hafid, T Bourlet, H Raberin, C Genin, and RTM Sung.** Experimental model of congenital toxoplasmosis in guinea-pigs: use of quantitative and qualitative PCR for the study of maternofetal transmission. *Journal of Medical Microbiology*, 51 (10): 871-878, 2002.
- Flori P, J Hafid, V Thonier, B Bellete, H Raberin, and SR Tran Manh.** Parasite load in guinea pig foetus with real time PCR after maternofetal transmission of *Toxoplasma gondii*. *Parasite*, 10 (2): 133-140, 2003.
- French NP, D Clancy, HC Davison, and AJ Trees.** Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle: transmission and options for control. *International Journal for Parasitology*, 29 (10): 1691-1704, 1999.

- Gazzinelli RT, M Wysocka, S Hieny, T Schariton-Kersten, A Cheever, R Kühn, W Müller, G Trinchieri, and A Sher.** In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *The Journal of Immunology*, 157 (2): 798-805, 1996.
- Gibney EH, A Kipar, A Rosbottom, CS Guy, RF Smith, U Hetzel, AJ Trees, and DJL Williams.** The extent of parasite-associated necrosis in the placenta and foetal tissues of cattle following *Neospora caninum* infection in early and late gestation correlates with foetal death. *International Journal for Parasitology*, 38 (5): 579-588, 2007.
- Gondim LFP, H Saeki, H Onaga, M Haritani, and I Yamane.** Maintenance of *Neospora caninum* tachyzoites using Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *New Zealand Veterinary Journal*, 47 (1): 36, 1999.
- Gondim LFP, L Gao, and MM McAllister.** Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and *in vitro* isolation from oocysts. *The Journal of Parasitology*, 88 (6): 1159-1163, 2002.
- Gondim LF, MM McAllister, WC Pitt, and DE Zemlicka.** Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, 34 (2): 159-161, 2004a.
- Gondim LFP, MM McAllister, NE Mateus-Pinilla, WC Pitt, LD Mech, and ME Nelson.** Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. *The Journal of Parasitology*, 90 (6): 1361-1365, 2004b.
- Gondim LFP, MM McAllister, RC Anderson-Sprecher, C Björkman, TF Lock, LD Firkins, L Gao, and WR Fischer.** Transplacental transmission and abortion in cows administered *Neospora caninum* oocysts. *The Journal of Parasitology*, 90 (6): 1394-1400, 2004c.
- Gondim LF.** *Neospora caninum* in wildlife. *Trends in Parasitology*, 22 (6): 247-252, 2006.
- Gottstein B, S Eperon, WJ Dai, A Cannas, A Hemphill, and G Greif.** Efficacy of toltrazuril and ponazuril against experimental *Neospora caninum* infection in mice. *Parasitology Research*, 87 (1): 43-48, 2001.
- Gunning RF, RC Gumbrell, and M Jeffrey.** *Neospora* infection and congenital ataxia in calves. *The Veterinary Record*, 134 (21): 558, 1994.
- Guo ZG and AM Johnson.** Genetic comparison of *Neospora caninum* with *Toxoplasma* and *Sarcocystis* by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. *Parasitology Research*, 81 (5): 365-370, 1995.
- Guy CS, DJL Williams, DF Kelly, JW McGarry, F Guy, C Björkman, RF Smith, and AJ Trees.** *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows: spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody. *The Veterinary Record*, 149 (15): 443-449, 2001.
- Haddad JPA, IR Dohoo, and JA VanLeewen.** A review of *Neospora caninum* in dairy and beef cattle - a Canadian perspective. *The Canadian Veterinary Journal*, 46 (3): 230-243, 2005.
- Haldorson GJ, BA Mathison, K Wenberg, PA Conrad, JP Dubey, AJ Trees, I Yamane, and TV Baszler.** Immunization with native surface protein NcSRS2 induces a Th2 immune response and

- reduces congenital *Neospora caninum* transmission in mice. *International Journal for Parasitology*, 35 (13): 1407-1415, 2005.
- Hall CA, MP Reichel, and JT Ellis. *Neospora* abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. *Veterinary Parasitology*, 128 (3-4): 231-241, 2005.
- Hamir AN, SJ Tornquist, TC Guerros, MJ Topper, and JP Dubey. *Neospora caninum*-associated equine protozoal myeloencephalitis. *Veterinary Parasitology*, 79 (4): 269-274, 1998.
- Hattel AL, MD Castro, JD Gummo, D Weinstock, JA Reed, and JP Dubey. Neosporosis-associated bovine abortion in Pennsylvania. *Veterinary Parasitology*, 74 (2-4): 307-313, 1998.
- Hay WH, LG Shell, DS Lindsay, and JP Dubey. Diagnosis and treatment of *Neospora caninum* infection in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 197 (1): 87-89, 1990.
- He N, F Aosai, WT Luo, M Ueda, TH Yang, K Yamashita, S Sekiya, and A Yano. Parasite load in pregnant mice infected by *Toxoplasma gondii* assayed by quantitative competitive-PCR. *Parasitology International*, 46 (2): 143-147, 1997.
- Heckerroth AR and AM Tenter. Immunoanalysis of three litters born to a Doberman bitch infected with *Neospora caninum*. *Parasitol Research*, 100 (4): 837-846, 2007.
- Hein WR, JN Shelton, MW Simpson-Morgan, and B Morris. Traffic and proliferative responses of recirculating lymphocytes in fetal calves. *Immunology*, 64 (4): 621-626, 1988.
- Helman RG, EL Stair, TW Lehenbauer, S Rodgers, and JT Saliki. Neosporal abortion in Oklahoma cattle with emphasis on the distribution of brain lesions in aborted fetuses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 10 (3): 292-295, 1998.
- Hemphill A. The host-parasite relationship in neosporosis. *Advances in Parasitology*, 43: 47-104, 1999.
- Hemphill A, N Vonlaufen, and A Naguleswaran. Cellular and immunological basis of the host-parasite relationship during infection with *Neospora caninum*. *Parasitology*, 133 (Pt3): 261-278, 2006.
- Hietala SK and MC Thurmond. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. *International Journal for Parasitology*, 29 (10): 1669-1676, 1999.
- Higgins DA, MJ Stack, and C Richardson. Lymphocyte markers in the bovine foetus. *Developmental and Comparative Immunology*, 7 (2): 369-377, 1983.
- Hobson JC, TF Duffield, D Kelton, K Lissemore, SK Hietala, KE Leslie, B McEwen, and AS Peregrine. Risk factors associated with *Neospora caninum* abortion in Ontario Holstein dairy herds. *Veterinary Parasitology*, 127 (3-4): 177-188, 2005.
- Holmdahl OJ and JG Mattsson. Rapid and sensitive identification of *Neospora caninum* by in vitro amplification of the internal transcribed spacer 1. *Parasitology*, 112 (Pt 2): 177-182, 1996.
- Holmdahl J, C Björkman, S Stenlund, A Ugglå, and JP Dubey. Bovine *Neospora* and *Neospora caninum*: one and the same. *Parasitology Today*, 13 (1): 40-41, 1997.
- Iáñez E. Curso de Inmunología General. Capítulo 15. Regulación y Tolerancia. http://ugr.es/~eianez/inmunol/cap_15.htm. Departamento de Microbiología, Universidad de Granada., 2010.

