



Trabajo de Tesis realizado como requisito para obtener el título de

DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

TÍTULO DEL TRABAJO: EFECTOS DE LA PROTECCIÓN MEDIADA POR LA PRODUCCIÓN DE INTERFERÓN gamma EN CÉLULAS BOVINAS ESTIMULADAS POR *Neospora caninum*

AUTORA: Méd. Vet. Diana Raquel Bacigalupe

DIRECTORA: Dra. María Cecilia Venturini

CODIRECTORA: Dra. Lucila Venturini

LUGAR DE TRABAJO: Laboratorio de Inmunoparasitología, Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

MIEMBROS DEL JURADO:

Titulares: Dr. Guglielmone, Alberto

Dra. Navone, Graciela

Dr. Mórtola, Eduardo

Suplentes: Dr. Echaide, Ignacio

Dra. Radman, Nilda

2007

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer profundamente a las personas que estuvieron a mi lado durante todo este tiempo, tanto dándome su apoyo espiritual y su cariño como brindándome desinteresadamente sus conocimientos y su tiempo. A Cecilia y Lucila; a Juan, Ale, Isi, Walter, Gastón, Lais y Magda, mis amigos del laboratorio; al Dr. Enrique Pennimpede; a todo el personal de las cátedras de Parasitología y de Inmunología de la Facultad de Ciencias Veterinarias. También quiero expresar mi agradecimiento a quienes me ofrecieron su inestimable ayuda con las técnicas y con el material utilizado en el trabajo: al personal del Instituto de Virología del INTA Castelar y a su directora, la Dra. Patricia Zamorano, al personal veterinario del frigorífico Gorina, al personal de la Cátedra de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Veterinarias.

Un párrafo aparte para agradecer a las personas que más quiero, a las que no presté toda la atención que debía para poder terminar con este trabajo, y que son las que le dan sentido a todo, mis nenas Marianella y Julieta, Silvio, papá, mamá y mis hermanos.

A todos, muchísimas gracias, sepan que sin ustedes no podría haber realizado jamás este trabajo.

CITAS BIBLIOGRÁFICAS CORRESPONDIENTES A LAS PUBLICACIONES PARCIALES DEL TRABAJO DE TESIS

- Bacigalupe, D., Venturini M.C., Moré G., Unzaga, J.M., Larsen A., Basso W., Venturini L. Detección de INF γ en células bovinas estimuladas por *Neospora caninum*. XVI Reunión Científico Técnica de la AAVDL. 5, 6 Y 7 de diciembre de 2006. Mar del Plata.

- Bacigalupe Diana, Venturini María C., Moré Gastón, Unzaga Juan M., Larsen Alejandra, Basso Walter, Pardini Lais L., Venturini Lucila. Interferon gamma production and protective effects after *Neospora caninum* tachyzoite activation of bovine spleen cells. 8th International Veterinary Immunology Symposium. 15 al 19 de agosto de 2007. Ouro Preto, Brasil.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS II

CITAS BIBLIOGRÁFICAS CORRESPONDIENTES A LAS PUBLICACIONES
PARCIALES DEL TRABAJO DE TESIS..... III

ÍNDICE DE CONTENIDOS..... IV

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS UTILIZADOS..... V

TÍTULO..... 1

PALABRAS CLAVE..... 1

RESUMEN..... 1

TITLE..... 2

KEYWORDS..... 2

ABSTRACT..... 2

1. INTRODUCCIÓN..... 4

1.1 BIOLOGÍA DE *Neospora caninum*..... 5

1.2 NEOSPOROSIS EN BOVINOS..... 9

1.2.1 NEOSPOROSIS BOVINA EN ARGENTINA..... 13

1.2.2 DIAGNÓSTICO..... 15

1.2.3 IMPORTANCIA ECONÓMICA..... 16

1.3 INTERACCIÓN CON LA CÉLULA HOSPEDADORA Y ANTÍGENOS DEL
PARÁSITO..... 18

1.4 RESPUESTA INMUNE..... 21

1.4.1 RESPUESTA INMUNE EN LA PREÑEZ..... 28

1.5 CONTROL Y PROFILAXIS..... 31

1.5.1 VACUNAS..... 32

1.6 OBJETIVOS..... 36

1.6.1 OBJETIVO GENERAL..... 36

1.6.2 OBJETIVOS PARTICULARES..... 36

1.7 HIPÓTESIS MÁS RELEVANTES..... 37

2. MATERIALES Y MÉTODOS..... 38

2.1 DISEÑO EXPERIMENTAL..... 38

2.2 CULTIVOS DE CÉLULAS VERO Y BM..... 41

2.3 OBTENCIÓN Y CULTIVO DE CÉLULAS ESPLÉNICAS BOVINAS (CEB)..... 42

2.4 CULTIVO Y OBTENCIÓN DE TAQUIZOÍTOS DE *N. caninum*..... 44

2.5 OBTENCIÓN DE TAQUIZOÍTOS INACTIVADOS 45

2.6 PREPARACIÓN DEL LISADO DE *N. caninum*..... 45

2.7 RECOLECCIÓN DE LOS SOBRENADANTES DE CULTIVO Y TRATAMIENTOS
SOBRE CÉLULAS BM..... 47

2.8 RECOLECCIÓN DE LAS CÉB..... 49

2.9 PRUEBA DE RT-PCR..... 49

2.10 PRUEBA DE ELISA (ENZIMOINMUNOENSAYO) PARA IFN γ 51

3. RESULTADOS..... 53

3.1 INACTIVACIÓN DE TAQUIZOÍTOS..... 53

3.2 CARACTERIZACIÓN DEL LISADO DE TAQUIZOÍTOS..... 53

3.3 OBTENCIÓN Y CULTIVO DE CÉLULAS ESPLÉNICAS..... 53

3.4 EXPERIMENTO 1..... 53

3.5 EXPERIMENTO 2..... 55

3.6 EXPERIMENTO 3:PRUEBA DE ELISA (ENZIMOINMUNOENSAYO) PARA IFN γ 64

3.7 EXPERIMENTO 4: PRUEBA DE RT-PCR PARA IFN γ 65

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES..... 67

5. BIBLIOGRAFÍA..... 70

ANEXO: TÉCNICAS UTILIZADAS..... 93

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS UTILIZADOS

AA: antibióticos- antimicótico

ARNm: ARN mensajero

BM: monocitos bovinos

BPA: prueba de Angus y Barton para Brucelosis bovina

CEB: células esplénicas bovinas

EDTA: ácido etilén-diamino-tetraacético

ELISA: enzimoimmunoensayo

F.C.V.: Facultad de Ciencias Veterinarias

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

IFI: inmunofluorescencia indirecta

Ig: inmunoglobulina

IFN γ : interferón gamma

IL: interleuquina

kDa: kilodalton

MgCl₂: cloruro de magnesio

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad

NK: células naturalmente asesinas

nm: nanómetros

NO: óxido nítrico

pb: pares de bases

PBS: solución tampón de fosfatos

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PEG: polietilenglicol

RT-PCR: prueba de PCR con Transcriptasa reversa

SFB: suero fetal bovino

Th: linfocitos T colaboradores

TLR: receptores semejantes a Toll

TMB: 3, 3', 5, 5' - tetrametil bencidina

TNF- α : factor de necrosis tumoral α

U.N.L.P.: Universidad Nacional de La Plata

Vero: células de riñón de mono verde africano

TÍTULO

EFFECTOS DE LA PROTECCIÓN MEDIADA POR LA PRODUCCIÓN DE INTERFERÓN gamma EN CÉLULAS BOVINAS ESTIMULADAS POR *Neospora caninum*

PALABRAS CLAVE

Neospora caninum, inmunidad, interferón γ , citoquinas

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue analizar la respuesta inmune mediada por células en la infección por *Neospora caninum* a través de la utilización de un modelo *in vitro*. Se obtuvieron células esplénicas de bovinos serológicamente negativos a *N. caninum* y se estimularon con taquizoítos de la cepa NC-1 de *N. caninum* vivos (tratamiento **GI**), inactivados con formol y calor (tratamiento **GF**) y con productos de su lisado (tratamiento **GS**), dejando células sin estimular como controles (**GC**). En los sobrenadantes de estos cultivos se determinó la concentración de interferón gamma (IFN γ) mediante una prueba de ELISA comercial (Bovigam™), resultando en todos los casos negativos con respecto al testigo provisto por el equipo. Se obtuvieron las células esplénicas, se tiñeron con Giemsa y se observaron para la detección de cambios morfológicos. Las células de los grupos **GI** y **GS** mostraron cambios compatibles con activación celular, mientras que en las células del tratamiento **GF** no

se observaron cambios. Se incubaron cultivos de monocitos bovinos (BM) con los sobrenadantes de los diferentes tratamientos de las células esplénicas, los que se desafiaron con taquizoítos de *N. caninum*. En las células BM cultivadas con los sobrenadantes de los tratamientos **GI**, **GS**, y **GF** se observaron diferencias en la multiplicación del parásito. Las células se tiñeron para determinar el porcentaje de áreas de lisis en cada tratamiento con respecto al área total, utilizando el programa Image Pro Plus. Los resultados fueron: tratamiento **GI** 3,66 %, **GF** 7,98 %, **GS** 10,70 % y **GC** 16,67 %. Se observaron diferencias significativas entre los grupos (χ^2 $p < 0,001$). Para determinar la producción de $\text{IFN}\gamma$ en las células esplénicas cultivadas, se obtuvo el ADN específico a partir del ARN mensajero y se realizó la prueba de RT-PCR. Los productos amplificados provenientes de las células de los tratamientos **GI** y **GS** revelaron bandas de 261 pb específicas. Se concluye que el lisado de taquizoítos de *N. caninum* vehiculado con un adyuvante adecuado sería una alternativa eficiente para la inmunopprofilaxis de la neosporosis.

TITLE

Effects of the protection by gamma interferon production in *Neospora caninum*-stimulated bovine cells.

KEY WORDS

Neospora caninum, immunity, γ interferon, cytokines

ABSTRACT

The aim of this work was to analyse the cellular immune response to *Neospora caninum* through an *in vitro* model.

Bovine spleen cells from cows serologically negative to *N. caninum* were cultured and stimulated with live *N. caninum* tachyzoites (group **GI**), formalin- heat-inactivated tachyzoites (**GF**), and a tachyzoite lysate (**GS**). Uninfected cells were used as a negative control. An ELISA test for IFN γ (Bovigam™) was performed on supernatants from *N. caninum* treated cells, with negative results in all treatments respect to the standard provided by the kit. *N. caninum* stimulated and control spleen cells were stained with Giemsa and typical activation morphology was observed in cells from **GI** and **GS** groups, while no change were observed in group **GF**. Supernatants from each *N. caninum* treatment were placed on monocyte bovine cells (BM) cultures and them were inoculated with live *N. caninum* tachyzoites. Supernatant from cell groups **GI**, **GF** and **GS** had a protective effect on BM cells. Lysis plaque formation was evaluated on the BM cell monolayer using Image Pro plus software. Significant differences were observed among groups (χ^2 $p < 0.001$). The lysis plaque percentage of each treatment was: **GI** 3.66%, **GF** 7.98%, **GS** 10.70% and **GC** 16.67%. IFN γ mRNA expression in spleen cells was evaluated by RT-PCR, revealing IFN γ expression in cells from group **GI**, as well as in group **GS**. It is concluded that tachyzoite lysate combined with an appropriate adjuvant may provide a valuable tool for immunoprophylaxis of the neosporosis.

1. Introducción

Bjerkås y col., en el año 1984, informaron el hallazgo de un esporozoo formador de quistes que era el causante de meningoencefalitis y miositis en cachorros provenientes de tres camadas de una perra de raza Boxer (1). Aunque el parásito era similar a *Toxoplasma gondii*, los perros no tenían anticuerpos para este parásito. La pared de los quistes observados en el encéfalo de los cachorros era más gruesa que la de *T. gondii* y, a diferencia de éste, el protozoo no fue infectante para ratones. Estudios ultraestructurales posteriores demostraron que el parásito era diferente a los protozoos conocidos hasta el momento (2).

En 1988 Dubey propuso incluir al parásito en un nuevo género: *Neospora*, siendo *Neospora caninum* la especie tipo (3). Ese mismo año, a partir de tejidos provenientes de cachorros con síntomas similares a los descritos por Bjerkås, Dubey y col. realizaron el aislamiento del parásito en cultivos celulares y reprodujeron la enfermedad mediante la inoculación experimental de perros con taquizoítos del cultivo. Además, se desarrolló una prueba para el diagnóstico serológico de la infección. Tanto en el cerebro de los cachorros como en el de ratones inoculados con tejido nervioso de los mismos se encontraron quistes de pared gruesa (4).

En 1998 McAllister y col. comprobaron que los perros eran hospedadores definitivos de este parásito, cuando demostraron los ooquistes en materia fecal de perros experimentalmente infectados con quistes provenientes de ratones (5). En el año 2001, en Argentina, Basso y col. realizaron el primer hallazgo de ooquistes de *N.*

caninum en materia fecal de caninos infectados naturalmente, denominando a la cepa aislada NC-6 Argentina (6).

En 1989 Thilsted y Dubey informaron el hallazgo de organismos similares a *N. caninum* en tejidos de fetos bovinos abortados en Nuevo México, EE.UU., y fueron los primeros en considerar a este parásito como causa de aborto en bovinos (7). Posteriormente se demostró que la neosporosis era una de las principales causas de aborto en bovinos en California (8, 9). A nivel mundial numerosos trabajos informan sobre la prevalencia de esta parasitosis en bovinos de los diferentes países, y su asociación con abortos y otras pérdidas económicas (10, 11, 12, 13, 14, 15).

1.1 Biología de *Neospora caninum*

El ciclo biológico de *N. caninum* es de tipo heteroxeno. Los hospedadores definitivos reconocidos hasta el momento son los perros (*Canis familiaris*) y los coyotes (*Canis latrans*) (5, 6, 16). Los bovinos son hospedadores intermediarios del parásito, en los que puede causar abortos y otras pérdidas económicas. También se ha asociado esporádicamente este protozoario con enfermedades en otras especies domésticas, como ovinos (17), cabras (18) y caballos (19), todos ellos actuando como hospedadores intermediarios. Se encontró evidencia de infección natural, además, en ciervos, rinocerontes, búfalos, camellos, coyotes, liebres, zorros y mapaches. Experimentalmente se han podido infectar ratones, ratas, perros, zorros, cabras, gatos, ovejas, coyotes, cerdos, meriones, conejos, primates no humanos y bovinos (20, 21). *N. caninum* puede ser transmitido a través de la placenta en los

hospedadores, tanto definitivos como intermediarios, y la vía vertical se ha propuesto como la principal ruta de transmisión en el ganado bovino de algunos países (21).

Se conocen tres estados del parásito: los taquizoítos, los bradizoítos y los esporozoítos. Los taquizoítos y los bradizoítos se encuentran en los tejidos de los hospedadores, tanto intermediarios como definitivos, mientras que los esporozoítos se ubican dentro de los ooquistes eliminados en las heces por los hospedadores definitivos.

N. caninum presenta la estructura típica de los protozoos del Phylum Apicomplexa.

Los **taquizoítos**, con forma de gajo de naranja, miden aproximadamente $2 \times 6 \mu$ y tienen un núcleo central. Poseen un complejo apical formado por microtúbulos subpeliculares, conoide, anillos polares anteriores y posteriores, 6 a 16 roptrias con contenido electro-denso, y numerosos micronemas. Otras organelas son: una mitocondria tubular, el complejo de Golgi, ribosomas y retículo endoplásmico. Pueden infectar un amplio rango de células, incluyendo células neurales, endoteliales, miocitos, hepatocitos, células renales, macrófagos alveolares y células del trofoblasto, dentro de las cuales se dividen rápidamente (9, 22, 23).

Los **bradizoítos** son similares a los taquizoítos y miden aproximadamente $6,5 \times 1,5 \mu$, tienen un núcleo terminal y contienen gránulos de amilopectina PAS positivos (23). Los quistes tisulares, dentro de los cuales se dividen lentamente los bradizoítos, se hallan en diferentes tejidos. En fetos bovinos y terneros infectados por vía transplacentaria se observan en el cerebro y la médula espinal y pueden medir hasta 50μ de diámetro con una membrana menor de $2,5 \mu$ de espesor (9, 22, 24). El grosor de la pared depende, entre otros factores, del tiempo de formación del quiste (en la mayoría mide $1-2 \mu$). También se ha informado el hallazgo de quistes

en músculo esquelético de dos terneros de dos días de edad (25). En perros se han hallado quistes tisulares de 107 μ de diámetro y con una membrana de 4 μ (22).

En cortes histológicos es difícil distinguir los estados de bradizoíto y taquizoíto, ya que éstos se presentan en ocasiones agrupados, o bien la membrana del quiste puede ser muy delgada. En estos casos, para confirmar de cuál estado se trata, se utiliza la técnica de inmunohistoquímica con anticuerpos anti- bradizoítos específicos (BAG-1) (26).

Los **ooquistes**, de aproximadamente 10 x 12 μ de diámetro, son excretados en las heces de los hospedadores definitivos (6, 16). La esporulación ocurre en el medio ambiente y en su interior se forman dos esporocistos con cuatro esporozoítos cada uno (23). Se desconocen los estados previos en el intestino del perro, aunque se ha informado del hallazgo de estados similares a esquizontes en cultivos celulares inoculados con bradizoítos provenientes de cerebro de perros infectados (27).

Los **hospedadores definitivos** pueden adquirir la infección por la ingestión de tejidos que contengan quistes tisulares de *N. caninum* y por la vía transplacentaria. Perros experimentalmente alimentados con placentas de vacas infectadas naturalmente eliminaron ooquistes (28). En los perros, *N. caninum* puede causar signos clínicos, principalmente en cachorros infectados transplacentariamente. Los cachorros pueden presentar paresia del tren posterior que evoluciona a parálisis ascendente progresiva, con atrofia muscular, y en algunos casos hiperextensión rígida de los miembros. También se pueden presentar otras manifestaciones neurológicas u orgánicas asociadas que dependerán del sitio parasitado (depresión, convulsiones, nistagmo, anisocoria, neumonía, megaesófago, etc.). Los perros adultos pueden presentar polimiositis y compromiso del sistema nervioso central,

aunque se ha informado sobre casos de dermatitis, neumonía, miocarditis e infección generalizada (29, 30, 31).

En los bovinos, *N. caninum* puede transmitirse por vía horizontal (post-natal) o por vía vertical (transplacentaria). La vía horizontal ocurre cuando el ganado ingiere ooquistes esporulados y la vía vertical se produce por la transmisión transplacentaria de los taquizoítos desde la madre hacia el feto. La transmisión horizontal entre bovinos no ha sido demostrada, como así tampoco la transmisión venérea (23).

1.2 Neosporosis en bovinos

Los bovinos pueden adquirir la infección por medio de la ingestión de los ooquistes que han sido eliminados en las heces de los hospedadores definitivos (5, 6, 32), o bien por transmisión de parásitos de la madre al hijo a través de la placenta (33, 34). La transmisión transplacentaria de *N. caninum* es altamente eficiente en los bovinos, habiéndose observado que entre el 75 % y el 90 % de los terneros que provenían de madres infectadas estaban parasitados al nacer (33, 34).

La prevalencia serológica de la infección varía según los países de origen y las técnicas utilizadas para detectar los anticuerpos específicos. En Argentina, Venturini y col. en 1999 hallaron una prevalencia serológica de 64,5 % en vacas de tambo con antecedentes de abortos, y de 24,4 % en fetos de frigorífico, utilizando la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) (12). Moore y col., en el año 2002, hallaron una prevalencia serológica de 16,6 % en vacas de tambo sin problemas de abortos utilizando la técnica de IFI con diluciones de los sueros de 1: 200 (35). En Inglaterra se estimó la seroprevalencia del 6 % en ganado lechero (34), similar a la hallada en Nueva Zelanda (13). En un estudio en ganado de carne en Canadá se detectó una seroprevalencia del 30 % (36). En EE.UU. se observó una variabilidad del 2 al 98 %, según los diferentes establecimientos estudiados (37).

