

## **PRODUCCION DE INTERFERON GAMA (IFN- $\gamma$ ), NIVELES PLASMÁTICOS DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A LA GESTACION (PAG-1) Y ANTICUERPOS IgG1 E IgG2 DURANTE LA GESTACION EN VACAS DE APTITUD LECHERA CRÓNICAMENTE INFECTADAS POR *Neospora caninum***

Bech-Sàbat, G.<sup>1,\*</sup>, López-Gatius, F.<sup>1</sup>, Nogareda, C.<sup>1</sup>, García-Ispuerto, I.<sup>1</sup>, Serrano, B.<sup>1</sup>, Santolaria, P.<sup>2</sup>, Yáñez, J.L.<sup>2</sup> y Almería, S.<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Producción Animal, Universitat de Lleida, ETSEA, 25198 Lleida. [gbech@prodan.udl.cat](mailto:gbech@prodan.udl.cat). <sup>2</sup>UCA y Departamento de Producción Animal, Universidad de Zaragoza, 22071 Huesca. <sup>3</sup>Departamento de Anatomía y Sanidad Animal, y <sup>4</sup>Centro de Investigación en Sanidad Animal (CreSA), Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

### **INTRODUCCIÓN**

Los mecanismos que inducen la inmunotolerancia materna respecto del feto, un cuerpo antigénicamente extraño, durante la gestación no son bien conocidos (Aagaard-Tillery et al., 2006). Los componentes más importantes de la respuesta inmune celular durante la gestación son las células T colaboradoras (Th) que regulan la respuesta celular por medio de citoquinas. Las citoquinas pueden clasificarse como “pro-inflamatorias”, producidas por células Th1 y “pro-gestacionales”, producidas por células Th2. Estos dos tipos de citoquinas estimulan la inmunidad celular y la respuesta humoral respectivamente (Wilczyński, 2005). Durante la gestación, aunque hay un cierto equilibrio Th1/Th2, se observa una tendencia hacia la actividad Th2, sobre todo en la mitad de la gestación, mientras que una excesiva actividad Th1 puede asociarse con la pérdida de la gestación (Roberston, 2000). Así, la mayor parte de las gestaciones se caracterizan por el predominio de la respuesta humoral con una producción incrementada de anticuerpos (Druckman y Druckman, 2005). El conflicto entre el proceso inmune y el reproductivo es todavía más complicado de entender en presencia de una infección parasitaria como la neosporosis bovina.

*Neospora caninum*, un protozoo intracelular, es considerado en la actualidad como la mayor causa de aborto e infección congénita en el ganado vacuno a nivel mundial (Dubey et al., 2007). El tipo de respuesta inmune Th1, relacionada con citoquinas pro-inflamatorias tales como el interferón gama (IFN- $\gamma$ ), parece esencial en el control de los protozoos intracelulares. Sin embargo, aunque la producción de IFN- $\gamma$  es muy eficaz frente a la parasitación en las vacas infectadas no gestantes, puede favorecer el aborto en los animales gestantes (Williams y Trees, 2006). A pesar de ello, en un estudio reciente (López-Gatius et al., 2007a) el riesgo de aborto fue inexistente en vacas seropositivas a *N. caninum* que produjeron IFN- $\gamma$ . Por otro lado, la producción de IFN- $\gamma$  se ha relacionado con un incremento de la respuesta de anticuerpos del isotipo IgG2, también mediada por células Th1. El presente estudio evalúa las interacciones entre la producción de IFN- $\gamma$ , los niveles plasmáticos de proteínas asociadas a la gestación (PAG-1), como medidores de bienestar feto-placentario, y la respuesta específica de anticuerpos IgG1 e IgG2 durante la gestación en vacas crónicamente infectadas por *N. caninum*.

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

Se recogieron muestras de sangre los días 40, 90, 120, 150, 180 y 210 de gestación o hasta el aborto de vacas lactantes de raza Holstein-Frisona. Se determinaron los valores plasmáticos de anticuerpos frente a *N. caninum* e IFN- $\gamma$  y PAGs por técnicas ELISA y RIA, respectivamente, previamente validadas. (López-Gatius et al., 2004a; 2004b; 2007a; 2007b). Para la evaluación de las interacciones entre la producción de IFN- $\gamma$  y PAG-1, los datos derivaron de 88 vacas: 62 seropositivas y 26 seronegativas que tuvieron un parto normal, mientras que en el caso de las interacciones entre la producción de IFN- $\gamma$  y los serotipos IgG1 e IgG2, los datos derivaron de 31 vacas seropositivas, de las que 10 abortaron.

Para el análisis estadístico, se utilizaron métodos de medidas repetidas usando el GLM, paquete SPSS v14.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Interacciones entre la producción de IFN- $\gamma$ y PAG-1

Se detectó IFN- $\gamma$  en el plasma de 14 de las 62 vacas seropositivas a *N. caninum*, mientras no se detectó en ninguna de las 26 seronegativas. Los niveles de PAG-1 no resultaron afectados por el número de lactación de las vacas, la producción de leche en el momento del diagnóstico de la gestación ni por la seropositividad a *N. caninum*. Los niveles de PAG-1 se correlacionaron positivamente con el periodo de la gestación ( $P < 0.001$ ) y con la presencia de gestaciones gemelares ( $P < 0.01$ ) confirmando trabajos previos (López-Gatius et al., 2007b; 2007c) y también se vieron afectados significativamente por la producción de IFN- $\gamma$ . Las vacas *N. caninum*-seronegativas y seropositivas sin producción de IFN- $\gamma$  presentaron valores superiores de PAG-1 a lo largo de la gestación, respecto de las seropositivas que produjeron IFN- $\gamma$  ( $P < 0.05$ ). Estos resultados sugieren que las concentraciones de PAG-1 plasmáticas disminuyen en vacas crónicamente infectadas por *N. caninum* tras el desarrollo de una respuesta inmune celular, pero no se modifican con la presencia de anticuerpos frente al parásito.

### Interacciones entre la producción de IFN- $\gamma$ y los anticuerpos IgG1 e IgG2

Las vacas que no abortaron que produjeron IFN- $\gamma$  ( $n=10$ ) mostraron una relación IgG2/IgG1 más elevada ( $P=0.01$ ) a lo largo de la gestación que las vacas que no produjeron IFN- $\gamma$  ( $n=11$ ). Se observó un efecto negativo significativo ( $P < 0.05$ ) de la producción de IFN- $\gamma$  sobre los niveles de IgG1, mientras los niveles plasmáticos de IgG2 no se vieron afectados por la producción de IFN- $\gamma$ . En contraste, se registraron concentraciones más elevadas de IgG2 que IgG1 a lo largo de la gestación en los animales que abortaron, en ambos tipos de vacas, las que no produjeron IFN- $\gamma$  y en la única que abortó produciendo la citoquina.

### Conclusión

Nuestros datos indican que la producción de IFN- $\gamma$  se correlaciona negativamente con los niveles plasmáticos de PAG-1 durante la gestación en vacas infectadas por *N. caninum* mientras la producción de anticuerpos frente *N. caninum* no se correlaciona con los niveles de PAG-1. Una respuesta inmune celular de tipo Th1, en la que los anticuerpos IgG2 prevalecen, podría disminuir el riesgo de aborto por *N. caninum*, pero sólo si se acompaña de la producción de IFN- $\gamma$ . Elevados niveles de anticuerpos IgG2 por sí mismos, son insuficientes para proteger frente al aborto.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aagaard-Tillery, K.M., Silver, R. & Dalton, J. 2006. *Semin. Fetal Neonat. Med.* 11:279-95.
- Druckmann, R. & Druckmann, M.A. 2005. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 97:389-96.
- Dubey, J.P., Schares, G. & Ortega-Mora, L.M. 2007. *Clin. Microbiol. Rev.* 20:323-67.
- López-Gatius, F., Pabón, M. & Almería, S. 2004a. *Theriogen.* 62:606-13.
- López-Gatius, F., López-Béjar, M., Murugavel, K., Pabón, M., Ferrer, D. & Almería, S. 2004b. *J. Vet. Med. S.B* 51:348-52.
- López-Gatius, F., Almería, S., Donofrio, G., Nogareda, C., García-Ispierto, I., Bech-Sàbat, G., Santolaria, P., Yániz, J.L., Pabón, M., de Sousa, N.M. & Beckers, J.F. 2007a. *Theriogen.* 68:1067-73.
- López-Gatius, F., Garbayo, J.M., Santolaria, P., Yániz, J., Ayad, A., de Sousa, N.M. & Beckers, J.F. 2007b. *Dom. Anim. Endocrinol.* 32:29-42.
- López-Gatius, F., Garbayo, J.M., Santolaria, P., Yániz, J.L., Almería, S., Ayad, A., de Sousa, N.M. & Beckers J.F. 2007c. *Theriogen.* 67:502-8.
- López-Gatius, F., Hunter, R.H.F., Garbayo, J.M., Santolaria, P., Yániz, J., Serrano, B., Ayad, A., de Sousa, N.M. & Beckers, J.F. 2007d. *Theriogen.* 67:1324-1330.
- Roberston, S.A. 2000. *Rev. Reprod.* 5:164-4.
- Williams, D.J.L. & Trees, A.J. 2006. *Parasite Immunol.* 28:61-7.
- Wilczyński, J.R. 2005. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Immunol.* 122:136-43.

**Agradecimientos:** Este estudio ha sido financiado por las ayudas CICYT, AGL2007-65521-C02-01/GAN y AGL2007-65521-C02-02/GAN. Bech-Sàbat fue financiado por la beca FPU del Ministerio de Educación y Ciencia, AP-2005-5378.

**INTERACTIONS BETWEEN GAMMA INTERFERON (IFN- $\gamma$ ) PRODUCTION AND PLASMA LEVELS OF PREGNANCY-ASSOCIATED GLYCOPROTEIN-1 (PAG-1) AND IgG1 AND IgG2 ANTIBODY RESPONSES DURING GESTATION IN DAIRY COWS NATURALLY INFECTED WITH *Neospora caninum***

**ABSTRACT:** Gamma interferon (IFN- $\gamma$ ) production protects cows infected with *Neospora caninum* against abortion. The present study analyzes interactions between IFN- $\gamma$  production and levels of plasma pregnancy-associated glycoproteins-1 (PAG-1) and IgG1 and IgG2 throughout gestation in *Neospora*-infected dairy cows. Plasma collected throughout gestation or until abortion was tested for antibodies against *N. caninum*, IgG1 and IgG2 isotypes, PAG-1 and IFN- $\gamma$ . GLM repeated measures analysis revealed that non-aborting *Neospora*-seronegative and -seropositive dairy cows (n=62) showing no IFN- $\gamma$  production exhibited higher (P=0.04) PAG-1 concentrations than seropositive cows producing IFN- $\gamma$  (n=14). Non-aborting seropositive cows producing IFN- $\gamma$  (n=10) showed higher (P=0.01) IgG2/IgG1 ratio than cows not producing IFN- $\gamma$  (n=11). A negative (P=0.027) effect of IFN- $\gamma$  production on IgG1 was also observed, while IFN- $\gamma$  production did not affect IgG2 levels. In contrast, higher levels of IgG2 than IgG1 antibodies were observed in aborting seropositive animals (n=10), both in those producing and not producing IFN- $\gamma$ . Our data indicate that in *Neospora*-infected dairy cows, the production of IFN- $\gamma$  correlates negatively and the production of antibodies is uncorrelated with plasma PAG-1 concentrations during gestation and that a Th1 cellular immune response, in which IgG2 antibodies prevail, could be protective against *N. caninum* abortion, but only in cows producing IFN- $\gamma$ .

**Keywords:** Dairy cows, *Neospora caninum*, pregnancy associated glycoproteins, gamma interferon, IgG1-IgG2 serotypes.