- Innes EA, WR Panton, J Marks, AJ Trees, J Holmdahl, and D Buxton.** Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum*, as shown by incorporation of 3H uracil. *Journal of Comparative Pathology*, 113 (1): 95-100, 1995.
- Innes EA, D Buxton, S Maley, S Wright, J Marks, I Esteban, A Rae, A Schock, and J Wastling.** Neosporosis. Aspects of epidemiology and host immune response. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 916: 93-101, 2000.
- Innes EA, SE Wright, S Maley, A Rae, A Schock, E Kirvar, P Bartley, C Hamilton, IM Carey, and D Buxton.** Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *International Journal for Parasitology*, 31 (13): 1523-1534, 2001.
- Innes EA, AG Andrianarivo, C Björkman, DJ Williams, and PA Conrad.** Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends in Parasitology*, 18 (11): 497-504, 2002.
- Innes EA, S Wright, P Bartley, S Maley, C Macaldowie, I Esteban-Redondo, and D Buxton.** The host-parasite relationship in bovine neosporosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 108 (1-2): 29-36, 2005.
- Jardine JE.** The ultrastructure of bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum* in dogs: absence of distinguishing morphological features between parasites of canine and bovine origin. *Veterinary Parasitology*, 62 (3-4): 231-240, 1996.
- Jenkins M, T Baszler, C Björkman, G Schares, and D Williams.** Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *International Journal for Parasitology*, 32 (5): 631-636, 2002.
- Jensen J, M Rubino, WC Yang, AJ Cooley, and RD Schultz.** Ontogeny of mitogen responsive lymphocytes in the bovine fetus. *Developmental and Comparative Immunology*, 12 (3): 685-692, 1988.
- Johnson LL.** Resistance to *Toxoplasma gondii* in mice infected as neonates or exposed *in-utero*. *Infection and Immunity*, 62 (8): 3075-3079, 1994.
- Johnson AM.** Is there more than one species in the genus *Toxoplasma*? *The Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 23 (6): 383-389, 1999.
- Kano R, Y Masukata, Y Omata, Y Kobayashi, R Maeda, and A Saito.** Relationship between type 1/type 2 immune responses and occurrence of vertical transmission in BALB/c mice infected with *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*, 129 (1-2): 159-164, 2005.
- Kano R, A Kudo, H Kamiya, Y Kobayashi, R Maeda, and Y Omata.** C57BL/6 mice infected with *Neospora caninum* during administration of progesterone show bias toward type 2 immune response. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 69 (10): 1095-1097, 2007.
- Kasper LH and IA Khan.** Antigen-specific CD8+ T cells protect against lethal toxoplasmosis in mice infected with *Neospora caninum*. *Infection and Immunity*, 66 (4): 1554-1560, 1998.
- Khan IA, JD Schwartzman, S Fonseka, and LH Kasper.** *Neospora caninum*: role for immune cytokines in host immunity. *Experimental Parasitology*, 85 (1): 24-34, 1997.
- King JS, Šlapeta J, DJ Jenkins, SE Al-Qassab, JT Ellis, and PA Windsor.** Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, 40 (8): 945-950, 2010.

- Klevar S, S Kulberg, P Boysen, AK Storset, T Moldal, C Björkman, and I Olsen.** Natural killer cells act as early responders in an experimental infection with *Neospora caninum* in calves. *International Journal for Parasitology*, 37 (3-4): 329-339, 2007.
- Kobayashi Y, Yamada M, Y Omata, T Koyama, A Saito, T Matsuda, K Okuyama, S Fujimoto, H Furukoa, and T Matsui.** Naturally-occurring *Neospora caninum* infection in an adult sheep and her twin fetuses. *The Journal of Parasitology*, 87 (2): 434-436, 2001.
- Koyama T, Y Kobayashi, Y Omata, M Yamada, H Furuoka, R Maeda, T Matsui, A Saito, and T Mikami.** Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a pregnant sheep. *The Journal of Parasitology*, 87 (6): 1486-1488, 2001.
- Krishnan L, LJ Guilbert, AS Russell, TG Wegmann, TR Mosmann, and M Belosevic.** Pregnancy impairs resistance of C57BL/6 mice to *Leishmania major* infection and causes decreased antigen-specific IFN-gamma response and increased production of T helper 2 cytokines. *The Journal of Immunology*, 156 (2): 644-652, 1996a.
- Krishnan L, LJ Guilbert, TG Wegmann, M Belosevic, and TR Mosmann.** T helper 1 response against *Leishmania major* in pregnant C57BL/6 mice increases implantation failure and fetal resorptions. Correlation with increased IFN-gamma and TNF and reduced IL-10 production by placental cells. *The Journal of Immunology*, 156 (2): 653-662, 1996b.
- Larson RL, DK Hardin, and VL Pierce.** Economic considerations for diagnostic and control options for *Neospora caninum*-induced abortions in endemically infected herds of beef cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 224 (10): 1597-1604, 2004.
- Liddell S, MC Jenkins, and JP Dubey.** Vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice determined by polymerase chain reaction detection. *The Journal of Parasitology*, 85 (3): 550-555, 1999.
- Liew FY.** TH1 and TH2 cells: a historical perspective. *Nature Reviews. Immunology*, 2 (1): 55-60, 2002.
- Lindsay DS and JP Dubey.** *Neospora caninum* (Protozoa: apicomplexa) infections in mice. *The Journal of Parasitology*, 75 (5): 772-779, 1989.
- Lindsay DS and JP Dubey.** Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa). *The Journal of Parasitology*, 76 (3): 410-413, 1990.
- Lindsay DS, BL Blagburn, and JP Dubey.** Factors affecting the survival of *Neospora caninum* bradyzoites in murine tissues. *The Journal of Parasitology*, 78 (1): 70-72, 1992.
- Lindsay DS, CA Speer, MA Toivio-Kinnucan, JP Dubey, and BL Blagburn.** Use of infected cultured cells to compare ultrastructural features of *Neospora caninum* from dogs and *Toxoplasma gondii*. *American Journal of Veterinary Research*, 54 (1): 103-106, 1993.
- Lindsay DS, SD Lenz, RA Cole, JP Dubey, and BL Blagburn.** Mouse model for central nervous system *Neospora caninum* infections. *The Journal of Parasitology*, 81 (2): 313-315, 1995.
- Lindsay DS, SJ Upton, and JP Dubey.** A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. *International Journal for Parasitology*, 29 (10): 1521-1523, 1999a.
- Lindsay DS, JP Dubey, and RB Duncan.** Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*, 82 (4): 327-333, 1999b.

- Lindsay DS, JP Dubey, and MM McAllister.** *Neospora caninum* and the potential for parasite transmission. *Small Animal*, 21: 317-321, 1999c.
- Lindsay DS, SD Lenz, BL Blagburn, and DA Brake.** Characterization of temperature-sensitive strains of *Neospora caninum* in mice. *The Journal of Parasitology*, 85 (1): 64-67, 1999d.
- Long MT and TV Baszler.** Fetal loss in BALB/C mice infected with *Neospora caninum*. *The Journal of Parasitology*, 82 (4): 608-611, 1996.
- Long MT, TV Baszler, and BA Mathison.** Comparison of intracerebral parasite load, lesion development, and systemic cytokines in mouse strains infected with *Neospora caninum*. *The Journal of Parasitology*, 84 (2): 316-320, 1998.
- Long MT and TV Baszler.** Neutralization of maternal IL-4 modulates congenital protozoal transmission: comparison of innate versus acquired immune responses. *The Journal of Immunology*, 164 (9): 4768-4774, 2000.
- López-Gatius F, M Pabón, and S Almería.** *Neospora caninum* infection does not affect early pregnancy in dairy cattle. *Theriogenology*, 62 (3-4): 606-613, 2004.
- Lundén A, J Marks, SW Maley, and EA Innes.** Cellular immune responses in cattle experimentally infected with *Neospora caninum*. *Parasite Immunology*, 20 (11): 519-526, 1998.
- Macaldowie C, SW Maley, S Wright, P Bartley, I Esteban-Redondo, D Buxton, and EA Innes.** Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. *Journal of Comparative Pathology*, 131 (2-3): 142-156, 2004.
- Magnino S, PG Vigo, M Fabbi, M Colombo, C Bandi, and C Genchi.** Isolation of a bovine *Neospora* from a newborn calf in Italy. *The Veterinary Record*, 144 (16): 456-1999.
- Mainar-Jaime RC, MC Thurmond, B Berzal-Herranz, and SK Hietala.** Seroprevalence of *Neospora caninum* and abortion in dairy cows in northern Spain. *The Veterinary Record*, 145 (3): 72-75, 1999.
- Maley SW, D Buxton, AG Rae, SE Wright, A Schock, PM Bartley, I Esteban-Redondo, C Swales, CM Hamilton, J Sales, and EA Innes.** The pathogenesis of neosporosis in pregnant cattle: inoculation at mid-gestation. *Journal of Comparative Pathology*, 129 (2-3): 186-195, 2003.
- Maley SW, D Buxton, CN Macaldowie, IE Anderson, SE Wright, PM Bartley, I Esteban-Redondo, CM Hamilton, AK Storset, and EA Innes.** Characterization of the immune response in the placenta of cattle experimentally infected with *Neospora caninum* in early gestation. *Journal of Comparative Pathology*, 135 (2-3): 130-141, 2006.
- Marks J, A Lundén, D Harkins, and E Innes.** Identification of *Neospora* antigens recognized by CD4+ T cells and immune sera from experimentally infected cattle. *Parasite Immunology*, 20 (7): 303-309, 1998.
- Marsh AE, BC Barr, K Sverlow, M Ho, JP Dubey, and PA Conrad.** Sequence analysis and comparison of ribosomal DNA from bovine *Neospora* to similar coccidial parasites. *The Journal of Parasitology*, 81 (4): 530-535, 1995.
- Marsh AE, BC Barr, J Madigan, J Lakritz, R Nordhause, and PA Conrad.** Neosporosis as a cause of equine protozoal myeloencephalitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 209 (11): 1907-1913, 1996.

- Marks J, A Lundén, D Harkins, and E Innes.** Identification of *Neospora* antigens recognized by CD4+ T cells and immune sera from experimentally infected cattle. *Parasite Immunology*, 20 (7): 303-309, 1998.
- Masuda T, Y Kobayashi, R Maeda, and Y Omata.** Possibility of *Neospora caninum* infection by venereal transmission in CB-17 *scid* mice. *Veterinary Parasitology*, 149 (1-2): 130-133, 2007.
- McAllister MM, EM Huffman, SK Hietala, PA Conrad, ML Anderson, and MD Salman.** Evidence suggesting a point source exposure in an outbreak of bovine abortion due to neosporosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 8 (3): 355-357, 1996.
- McAllister MM, JP Dubey, DS Lindsay, WR Jolley, RA Wills, and AM McGuire.** Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, 28 (9): 1473-1478, 1998.
- McAllister MM.** Uncovering the biology and epidemiology of *Neospora caninum*. *Parasitology Today*, 15 (6): 216-217, 1999.
- McAllister MM, C Björkman, R Anderson-Sprecher, and DG Rogers.** Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 217 (6): 881-887, 2000.
- McCann CM, MM McAllister, LF Gondim, RF Smith, PJ Cripps, A Kipar, DJ Williams, and AJ Trees.** *Neospora caninum* in cattle: experimental infection with oocysts can result in exogenous transplacental infection, but not endogenous transplacental infection in the subsequent pregnancy. *International Journal for Parasitology*, 37 (14): 1631-1639, 2007.
- McGarry JW, CM Stockton, DJ Williams, and AJ Trees.** Protracted shedding of oocysts of *Neospora caninum* by a naturally infected foxhound. *The Journal of Parasitology*, 89 (3): 628-630, 2003.
- McGuire AM, MM McAllister, WR Jolley, and RC Anderson-Sprecher.** A protocol for the production of *Neospora caninum* tissue cysts in mice. *The Journal of Parasitology*, 83 (4): 647-651, 1997.
- Medina L, C Cruz-Vázquez, T Quezada, E Morales, and Z García-Vázquez.** Survey of *Neospora caninum* infection by nested PCR in aborted fetuses from dairy farms in Aguascalientes, Mexico. *Veterinary Parasitology*, 136 (3-4): 187-191, 2005
- Michie C.** Th1 and Th2 cytokines in pregnancy, from a fetal viewpoint. *Immunology Today*, 19 (7): 333, 1998.
- Miller CM, HE Quinn, PA Windsor, and JT Ellis.** Characterisation of the first Australian isolate of *Neospora caninum* from cattle. *Australian Veterinary Journal*, 80 (10): 620-625, 2002.
- Miller C, H Quinn, C Ryce, MP Reichel, and JT Ellis.** Reduction in transplacental transmission of *Neospora caninum* in outbred mice by vaccination. *International Journal for Parasitology*, 35 (7): 821-828, 2005.
- Moen AR, W Wouda, MF Mul, EA Graat, and T van Werven.** Increased risk of abortion following *Neospora caninum* abortion outbreaks: a retrospective and prospective cohort study in four dairy herds. *Theriogenology*, 49 (7): 1301-1309, 1998.

- Moormann AM, AD Sullivan, RA Rochford, SW Chensue, PJ Bock, T NYrienda and SR Meshnick.** Malaria and pregnancy: placental cytokine expression and its relationship to intrauterine retardation. *Journal of Infectious Disease*, 180 (6): 1987-1993, 1999.
- Moskwa B, W Cabaj, K Pastusiak, and J Bien.** The suitability of milk in detection of *Neospora caninum* infection in cows. *Acta Parasitologica*, 48 (2): 138-141, 2003.
- Moskwa B, K Pastusiak, J Bien, and W Cabaj.** The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. *Parasitol Research*, 100 (3): 633-636, 2007.
- Nietfeld JC, JP Dubey, ML Anderson, MC Libal, MJ Yaeger, and RD Neiger.** *Neospora*-like protozoan infection as a cause of abortion in dairy cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 4 (2): 223-226, 1992.
- Nishikawa Y, K Tragoolpua, N Inoue, L Makala, H Nagasawa, H Otsuka, and T Mikami.** In the absence of endogenous gamma interferon, mice acutely infected with *Neospora caninum* succumb to a lethal immune response characterized by inactivation of peritoneal macrophages. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8 (4): 811-816, 2001a.
- Nishikawa Y, N Inoue, X Xuan, H Nagasawa, I Igarashi, K Fujisaki, H Otsuka, and T Mikami.** Protective efficacy of vaccination by recombinant vaccinia virus against *Neospora caninum* infection. *Vaccine*, 19 (11-12): 1381-1390, 2001b.
- Nishikawa Y, T Mikami, and H Nagasawa.** Vaccine development against *Neospora caninum* infection. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 64 (1): 1-5, 2002.
- Nishikawa Y, N Inoue, L Makala, and H Nagasawa.** A role for balance of interferon-gamma and interleukin-4 production in protective immunity against *Neospora caninum* infection. *Veterinary Parasitology*, 116 (3): 175-184, 2003.
- O'Toole D and M Jeffrey.** Congenital sporozoan encephalomyelitis in a calf. *The Veterinary Record*, 121 (24): 563-566, 1987
- Obendorf DL, N Murray, G Veldhuis, BL Munday, and JP Dubey.** Abortion caused by neosporosis in cattle. *Australian Veterinary Journal*, 72 (3): 117-118, 1995.
- Ohmori Y and TA Hamilton.** IL-4-induced STAT6 suppresses IFN-gamma-stimulated STAT1-dependent transcription in mouse macrophages. *The Journal of Immunology*, 159 (11): 5474-5482, 1997.
- Omata Y, M Nidaira, R Kano, Y Kobayashi, T Koyama, H Furuoka, R Maeda, T Matsui, and A Saito.** Vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice in both acute and chronic infection. *Veterinary Parasitology*, 121 (3-4): 323-328, 2004.
- Ortega-Mora LM, I Ferre, I Del Pozo, A Caetano-da-Silva, E Collantes-Fernández, J Regidor-Cerrillo, C Ugarte-Garagalza, and G Aduriz.** Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. *Veterinary Parasitology*, 117 (4): 301-308, 2003.
- Ortega-Mora LM, A Fernández-García, and M Gómez-Bautista.** Diagnosis of bovine neosporosis: Recent advances and perspectives. *Acta Parasitologica*, 51 (1): 1-14, 2006.
- Osburn BI, NJ MacLachlan, and TG Terrell.** Ontogeny of the immune-system. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 181 (10): 1049-1052, 1982.

- Paniagua R, M Nistal, P Sesma, M Álvarez-Uría, R Anadón, FJ Sáez, and MP De Miguel. Citología e Histología vegetal y animal. Biología de las células y tejidos animales y vegetales. Editorial MC Graw Hill, Segunda Edición, 1997.
- Paré J, MC Thurmond, and SK Hietala. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhoo mortality. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 60 (2): 133-139, 1996.
- Paré J, MC Thurmond, and SK Hietala. *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. *The Journal of Parasitology*, 83 (1): 82-87, 1997.
- Parish SM, L Maag-Miller, TE Besser, JP Weidner, T McElwain, DP Knowles, CW Leathers. Myelitis associated with protozoal infection in newborn calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 191 (12): 1599-1600, 1997
- Pedraza-Díaz S, V Marugan-Hernández, E Collantes-Fernández, J Regidor-Cerrillo, S Rojo-Montejo, M Gómez-Bautista, and LM Ortega-Mora. Microsatellite markers for the molecular characterization of *Neospora caninum*: Application to clinical samples. *Veterinary Parasitology*, 166 (1-2): 38-46, 2009.
- Pereira García-Melo D, J Regidor-Cerrillo, E Collantes-Fernández, A Aguado-Martínez, I Del Pozo, E Mingujón, M Gómez-Bautista, G Aduriz, and LM Ortega-Mora. Pathogenic characterisation in mice of *Neospora caninum* isolates obtained from asymptomatic calves. *Parasitology*, 137 (7): 1057-1068, 2010.
- Pereira-Bueno J, A Quintanilla-Gozal, V Pérez-Pérez, A Espi-Felgueroso, G Álvarez-García, E Collantes-Fernández, and LM Ortega-Mora. Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. *Veterinary Parasitology*, 111 (2-3): 143-152, 2003.
- Pérez-Zaballos FJ. Variabilidad adaptativa y patogénica en *Neospora caninum*. Tesis Doctoral, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España, 2004.
- Pérez-Zaballos FJ, LM Ortega-Mora, G Álvarez-García, E Collantes-Fernández, V Navarro-Lozano, L García-Villada, and E Costas. Adaptation of *Neospora caninum* isolates to cell-culture changes: an argument in favor of its clonal population structure *The Journal of Parasitology*, 91 (3): 507-510, 2005.
- Peters M, E Lütkefels, AR Heckerroth, and G Schares. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. *International Journal for Parasitology*, 31 (10): 1144-1148, 2001.
- Peterhans E, TW Jungi, and M Schweizer. BVDV and innate immunity. *Biologicals*, 31 (2): 107-112, 2003.
- Pezerico SB, H Langoni, AV Da Silva, and RC Da Silva. Evaluation of *Toxoplasma gondii* placental transmission in BALB/c mice model. *Experimental Parasitology*, 123 (2): 168-172, 2009.
- Pfaff AW, O Villard, JP Klein, M Mousli, and E Candolfi. Regulation of *Toxoplasma gondii* multiplication in BeWo trophoblast cells: cross-regulation of nitric oxide production and polyamine biosynthesis. *International Journal for Parasitology*, 35 (14): 1569-1576, 2005.
- Pfaff AW, A Abou-Bacar, V Letscher-Bru, O Villard, A Senegas, M Mousli, and E Candolfi. Cellular and molecular physiopathology of congenital toxoplasmosis: the dual role of IFN-gamma. *Parasitology*, 134 (Pt 13): 1895-1902, 2007.

- Pfeiffer DU, NB Williamson, MP Reichel, JJ Wichtel, and WR Teague.** A longitudinal study of *Neospora caninum* infection on a dairy farm in New Zealand. *Preventive Veterinary Medicine*, 54 (1): 11-24, 2002.
- Pierrgili FD, L Rosignoli, G Ricci, A Moretti, P Pasquali, and GA Polidori.** *Neospora caninum* infection in a clinically healthy calf: parasitological study and serological follow-up. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 47 (1): 47-53, 2000.
- Pierrgili FD, P Pasquali, M Diaferia, V Mangili, and L Rosignoli.** *Neospora caninum* infection and congenital transmission: serological and parasitological study of cows up to the fourth gestation. *Journal of Veterinary Medicine B Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 50 (8): 399-404, 2003.
- Pitel PH, S Pronost, G Chatagnon, D Tainturier, G Fortier, and JJ Ballet.** Neosporosis in bovine dairy herds from the west of France: detection of *Neospora caninum* DNA in aborted fetuses, seroepidemiology of *N. caninum* in cattle and dogs. *Veterinary Parasitology*, 102 (4): 269-277, 2001.
- Quinn HE, CM Miller, C Ryce, PA Windsor, and JT Ellis.** Characterization of an outbred pregnant mouse model of *Neospora caninum* infection. *The Journal of Parasitology*, 88 (4): 691-696, 2002a.
- Quinn HE, JT Ellis, and NC Smith.** *Neospora caninum*: a cause of immune-mediated failure of pregnancy? *Trends in Parasitology*, 18 (9):391-394, 2002b.
- Quinn HE, CM Miller, and JT Ellis.** The cell-mediated immune response to *Neospora caninum* during pregnancy in the mouse is associated with a bias towards production of interleukin-4. *International Journal for Parasitology*, 34 (6): 723-732, 2004.
- Quintanilla-Gozalo A, J Pereira-Bueno, E Tabarés, EA Innes, R González-Paniello, and LM Ortega-Mora.** Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Spain. *International Journal for Parasitology*, 29 (8): 1201-1208, 1999.
- Raghupathy R.** Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunology Today*, 18 (10): 478-482, 1997.
- Raghupathy R.** Th1 and Th2 cytokines in pregnancy, from a fetal viewpoint. Reply to Michie. *Immunology Today*, 19 (7): 333-334, 1998.
- Ramamoorthy S, DS Lindsay, GG Schurig, SM Boyle, RB Duncan, R Vemulapalli, and N Sriranganathan.** Vaccination with gamma-irradiated *Neospora caninum* tachyzoites protects mice against acute challenge with *N. caninum*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 53 (2): 151-156, 2006.
- Ramamoorthy S, R Duncan, DS Lindsay, and N Sriranganathan.** Optimization of the use of C57BL/6 mice as a laboratory animal model for *Neospora caninum* vaccine studies. *Veterinary Parasitology*, 145 (3-4): 253-259, 2007.
- Regidor-Cerrillo J, S Pedraza-Díaz, M Gómez-Bautista, and LM Ortega-Mora.** Multilocus microsatellite analysis reveals extensive genetic diversity in *Neospora caninum*. *The Journal of Parasitology*, 92 (3): 517-524, 2006.
- Regidor-Cerrillo J, M Gómez-Bautista, J Pereira-Bueno, G Aduriz, V Navarro-Lozano, V Risco-Castillo, A Fernández-García, S Pedraza-Díaz, and LM Ortega-Mora.** Isolation and

- genetic characterization of *Neospora caninum* from asymptomatic calves in Spain. *Parasitology*, 135 (14): 1651-1659, 2008.
- Regidor-Cerrillo J, M Gómez-Bautista, I del Pozo, E Jiménez-Ruiz, G Aduriz, and LM Ortega-Mora.** Influence of *Neospora caninum* intra-specific variability in the outcome of infection in a pregnant BALB/c mouse model. *Veterinary Research*, 41 (4): doi 10.1051/vetres/2010024, 2010.
- Reichel MP and JT Ellis.** Control options for *Neospora caninum* infections in cattle-current state of knowledge. *New Zealand Veterinary Journal*, 50 (3): 86-92, 2002.
- Reichel MP and JT Ellis.** *Neospora caninum*-how close are we to development of an efficacious vaccine that prevents abortion in cattle?. *International Journal for Parasitology*, 39 (11): 1173-1187, 2009.
- Remington JS.** Experiments on the transmission of toxoplasmosis. *Survey of Ophthalmology*, 6: 856-876, 1961.
- Rettigner C, T Leclipteux, F De Meerschman, C Focant, and B Losson.** Survival, immune responses and tissue cyst production in outbred (Swiss white) and inbred (CBA/Ca) strains of mice experimentally infected with *Neospora caninum* tachyzoites. *Veterinary Research*, 35 (2): 225-232, 2004a.
- Rettigner C, F De Meerschman, C Focant, A Vanderplasschen, and B Losson.** 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 (Pt 2): 149-160, 2004b.
- Rindsjö E.** Intrauterine immunology in allergy and infection. Tesis Doctoral, Department of Medicine Solna, Clinical Allergy Research Unit, Karolinska Institutet, Estocolmo, Suecia, 2008.
- Ritter DM, R Kerlin, G Sibert, and D Brake.** Immune factors influencing the course of infection with *Neospora caninum* in the murine host. *The Journal of Parasitology*, 88 (2): 271-280, 2002.
- Roberts CW, W Walker, and J Alexander.** Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clinical Microbiology Reviews*, 14 (3): 476-488, 2001.
- Rodrigues AAR, SM Gennari, DM Aguiar, C Sreekumar, DE Hill, KB Miska, MCB Vianna, and JP Dubey.** Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. *Veterinary Parasitology*, 124 (3-4): 139-150, 2004.
- Rojo-Montejo S, E Collantes-Fernández, J Blanco-Murcia, A Rodríguez-Bertos, V Risco-Castillo, and LM Ortega-Mora.** Experimental infection with a low virulence isolate of *Neospora caninum* at 70 days gestation in cattle did not result in foetopathy. *Veterinary Research*, 40 (5): 49, 2009a.
- Rojo-Montejo S, E Collantes-Fernández, J Regidor-Cerrillo, A Álvarez-García, V Marugan-Hernández, S Pedraza-Díaz, J Blanco-Murcia, A Prenafeta, and LM Ortega-Mora.** Isolation and characterization of a bovine isolate *Neospora caninum* with a low virulence. *Veterinary Parasitology*, 159 (1): 7-16, 2009b.
- Romero JJ and K Frankena.** The effect of the dam-calf relationship on serostatus to *Neospora caninum* on 20 Costa Rican dairy farms. *Veterinary Parasitology*, 114 (3): 159-171, 2003.

- Romero JJ, E Pérez, and K Frankena. Effect of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite vaccine on the crude abortion rate of Costa Rican dairy cows under field conditions. *Veterinary Parasitology*, 123 (3-4): 149-159, 2004.
- Rosbottom A, CS Guy, EH Gibney, RF Smith, JF Valarcher, G Taylor, and DJ Williams. Peripheral immune responses in pregnant cattle following *Neospora caninum* infection. *Parasite Immunology*, 29 (4): 219-228, 2007.
- Rosbottom A, EH Gibney, CS Guy, A Kipar, RF Smith, P Kaiser, AJ Trees, and DJ Williams. An upregulation of cytokines is detected in the placentas of cattle infected with *Neospora caninum* and is more marked early in gestation when fetal death is observed. *Infection and Immunity*, 76 (6): 2352-2361, 2008.
- Rossant J and JC Cross. Placental development: lessons from mouse mutants. *Nature Reviews. Genetics*, 2 (7): 538-548, 2001.
- Ruberte J, A Carretero, M Navarro, and V Nacher. Embriología. <http://minnie.uab.es/~veteri/21197/Embriologia.jesus09def.pdf>. Unidad de Anatomía, Departamento de Sanidad Animal y Anatomía Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, 2009.
- Sager H, I Fischer, K Furrer, M Strasser, A Waldvogel, P Boerlin, L Audigé, and B Gottstein. A Swiss case-control study to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. *Veterinary Parasitology*, 102 (1-2): 1-15, 2001.
- Sager H, D Hüssy, A Kuffer, F Schreve, and B Gottstein. First documentation of a *Neospora*-induced "abortion storm" (exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum*) in a Swiss dairy farm. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 147 (3): 113-120, 2005.
- Sawada M, CH Park, H Kondo, T Morita, A Shimada, I Yamane, and T Umemura. Serological survey of antibody to *Neospora caninum* in Japanese dogs. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 60 (7): 853-854, 1998.
- Sawada M, H Kondo, Y Tomioka, C Park, T Morita, A Shimada, and T Umemura. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected adult dairy cow. *Veterinary Parasitology*, 90 (3): 247-252, 2000.
- Schares G, M Rauser, K Zimmer, M Peters, R Wurm, JP Dubey, DC de Graaf, R Edelhofer, C Mertens, G Hess, and FJ Conraths. Serological differences in *Neospora caninum*-associated epidemic and endemic abortions. *The Journal of Parasitology*, 85 (4): 688-694, 1999.
- Schares G, AB Bärwald, C Staubach, M Ziller, D Klöss, R Schröder, R Labohm, K Dräger, W Fasen, RG Hess, and FJ Conraths. Potential risk factors for bovine *Neospora caninum* infection in Germany are not under the control of the farmers. *Parasitology*, 129 (Pt 3): 301-309, 2004.
- Schares G, N Pantchev, D Barutzki, AO Heydorn, C Bauer, and FJ Conraths. Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany. *International Journal for Parasitology*, 35 (14): 1525-1537, 2005.
- Schock A, EA Innes, I Yamane, SM Latham, and JM Wastling. Genetic and biological diversity among isolates of *Neospora caninum*. *Parasitology*, 123 (Pt 1): 13-23, 2001.
- Serrano-Martínez E, I Ferre, A Martínez, K Osoro, A Mateos-Sanz, I Del Pozo, G Aduriz, C Tamargo, CO Hidalgo, and LM Ortega-Mora. Experimental neosporosis in bulls: Parasite detection in semen and blood and specific antibody and interferon-gamma responses. *Theriogenology*, 67 (6): 1175-1184, 2007a.

- Serrano-Martínez E, I Ferre, K Osoro, G Aduriz, RA Mota, A Martínez, I Del Pozo, CO Hidalgo, and LM Ortega-Mora. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers and cows using contaminated semen with different numbers of tachyzoites. *Theriogenology*, 67 (4): 729-737, 2007b.
- Shibahara T, T Kokuho, M Eto, M Haritani, T Hamaoka, K Shimura, K Nakamura, Y Yokomizo, and I Yamane. Pathological and immunological findings of athymic nude and congenic wild type BALB/c mice experimentally infected with *Neospora caninum*. *Veterinary Pathology*, 36 (4): 321-327, 1999.
- Šlapeta JR, D Modrý, I Kyselová, R Hořejs, J Lukěš, and B Koudela. Dog shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. *Veterinary Parasitology*, 109 (3-4): 157-167, 2002.
- Speer CA and JP Dubey. Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum*. *The Journal of Protozoology*, 36 (5): 458-463, 1989.
- Speer CA, JP Dubey, MM McAllister, and JA Blixt. Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 29 (10): 1509-1519, 1999.
- Spencer JA, MJ Higginbotham, RR Young-White, AJ Guarino, and BL Blagburn. *Neospora caninum*: Adoptive transfer of immune lymphocytes precipitates disease in BALB/c mice. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 106 (3-4): 329-333, 2005.
- Stahl W, M Sekiguchi, and Y Kaneda. Multiple organ dysfunction in congenital murine toxoplasmosis. *The Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 29 (2): 53-63, 2004.
- Staska LM, TC McGuire, CJ Davies, HA Lewin, and TV Baszler. *Neospora caninum*-infected cattle develop parasite-specific CD4+ cytotoxic T lymphocytes. *Infection and Immunity*, 71 (6): 3272-3279, 2003.
- Staska LM, CJ Davies, WC Brown, TC McGuire, CE Suarez, JY Park, BA Mathison, JR Abbott, and TV Baszler. Identification of vaccine candidate peptides in the NcSRS2 surface protein of *Neospora caninum* by using CD4+ cytotoxic T lymphocytes and gamma interferon-secreting T lymphocytes of infected Holstein cattle. *Infection and Immunity*, 73 (3): 1321-1329, 2005.
- Stenlund S, C Björkman, OJ Holmdahl, H Kindahl, and A Uggla. Characterization of a Swedish bovine isolate of *Neospora caninum*. *Parasitology Research*, 83 (3): 214-219, 1997.
- Stenlund S, H Kindahl, U Magnusson, A Uggla, and C Björkman. Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*, 85 (4): 227-234, 1999.
- Tanaka T, T Hamada, N Inoue, H Nagasawa, K Fujisaki, N Suzuki, and T Mikami. The role of CD4(+) or CD8(+) T cells in the protective immune response of BALB/c mice to *Neospora caninum* infection. *Veterinary Parasitology*, 90 (3): 183-191, 2000a.
- Tanaka T, H Nagasawa, K Fujisaki, N Suzuki, and T Mikami. Growth-inhibitory effects of interferon-gamma on *Neospora caninum* in murine macrophages by a nitric oxide mechanism. *Parasitology Research*, 86 (9): 768-771, 2000b.
- Teisaire ES, OL Nieto, IA Roldán, ZU Kreisel, M López-Aragón, and A García Moreno. Guía de trabajos prácticos de embriología. 3. Desarrollo embrionario inicial: modelos de aves y mamíferos.

<http://darwin.bio.ucm.es/revistas/index.php/reduca-biologia/article/viewFile/21/74>. *Reduca (Biología): Serie Embriología*, 3 (1): 22-29 2010.

Teixeira L, AS Botelho, AR Batista, CS Meireles, A Ribeiro, HS Domingues, JM Correia da Costa, AG Castro, AM Faustino, and M Vilanova. Analysis of the immune response to *Neospora caninum* in a model of intragastric infection in mice. *Parasite Immunology*, 29 (1): 23-36, 2007.

Thilsted JP and JP Dubey. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1 (3): 205-209, 1989.

Thornton RN, EJ Thompson, and JP Dubey. *Neospora* abortion in New Zealand cattle. *New Zealand Veterinary Journal*, 39 (4): 129-133, 1991.

Thurmond MC, SK Hietala, and PC Blanchard. Herd-based diagnosis of *Neospora caninum*-induced endemic and epidemic abortion in cows and evidence for congenital and postnatal transmission. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 9 (1): 44-49, 1997

Tierney TJ and MW Simpson-Morgan. The proliferative responses of lymphocytes from foetal calves and adult cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 59 (1-2): 49-64, 1997a.

Tierney TJ and MW Simpson-Morgan. The immune response of foetal calves. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 57 (3-4): 229-238, 1997b.

Trees AJ, MM McAllister, CS Guy, JW McGarry, RF Smith, and DJ Williams. *Neospora caninum*: oocyst challenge of pregnant cows. *Veterinary Parasitology*, 109 (1-2): 147-154, 2002.

Trees AJ and DJL Williams. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends in Parasitology*, 21 (12): 558-561, 2005.

Tuo W, R Fetterer, M Jenkins, and JP Dubey. Identification and characterization of *Neospora caninum* cyclophilin that elicits gamma interferon production. *Infection and Immunity*, 73 (8): 5093-5100, 2005.

Ugla A, JP Dubey, G Lundmark, and P Olson. Encephalomyelitis and myositis in a boxer puppy due to a *Neospora*-like infection. *Veterinary Parasitology*, 32 (2-3): 255-260, 1989.

Ugla A, S Stenlund, OJ Holmdahl, EB Jakubek, P Thebo, H Kindahl, and C Björkman. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. *International Journal for Parasitology*, 28 (9): 1467-1472, 1998.

Vianna MC, C Sreekumar, KB Miska, DE Hill, and JP Dubey. Isolation of *Neospora caninum* from naturally infected white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Veterinary Parasitology*, 129 (3-4): 253-257, 2005.

Von Blumröder D, G Schares, R Norton, DJ Williams, I Esteban-Redondo, S Wright, C Björkman, J Frössling, V Risco-Castillo, A Fernández-García, LM Ortega-Mora, H Sager, A Hemphill, C Van Maanen, W Wouda, and FJ Conraths. Comparison and standardisation of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in bovines. *Veterinary Parasitology*, 120 (1-2): 11-22, 2004.

Von der Weid T, AM Beebe, DC Roopenian, and RL Coffman. Early production of IL-4 and induction of Th2 responses in the lymph node originate from an MHC class I-independent CD4⁺NK1.1⁺ T cell population. *The Journal of Immunology*, 157 (10): 4421-4427, 1996.

- Waldner CL, ED Janzen, J Henderson, and DM Haines.** Outbreak of abortion associated with *Neospora caninum* infection in a beef herd. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 215 (10): 1485-1489, 1999.
- Wegmann TG, H Lin, L Guilbert, and TR Mosmann.** Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunology Today*, 14 (7): 353-356, 1993.
- Williams DJ, CS Guy, JW McGarry, F Guy, L Tasker, RF Smith, K MacEachern, PJ Cripps, DF Kelly, and AJ Trees.** *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitology*, 121 (Pt 4): 347-358, 2000.
- Williams DJ, CS Guy, RF Smith, F Guy, JW McGarry, JS McKay, and AJ Trees.** First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection. *International Journal for Parasitology*, 33 (10): 1059-1065, 2003.
- Williams DJL, CS Guy, RF Smith, J Ellis, C Björkman, MP Reichel, and AJ Trees.** Immunization of cattle with live tachyzoites of *Neospora caninum* confers protection against fetal death. *Infection and Immunity*, 75 (3): 1343-1348, 2007.
- Williams DJ, CS Hartley, C Björkman, and AJ Trees.** 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, 2009.
- Wouda W, AR Moen, IJ Visser, and F van Knapen.** Bovine fetal neosporosis: a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification of organisms in brain, heart, and liver. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 9 (2): 180-185, 1997.
- Wouda W, AR Moen, and YH Schukken.** Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. *Theriogenology*, 49 (7): 1311-1316, 1998.
- Wouda W, T Dijkstra, AM Kramer, C van Maanen, and JM Brinkhof.** Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. *International Journal for Parasitology*, 29 (10): 1677-1682, 1999.
- Yaeger MJ, S Shawd-Wessels, and P Leslie-Steen.** *Neospora* abortion storm in a midwestern dairy farm. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 64 (4): 506-508, 1994.
- Yamane I, T Kokuho, K Shimura, M Eto, M Haritani, Y Ouchi, KW Sverlow, and PA Conrad.** *In vitro* isolation of a bovine *Neospora* in Japan. *The Veterinary Record*, 138 (26): 652, 1996.
- Yamane I, T Kokuho, K Shimura, M Eto, T Shibahara, M Haritani, Y Ouchi, K Sverlow, and PA Conrad.** *In vitro* isolation and characterisation of a bovine *Neospora* species in Japan. *Research in Veterinary Science*, 63 (1): 77-80, 1997.
- Yamane I, H Kitani, T Kokuho, T Shibahara, M Haritani, T Hamaoka, S Shimizu, M Koiwai, K Shimura, and Y Yokomizo.** The inhibitory effect of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha on intracellular multiplication of *Neospora caninum* in primary bovine brain cells. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 62 (3): 347-351, 2000.



Grupo SaluVet
Departamento de Sanidad Animal
Facultad de Veterinaria
Universidad Complutense de Madrid
Avenida Puerta de Hierro, s/n
28040
Madrid