Las consecuencias de la infección en los bovinos durante la preñez incluyen la producción de abortos, más frecuentes entre el 5º y el 8º mes de gestación, el nacimiento de terneros débiles que mueren poco tiempo después del parto, o el nacimiento de terneros infectados pero clínicamente sanos. Los fetos de menor edad pueden presentarse momificados y ser retenidos en el útero por varios meses, y

aquellos más pequeños pueden ser reabsorbidos y como consecuencia de ello, las madres retornan al ciclo (23). Las terneras clínicamente sanas pero infectadas transplacentariamente podrán transmitir a sus crías la infección por vía vertical endógena durante preñeces consecutivas, por lo que la infección puede permanecer por años en un rodeo sin necesidad de un hospedador definitivo (38).

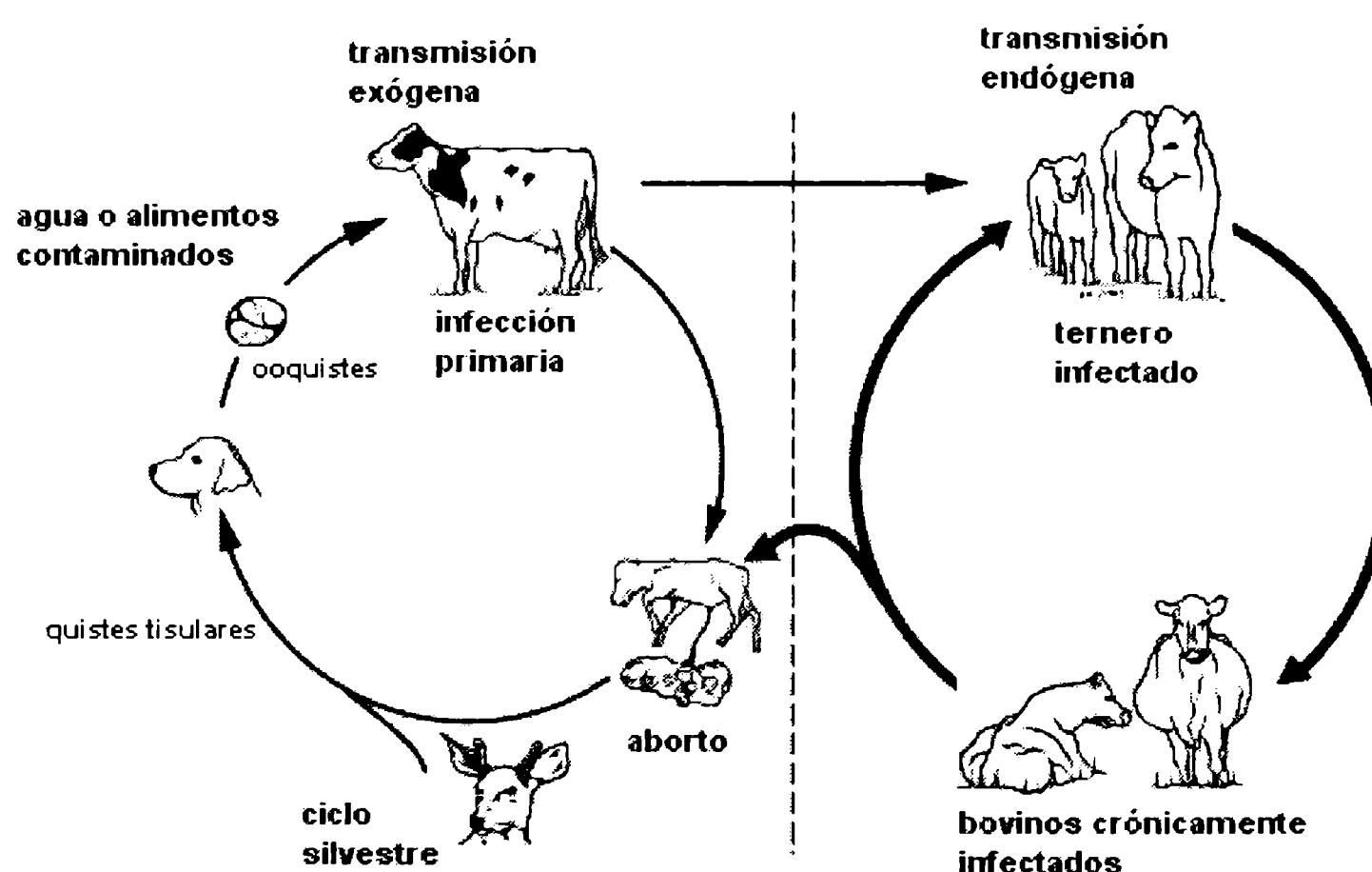
En los bovinos la neosporosis raramente se asocia con signos clínicos, siendo el más común la presencia de abortos. En terneros menores de dos meses infectados transplacentariamente se pueden observar signos de daño neurológico, dificultad para caminar y bajo peso (20, 15). Las extremidades pueden estar flexionadas o hiperextendidas, con ataxia y pérdida de reflejos y de la propiocepción. Ocasionalmente pueden presentarse defectos como hidrocefalia y exoftalmia (15).

Numerosos trabajos confirman la asociación de neosporosis bovina con la presencia de abortos, particularmente en bovinos de tambo (7, 8, 12, 15, 39, 40, 41). Las vacas infectadas tienen mayores probabilidades de abortar que las no infectadas, y este riesgo va disminuyendo en las sucesivas preñeces (36, 37, 42, 43). Se han descrito dos patrones en la aparición de abortos por neosporosis en bovinos: abortos endémicos y epidémicos. En los abortos endémicos se presenta una tasa de abortos mayor al 5 % por año y es persistente a través del tiempo, en los epidémicos ocurre una alta proporción de abortos, hasta del 30 % (7), en un breve período de tiempo (37).

Según sea el momento en que la madre se infecta, la transmisión transplacentaria puede ser exógena, si la infección ocurre durante la preñez, y endógena, si la madre está infectada de manera crónica previamente a la gestación (figura 1). Estos dos tipos de transmisión tienen distintas consecuencias (44). La transmisión

transplacentaria exógena sería el resultado de la primoinfección y se asocia con la aparición de abortos epidémicos al no haber inmunidad previa (44, 45).

Figura 1: Transmisión de neosporosis en bovinos. Los ooquistes son producidos en el hospedador definitivo (perro) y su ingestión por una vaca preñada permite la infección del feto (transmisión transplacentaria exógena) o el aborto. Las terneras que nacen infectadas cuando sean adultas pueden pasar la infección, a su vez, a sus fetos (transmisión transplacentaria endógena). (Adaptado de 23).



El riesgo de transmisión de *N. caninum* al feto se incrementa con la edad gestacional. En bovinos experimentalmente infectados por vía intravenosa a las 10 semanas de gestación la transmisión fue del 83 %, mientras que en los infectados a las 30 semanas la transmisión fue del 100 % (46). Utilizando la vía subcutánea para la infección, la transmisión fue del 50 % a las 10 semanas y del 100 % a las 20 semanas (47, 48, 49). Un patrón similar se ha observado en toxoplasmosis en

humanos, a medida que avanza la gestación es mayor el porcentaje de infección fetal (50).

La edad gestacional en el momento de la infección también es importante para determinar el grado de daño fetal que puede ocurrir. Estudios experimentales indicaron que cuanto más temprano ocurre la infección, más severas son las consecuencias (39, 46, 48, 49, 51).

Otro factor a tener en cuenta en el caso de infecciones transplacentarias es la inmunocompetencia del feto (38). En bovinos infectados con *N. caninum*, la respuesta frente a la estimulación con mitógenos puede montarse alrededor del día 100 de gestación, pero en ese momento aún no pueden hallarse respuestas de anticuerpos o células específicas (49). Al progresar la preñez, la capacidad de producir respuestas efectivas contra el parásito también evoluciona. Alrededor de la mitad de la gestación el feto es capaz de desarrollar una respuesta inmune específica para *N. caninum* con la producción de IFN γ y otras citoquinas (52) que pueden influir en la relación parásito- hospedador y en la resolución de la enfermedad (49).

N. caninum es considerado un patógeno primario en bovinos. La lesión característica que se observa es encefalitis multifocal caracterizada por necrosis e inflamación no supurativa, en algunos casos con la presencia de los parásitos. En la placenta la multiplicación de *N. caninum* causa destrucción focal e inflamación no supurativa, con necrosis de las vellosidades placentarias. Los fetos abortados presentan focos de necrosis e infiltraciones multifocales en muchos tejidos, incluyendo corazón, músculo esquelético, pulmón e hígado. En terneros que nacieron enfermos la principal lesión que se ha observado ha sido encefalomiелitis, con gliosis y manguitos

perivasculares y la presencia de quistes o taquizoítos. También pueden observarse lesiones en el miocardio (23).

1.2.1 Neosporosis bovina en Argentina

La presencia de *N. caninum* en nuestro país fue informada por primera vez por Venturini y col. en el año 1995, a través de la detección de anticuerpos en vacas que habían abortado mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) (53). En 1998 Campero y col. identificaron quistes tisulares en el cerebro de fetos bovinos abortados con la técnica de inmunohistoquímica (54).

En el año 1999 Venturini y col. informaron una prevalencia serológica de 64,5 % en hembras bovinas con antecedentes de abortos provenientes de tambos de las provincias de Buenos Aires y sur de Santa Fe. En ese estudio se utilizó la prueba de IFI con títulos $\geq 1: 25$. En fetos de vacas Holando Argentino de faena se obtuvo una seroprevalencia de 24,4 % (título IFI $\geq 1: 80$), mientras que en fetos provenientes de ganado Aberdeen Angus la prevalencia fue de 4,5 %. Mediante histopatología del cerebro de fetos positivos, se observaron lesiones compatibles con neosporosis como encefalitis no supurativa, manguitos perivasculares, degeneración neuronal y gliosis multifocal, quedando de esta manera establecida la presencia de la vía de transmisión transplacentaria para neosporosis en Argentina (12). Se hallaron además anticuerpos para *N. caninum* en un ratón BALB/c que había sido inoculado con el cerebro de uno de los fetos positivos (55).

En un estudio realizado por Echaide y col. en las provincias de Córdoba y Santa Fe se estableció una prevalencia serológica para neosporosis en bovinos de tambo del

15 al 27,5 % (56). Los mismos autores posteriormente compararon los resultados obtenidos por la prueba de ELISA indirecta y la de Inmunofluorescencia indirecta y demostraron una concordancia entre ambas pruebas (57).

El primer aislamiento de *N. caninum* a partir de bovinos en el país fue realizado por Venturini y col. en el año 2001. Se inoculó cerebro de una ternera prematura que tenía un título de anticuerpos de 1: 800 por IFI, en meriones y ratones BALB/c. Se detectaron quistes en el cerebro de un ratón y un merión por observación en fresco y por histopatología, confirmando la etiología mediante inmunohistoquímica para *N. caninum* (58).

En el año 2001, Basso y col. aislaron por primera vez en Argentina *N. caninum* a partir de ooquistes detectados en heces de un perro infectado naturalmente, denominándose a esta cepa NC-6 Argentina (6).

Venturini y col. determinaron el efecto de la infección por *N. caninum* sobre la ganancia de peso en terneros de feed- lot por comparación del peso de animales seropositivos y seronegativos al inicio y al fin del período de engorde. Los animales negativos tuvieron una ganancia de peso significativamente mayor que los animales positivos (59).

En un estudio epidemiológico realizado por Moore y col. en el año 2002 mediante la utilización de la prueba de IFI a una dilución de los sueros de 1: 200, se detectaron seroprevalencias de 4,7 % en bovinos de cría y 16,6 % en bovinos de tambo sin antecedentes de enfermedad reproductiva, mientras que en vacas que habían abortado las prevalencias fueron de 43,1 % para bovinos de tambo y 18,9 % para bovinos de cría. También hallaron lesiones compatibles con neosporosis en fetos y placentas, confirmando el diagnóstico en 29 de 43 muestras sospechosas (35).

1.2.2 Diagnóstico

La detección de anticuerpos para *N. caninum* en los animales sospechosos indica la exposición al parásito. La técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) fue la primera prueba inmunoserológica usada para la detección de anticuerpos anti- *N. caninum* y se la ha utilizado como prueba de referencia para el desarrollo de otras técnicas (60, 61). Se considera que es adecuada para detectar infección en los animales y para caracterizar epidemiológicamente el rodeo de acuerdo a los valores de los títulos. Además de la prueba de IFI (20, 53, 62, 63, 64), se han desarrollado diversos tipos de ELISA, algunos comerciales (60, 61, 65, 66) y existe una prueba de Aglutinación directa con antígeno formolado (60, 67, 68). Diversos autores han comunicado el desarrollo de pruebas de Western blot, con diferentes preparaciones antigénicas (61, 69, 70).

El examen histológico e inmunohistoquímico de los órganos de los fetos abortados es necesario para un diagnóstico definitivo de neosporosis (21, 54). El aislamiento a partir de la inoculación de cerebros de fetos abortados o de terneros infectados en ratones o meriones también puede utilizarse con fines de diagnóstico, aunque es de baja sensibilidad ya que el tejido inoculado en general está autolizado y por lo tanto los parásitos tienen poca viabilidad (55, 61, 71).

La prueba de PCR juega un rol importante en el diagnóstico y la investigación de *N. caninum* (61, 72). Basso y col. demostraron la utilidad de esta prueba para el diagnóstico etiológico en casos de abortos bovinos, en los cuales el aislamiento del protozoo es muy difícil y la serología negativa no es confirmatoria (73). Se ha utilizado esta técnica para identificar el ADN de *N. caninum* en muestras de tejidos

fetales, líquido amniótico, ooquistes en heces de perros y coyotes, tejidos de hospedadores intermediarios, sangre, leche y semen (61).

1.2.3 Importancia económica

El efecto más importante de la neosporosis en los bovinos es la producción de abortos, con las consecuentes pérdidas económicas que ello ocasiona a los productores. Sin embargo, existen otras pérdidas que no son tan visibles, pero que tienen un impacto real en la economía, como por ejemplo la reabsorción embrionaria, infertilidad, muerte perinatal y descarte prematuro de animales seropositivos por bajo rendimiento en los rodeos. A estas pérdidas hay que sumarle los costos ocasionados por la asistencia profesional, el diagnóstico, la disminución en la producción láctea y el costo del reemplazo de las vacas abortadas (11, 37, 41, 42).

Se ha comprobado la asociación entre seropositividad a *N. caninum* y menor ganancia diaria de peso. En Argentina, en un estudio realizado en animales de feed-lot, Venturini y col. observaron una ganancia diaria de peso significativamente menor en los terneros seropositivos que en los seronegativos (59). Barling y col. también demostraron en ganado de carne las pérdidas económicas causadas por la presencia del parásito (74).

Las pérdidas económicas estimadas en California relacionadas con los abortos por *N. caninum* alcanzarían aproximadamente 35 millones de dólares estadounidenses por año, y se calcula que aproximadamente 40.000 abortos anuales podrían estar asociados a neosporosis. En Australia y Nueva Zelanda, se estima que las pérdidas

ocasionadas por la neosporosis superan los 100 millones de dólares australianos anuales **(13)**. Entre el 20 y 30 % de los abortos bovinos ocurridos en California se deberían a esta parasitosis, **(37)** como así también alrededor del 12,5% de los producidos en Bélgica **(14)** y el Reino Unido **(10)**.

En Argentina, en el año 2002 se estimó que las pérdidas en rodeos lecheros eran de 80 millones de dólares por año considerando la seroprevalencia en estos rodeos, el costo por los abortos, la menor producción láctea y la eliminación de animales seropositivos **(75)**.

1.3 Interacción con la célula hospedadora y antígenos del parásito

N. caninum, al igual que *T. gondii*, es capaz de infectar un gran número de células (76). A pesar de que *in vitro* puede invadir células de origen humano, como fibroblastos o Hela, no hay evidencias concluyentes de que el parásito infecte humanos (21, 23, 77).

Para iniciar la invasión celular, los taquizoítos se orientan perpendicularmente a la superficie celular y, de forma activa, penetran hasta localizarse en el citoplasma, dentro de una vacuola parasitofora. El contacto inicial es mediado, al menos en parte, por los dos antígenos inmunodominantes principales de la superficie del parásito llamados NcSAG1 y NcSRS2 (77, 78), aunque se han encontrado otras proteínas, de pesos de 73 kDa, 80 kDa y 100 kDa, que también participarían en este proceso (77).

La superficie de los taquizoítos de *N. caninum* presenta marcadas diferencias en cuanto a la composición de los carbohidratos con respecto a *T. gondii*. Baszler y col. demostraron que la superficie de *N. caninum* se encuentra glicosilada y descubrieron un epítipo en la proteína superficial de 65 kDa, el cual fue utilizado para desarrollar pruebas de ELISA de competencia (65, 66). Posteriormente, fue demostrada la ausencia de glicanos en la superficie de *T. gondii* y la presencia de los mismos en la superficie y en los gránulos densos de *N. caninum* (77, 79). Se conjetura que la presencia de carbohidratos en las proteínas antigénicas podría tener consecuencias inmunológicas al favorecer el enmascaramiento de epítopos (77).

Una vez que ha contactado con la célula blanco, *N. caninum* comienza a descargar el contenido de sus organelas secretorias (micronemas, roptrias y gránulos densos).

Se sabe poco sobre esta etapa de la invasión en *N. caninum*, pero se ha estudiado ampliamente para *T. gondii* y se supone que los mecanismos serían similares. Las proteasas, como las serinas, juegan un rol principal en el ensamblaje y descarga de las proteínas de micronemas y roptrias, a la vez que un sistema de actina y miosina del parásito es responsable de la penetración (77). La proteasa serina NcSUB1, conocida como NCp65, fue la primera enzima proteolítica en ser descrita en *N. caninum* y se demostró que se generan anticuerpos contra ella (80). Las primeras organelas en descargar su contenido para la invasión son los micronemas, que incluyen las proteínas solubles NcMIC1, NcMIC2 y NcMIC4 y una proteína de membrana NcMIC3 (77, 81). Estas proteínas poseen dominios que interactúan con receptores de las células blanco para la adhesión.

Una vez dentro de la célula, el parásito reside en la vacuola parasitofores, rodeado de la membrana que deriva esencialmente de la membrana de la célula hospedadora. La luz de la vacuola y su membrana son modificadas por los productos secretados de las roptrias y los gránulos densos. Las proteínas de las roptrias están involucradas al principio de la formación de la vacuola parasitofores, por ejemplo ROP2, que se inserta en la membrana de la vacuola y ayuda a reclutar organelas como la mitocondria y el retículo endoplasmático (82). La membrana de la vacuola y ciertas moléculas secretadas por el parásito que la atraviesan, por ejemplo en *T. gondii* ROP2 y GRA5, están involucradas en la manipulación de la célula hospedadora (77). Estas moléculas colaboran en la reducción de la expresión de los genes que codifican las moléculas del MHC de clase II y la presentación antigénica en macrófagos infectados y facilitan la replicación del parásito inhibiendo la síntesis de óxido nítrico (83).

Se ha comprobado que las proteínas de los gránulos densos NcGRA1, NcGRA2 y NcGRA7 son secretadas durante la conversión del estado de taquizoíto a bradizoíto y son incorporadas en la membrana del quiste en formación **(84)**.

1.4 Respuesta inmune

Luego del ingreso de un agente extraño en un organismo se desencadenan los mecanismos de la Inmunidad Innata y la Inmunidad Adaptativa. La respuesta inmune innata constituye la primera línea de defensa, ya que inicia y posteriormente dirige la respuesta adaptativa. Está compuesta por mecanismos como la inflamación, la fagocitosis, el sistema del complemento y las superficies epiteliales, y por células granulocíticas, NK (asesinas naturales), macrófagos y dendríticas, entre otros componentes. Se basa en el reconocimiento de los patrones moleculares asociados a los patógenos mediante receptores presentes en las células. Actúa de manera inmediata ante una agresión, sin necesidad de contacto previo, eliminando los agentes causales en la mayoría de los casos, y no es capaz de generar memoria. Sin embargo, no siempre pueden limitarse los microorganismos con la respuesta innata y en estos casos, luego de cuatro a siete días, se genera la respuesta inmune adaptativa. Las células que están incluidas en esta respuesta son principalmente los linfocitos T y B, que tienen receptores altamente específicos para los agentes extraños y que han evolucionado para aumentar esta especificidad y la protección frente a reinfecciones por el mismo agente.

Estos dos tipos de respuesta se complementan para la eliminación del agente. Los linfocitos requieren para su reconocimiento que el antígeno les sea presentado por otras células, principalmente las dendríticas y los macrófagos, que pertenecen al sistema inmune innato (85, 86, 87).

Los sistemas de defensa innata dependen de receptores codificados por genes de la línea germinal que reconocen estructuras comunes y conservadas de los gérmenes

patógenos (patrones moleculares asociados a patógenos). Se han descrito patrones en una variedad de agentes patógenos, por ejemplo el lipopolisacárido de la pared de las bacterias Gram positivas, proteoglucanos bacterianos, muramildipéptido, ácidos nucleicos virales. Los receptores para estos patrones median una serie de funciones diferentes, muchos son endocíticos, otros son quimiotácticos y otros inducen moléculas efectoras que influyen en el inicio de la respuesta inmune adaptativa. Los receptores de señalización son los llamados receptores semejantes a Toll (TLR) y su unión al ligando del patógeno induce a la activación de factores nucleares que lleva a la producción de citoquinas y quimioquinas, además de la expresión de moléculas coestimuladoras que promueven la respuesta adaptativa (85). El receptor TLR 2 reconoce el glicosilfosfatidilinositol de *Trypanosoma cruzi* y así estimula el eje formado por interleuquina 12- óxido nítrico. Se ha sugerido que estos patrones moleculares están presentes en las estructuras del complejo apical de los Apicomplexa (88).

Las citoquinas son moléculas pequeñas (menores de 25 kDa) que son secretadas por varios tipos celulares como respuesta a un estímulo activador, e inducen respuestas mediante la unión a receptores específicos. Pueden actuar de manera autocrina, afectando el comportamiento de la célula que la libera, o de manera paracrina, afectando a células adyacentes. Las citoquinas secretadas por los macrófagos en respuesta a agentes patógenos constituyen un grupo de moléculas diversas e incluyen interleuquina 1 (IL-1), interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 12 (IL-12), factor de necrosis tumoral α (TNF- α) e interleuquina 8 (IL-8). De ellas, la IL-1 y la IL-12 son importantes para la respuesta adaptativa a patógenos intracelulares, la

primera activa a los linfocitos y la IL-12 induce la diferenciación de las células T $CD4^+$ a células Th1 (85).

Para el inicio de la respuesta inmune adaptativa los linfocitos T deben reconocer, por medio de sus receptores específicos, al antígeno presentado en la membrana de la célula presentadora junto a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Las células T detectan la presencia de patógenos intracelulares porque las células infectadas muestran en su superficie los fragmentos peptídicos derivados de las proteínas del patógeno que han sido procesadas en su interior y son presentadas formando complejos con las moléculas del MHC. En el caso de que el antígeno se presente junto al MHC de clase I, será reconocido por los linfocitos T $CD8^+$ o citotóxicos, cuya función es eliminar las células infectadas mediante un complejo enzimático compuesto principalmente por perforinas y granzimas. Si el antígeno es presentado junto a moléculas del MHC de tipo II es reconocido por los linfocitos T $CD4^+$, colaboradores o helpers. Éstos están especializados para activar otras células mediante la secreción de citoquinas (85, 86, 87).

La respuesta inmune adaptativa contra agentes patógenos está compuesta por citoquinas expresadas a diferentes niveles principalmente por los linfocitos T colaboradores $CD4^+$ (T helpers o Th). Según las células y citoquinas que estén involucradas y que la dominen, esta respuesta puede ser de tipo Th1 o Th2. Las citoquinas involucradas en la respuesta Th1 tienden a inducir la activación de macrófagos para que destruyan los agentes patógenos que albergan en vacuolas, por lo que se relacionan con la respuesta inmune mediada por células, mientras que las citoquinas Th2 inducen la inmunidad mediada por anticuerpos, estimulando a los linfocitos B para la producción de inmunoglobulinas específicas. La mayoría de las

infecciones producen una respuesta combinada celular y humoral, generalmente con el dominio de alguna de ellas (85, 86, 87, 89).

Los estudios realizados sobre los linfocitos Th para clasificarlos en las subpoblaciones Th1 o Th2, según las citoquinas que producen, han sido hechos en su mayoría en ratones (90), pero se ha determinado que en los bovinos existen patrones de citoquinas variados y que difieren en cierta medida de los observados en ratones. La respuesta de células T en bovinos es más heterogénea, aunque igualmente puede predominar una respuesta de tipo Th1 o Th2 (85, 87, 89).

Durante el desarrollo de la respuesta Th1 se expresan como citoquinas dominantes IL-2 (interleuquina 2), IFN γ y TNF- α , mientras que en la respuesta Th2 se producen principalmente IL-4 (interleuquina 4), IL-5 (interleuquina 5) e IL-10 (interleuquina 10). La respuesta predominante de tipo Th1 se produce en infecciones causadas por patógenos intracelulares e induce la producción de IL-12 por los macrófagos y células dendríticas. La IL-12 estimula la producción de IFN γ por los linfocitos Th1 y por las células NK, polarizando la respuesta, aunque también se detectan bajos niveles de IL-4. El IFN γ induce la expresión de genes y funciones celulares, como la producción de oxígeno reactivo e intermediarios del nitrógeno, y la degradación del triptofano en las células fagocíticas profesionales, destinados a eliminar los patógenos intracelulares (49, 85, 87, 91). De esto se deduce que en el desarrollo de la respuesta inmune se produce un amplio espectro de patrones de citoquinas por los linfocitos T, que interactúan entre sí. Se ha demostrado que la IL-10 y la IL-4 son efectivas citoquinas anti-inflamatorias, cuya función de antagonizar al IFN γ protege al organismo de sus efectos tóxicos (91, 92, 93). La IL-10 suprime la proliferación de células y la producción de IFN γ y otras citoquinas, además de inhibir la presentación

antigénica en macrófagos bovinos (89, 94), mientras que la IL-4 causa el fin de la señal producida por la IL-12 y compite con el IFN γ por la unión de los sitios de activación en los macrófagos (95).

En cuanto a la respuesta inmune frente a la infección por *N. caninum*, se han detectado anticuerpos mediante pruebas serológicas y una respuesta inmune de tipo celular basada en la proliferación de células específicas para el antígeno y la producción de citoquinas, principalmente IFN γ , tanto en animales infectados naturalmente como experimentalmente (32, 38, 45, 46, 49, 96, 97, 98).

La efectividad de la respuesta humoral frente a *Neospora* se considera que estaría limitada sólo a las fases del ciclo en que el parásito se presenta en forma de taquizoítos extracelulares. En ratones infectados con taquizoítos se demostró que la cepa de ratones deficiente en la producción de anticuerpos (μ MT) es más susceptible a la infección comparada con los ratones normales (99). Como en el caso de todos los parásitos intracelulares obligados, en la neosporosis la respuesta inmune mediada por células juega un rol principal en la protección frente a la infección (38, 45, 49). Los estudios llevados a cabo para investigar este tipo de respuesta se han basado en los conocimientos previos sobre la respuesta inmune frente a *Toxoplasma gondii*, por la similitud que existe en la morfología, fisiología y ciclo de ambos protozoos, con la salvedad de que los ratones, generalmente utilizados para efectuar estudios, son hospedadores habituales de *T. gondii* y no de *N. caninum*. Sin embargo, la mayoría de las experiencias *in vivo* realizadas para investigar la respuesta a *N. caninum* se han llevado a cabo con modelos desarrollados en esta especie, siendo de gran utilidad los ratones con defectos selectivos genéticos e inmunológicos (20, 91, 95, 99).

Como en el caso de *T. gondii*, la respuesta a *N. caninum* estaría dominada por las citoquinas de tipo Th1, principalmente IL-12 e IFN γ (100, 101). Mediante estudios *in vivo* realizados en ratones y en bovinos se ha demostrado que los hospedadores infectados con *N. caninum* producen inicialmente una respuesta inmune celular de ese tipo destinada a limitar la multiplicación del parásito. Las citoquinas que dominan en esta respuesta son la IL-12 y el IFN γ , así como los anticuerpos del isotipo Ig G2a (46, 49, 93, 96, 99, 102, 103, 104).

Se ha observado que la infección experimental en bovinos adultos produce elevados niveles de IFN γ y una respuesta específica con anticuerpos de isotipo Ig G2, indicando una respuesta de células T helper tipo 1 (46, 96). La importancia del IFN γ en la respuesta inmune protectora frente a la infección por *N. caninum* se demostró en ratones a los cuales se les suprimió la producción de la citoquina, así como en ratones *knockout*, determinados genéticamente para no producir IFN γ . Estos animales fueron incapaces de sobrevivir a la infección con *N. caninum* (95, 102), indicando que esta citoquina es el principal mediador para la supervivencia y resistencia durante la infección aguda. Baszler y col. demostraron que la respuesta de tipo Th1 es protectora en ratones, y que la misma requiere de la producción persistente de IL-12 (95).

El IFN γ producido por los linfocitos T activa las células macrofágicas para que directamente puedan eliminar los parásitos intracelulares. En la respuesta de tipo Th2 la producción de IL-10, que inhibe la producción de IL-12 e IFN γ , facilitaría la multiplicación del parásito reduciendo la producción de NO y otros metabolitos en los macrófagos y alterando el balance hospedador-parásito a favor de este último (38, 49, 93). La producción de IL-10 como inhibidor de la respuesta de tipo Th1 es un

mecanismo utilizado por el sistema inmune para reducir la presencia de niveles tóxicos de las citoquinas inflamatorias, lo que ha sido demostrado en ratones deficientes en la producción de IL-10 infectados con *T. gondii*. La producción de IL-10 y de IL-4 ha sido observada también en la infección por *N. caninum* en ratones (93), sugiriendo la misma función que en el caso de la toxoplasmosis. La relativa susceptibilidad a la encefalitis por *N. caninum* en ciertas cepas de ratones, como C57BL/6 y BALB/c, ha sido asociada a altos niveles en la producción de IL-4; la resistencia de otras cepas se asoció a la baja producción de esta citoquina y a la alta producción de IFN γ (91, 95, 103).

También se demostró mediante estudios *in vitro* la importancia que tiene la presencia de IFN γ , en el marco de la respuesta de tipo Th1, para la protección ante la infección con *N. caninum*. Mediante el tratamiento con esta citoquina en células provenientes de bovinos se inhibió la multiplicación intracelular del parásito (105). Células esplénicas provenientes de ratones infectados produjeron en primer lugar IL-12 y luego IFN γ (102). Fueron detectados niveles significativos de IFN γ , IL-12 y TNF- α en sobrenadantes de células de bazo de ratones infectados experimentalmente con *N. caninum*, estimuladas con un antígeno de taquizoítos lisados (93). Otros estudios demostraron la protección a *T. gondii* en ratones vacunados con la cepa NC-1 de *N. caninum*, y que esta resistencia dependía de las células CD8 $^{+}$, las cuales produjeron grandes cantidades de IFN γ (106).

Los estudios realizados para investigar la respuesta inmune en ratones demostraron que para el control de la infección además de la presencia de IFN γ se requiere la activación de los linfocitos T CD8 $^{+}$ y CD4 $^{+}$ específicos (95, 102, 103, 104, 107). En el caso de la respuesta a la infección por *T. gondii* los linfocitos T CD8 $^{+}$ citotóxicos

juegan un rol principal en la protección, comparado con el rol observado para los CD4⁺ (108). Sin embargo, estudios realizados en ratones y en células de bovinos infectados con *N. caninum* demostraron que en la respuesta protectora serían en cierta medida más importantes los linfocitos CD4⁺ que los CD8⁺ (104, 107). Se observó *in vitro* que los linfocitos CD4⁺ citotóxicos eliminan las células blanco infectadas con *N. caninum* mediante un mecanismo que involucra perforinas y granzimas, causando la lisis celular (107).

Mientras que lo anteriormente mencionado provee indicios sobre la fase adaptativa de la inmunidad, poco es lo que se conoce sobre los mecanismos inmunes innatos en la infección por *N. caninum*. Recientemente se ha demostrado con un modelo *in vitro* que las células NK juegan un rol importante en la inmunidad en los bovinos, ya que fueron capaces de producir IFN γ al ser estimuladas directamente por los taquizoítos y también pudieron eliminar a los fibroblastos infectados por el parásito (109).

1.4.1 Respuesta inmune en la preñez

La preñez presenta una situación especial para el sistema inmune, ya que la madre debe contener al feto, considerado un injerto semi-alogénico, sin rechazarlo. La regulación de las citoquinas durante esta etapa es de fundamental importancia, ya que cualquier desbalance podría afectar a la preñez, ocasionando el aborto.

N. caninum forma parte de un grupo de protozoarios entre los que se incluyen *Plasmodium*, *Toxoplasma* y *Leishmania*. Una característica en común que poseen estos parásitos es la respuesta inmune predominante de tipo Th1 que produce el

hospedador frente a la infección. Se ha sugerido que este tipo de respuesta dominada por las citoquinas llamadas “pro- inflamatorias” (IFN γ , IL-12, IL-2) compromete la viabilidad fetal, la cual requiere una respuesta localizada de tipo Th2 (23, 49, 93). Las citoquinas presentes en la interfase materno- fetal, por lo tanto, juegan un rol crucial para la supervivencia del feto. El trofoblasto fetal produce localmente un ambiente de citoquinas de tipo Th2 (IL-10, IL-4), cuya función es contrarrestar los efectos de las citoquinas Th1 y proteger al feto. Estas citoquinas aumentan también en el plasma materno (49, 93). Estos cambios son inducidos por el aumento de la hormona progesterona, que favorece en los linfocitos T una respuesta de tipo Th2 (38, 49).

El desafío durante la preñez en bovinos infectados consiste en lograr un balance de las citoquinas presentes en la interfase materno- fetal, de manera que la preñez sea viable pero controlando la infección. Si el estímulo de la presencia de parásitos en la placenta es muy intenso, el aumento de citoquinas Th2 no lograría neutralizar adecuadamente al IFN γ y se produciría el aborto por esta causa (23, 38). Por lo tanto, en este caso las consecuencias de la respuesta inmune serían fatales para el feto, pero beneficiosas para la madre, que controlaría la infección. La situación inversa se da cuando las citoquinas Th2 suprimen efectivamente la producción de las citoquinas pro- inflamatorias, permitiendo la viabilidad fetal pero a su vez favoreciendo la infección (23, 45, 49).

Se ha observado en bovinos crónicamente infectados con *N. caninum* que durante la gestación los títulos de anticuerpos específicos presentan fluctuaciones. Como se considera que el título de anticuerpos está relacionado con la exposición antigénica, un aumento del mismo indicaría un incremento en la multiplicación del parásito, por

lo que se supuso que podría haber una reactivación de la infección crónica (38, 49). En ratones infectados de forma crónica con *T. gondii* se comprobó que una disminución en la producción de IFN γ induce la reactivación de la infección (101). En bovinos infectados crónicamente con *N. caninum* se admite que la infección se mantiene controlada por el IFN γ y los linfocitos T CD4⁺ citotóxicos. Hacia la mitad del período de preñez en los bovinos, fisiológicamente ocurre una disminución en la respuesta inmune de tipo Th1 y un aumento en la Th2, destinados a proteger al feto. Debido a la producción de IL-10 e IL-4 derivadas de la placenta se disminuyen los niveles de IFN γ , lo que favorecería la reactivación de la infección latente, con parasitemia e infección fetal. A causa de ello, y según el tiempo de gestación, se producirá el aborto o el nacimiento de un ternero infectado (38, 45, 47, 49).

Estudios realizados en ratones preñados con deficiencia de IL-4 demostraron una disminución en el pasaje transplacentario de *T. gondii* al feto, lo que llevó a pensar que sucedería lo mismo con ratones infectados con *N. caninum*. Mediante la neutralización de la IL-4 de ratones infectados con este parásito y desafiados con taquizoítos en la preñez se demostró que las citoquinas Th1 disminuyen el pasaje transplacentario de *N. caninum*, mientras que la presencia de IL-4 antagonizando estas citoquinas favorece la infección fetal (93, 110).

1.5 Control y profilaxis

Hasta el momento, no hay métodos específicos de control de la neosporosis en un rodeo. Para evitar la transmisión horizontal del parásito se recomienda tomar medidas para impedir la contaminación del agua y el alimento de los bovinos con materia fecal de perros, así como eliminar los fetos abortados, las membranas fetales, placentas y los terneros muertos, para impedir su ingestión por los hospedadores definitivos.

Para evitar la transmisión vertical en los rodeos se ha propuesto que se descarten los bovinos seropositivos y que la reposición se realice con animales seronegativos. Es necesario destacar que este tipo de manejo deberá estar acompañado de las prácticas mencionadas para controlar el riesgo de transmisión horizontal (38, 43, 45, 47, 111).

No se conoce un tratamiento eficaz para los bovinos. Se ha demostrado que la técnica de transferencia embrionaria en vacas no infectadas es efectiva para prevenir la transmisión vertical del parásito (38). La transmisión transplacentaria es un procedimiento primario de adquisición y permanencia de *N. caninum* en un rodeo (34, 112, 113). Una forma de controlar la neosporosis sería disminuir este tipo de transmisión inmunizando a las madres.

Si se tiene en cuenta que los animales infectados crónicamente tienen menos probabilidades de abortar que los animales recientemente infectados y que el riesgo de aborto decrece en las preñeces sucesivas, se deduce que hay un desarrollo de cierto grado de inmunidad natural contra el aborto. Esto ha llevado a la realización de una variedad de estudios destinados a investigar la inmunoprofilaxis para

neosporosis. Se han utilizado modelos en ratones para evaluar distintos tipos de inmunizaciones, aunque también hay estudios realizados en bovinos, con mayor o menor éxito según los casos.

1.5.1 Vacunas

Las vacunas en general se clasifican, según el estado del agente, en vivas y muertas. Las vacunas vivas son las que tienen más probabilidades de inducir respuestas celulares en los animales inoculados, por lo que sería interesante el desarrollo de este tipo de vacunas con cepas atenuadas, similares a la vacuna para toxoplasmosis Toxovac® (49, 114). Como desventajas de las vacunas vivas se cuenta el mayor costo de producción, la corta vida media, la conservación más dificultosa y las posibilidades de que la cepa sufra reversión a la virulencia original. Las vacunas muertas, si bien son más seguras, generalmente no estimulan los mecanismos de la inmunidad celular y pueden carecer de algunos de los antígenos protectores debido al proceso de inactivación o bien por tratarse de antígenos de secreción de los parásitos vivos (38, 49, 86).

Otro punto de interés en el desarrollo de vacunas es la selección de antígenos relevantes para el desarrollo de la respuesta inmune. Estos antígenos pueden ser los reconocidos por los sueros inmunes, que son principalmente los inmunodominantes superficiales, y los reconocidos por las células T CD4⁺ y CD8⁺. También hay antígenos que el parásito utiliza para sobrevivir, por ejemplo en la invasión y el desarrollo intracelular, que son tanto antígenos de superficie como de micronemas, roptrias y gránulos densos (38, 115), tales como NcGRA6 y NcGRA7

(116). La identificación y selección de estas proteínas antigénicas son el objetivo del trabajo de varios grupos de investigadores (117).

Se han realizado estudios inmunizando ratones con taquizoítos de *Neospora* vivos, con taquizoítos no viables y con proteínas parasitarias. Se ha probado la cepa sensible a la temperatura descrita por Lindsay en ratones como una vacuna viva (118). Esta cepa, generada de la cepa NC-1 por mutagénesis química y selección por crecimiento a 32°C, fue inoculada a ratones BALC/c. Después del desafío con la cepa NC-1 los ratones inmunizados tuvieron mayor supervivencia y lesiones significativamente menores que los ratones no inmunizados (118). Kasper y Khan inmunizaron ratones con taquizoítos vivos de *N. caninum* y la respuesta, mediada por linfocitos T CD8⁺, protegió ante un desafío con *Toxoplasma gondii* (106). En ratones BALB/c inoculados con una cepa poco virulenta de *N. caninum* (NCSweB1) se obtuvo una protección parcial ante la cepa NC-Liverpool, de mayor virulencia (119). Lundén y col. inocularon ratones con taquizoítos vivos y lisados con el agregado de adyuvantes (Quil A) o incorporados a complejos inmunoestimulantes (iscoms). Ante el desafío con taquizoítos vivos hubo un incremento de la respuesta celular, medida por IFN γ , que protegió a los ratones inmunizados de la encefalitis (120). La transmisión vertical en ratones BALB/c se previno inmunizándolos con taquizoítos vivos y neutralizando la IL-4 previamente a la inseminación y al desafío durante la preñez (110). También se previno la transmisión vertical por inmunización con un lisado crudo del parásito más el adyuvante ImmuMAXSR[®] (121). En ratones Qs inmunizados con taquizoítos vivos y con un lisado crudo de *N. caninum*, desafiados durante la preñez, se redujo la eficiencia de la transmisión del parásito (122).

Otros estudios en ratones han evaluado la posibilidad de usar antígenos de *N. caninum* expresados en diferentes sistemas. Nishikawa y col. vacunaron ratones con los antígenos NcSRS2 y NcSAG1 en un sistema de virus vaccinia, protegiéndolos de la infección cerebral y fetal (115). En ratones inmunizados con la proteína recombinante NcSRS2 incluida en iscoms se obtuvo la producción de anticuerpos específicos hacia la proteína nativa y hubo una reducción del número de parásitos cerebrales en los ratones (123). La misma proteína nativa, NcSRS2, purificada con anticuerpos monoclonales, también protegió a ratones de la transmisión transplacentaria (124).

Con vacunas de ADN basadas en NcGRA7 y NcHSP33 se obtuvo confirieron entre un 47 y un 54 % de protección contra la transmisión vertical en ratones BALB/c (125). Jenkins y col., incluyendo un adyuvante (CpG) a la vacuna de ADN con NcGRA7, aumentaron el efecto (116). La vacunación de ratones C57BL/6 con la proteína recombinante NcMIC3 expresada y purificada de *E. coli* protegió a los animales de la infección cerebral (126). La inmunización con la proteína NcMIC1 recombinante y en vacunas de ADN no fue exitosa (77). Estos hallazgos en ratones sugieren que los antígenos inmunodominantes podrían ser útiles para la vacunación. En bovinos también ha habido varios intentos de inmunización. Hasta el momento, la única vacuna disponible para *Neospora* es la denominada Bovilis- NeoGuard™ de Intervet. Está compuesta de taquizoítos muertos y el adyuvante Havlogen. Esta vacuna es segura para ser usada en animales sanos (127). En un estudio de campo realizado en Costa Rica se demostró una reducción en el número de abortos (128). Una preparación semejante, con el adyuvante POLYGEN®, indujo proliferación de células mononucleares periféricas *in vitro* y producción de IFN γ (97) pero no previno

la transmisión transplacentaria ante el desafío con taquizoítos vivos en la preñez (98).

Bovinos infectados previamente a la preñez no transmitieron el parásito a sus crías (46, 47) y la inmunización con taquizoítos vivos previa a la preñez indujo suficiente inmunidad para proteger de la infección fetal ante el desafío durante la mitad de la gestación (47). En animales infectados crónicamente se observó cierta protección ante el aborto frente a un desafío exógeno (45) pero no frente a la transmisión transplacentaria endógena (97, 129). En un estudio reciente, Williams y col. observaron que la inmunización con taquizoítos vivos previa a la preñez protegió de fetopatías en bovinos, mientras que en el caso de la inmunización con un lisado de taquizoítos el resultado dependía del adyuvante que se utilizara. Esa protección se asoció con la respuesta inmune celular, no hallándose correlación positiva entre el título de anticuerpos y la protección fetal (45).

Una vacuna efectiva para *N. caninum* debería estimular la respuesta inmune humoral y celular, para lo que se debe determinar qué blancos se utilizarán para la inducción de linfocitos específicos. También es necesario que se estimulen las células de la inmunidad innata, responsables, entre otras cosas, de dirigir correctamente al desarrollo de la inmunidad adaptativa, y por lo tanto de la respuesta anamnésica (38, 49).

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo general:

Estudiar los mecanismos de la respuesta inmune mediada por células en la infección por *Neospora caninum* a través de la utilización de un modelo *in vitro*, con el fin de establecer estrategias para la protección.

1.6.2 Objetivos particulares:

- 1) Obtener células esplénicas (linfocitos, macrófagos, NK) del bazo de bovinos no infectados con *Neospora caninum*.
- 2) Realizar los cultivos de estas células y tratarlas con taquizoítos de la cepa NC-1 de *N. caninum* en tres formas: vivos, inactivados y lisados.
- 3) Determinar la producción de IFN γ en las células esplénicas por la prueba de RT-PCR y en los sobrenadantes de los cultivos infectados por la prueba de ELISA.
- 4) Determinar el efecto protector de los sobrenadantes de las células esplénicas con los distintos tratamientos mencionados en el punto 2) y los controles sobre cultivos de monocitos bovinos.

1.7 Hipótesis más relevantes

- La producción de citoquinas por células infectadas induce la protección contra *N. caninum* impidiendo la multiplicación del parásito.
- Los parásitos inactivados no inducen la producción de citoquinas involucradas en la protección.

2. Materiales y métodos

2.1 Diseño experimental

Se obtuvieron las células esplénicas de bazos de terneros bovinos, negativos a brucelosis y neosporosis de un frigorífico ubicado en los alrededores de la ciudad de La Plata. Las células esplénicas bovinas (CEB) se cultivaron en placas de cultivo de 24 o 96 pocillos de acuerdo al experimento.

Se realizaron cultivos de células VERO (células de riñón de mono verde africano) y se infectaron con taquizoítos de *N. caninum*. Los taquizoítos se utilizaron para los tratamientos sobre CEB, vivos o infectantes (I), inactivados (F) y lisados (S).

Se recogieron los sobrenadantes de los cultivos de las células esplénicas sometidas a diferentes tratamientos.

Se cultivaron células BM (monocitos bovinos) para utilizar en el experimento 2.

Experimento 1: Efecto del tratamiento de CEB con taquizoítos de *N. caninum* vivos (I), inactivados (F) y lisados (S).

Las células se cultivaron en placas de 24 o 96 pocillos y se dividieron en grupos de pocillos como se indica en la figura 2.

En parte de los pocillos se colocaron cubreobjetos redondos estériles para obtener CEB adherentes y analizar su morfología.

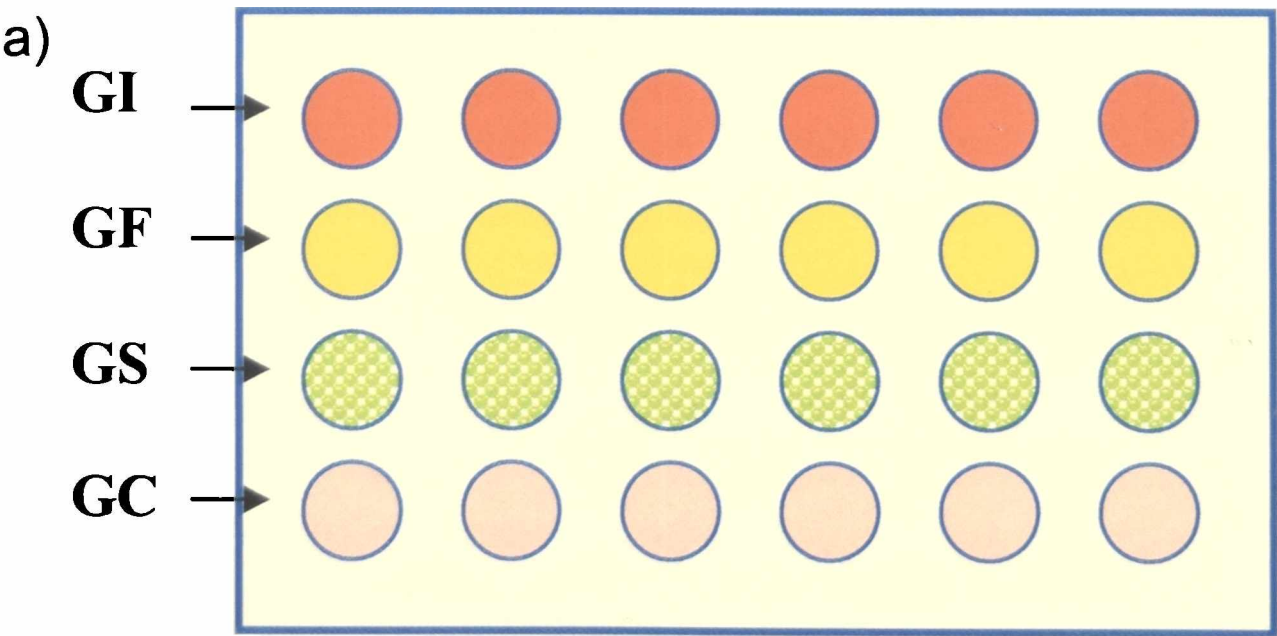
Brevemente

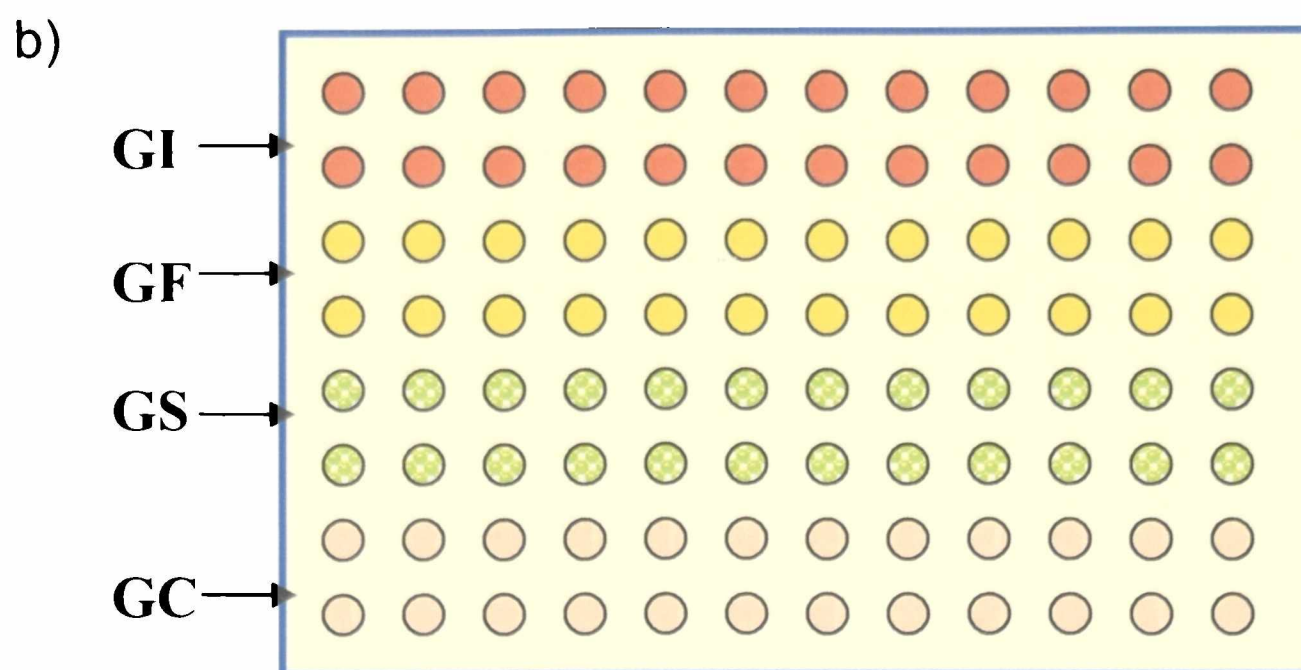
Grupo	Tratamiento
GI	CEB + I
GF	CEB + F
GS	CEB + S
GC	CEB control sin tratar

Se probaron diferentes concentraciones de taquizoítos vivos con respecto al número de células esplénicas cultivadas, en las siguientes relaciones: 1 taquizoíto/ 1 célula, 1 taquizoíto/ 2 células y 1 taquizoíto/ 4 células, seleccionándose esta última relación luego de la observación microscópica de los cultivos infectados.

Los taquizoítos inactivados se utilizaron en la misma concentración que los vivos, y el lisado a la concentración de 20 µg de proteína/ ml.

Figura 2: distribución por tratamientos en células esplénicas cultivadas en placas de 24 (a) y de 96 pocillos (b). **GI**: estimuladas con taquizoítos de *N. caninum* vivos. **GF**: estimuladas con taquizoítos inactivados. **GS**: estimuladas con taquizoítos lisados. **GC**: controles sin estimular





Luego de la infección, las células se cultivaron a diferentes tiempos, hasta un máximo de 10 días, en estufa a 37° C y con 5 % de CO₂.

Experimento 2: Efecto de los sobrenadantes de los cultivos de CEB sometidas a los diferentes tratamientos del Experimento 1 en la infección *in vitro* con *N. caninum*.

Se cultivaron células BM en placas de 24 pocillos y se trataron con los sobrenadantes provenientes de los diferentes tratamientos recogidos a los 3 y 7 días de cultivo.

Se colocaron cubreobjetos redondos estériles en la base de los pocillos para obtener el porcentaje de lisis relacionado con cada tratamiento utilizando el programa Image Pro Plus y comparando los resultados con la prueba de χ^2 (ji – cuadrado).

Experimento 3:

Detección de INF γ en los sobrenadantes de **GI**, **GF**, **GS** y **GC** de CEB mediante una prueba de ELISA de captura comercial (Bovigam®).

Experimento 4:

Detección del ARNm para INF γ de las CEB mediante una prueba de RT-PCR comercial (Quiagen One-Step RT-PCR kit). Las células esplénicas se cultivaron y se trataron como se indica en el experimento 1 (**GI**, **GF**, **GS** y **GC**). Luego de 4 y 6 días de tratamiento se obtuvieron las CEB para la prueba de RT-PCR.

2.2 Cultivos de células Vero (células de riñón de mono verde africano) y BM (monocitos bovinos)

Se mantuvieron células de la línea Vero para infectarlas con el fin de obtener los taquizoítos de *N. caninum*, y células BM para realizar la prueba de los sobrenadantes. Para ello, brevemente, se descongelaron células que se mantenían criopreservadas en nitrógeno líquido y se cultivaron en botellas de 25 cm² (Greiner Bio-One, Alemania) con medio RPMI 1640 complementado con glutamina (PAA Laboratories, Austria) y suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) (PAA Laboratories, Austria) y 1 % de una solución de antibióticos y antimicóticos (AA) (10.000 unidades de penicilina/ ml, 10 mg de estreptomicina/ ml y 0,25 mg de fungizona/ ml) (PAA Laboratories, Austria). Todos los cultivos se realizaron a 37° C y en una atmósfera con 5 % de CO₂ (estufa para cultivos Brand Bio-Labo, Japón). Una vez formada la monocapa, las células se mantuvieron con el mismo medio, pero suplementado con 3 % de SFB (PAA Laboratories, Austria). A los 7 días de cultivo, las monocapa celular fue sometida a la acción de tripsina-EDTA (PAA Laboratories, Austria) en solución tampón de fosfatos de pH 7,2 (PBS) y a 37° C, con el fin de

desprender las células adheridas y separarlas. La suspensión celular se distribuyó en nuevas botellas de cultivo con medio con 10 % de SFB, continuando de esta manera los cultivos durante la ejecución del presente trabajo. El protocolo detallado se encuentra en el Anexo.

2.3 Obtención y cultivo de células esplénicas bovinas (CEB)

En la primera etapa del plan se realizó el cultivo de células esplénicas de ratones BALB/c, para poner a punto la técnica y observar la sobrevivencia de estas células en cultivo. Posteriormente, la técnica se llevó a cabo con bazo de terneros determinando la viabilidad de estas células en cultivo.

Se obtuvieron bazo y muestras de sangre de terneros de la raza Aberdeen Angus en un frigorífico ubicado en los alrededores de La Plata. Los materiales fueron mantenidos en condiciones de refrigeración desde la obtención en el frigorífico y hasta el momento de su procesamiento en el laboratorio, el cual se realizó dentro de las tres horas de su extracción.

Paralelamente se obtuvieron muestras de sangre de los animales seleccionados, las que se centrifugaron a 1200 g (centrífuga KUBOTA 5700, Japón) para obtener los sueros, a los que se realizaron las pruebas de Inmunofluorescencia indirecta para *N. caninum* y de Angus y Barton (BPA) para *Brucella abortus* (protocolos en el Anexo). Se utilizaron los bazo de los animales que fueron serológicamente negativos para ambas pruebas, considerando positivo en el caso de *N. caninum* un título mayor o igual a 1: 25.

En forma estéril (flujo laminar Hitachi, Japón), se extrajo la cápsula del bazo y se obtuvo un trozo de pulpa de aproximadamente 2 cm de lado. Se trituró la pulpa con tijeras de punta curva en una cápsula de Petri estéril y se agregó PBS estéril. El triturado se filtró a través de una malla de acero inoxidable de 53 μ con la ayuda del émbolo de una jeringa y con el agregado de medio de cultivo RPMI 1640. Se recogió el producto filtrado en un tubo de centrifuga de 50 ml de capacidad, colocando medio de cultivo en la placa de Petri y en la malla. La suspensión se centrifugó a 300 g durante 10 minutos en una centrífuga refrigerada, a 6° C (KUBOTA 5700, Japón). Para la lisis de los glóbulos rojos, se descartó el sobrenadante y el culot fue resuspendido en 10 ml de cloruro de amonio al 0,83 % (NH_4Cl) previamente calentado a 37° C. Se mezcló mediante pipeteo repetidas veces y se centrifugó a 300 g por 10 minutos y a 6° C. El culot se resuspendió en medio RPMI 1640 suplementado con 3 % de SFB y 1 % de AA para realizar dos lavados. Luego el culot se resuspendió en 5 ml de medio RPMI con 10 % de SFB y 1 % de AA y se procedió a cuantificar las células blancas en una cámara de Neubauer. Previamente al conteo la suspensión se diluyó 1: 2 con el colorante Azul Tripán al 0,5 % y se contaron sólo las células viables.

En principio se utilizó una concentración de 1×10^6 células/ ml en medio RPMI 1640 con 10 % de SFB y 1 % de AA, preparado como se indica en el punto 2.1. Se utilizaron placas para cultivo de células con 24 pocillos (Linbro®, Flow Laboratories, EE.UU.) colocando en cada pocillo un ml de la suspensión celular. Previamente se habían colocado cubreobjetos redondos en el fondo de los pocillos, para obtener las células adherentes del bazo, teñirlas y observarlas al microscopio.

Posteriormente, debido a los resultados obtenidos, se incrementó la concentración celular a $1,5 \times 10^7$ células/ ml de medio, que se cultivaron en placas de 24 y de 96 pocillos (Linbro®, Flow Laboratories, EE.UU.).

Los cultivos se realizaron en estufa (Brand Bio-Labo, Japón) a 37° C y con una atmósfera con 5 % de CO₂.

2.4 Cultivo y obtención de taquizoítos de N. caninum

Se utilizaron cultivos de células Vero de tres días para infectar con taquizoítos de *N. caninum* de la cepa Nc-1, cedida por el Dr. J. P. Dubey y mantenida en el Laboratorio de Inmunoparasitología, F.C.V., U.N.L.P. Para la infección se utilizaron taquizoítos provenientes de cultivos de células Vero infectados siete días antes. Los cultivos se mantuvieron como se indica en el punto 2.1. Se realizaron pasajes semanales de taquizoítos durante el desarrollo del plan de trabajo.

Cuando aproximadamente el 50 % de la monocapa había sido lisada por los parásitos, se descartó el medio de cultivo y se agregó PBS. La monocapa se levantó con un raspador estéril (Greiner Bio-One, Japón) y la suspensión fue recogida en un tubo de centrifuga de 50 ml. Para causar la lisis de las células que hubieren quedado, la suspensión se pasó repetidas veces por agujas de diferente tamaño, en el siguiente orden: 18 G, 21 G, 22 G, 25 G y 27 G. Se comprobó la ruptura total de las células por observación directa en microscopio óptico a 400 aumentos. Luego se realizaron dos lavados con medio de cultivo y los taquizoítos obtenidos se contaron en una cámara de Neubauer. La dilución deseada se realizó con medio de cultivo con 10 % de SFB y 1 % de AA.

2.5 Obtención de taquizoítos inactivados

Los taquizoítos de *N. caninum* se obtuvieron como se detalla en el punto 2.3. Para inactivarlos, se los sometió a la acción de formol (formaldehído, Merck) combinado con calor (37° C). Se probaron diferentes concentraciones del formol: 0,1 %, 0,3 %, 0,5 % y 1 %, y se dejaron actuar a 37° C. Se fue observando la acción sobre los taquizoítos, comprobando su viabilidad con el colorante azul Tripán 0,5 % a los 15 minutos, a los 30 minutos, a la hora y dejándolos toda la noche. Se seleccionó la concentración de formol de 1 %, durante una hora a 37° C. Luego se realizaron cinco lavados de los taquizoítos inactivados con PBS estéril y se llevaron a la concentración final con medio RPMI 1640 con 10 % de SFB y 1 % de AA.

2.6 Preparación del lisado de *N. caninum*

Los taquizoítos provenientes de cultivos en células Vero se recogieron de la misma manera que en el punto 2.3, llevándolos a una concentración de $5,5$ a $6,5 \times 10^7$ / ml, en PBS estéril. La suspensión se sometió a 5 ciclos de sonicado de 30 segundos cada uno, a una potencia de 3, en hielo. La total ruptura de los taquizoítos se comprobó por observación en microscopio óptico a 400 aumentos. En los primeros ensayos, se midió la concentración proteica del lisado por el método de Lowry utilizando albúmina bovina como testigo, en la cátedra de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Veterinarias. Posteriormente, se utilizó un equipo para la medición de concentración proteica por el método de Bradford (Bio-Rad protein assay, Bio-Rad

Laboratories, EE.UU.), que emplea el colorante Coomassie blue como reactivo y albúmina bovina como testigo (protocolo detallado en el Anexo).

El lisado se llevó a una concentración de 20 µg de proteína/ ml, como lo menciona la bibliografía (97) y se realizó la caracterización proteica del mismo mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Para ello, el lisado se suspendió en buffer de muestra y se calentó durante 5 minutos a 100 °C. Para la corrida electroforética se utilizó un equipo BioRad Mini- Protean II en un sistema de buffer discontinuo y en condiciones de reducción. Se prepararon los geles según el protocolo que se detalla en el Anexo, el gel de siembra se hizo al 4 % y el de corrida al 12,5 %. Básicamente, se elaboraron las soluciones de acrilamida- bisacrilamida, buffer Tris pH 8,8 (para el gel de siembra) y pH 6,8 (para el gel de corrida), SDS al 10 %, y se les agregó en las proporciones indicadas el Temed y el persulfato de amonio al 1 %. Se colocó el peine y se esperó a que ocurriese la polimerización. Luego se sembraron 15 µl de antígeno en cada calle del gel y 5 µl del marcador de bajo peso molecular (Pharmacia), el cual contiene las siguientes proteínas: Fosforilasa b 94 kDa, Albúmina 67 kDa, Ovalbúmina 43 kDa, Anhidrasa carbónica 30 kDa, Inhibidor Tripsina 20,1 kDa y α -Lactalbúmina 14,4 kDa.

Se corrió a 50 mA de corriente continua durante 60 minutos.

Para visualizar las bandas se utilizó tinción de plata, la cual aumenta la sensibilidad comparada con la tinción de rutina de Coomassie blue. La técnica de tinción de plata fue suministrada por el Dr. Andrew Hemphill, del Instituto de Parasitología de la Universidad de Berna, Suiza. El protocolo se encuentra en el Anexo.

2.7 Recolección de los sobrenadantes de cultivos y tratamientos sobre células BM

Los sobrenadantes de las células esplénicas se recogieron en tubos tipo eppendorf estériles y se centrifugaron a 10.000 g durante 5 minutos.

Luego, se dividieron en tres alícuotas: una de ellas se utilizó para la prueba sobre células BM (experimento 2), la segunda para la detección de IFN γ con la prueba de ELISA (experimento 3) y la tercera parte se conservó a -20 °C. De los sobrenadantes que se colocarían en cultivos de células BM, una fracción se concentró con tubos de celulosa (Viskase Sales Corp, Japón) y polietilenglicol 6000 (PEG 6000) (Merck) previamente a su utilización (protocolo en el Anexo).

En la etapa de prueba, los sobrenadantes se recogieron a las 48 hs. Luego se probaron diferentes períodos de cultivo: 3, 7 y 10 días. Para el ensayo sobre las células BM se utilizaron los sobrenadantes recogidos a los 3 y 7 días de cultivo.

Prueba de los sobrenadantes sobre las células BM

Los sobrenadantes de las CEB (GI, GF, GS y GC) se colocaron sobre cultivos de células BM de 72 horas, los cuales se desafiaron con taquizoítos de *N. caninum*. Las células se observaron con microscopio invertido durante la prueba para detectar cambios en su morfología.

Para ello, se cultivaron en placas de 24 pocillos (Linbro®, Flow Laboratories, EE.UU) a las que se les había colocado previamente en el fondo de los pocillos cubreobjetos redondos. Cada placa se dividió en igual cantidad de pocillos para cada tratamiento

y para los controles: sin infectar pero con sobrenadante (controles de sobrenadante) y sin sobrenadante pero infectados (controles de infección).

Los sobrenadantes se prepararon diluyéndolos 1:2 con medio de cultivo suplementado con 10 % de SFB como se indica en el punto 2.1. Para los controles de infección se utilizó medio de cultivo con 5 % de SFB y 1 % de AA.

Las células se infectaron con taquizoítos de *N. caninum* obtenidos como se detalla en el punto 2.3, en una relación de 1 taquizoíto/ 4 células BM, y en presencia de los sobrenadantes de las CEB.

Los cultivos se realizaron en estufa a 37° C y con 5 % de CO₂, hasta que se observó la presencia de focos de lisis en la monocapa celular, lo que ocurrió entre los cinco y seis días de cultivo.

Las células fueron observadas con microscopio invertido durante todo el procedimiento.

Se recogieron los cubreobjetos del fondo de los pocillos, se los lavó con PBS, se los fijó con metanol y se procedió a teñirlos con Giemsa. Los cubreobjetos se montaron invertidos en portaobjetos con Bálsamo de Canadá sintético (BioPack, Argentina). Luego de la observación microscópica, se analizaron las áreas de lisis con el programa Image Pro Plus. Se tomaron fotografías de diferentes áreas de cada cubreobjeto a 40 x en microscopio óptico. De cada área se comparó la superficie lisada con respecto a la superficie total, obteniendo el porcentaje de área lisada. Se realizó el procedimiento para los cubreobjetos provenientes de cada tratamiento y controles.

Los efectos de los sobrenadantes de cada tratamiento sobre las células BM se compararon mediante la prueba estadística de χ^2 (ji- cuadrado), utilizando los promedios de áreas lisadas (programa Epidat 3.1).

2.8 Recolección de las CEB

Una vez finalizado el tratamiento, se recogieron las células esplénicas de las placas correspondientes, previo raspado del fondo de los pocillos, en tubos tipo eppendorf en forma estéril para la prueba de RT-PCR.

Los cubreobjetos que se habían colocado en las placas de 24 pocillos se levantaron a los siete días de la incubación, se tiñeron como se indica en el punto 2.7 y se observaron al microscopio óptico.

2.9 Prueba de RT-PCR

Con el fin de determinar si las CEB sometidas a los diferentes tratamientos produjeron $\text{IFN}\gamma$, se investigó la presencia de ARN mensajero (ARNm) para esta citoquina en dichas células (experimento 4). Se obtuvieron CEB que fueron cultivadas y sometidas a los mismos tratamientos que se mencionaron en el punto 2.6. A los cuatro y seis días del cultivo, se recogieron las células despegándolas de la placa con un raspador y se conservaron en tubos eppendorf estériles, cada uno con aproximadamente 3×10^6 células. Los tubos fueron centrifugados a 1200 g durante 5 minutos y el pellet fue resuspendido en buffer de lisis (RNeasy Kit- QUIAGEN). Las células se lisaron por pasajes por agujas de 20 G y con el buffer de

lisis provisto y se extrajo el ARN total mediante un equipo comercial (RNeasy Kit- QUIAGEN), siguiendo las indicaciones del fabricante (protocolo detallado en el Anexo).

Para la prueba de RT-PCR se utilizó un equipo comercial (QUIAGEN One- Step RT-PCR kit), el cual tiene incorporadas las enzimas necesarias para la transcripción: la Transcriptasa Reversa que actúa al principio del programa y con temperatura de 50° C, y la HotStar Taq DNA Polimerasa que actúa a mayor temperatura, inactivándose la transcriptasa reversa. Se utilizaron en primera instancia los primers descritos por Takeda y col. (92) para IFN γ bovino, cuya secuencia es:

5'-CTGTGGGCTTTTGGGTTTTTCTG-3'

5'- CTCTTCCGCTTTCTGAGGTTAGA-3'

Estos primers dan como resultado un amplificado de 426 pb. La compatibilidad de estos primers incluye en primer lugar IFN γ de *Bos taurus*, y luego otras secuencias compatibles como IFN γ de otros animales y ADN de microorganismos (Gene Bank, Blast).

Posteriormente, se decidió realizar la prueba de RT-PCR con los primers para IFN γ bovino utilizados por Shafer-Weaver y col. (130) y cuya secuencia es:

5'-AGCCAAATTGTCTCCTTCTACTTC-3'

5'-CTGACTTCTCTTCCGCTTTCTG-3'

Los primers mencionados dan como resultado un amplificado de 261 pb.

Para la prueba de RT-PCR, se preparó el mastermix para cada muestra con 2 μ l de los nucleótidos, 2 μ l de la mezcla de enzimas, 0,3 μ l de cada primer, 10 μ l de buffer,

2,5 μ l de $MgCl_2$, 34,4 μ l de agua y 1 μ l del ARN extraído y se llevó al termociclador PCR Sprint (Thermo, Electron Corporation). El programa de ciclado comenzó con una temperatura de 50° C durante 30 minutos para realizar la transcripción reversa. Luego se aumentó la temperatura a 94° C por 15 minutos activándose la enzima HotStar Taq DNA Polimerasa e inactivándose la Transcriptasa Reversa. Los ciclos de amplificación se fueron modificando en número y en la temperatura de alineación (*annealing*), para aumentar la especificidad de la técnica. Se comenzó con 50° C y en sucesivas pruebas se aumentó la temperatura de annealing a 54° C y 58° C. El número de ciclos se fijó en 40, luego de probar con menor cantidad. Cada ciclo incluyó un minuto a 94° C para la desnaturalización, un minuto a temperatura de alineación y un minuto a 72° C para la extensión. La amplificación final se realizó a 72° C durante cinco minutos.

Luego de la RT-PCR, para visualizar los amplificados obtenidos, se corrieron las muestras en geles de poliacrilamida al 6 %, sembrando agua como control negativo y los marcadores de pares de bases (Ladder de 50 pb O'range ruler Fermentas y de 100 pb EZload molecular ruler) y se colorearon las bandas de amplificados con la tinción de nitrato de plata. Los protocolos detallados se encuentran en el Anexo.

2.10 Prueba de ELISA (enzimoinmunoensayo) para $IFN\gamma$

Para determinar la concentración de $IFN\gamma$ en los sobrenadantes de las células esplénicas se utilizaron pruebas de ELISA de captura comerciales específicas para esta citoquina de origen bovino. En primer lugar, se probó el equipo BioX gamma

interferon test kit (BioX, Bélgica). Luego se utilizó otra prueba comercial, Bovigam™ (CSL, Australia). Los fundamentos de ambos equipos son similares.

En ambos casos, se utilizaron los sobrenadantes sin diluir y los testigos positivos y negativos provistos por el equipo. El protocolo detallado de la prueba se encuentra en el Anexo. Brevemente, en cada placa donde se hallaban adsorbidos anticuerpos anti- IFN γ , se agregaron 50 μ l del diluyente y la misma cantidad de las muestras (sobrenadantes de CEB GI, GF, GS y GC) y controles. Se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron seis lavados con la solución de lavado, se agregaron 100 μ l del conjugado anti- IFN γ bovino marcado con la enzima peroxidasa. Se incubó nuevamente de la misma manera que la vez anterior y se lavó seis veces. La reacción se reveló con 100 μ l de la solución del sustrato específico para la enzima (H₂O₂) y el cromógeno (TMB: 3, 3', 5, 5'- tetrametil bencidina). Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y se agregaron a cada pocillo 50 μ l de la solución de frenado (0,5 M ácido sulfúrico). Las densidades ópticas se determinaron utilizando un espectrofotómetro para placas de ELISA (Labsystems Multiskan MS, Finlandia) con el filtro de 450 nm y se compararon los resultados de las muestras con los de los testigos para determinar la concentración del IFN γ en los sobrenadantes.

Además del ELISA que se realizó sobre los sobrenadantes, se incubaron las células esplénicas directamente en la placa del equipo de ELISA comercial Bovigam™, con la misma distribución de pocillos por tratamiento que en las placas de 96 pocillos de la figura 2. La incubación se realizó de la misma manera que en las placas de cultivos celulares, durante un tiempo de cinco días. Posteriormente, se realizó en la misma placa la prueba de ELISA como se describió anteriormente.

3. Resultados

3.1 Inactivación de taquizoítos

Como se indicó anteriormente, se probaron diferentes concentraciones de formol a 37° C sobre taquizoítos vivos de *N. caninum*, siendo la más efectiva la del 1 %. La inactivación de los taquizoítos se controló con la utilización del colorante Azul Tripán.

3.2 Caracterización del lisado de taquizoítos por la técnica de SDS-PAGE

En el gel teñido con sales de plata se revelaron bandas proteicas de 116, 94, 69, 66-67, 65, 37, 30 y 26 kDa.

3.3 Obtención y cultivo de células esplénicas

Las CEB se mantuvieron en cultivo hasta 10 días, determinándose su viabilidad con el colorante Azul Tripán. Se observó que a los siete días el 100 % de las células en cultivo estaban vivas, posteriormente fue disminuyendo este porcentaje.

3.4 Experimento 1

En los primeros ensayos se cultivaron las células esplénicas estimuladas con los diferentes tratamientos durante 48 hs, extendiendo luego el período de cultivo a 3, 7 y 10 días debido a los resultados obtenidos en la prueba de ELISA.

Cambios en la morfología celular: A los siete días de incubación, se observaron los cubreobjetos teñidos con Giemsa y se advirtieron las siguientes diferencias entre las células adheridas al vidrio sometidas a los diferentes tratamientos:

- **GI:** Se observaron menos de 10 células por campo del microscopio de 100 aumentos. Las células presentaron prolongaciones en su citoplasma y algunos taquizoítos en su interior. La morfología correspondió a la característica de células activadas, de mayor tamaño y con citoplasma vacuolado. (figura 3)
- **GF:** Se contaron más de 100 células por campo de 100x, hallándose zonas de monocapa casi completa. No presentaron morfología compatible con activación celular. (figura 4)
- **GS:** Se observaron, en promedio, alrededor de 40 células aisladas por campo de 100 aumentos. Presentaron morfología propia de células activadas, de gran tamaño, con largas prolongaciones y vacuolas citoplasmáticas. (figura 5)
- **GC:** Las células adherentes se presentaron formando una monocapa casi completa, sin ningún grado de activación apreciable. (figura 6)

Figura 3: células esplénicas estimuladas con taquizoítos vivos de Neospora caninum (GI) (400 x). Tinción: Giemsa.

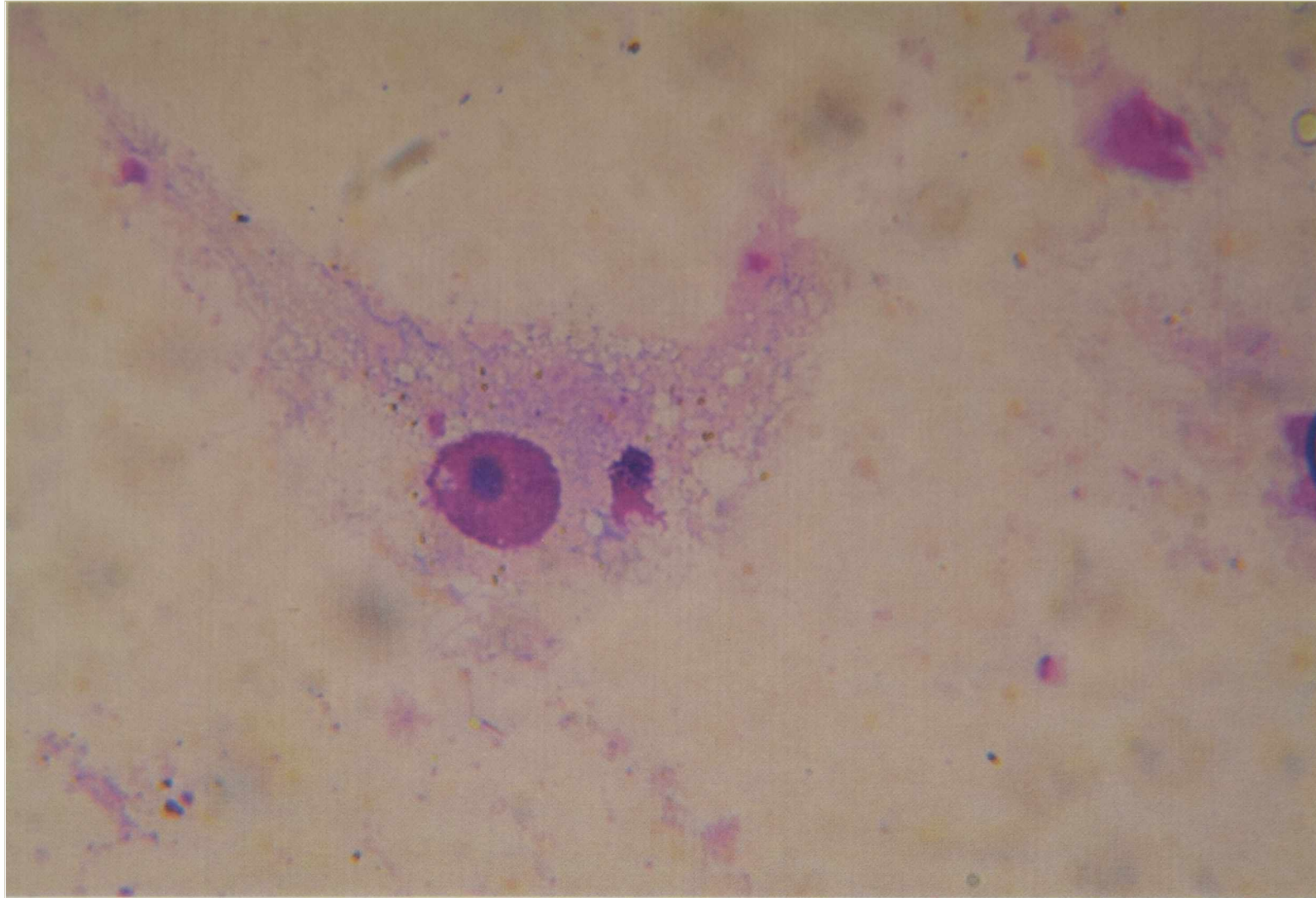
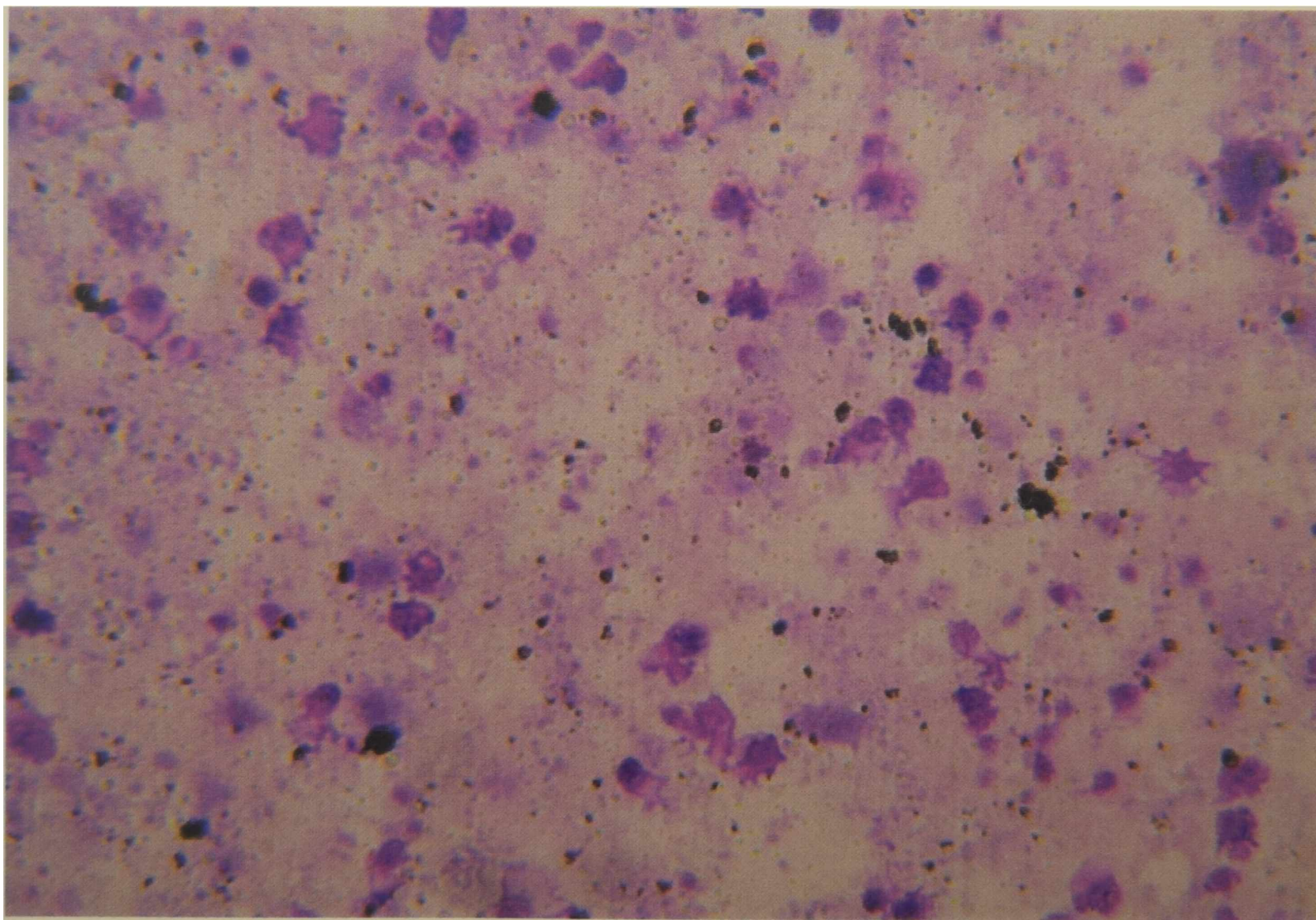


Figura 4: células esplénicas estimuladas con taquizoítos inactivados de Neospora caninum (GF) (400 x). Tinción: Giemsa.



*Figura 5: células esplénicas estimuladas con antígeno realizado con taquizoítos de *Neospora caninum* lisados (GS) (400 x). Tinción: Giemsa.*

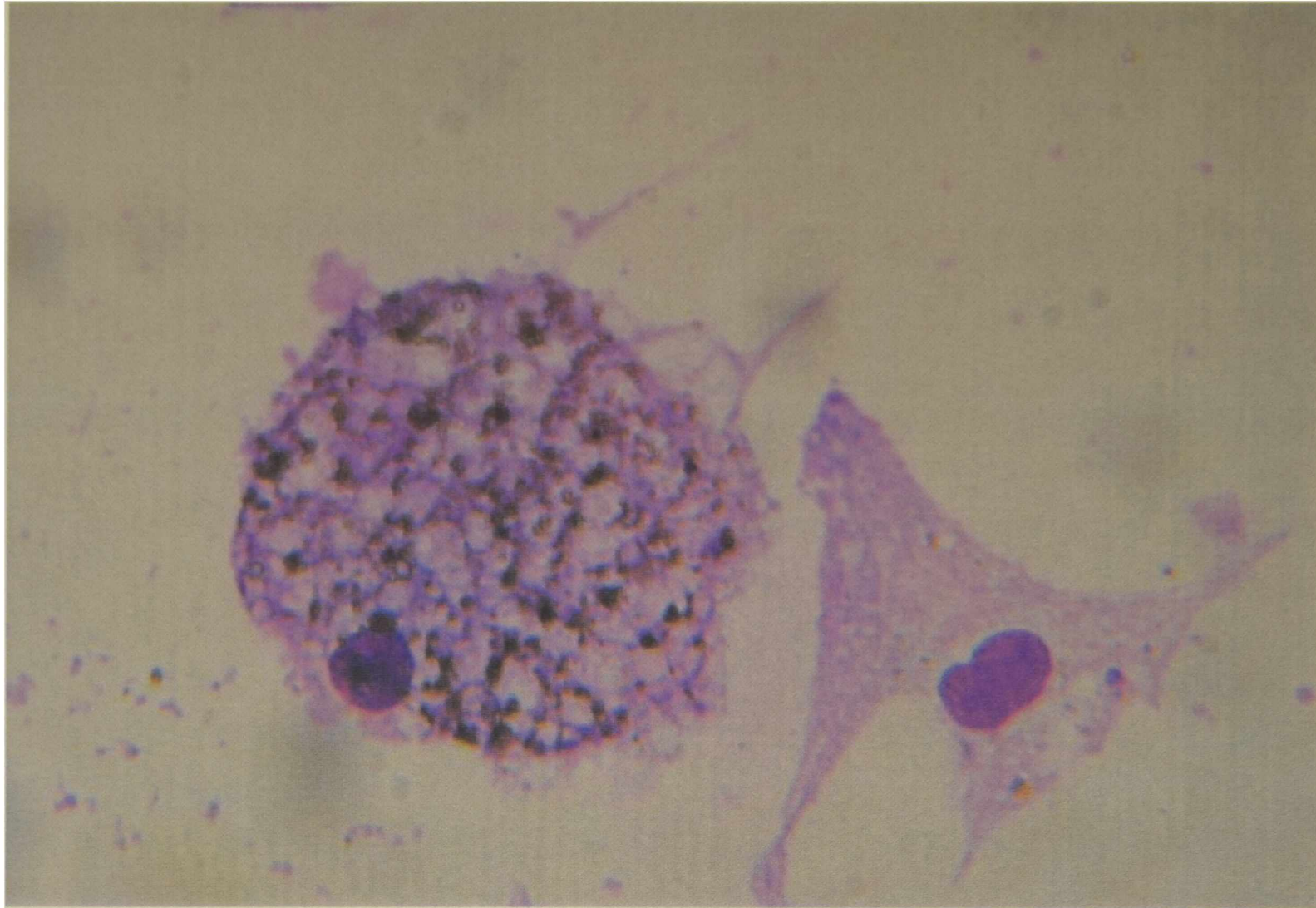
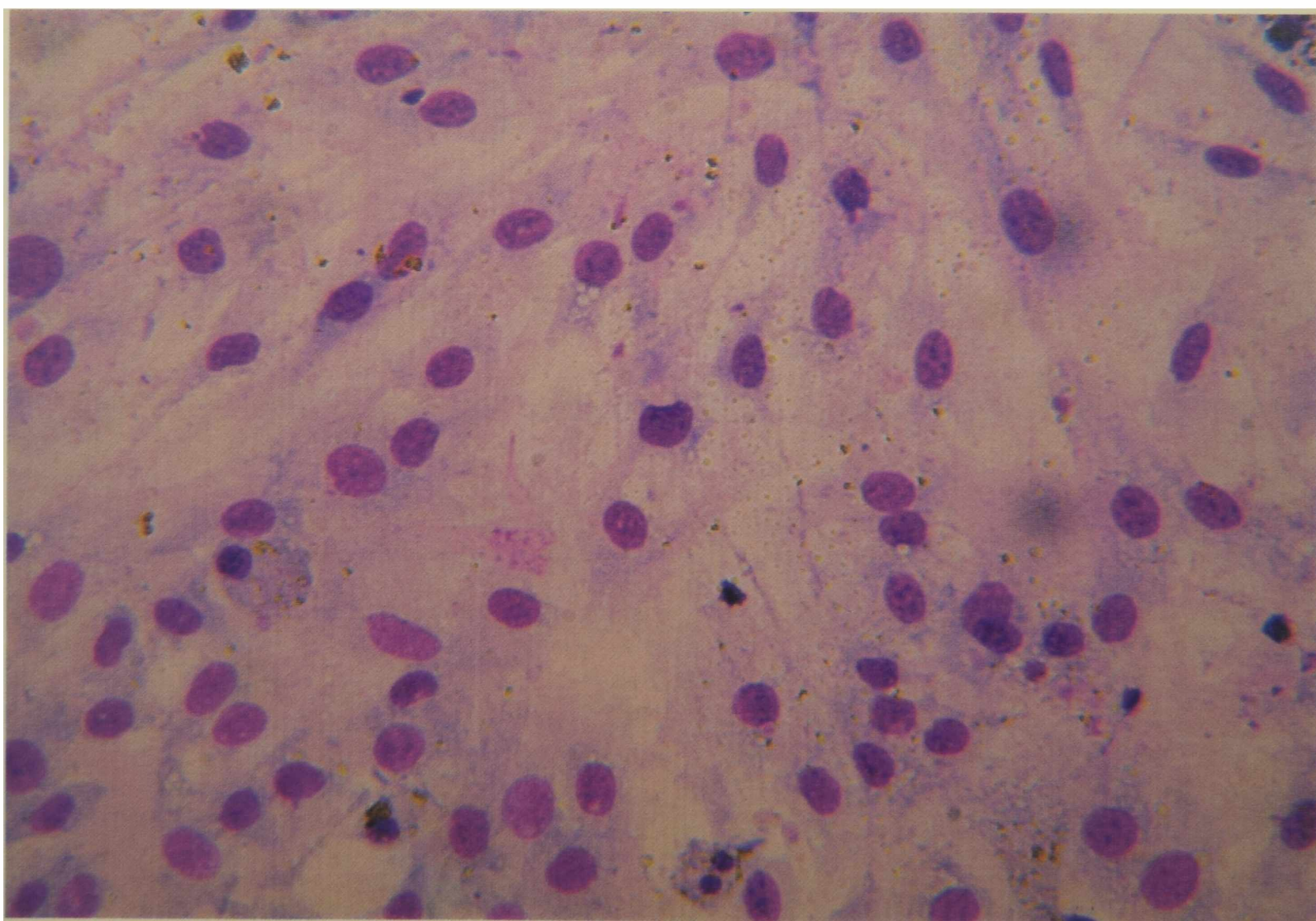


Figura 6: células esplénicas sin estimular (GC) (400 x). Tinción: Giemsa.



3.5 Experimento 2

En las células BM que recibieron los sobrenadantes concentrados con PEG 6000 no se observaron diferencias con respecto al crecimiento e infección de las células tratadas con los sobrenadantes sin concentrar.

En las células tratadas con sobrenadantes de CEB de 48 hs y de tres días de cultivo no se observaron diferencias en cuanto a la infección con respecto a los controles, tanto en la observación de los cultivos con microscopio invertido como en la observación de los cubreobjetos redondos teñidos con Giemsa.

Se observaron diferencias en las células BM que recibieron los sobrenadantes de GI, GF y GS de siete días de cultivo con respecto a los controles y entre los diferentes tratamientos. El porcentaje de las áreas de lisis con respecto al área total analizadas con el programa Image ProPlus fueron:

- Sobrenadantes de **GI** 3,66 %
- Sobrenadantes de **GF** 7,98 %
- Sobrenadantes de **GS** 10,70 %
- Sobrenadantes de **GC** 16,67 %

Las células BM no infectadas (controles) tuvieron un 1,68 % de lisis. Las características observadas en las células BM correspondientes a los tratamientos realizados se pueden observar en las figuras 7, 8, 9 y 10. El análisis estadístico de los promedios de focos de lisis observados en cada tratamiento por la prueba de ji-cuadrado de Pearson (programa Epidat 3.1) dio diferencias observadas altamente significativas entre todos los tratamientos y de cada tratamiento con respecto a los controles ($\chi^2 = p < 0,0001$). Indicado en Tablas 1 a 7.

Tabla N° 1: Análisis estadístico de las áreas de lisis observadas en las células BM cultivadas con los sobrenadantes de las CEB GI, GF, GS y GC. (*): tratamientos entre los que se hallaron diferencias significativas

Frecuencias observadas:

	Lisis	No lisis	Total
GI *	108223	3027462	3135685
GF *	226952	2908733	3135685
GS *	295962	2839723	3135685
GC *	415264	2720421	3135685
Total	1046401	11496339	12542740

Prueba Ji-cuadrado de Pearson:

Ji-cuadrado: 206519,4483 gl: 3 **Valor p: 0,0000**

Tabla N° 2: Análisis estadístico de las áreas de lisis observadas en las células BM cultivadas con los sobrenadantes de las células esplénicas GI y GF. (*): tratamientos entre los que se hallaron diferencias significativas

Frecuencias observadas:

	Lisis	No lisis	Total
GI *	108223	3027462	3135686
GF *	226953	2908733	3135686
Total	335177	5936195	6271372

Prueba Ji-cuadrado de Pearson: 44431,7905 **Valor p: 0,0000**

Tabla N° 3: Análisis estadístico de las áreas de lisis observadas en las células BM cultivadas con los sobrenadantes de las células esplénicas de los tratamientos GI y GS. (*): tratamientos entre los que se hallaron diferencias significativas.

Frecuencias observadas:

	Lisis	No lisis	Total
GI *	108224	3027462	3135686
GS *	226953	2908733	3135686
Total	335177	5936195	6271372

Prueba Ji-cuadrado de Pearson: 44431,7905 Valor p: 0,0000

Tabla N° 4: Análisis estadístico de las áreas de lisis observadas en las células BM cultivadas con los sobrenadantes de las células esplénicas de los tratamientos GI y GC. (*): tratamientos entre los que se hallaron diferencias significativas

Frecuencias observadas:

	Lisis	No lisis	Total
GI *	108224	3027462	3135686
GC *	415264	2720428	3135692
Total	523488	5747890	6271378

Prueba Ji-cuadrado de Pearson: 196488,1199 Valor p: 0,0000

Tabla N° 5: Análisis estadístico de las áreas de lisis observadas en las células BM cultivadas con los sobrenadantes de las células esplénicas GF y GS. (*): tratamientos entre los que se hallaron diferencias significativas

Frecuencias observadas

	Lisis	No lisis	Total
GF *	226953	2908733	3135686
GS *	295962	2839723	3135685
Total	522915	5748456	6271371

Prueba Ji-cuadrado de Pearson: 9935,5680 **Valor p: 0,0000**

Tabla N° 6: Análisis estadístico de las áreas de lisis observadas en las células BM cultivadas con los sobrenadantes de las células esplénicas GF y GC. (*): tratamientos entre los que se hallaron diferencias significativas

Frecuencias observadas

	Lisis	No lisis	Total
GF *	226953	2908733	3135686
GC *	415264	2720422	3135686
Total	642217	5629155	6271372

Prueba Ji-cuadrado de Pearson: 61516,1202 **Valor p: 0,0000**

Tabla N° 7: Análisis estadístico de las áreas de lisis observadas en las células BM cultivadas con los sobrenadantes de las células esplénicas GS y GC. (*): tratamientos entre los que se hallaron diferencias significativas

Frecuencias observadas

	Lisis	No lisis	Total
GS *	295962	2839723	3135685
GC *	415264	2720422	3135686
Total	711226	5560145	6271371

Prueba Ji-cuadrado de Pearson: 22571,6535 Valor p: 0,0000

Figura 7: monocitos bovinos cultivados con el sobrenadante de las células esplénicas estimuladas con taquizoítos vivos de *Neospora caninum* (GI), y desafiados con taquizoítos (40 x). Tinción: Giemsa.

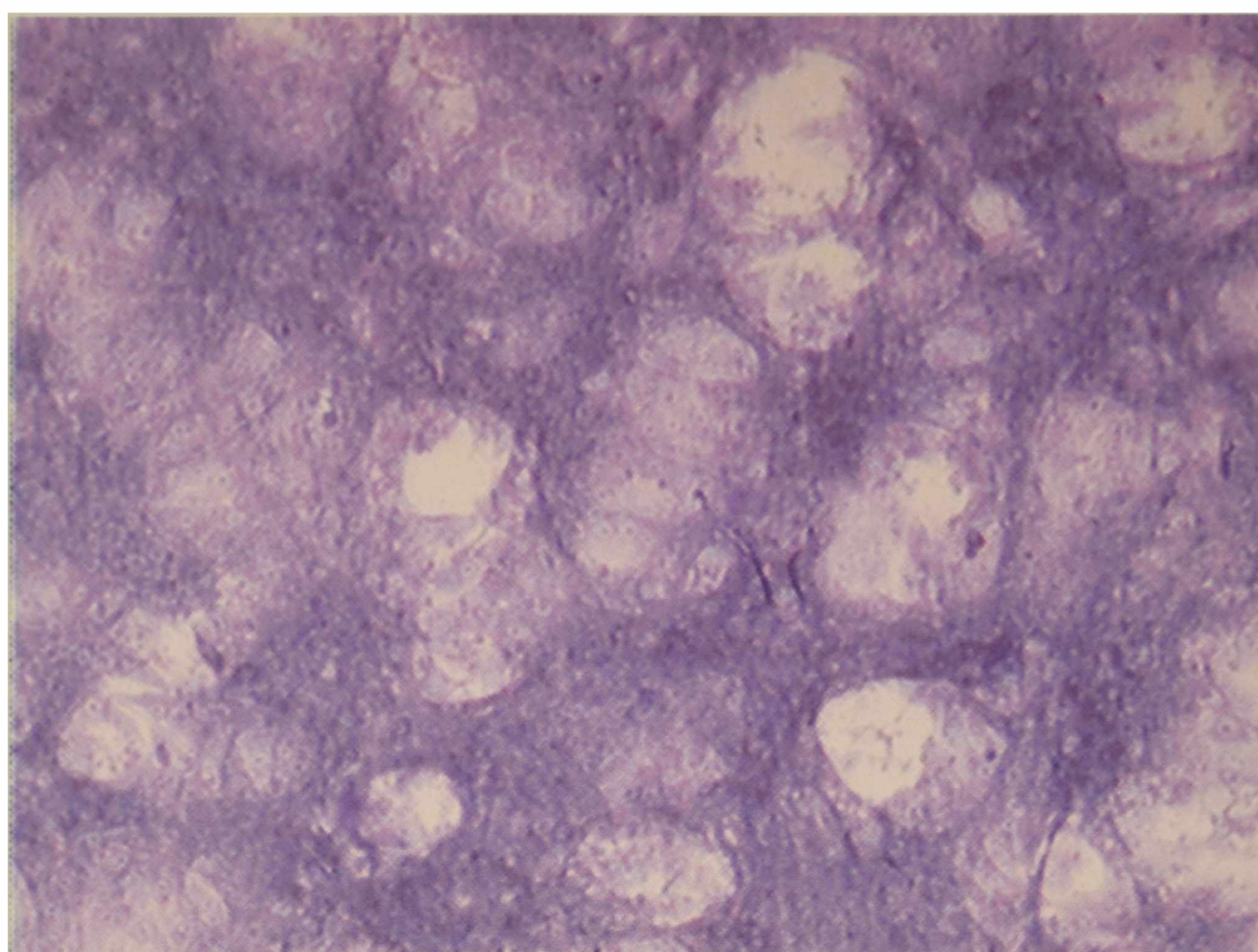


Figura 8: monocitos bovinos cultivados con el sobrenadante de las células esplénicas estimuladas con taquizoítos inactivados de *Neospora caninum* (GF), y desafiados con taquizoítos (40 x). Tinción: Giemsa.

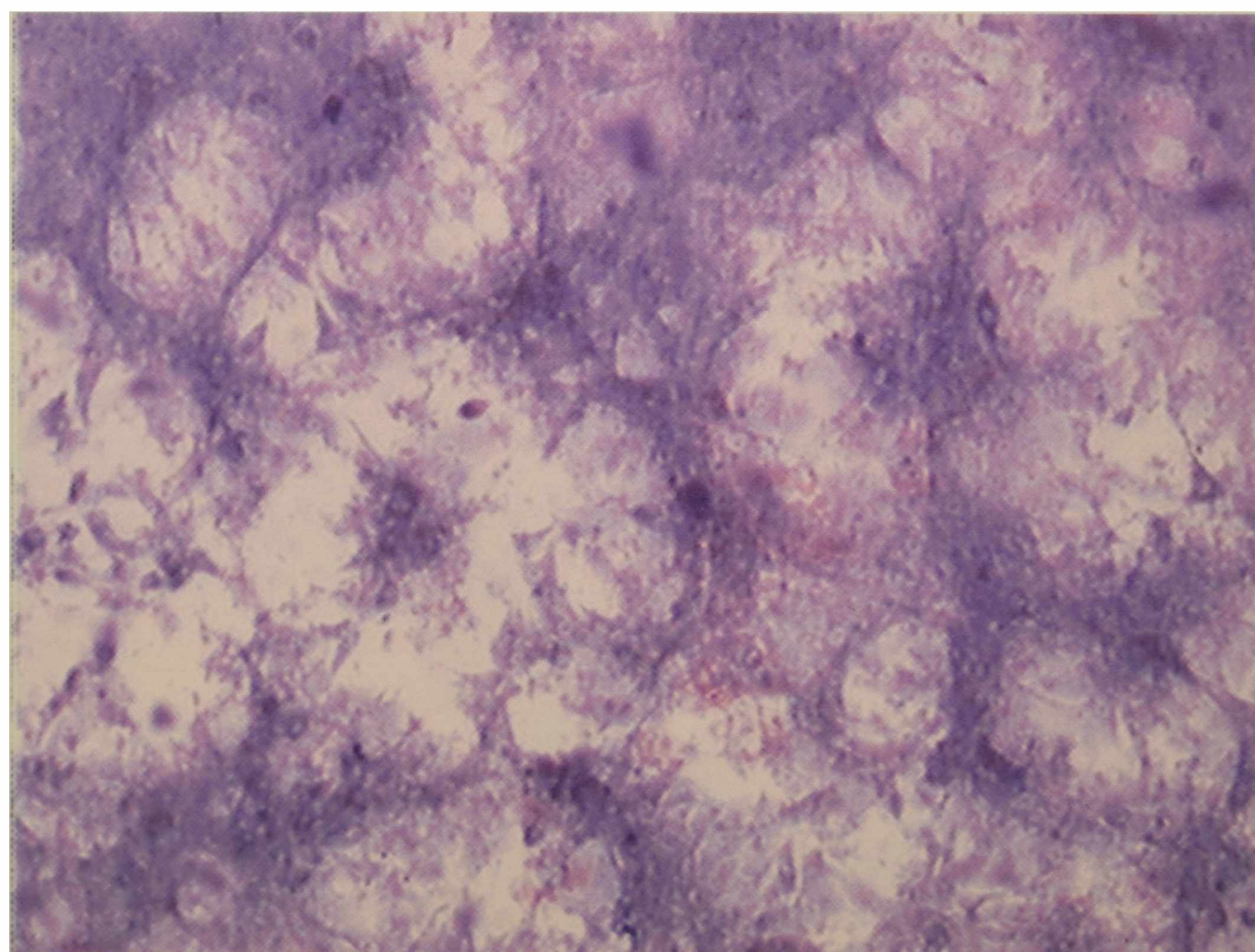


Figura 9: monocitos bovinos cultivados con el sobrenadante de las células esplénicas estimuladas con taquizoítos de *Neospora caninum* lisados (GS), y desafiados con taquizoítos (40 x). Tinción: Giemsa.

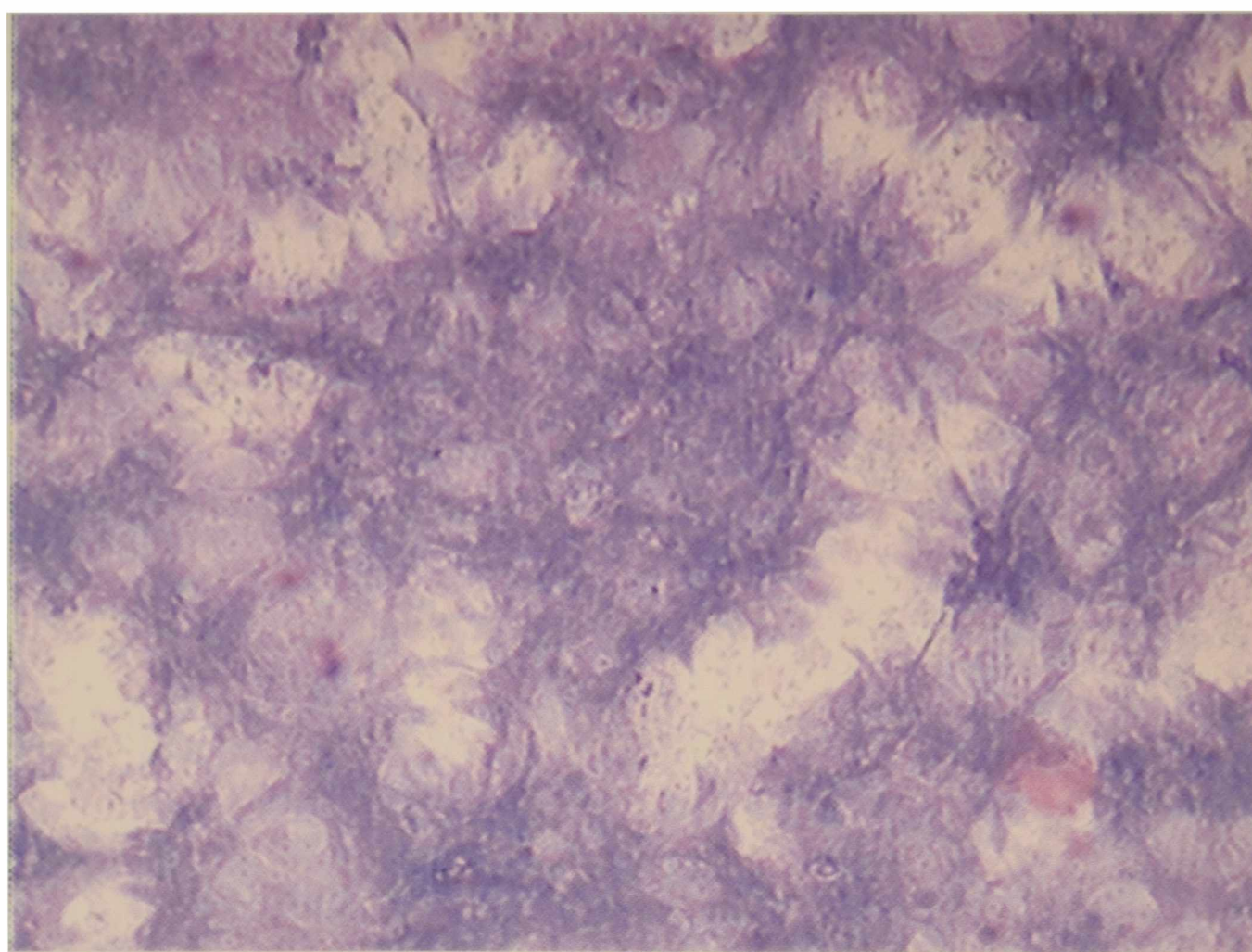
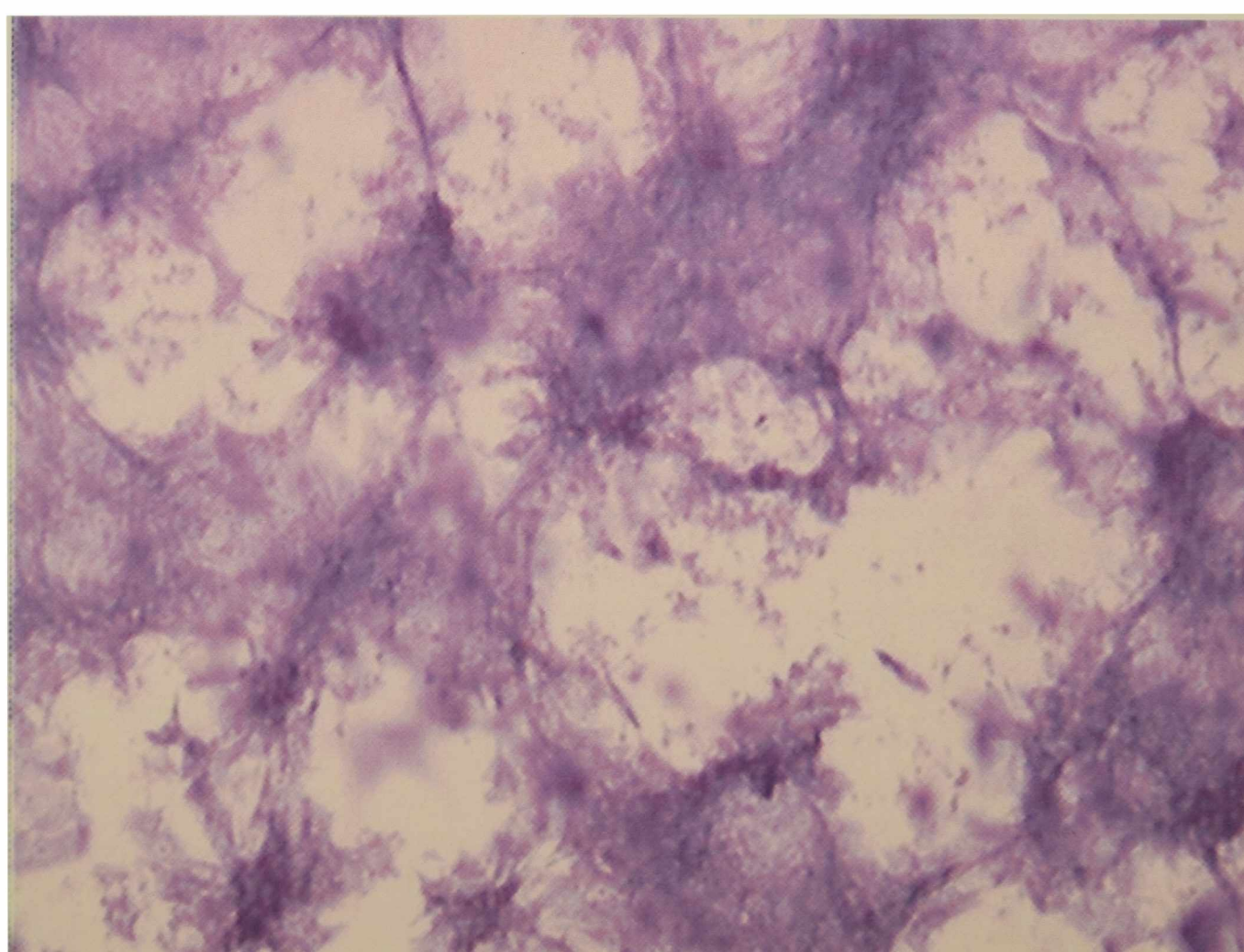


Figura 10: monocitos bovinos cultivados con el sobrenadante de las células esplénicas sin estimular (GC), y desafiados con taquizoítos (40 x). Tinción: Giemsa.



3.6 Experimento 3: Prueba de ELISA (enzimoinmunoensayo) para IFN γ

Con la prueba de ELISA para IFN γ bovino se observó una mayor densidad óptica del grupo de sobrenadantes correspondientes a las CEB GI en relación con los sobrenadantes de los tratamientos GS, GF y los controles (GC). Estos resultados se indican en la tabla 8.

Tabla 8: Detección de IFN γ por la prueba de ELISA en sobrenadantes de células esplénicas estimuladas con diferentes tratamientos de taquizoítos de *Neospora caninum*. El testigo de IFN γ provisto por el equipo tiene una concentración de 0,001 ng/ml con una densidad óptica de 1,327.

Muestra: sobrenadantes de los cultivos de células esplénicas	Densidad óptica	Concentración de IFN γ con respecto al testigo
Estimuladas con taquizoítos inactivados (GF)	0,709	-0,0597987
Estimuladas con lisado de taquizoítos (GS)	0,745	-0,0573826
Estimuladas con taquizoítos vivos (GI)	1,344	0,0171812
Controles (GC)	0,815	-0,0526846

De acuerdo a estos resultados se aumentó el tiempo de incubación y la concentración de las células estimuladas, pero no se detectaron diferencias en las densidades ópticas en los sobrenadantes de los diferentes tratamientos.

No se hallaron diferencias en las densidades ópticas cuando se incubaron directamente las CEB con los tratamientos sobre las placas del equipo de ELISA.

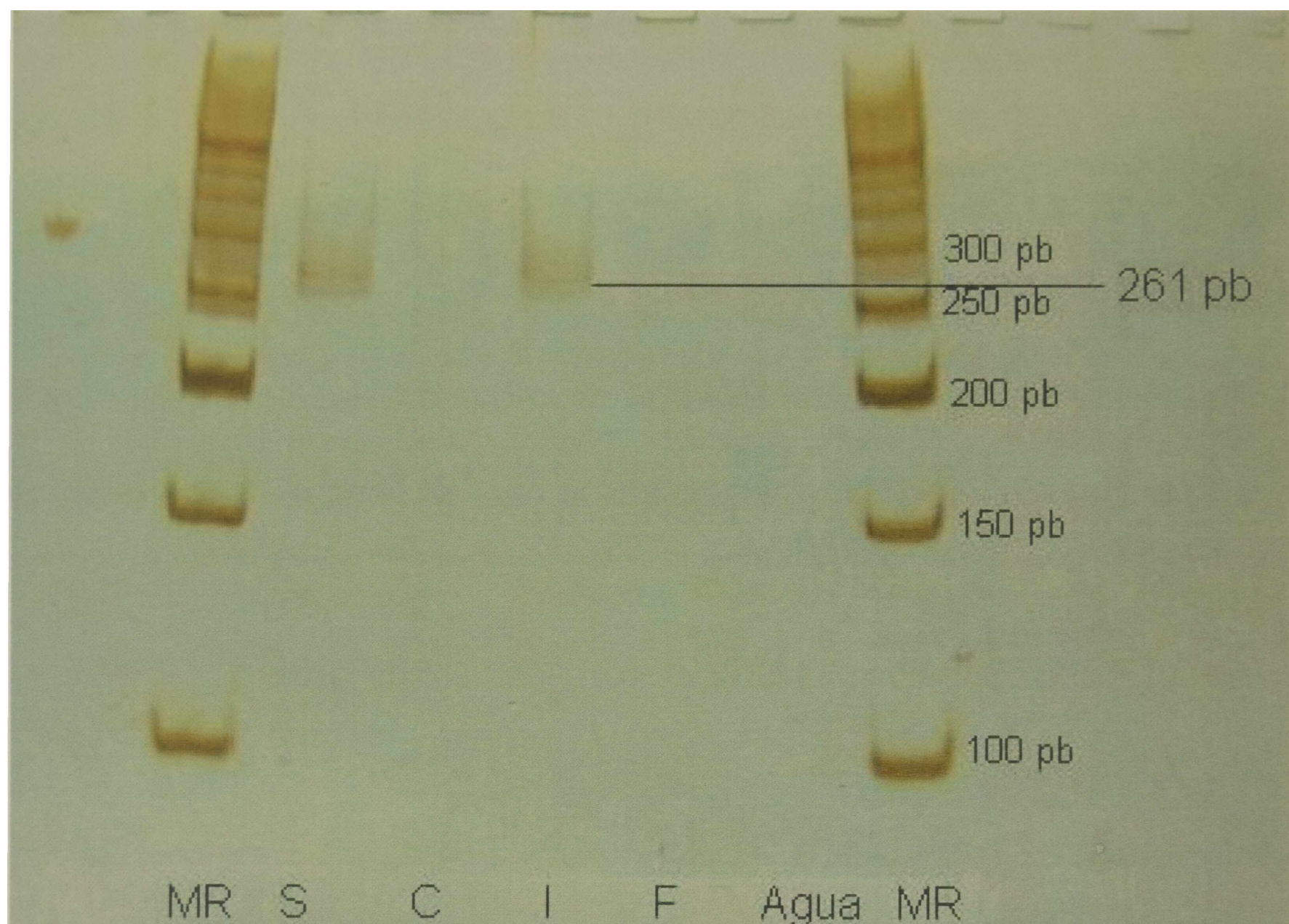
3.7 Experimento 4: RT-PCR para IFN γ

En los primeros ensayos, utilizando los primers citados por Takeda y col. (92), se observaron bandas inespecíficas de ADN en todas las muestras provenientes de CEB con los diferentes tratamientos, luego de la tinción de plata de los geles. Si bien se aumentó la temperatura de *annealing* no se incrementó la especificidad.

Utilizando el par de primers citados por Shafer-Weaver y col. (130) en la RT-PCR, se revelaron bandas específicas para ADN de IFN γ de 261 pb en las calles de los geles correspondientes a los amplificados de las CEB en los grupos **GI** (estimuladas con taquizoítos vivos) y **GS** (estimuladas con lisado de taquizoítos). Estas células provenían de los cultivos de seis días.

En las calles correspondientes a las muestras de CEB **GF** (estimuladas con taquizoítos inactivados) y **GC** (controles), así como en las que se colocó agua como control, no se observaron bandas. Estos resultados se pueden observar en la figura 11.

Figura 11: corrida electroforética de los amplificados para interferón gamma obtenidos por RT-PCR de las células esplénicas. **I:** células estimuladas con taquizoítos vivos. **F:** estimuladas con taquizoítos inactivados. **S:** estimuladas con taquizoítos lisados. **C:** controles sin estimular. **MR:** marcador de pares de bases. Tinción con sales de plata.



4. Discusión y Conclusiones

En el presente trabajo se realizaron pruebas *in vitro* en células esplénicas bovinas de animales no infectados, para evaluar con este modelo la respuesta inmune celular y la producción IFN γ . En otros trabajos las pruebas de producción de IFN γ se realizaron con células periféricas de bovinos o esplénicas de ratones, previamente inmunizados (32, 46, 93, 96, 97, 98, 102).

En la prueba RT-PCR utilizada para la detección de ARNm de IFN γ , se comprobó que tanto las células estimuladas con los lisados de taquizoítos de *N. caninum* como las células controles infectadas produjeron IFN γ . Se observó la activación de las células adherentes del bazo con ambos tratamientos. Los taquizoítos inactivados no indujeron la producción de IFN γ y no activaron a las células macrofágicas.

Los sobrenadantes de los cultivos de las células estimuladas con los taquizoítos vivos, sonicados e inactivados limitaron la multiplicación de *N. caninum* en los cultivos de monocitos bovinos. El análisis estadístico demostró diferencias significativas entre los tratamientos en relación al área de lisis observada, siendo efectivos tanto los taquizoítos sonicados como los inactivados.

La protección conferida por el sobrenadante de las células estimuladas por el antígeno lisado sobre las células BM estaría relacionada con la presencia de IFN γ , el que fue producido entre los días 4 y 7 posteriores al tratamiento. El tiempo de cultivo fue importante para obtener una mejor producción de IFN γ , ya que en los trabajos realizados por Williams y col. y por Andrianarivo y col. utilizando células bovinas, y por Khan con esplenocitos de ratones, se produjo IFN γ entre los días 2 y 5 de la infección (46, 97, 98, 102). Esta diferencia podría relacionarse con el estímulo

antigénico previo recibido por los animales, de los cuales provenían las células utilizadas en estos trabajos.

Con la prueba de ELISA en los sobrenadantes de cultivo no se detectó IFN γ lo que se debería a una baja sensibilidad de la prueba para este modelo *in vitro*, el cual utiliza células que no habían tenido contacto previo con el antígeno. Sin embargo, en experiencias previas se detectó IFN γ utilizando esta prueba, pero las células estimuladas provenían de animales previamente inmunizados (46, 97, 98). La falta de estimulación celular anterior al cultivo podría ser la responsable de la no detección de IFN γ en el sistema utilizado en este trabajo.

Una vacuna efectiva contra *N. caninum* debería estimular tanto la inmunidad innata como la adaptativa, y dentro de ésta, tanto la respuesta inmune celular como humoral. Debido a la complejidad estructural y biológica de *Neospora caninum*, la presencia de inmunógenos del parásito en una vacuna que estimularan la inmunidad mediada por células favorecería la protección.

Hasta el momento, la única vacuna para *N. caninum* que se utiliza en algunos países incluye taquizoítos inactivados y el adyuvante Havlogen. Si bien esta vacuna ha demostrado ser segura para ser usada en animales sanos (127), en pruebas de campo sólo se ha logrado una reducción en el número de abortos, siendo la eficacia calculada de la vacuna de 46 % (128). Durante el desarrollo de este trabajo se ha demostrado que los taquizoítos de *N. caninum* inactivados no producen adecuada activación *in vitro* de las células inmunes adherentes del bazo, ni estimulan la producción de IFN γ . En estudios realizados con *T. gondii* se comprobó que los parásitos inactivados no incrementaban la expresión de moléculas de coestímulo (B7) en las células dendríticas, que son necesarias para la producción de IFN γ por los

linfocitos T (**88**). Esto podría relacionarse con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

De acuerdo a los resultados, el antígeno elaborado con taquizoítos lisados vehiculizado con un adyuvante adecuado (liposomas, iscoms) que colabore con el procesamiento antigénico, podría ser una alternativa en la investigación de preparados biológicos para diseñar estrategias de prevención e inmunoprofilaxis en la neosporosis bovina.

Conclusiones

- Los taquizoítos vivos y lisados activaron a las células adherentes del bazo.
- Con la prueba de RT-PCR para la detección de ARNm de IFN γ se comprobó que las células esplénicas estimuladas con taquizoítos vivos y las estimuladas con los lisados produjeron IFN γ , no así las estimuladas con los taquizoítos inactivados.
- Las áreas de lisis producidas por el desafío con *N. caninum* observadas en los cultivos de monocitos bovinos tratados con sobrenadantes de los grupos experimentales mostraron diferencias significativas; fueron efectivos tanto los taquizoítos lisados como los formolados.
- Este tipo de protección estaría relacionada con la presencia de IFN γ en los sobrenadantes.

5. Bibliografía

- 1- Bjerkås I., Mohn S. F., Presthus J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and miositis in dogs. *Z. Parasitenkd.* 1984; 70: 271-274.
- 2- Bjerkås I., Presthus J. Immunohistochemical and ultrastructural characteristics of a cyst-forming sporozoon associated with encephalomyelitis and miositis in dogs. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 1988; 96: 445-454.
- 3- Dubey J. P., Carpenter J. L., Speer C. A., Topper M. J, Uggla, A. A newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1988; 192: 1269-1285.
- 4- Dubey J. P., Hattel A. L., Lindsay D. S., Topper M. J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1988; 193: 1259-1263.
- 5- Mc Allister M., Dubey J.P., Lindsay D.S., Jolley W.R., Wills R.A., Mc Guire A.M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *J. Parasitol.* 1998; 28: 1473- 1478.
- 6- Basso W., Venturini L., Venturini M.C., Hill D.E., Kwok O.C.H., Shen S.K., Dubey J.P. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. *J. Parasitol.* 2001; 87 (3): 612- 618.

- 7- Thilsted J.P., Dubey J.P. Neosporosis-like abortion in a herd of dairy cattle. J. Vet. Diagn. Invest. 1989; 1: 205-209.
- 8- Anderson M.L., Blanchard P.C., Barr B.C., Dubey J.P., Hoffman R.L., Conrad P.A. *Neospora* like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1991; 198: 241-244.
- 9- Barr B. C., Anderson M. L., Dubey J. P., Conrad P. A. *Neospora*-like protozoan infections associated with bovine abortions. Vet. Pathol. 1991; 28: 110-116.
- 10- Davison, H. C.; Otter, A., Trees A.J. Significance of *Neospora caninum* in British dairy cattle determined by estimation of seroprevalence in normally calving cattle and aborting cattle. Int. J. Parasitol. 1999; 29: 1189-1194.
- 11- Dubey, J. P. Neosporosis in cattle: biology and economic impact. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1999; 214 (8): 1160-1163.
- 12- Venturini M.C., Venturini L, Bacigalupe D., Machuca M, Echaide I., Basso W., Unzaga J. M., Di Lorenzo C., Guglielmone A, Jenkins M.C., Dubey J.P. *Neospora caninum* infections in bovine fetuses and dairy cows with abortions in Argentina. Int. J. Parasitol. 1999; 29: 1705- 1708.
- 13- Reichel, M. P. *Neospora caninum* infections in Australia and New Zealand. Aust. Vet. J. 2000; 78: 258-261.

14- De Meerschman F., Speybroeck N., Berkvens D., Rettignera C., Focant C. , Leclipteux T., Cassart D., Losson B. Fetal infection with *Neospora caninum* in dairy and beef cattle in Belgium. Theriogenology 2002; 58: 933-945.

15- Dubey, J. P. Neosporosis in cattle. J. Parasitol. 2003; 89 (Supl.): S42-S56.

16- Gondim L.F., McAllister M.M., Pitt W.C., Zemlicka D.E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. Int. J. Parasitol. 2004; 34: 159- 161.

17- Dubey J.P., Lindsay D.S. *Neospora caninum* induced abortion in sheep. J. Vet. Diagn. Invest. 1990; 2: 230- 233.

18- Barr B.C., Anderson M.L., Woods L.W., Dubey J.P., Conrad P.A. *Neospora*- like protozoan infections associated with abortion in goats. J. Vet. Diagn. Invest. 1992; 4: 365- 367.

19- Marsh A.E., Barr M.C., Madigan J., Lakritz J., Nordhausen R., Conrad P.A. Neosporosis as a cause of equine protozoal myeloencephalitis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1996; 209: 1907- 1913.

20- Dubey J.P., Lindsay D.S., Adams D.S., Gay J.M., Baszler T.V., Blagburn B.L., Thulliez P. Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. Am. J. Vet. Res. 1996; 57: 329-336.

21- Dubey J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. Korean J. Parasitol. 2003; 60: 1- 16.

22- Dubey J.P., Barr B.C., Barta J.R., Bjerkås I., Björkman C., Blagburn B.L., Bowman D.D., Buxton D., Ellis J.T., Gottstein B., Hemphill A., Hill D.E., Howe D.K., Jenkins M.C., Kobayashi Y., Koudela B., Marsh A.E., Mattsson J.G., McAllister M.M., Modrý D., Omata Y., Sibley L.D., Speer C.A., Trees A.J., Uggla A., Upton S.J., Williams D.J.L., Lindsay D.S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. Int. J. Parasitol. 2002; 32: 929- 946.

23- Dubey J.P., Buxton D., Wouda W. Pathogenesis of bovine neosporosis. J. Comp. Pathol. 2006; 134 (4): 267- 289.

24- Dubey, J. P. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. Vet. Parasitol. 1999; 84: 349-367.

25- Peters M., Lütkefels E., Heckeroth A. R., Schares G. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. Int. J. Parasitol. 2001; 31: 1144- 1148.

26- McAllister M.M., Parmley S.F., Weiss L.M., Welch V.J., McGuire A.M. An immunohistochemical method for detecting bradyzoite antigen (BAG5) in *Toxoplasma gondii*-infected tissues cross-reacts with a *Neospora caninum* bradyzoite antigen. J. Parasitol. 1996; 82 (2): 354- 355.

27- Dubey J.P., Sreekumar C., Knickman E., Miska K.B., Vianna M.C.B., Kwok O.C.H., Hill D.E., Jenkins M.C., Lindsay D.S., Greene C.E. Biologic, morphologic, and molecular characterisation of *Neospora caninum* isolates from littermate dogs Int. J. Parasitol. 2004; 34 (10): 1157- 1167.

28- Dijkstra T., Eysker M., Schares G., Conraths F. J., Wouda W., Barkema H. W. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites Int. J. Parasitol. 2001; 31 (8): 747- 752.

29- Castellano M. C., Basso W., Venturini L., Venturini M. C., Bacigalupe D., Unzaga J. M. Neosporosis canina. Descripción de un caso. Selecciones Veterinarias 1999; 7 (3): 244-246.

30- Lindsay D. S., Dubey J. P. Canine neosporosis. J. Vet. Parasitol. 2000; 14: 1-11.

31- Barber J. S., Trees A. J. Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. Vet. Record. 1996; 139: 439-443.

32- De Marez T., Liddell S., Dubey J.P., Jenkins M.C., Gasbarre L. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. Int. J. Parasitol. 1999; 29: 1647- 1657.

- 33-** Pare J., Thurmond M.C., Hietala S.K. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. Can. J. Vet. Res. 1996 ;60 (2): 133-139.
- 34-** Davison H.C., Otter A., Trees A.J. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infection in dairy cattle. Int. J. Parasitol. 1999; 29: 1683- 1689.
- 35-** Moore D. P., Campero C. M., Odeon A. C., Posso M. A., Cano D.R., Leunda M., Basso W., Venturini M. C., Spath E. Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. Vet. Parasitol. 2002; 107: 303-316.
- 36-** Waldner C.L., Janzen E.D., Ribble C.S. Determination of the association between *Neospora caninum* infection and reproductive performance in beef herds. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1998; 213 (5): 685- 690.
- 37-** Anderson M.L., Andrianarivo A.G., Conrad P.A. Neosporosis in cattle. Anim. Reprod. Sci. 2000; 60- 61: 417- 431.
- 38-** Innes E.A., Andrianarivo A.G., Björkman C., Williams D.J.L., Conrad P.A. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. Trends in Parasitol. 2002; 18 (11): 497- 504.

- 39-** Barr B.C., Rowe J.D., Sverlow K.W., BonDurant R.H., Ardans A.A., Oliver M.N., Conrad P.A. Experimental reproduction of bovine fetal *Neospora* infection and death with a bovine *Neospora* isolate. J. Vet. Diagn. Invest. 1994; 6: 207- 215.
- 40-** Gottstein B., Hentrich R., Wyss B., Thür A., Busato A., Stärk K.D.C., Müller N. Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. Int. J. Parasitol. 1998; 28: 679- 691.
- 41-** Thurmond M.C., Hietala S.K. Culling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows. Am. J. Vet. Res. 1996; 57: 1559- 1562
- 42-** Thurmond M.C., Hietala S.K. Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first- lactation dairy cows. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1997; 210: 672- 674.
- 43-** Hall C.A., Reichel M.P., Ellis J.T. *Neospora* abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. Vet. Parasitol. 2005; 128: 231- 241.
- 44-** Trees A.J., Williams D.J.L. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. Trends in Parasitol. 2005; 21 (12): 558- 561.
- 45-** Williams D.J.L., Guy C.S., Smith R.F., Ellis J., Björkman C., Reichel M.P., Trees A.J. Immunization of cattle with live tachyzoites of *Neospora caninum* confers protection against fetal death. Infect. Immun. 2007; 75(3):1343- 1348.

46- Williams D.J., Guy C.S., Garry J.W., Guy F., Tasker L., Smith R.F., MacEachern K., Crpps P.J., Kelly D.F., Trees A.J. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitology* 2000; 121: 347-358.

47- Innes E.A., Wright S.E., Maley S., Rae A., Schock A., Kirvar E., Bartley P., Hamilton C., Carey I., Buxton D. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *Int. J. Parasitol.* 2001; 31: 1523- 1534.

48- Malley S.W., Buxton D., Rae A.G., Wright S.E., Schock A., Bartley P.M., Esteban- Redondo I., Swales C., Kirvar E., Hamilton C.M., Sales J., Innes E.A. The pathogenesis of neosporosis in pregnant cattle: inoculation at mid- gestation. *J. Comp. Pathol.* 2003; 129: 186- 195.

49- Innes E.A., Wright S., Bartley P., Maley S., Macaldowie C., Esteban- Redondo I., Buxton D. The host- parasite relationship in bovine neosporosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2005; 108 (1-2): 29- 36.

50- Buxton D. Toxoplasmosis. *Practitioner* 1990; 234: 42- 44.

51- Buxton D., Maley S., Wright S., Thomson K., Trees A.J., Innes E.A. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. *J. Comp. Pathol.* 1998; 118: 267- 279.

52- Almeria S., De Marez T., Dawson H., Araujo R., Dubey J.P. Gasbarre L.C. Cytokine gene expression in dams and fetuses after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. *Parasite Immunol.* 2003; 25: 383- 392.

53- Venturini L., Di Lorenzo C., Venturini C., Romero J. Anticuerpos anti *Neospora sp.* en vacas que abortaron. *Vet. Arg.* XII 1995; 113: 167- 170.

54- Campero C.M., Anderson M.L., Conosciuto G., Odriozola H., Bretschneider G., Poso M.A.. *Neospora caninum*- associated abortion in a dairy herd in Argentina. *Vet. Record* 1998; 143: 228- 229.

55- Venturini M.C., Bacigalupe D., Venturini L., Rambeaud M., Campero C., Moore D., Unzaga J.M., Basso W., Machuca M. Detección de *Neospora caninum* en ratones inoculados con cerebros de fetos bovinos abortados. En: *Memorias del XXI Congreso Mundial de Buiatría.* Uruguay; 2000. p. 95

56- Echaide I.E., Valentini B., Baszler T.V. Detección de anticuerpos contra *Neospora caninum* en bovinos de la cuenca lechera de Santa Fe y Córdoba. Resultados preliminares. En: *resúmenes de la XII Reunión Científico Técnica, Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico.* p. 71. Mar del Plata, Argentina; 1998. p. 71.

57- Echaide I., Valentini B., Mondino D., Torioni S. Neosporosis bovina: análisis seroepidemiológico de un hato lechero mediante IFA y ELISA. En: resúmenes de la XIV Reunión Científico Técnica, Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. Villa General Belgrano, Córdoba, Argentina; 2002. PAR-01.

58- Venturini M.C., Bacigalupe D., Venturini L., Basso W., Moore P., Unzaga J.M., Machuca M., Campero C. Isolation of *Neospora* sp. from the brain of a dairy calf in Argentina. En: Resúmenes de 18th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, WAAVP. 23- 26 de agosto de 2001. Stressa, Italia; 2001. p. 20.

59- Venturini L., Boero C., Basso W., Venturini C., Moreno H... Neosporosis en terneros de un feed-lot: su evolución y efectos asociados en la ganancia de peso. En: Resúmenes de la XVI^a Reunión Científico Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Diagnóstico. 13-15 Noviembre de 2002. Córdoba, Argentina; 2002. p. E-16.

60- Björkman C., Uggla A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. Int. J. Parasitol. 1999; 29: 1497-1507.

61- Dubey J.P., Schares G. Diagnosis of bovine neosporosis. Vet. Parasitol. 2006; 31;140 (1-2): 1- 34.

- 62-** Barr B.C., Anderson M.L., Sverlow K.W., Conrad P.A. Diagnosis of bovine fetal *Neospora* infection with an indirect fluorescent antibody test. Vet. Record 1995; 137: 611- 613
- 63-** Conrad P. A., Sverlow K.W., Anderson M., Rowe J., BonDurant R.,Tuter G., Breitmeyer R., Palmer C.,Thurmond M., Ardans A., Dubey J.P., Duhamel G., Barr B. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. J. Vet. Diagn. Invest. 1993; 5: 572- 578
- 64-** Pare J., Hietala S..K, Thurmond M.C. Interpretation of an indirect fluorescent-antibody test for diagnosis of *Neospora* sp infection in cattle. J. Vet. Diagn. Invest. 1995; 7: 273-275.
- 65-** Baszler T.V., Adams S., Vander- Schalie J., Mathison B.A., Kostovic M. Validation of a commercially available monoclonal antibody- based competitive-inhibition enzyme- linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to *Neospora caninum* in cattle. J. Clin. Microbiol. 2001; 39: 3851- 3857.
- 66-** Baszler T., Knowles D., Dubey J.P., Gay J., Mathison B., McElwain T. Serological diagnosis of bovine neosporosis by *Neospora caninum* monoclonal antibody-based competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol. 1996; 34: 1423- 1428

- 67-** Packham A., Sverlow K., Conrad P., Loomis E., Rowe J., Anderson M., Marsh A., Cray C., Barr B. A. Modified Agglutination test for *Neospora caninum*: development, optimization, and comparison to the Indirect Fluorescent-Antibody test and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1998; 5 (4): 467- 473
- 68-** Romand S., Thulliez P., Dubey J.P. Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. Parasitol. Res. 1998; 80: 54- 56.
- 69-** Bjerkås I., Jenkins M., Dubey J.P.. Identification and characterization of *Neospora caninum* tachyzoite antigens useful for diagnosis of Neosporosis. Clin. Diag. Lab. Immunol. 1994; 1: 214- 221.
- 70-** Hemphill A., Gottstein B. Identification of a major surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. Parasitol. Res. 1996; 82: 497-504.
- 71-** Lindsay D.S., Lenz S.D., Cole R.A., Dubey J.P., Blagburn B.L. Mouse Model for Central Nervous-System *Neospora caninum* Infections. J. Parasitol. 1995; 81: 313-315
- 72-** Ho M.S.Y., Barr B.C., Marsh A., Anderson M., Rowe J., Tarantal A., Hendrickx A., Sverlow K., Dubey J.P., Conrad P. Identification of bovine *Neospora* parasites by PCR Amplification and Specific Small-Subunit rRNA Sequence Probe Hybridization. J. Clin. Microbiol. 1998; 34: 1203- 1208.

73- Basso W., Venturini M.C., Moré G., Quiroga M.A., Travería G., Bacigalupe D., Kienast M., Venturini L. Aplicación de PCR para la detección de *Neospora caninum* en fetos bovinos abortados mediante la técnica de PCR. 12º Simposio Internacional de la Asociación Mundial de Laboratorios de Diagnóstico Veterinario. Montevideo, Uruguay, 2005.

74- Barling K. S., