

RESPUESTA IMMUNE EN VACAS GESTANTES INFECTADAS DE MANERA EXPERIMENTAL CON *NEOSPORA CANINUM*

S. Almería#, J.P. Dubey*, L.C. Gasbarre.

#Parasitology, Veterinary School, Autonomous University of Barcelona.
Bellaterra, Barcelona, Spain.

*USDA, ARS, BHNRC, Beltsville, MD, USA.
USDA, ARS, IDRL, Beltsville, MD, USA.

INTRODUCCIÓN

Neospora caninum es un protozoo intracelular considerado en la actualidad como una de las causas más importantes de aborto en ganado vacuno en todo el mundo. Los ooquistes eliminados por el perro, único hospedador definitivo descrito hasta el momento, son transmitidos al ganado vacuno mediante agua o alimento contaminado. Sin embargo, la principal vía de transmisión en los rebaños es la vía vertical o transplacentaria, por el paso de taquizoitos desde las madres infectadas a sus crías durante la gestación. A diferencia de *Toxoplasma gondii* con el que tiene muchas semejanzas, los abortos pueden ser repetitivos. Animales infectados pueden no abortar pero sus crías estarán infectadas congénitamente en una muy elevada proporción, y estos animales seropositivos tienen un mayor riesgo de presentar abortos en el futuro comparados con animales seronegativos (Hietala and Thurmond, 1999; Davison et al., 1999). Por tanto, el control de las infecciones congénitas son una de las áreas fundamentales para prevenir los cuadros clínicos de neosporosis.

Los mecanismos inmunes mediados por células parecen tener un papel fundamental en el control de *N. caninum* reduciendo la parasitemia. Se ha descrito un papel fundamental de citoquinas como IFN-g y IL-12 (Khan et al., 1997). Pocos estudios se han realizado relacionados con la respuesta inmune en animales gestantes. El objetivo de este estudio fue estudiar la respuesta inmune que tiene lugar en animales gestantes infectados a los 110 días de gestación, con taquizoitos administrados vía intravenosa. Se estudió la existencia de transmisión transplacentaria y los cambios en las poblaciones inmunes y en la expresión de citoquinas durante el estudio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cuatro novillas de la raza Angus fueron infectadas por vía intravenosa con 10^7 taquizoitos derivados de una cepa bovina a los 110 días de gestación. Tres novillas gestantes fueron incluidas como grupo control no infectado. Se tomaron muestras de sangre a 1, 2 y 3 semanas tras la infección para el aislamiento de células mononucleares (PBMC) mediante centrifugación en gradientes de Ficoll. Las células fueron cultivadas con concanavalin A (Con A) durante 24 h. Los animales fueron sacrificados a las 3 semanas tras la infección. En el momento de la necropsia se recogieron en condiciones asépticas ganglios linfáticos bronquiales y mesentéricos y el bazo de los animales. A partir de estos órganos se aislaron células mononucleares según el método descrito por Gasbarre (1994).

Los fetos fueron separados de la placenta inmediatamente tras el sacrificio. Se recogieron el bazo y los ganglios inguinales para aislamiento de

células mononucleares siguiendo el mismo procedimiento usado en las novillas.

Las subpoblaciones celulares presentes en los tejidos fueron analizados mediante citometría de flujo según descrito por Gasbarre (1994). Los monoclonales utilizados determinan poblaciones CD3, CD4, CD8, IL-2 R, y linfocitos B.

El análisis de la expresión de citoquinas se realizó mediante PCR inversa a tiempo real siguiendo el método (Taqman®). RNA fue extraído siguiendo el método de Chomczynski and Sacchi (1987). La cantidad fue determinada mediante espectrofotometría. cDNA fue sintetizado a partir de 5 ug de RNA total en presencia de random iniciadores. Las análisis de PCR a tiempo real fueron realizadas usando el secuenciador ABI PRISM™ 7700 mediante el kit Brilliant™ quantitative PCR Core de Stratagene. Las sondas e iniciadores fueron diseñados mediante el programa Primer Express (PE-Biosystem, Foster City, CA) expandiendo un intrón cuando fue posible para evitar contaminación por DNA genómico. Como control se utilizó 18 S RNA (PE Applied Biosystems, Foster City, CA).

El valor Ct definido como el número de ciclos de PCR necesarios para que la señal de fluorescencia exceda la señal umbral fue definido en el logaritmo lineal de la curva de amplificación y mantenido constante a lo largo del estudio.

El análisis estadístico se realizó mediante test "t" de student comparando animales infectados con animales controles no infectados. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando $p \leq 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSION

Hasta el momento del sacrificio no se observó la existencia de aborto en ninguno de los animales infectados. Sin embargo, la transmisión transplacentaria ya había tenido lugar, y se encontraron parásitos en los tejidos de 3 de los 4 fetos infectados.

No se observaron diferencias entre los grupos infectado y control en los porcentajes de células mononucleares en sangre en la primera semana tras la infección. Sin embargo, a las dos semanas de la misma, los animales infectados presentaron unos porcentajes de linfocitos CD3+, CD4+ y IL-2R+ significativamente menores ($p \leq 0.05$). Asimismo, se observaron menores porcentajes de células CD8+ y mayores porcentajes de linfocitos B aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Los cambios fueron más evidentes a las 3 semanas tras la infección, cuando los animales infectados presentaron significativamente menores porcentajes de células CD3+, CD4+, CD8+ y IL-2R+, con niveles más elevados de linfocitos B que en animales control, aunque no estadísticamente significativos.

En los ganglios linfáticos mesentéricos se observaron resultados opuestos, encontrándose en los animales infectados mayores niveles de células CD3+ ($p \leq 0.05$), CD4+ y CD8+ (aunque no estadísticamente significativos) que en los animales control no infectados, mientras que los linfocitos B fueron menores en los animales infectados comparados con los animales control (aunque no estadísticamente significativos). Similares tendencias fueron observadas en los ganglios linfáticos bronquiales.

En los fetos, aunque se observaron pocas células inmunocompetentes, los niveles de linfocitos CD3 en el bazo fueron significativamente superiores en los animales infectados comparados con los animales control al igual que sucedía en las madres.

En cuanto a la expresión de citoquinas, los mayores cambios se observaron en las poblaciones esplénicas tanto de fetos como de hembras gestantes. Se observó en los fetos infectados un fuerte incremento en la expresión de IL-10 (9,8 veces), γ -IFN (34,3 veces) y TNF (3,7 veces), mientras que la expresión de IL-4 fue significativamente menor (6,5 veces) comparado con los fetos controles. Por su parte, en las hembras infectadas se observaron niveles significativamente mayores de TNF (3,7 veces) e IL-12 (3,2 veces) y unos niveles de expresión de IL-4 con tendencia a la significación ($p=0,06$) cuando se compararon con las hembras controles no infectadas.

El hecho de que tanto citoquinas de tipo 1 y de tipo fueron expresadas en mayor proporción en animales infectados podría estar relacionado con la transmisión transplacentaria del parásito y/o con la patología asociada a la parasitación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Chomczynski P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Ann. Biochem.* 162, 156-159.

Davison HC., Otter, A., Trees, A.J. 1999. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *Int. J. Parasitol.*, 29: 1683-1689.

Gasbarre, L.C. 1994. *Ostertagia ostertagi*: changes in lymphoid populations in the local lymphoid tissues after primary or secondary infection. *Vet. Parasitol.*, 55: 105-114.

Hietala S., and Thurmond, M.C. 1999. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serological responses in two dairies. *Int. J. Parasitol.*, 29: 1669-1676.

Khan, I.A., Schwartzman, J.D., Fonseka, S., Kasper, L.H. 1997. *Neospora caninum*: role for immune cytokines in host immunity. *Exp. Parasitol.*, 85: 24-34.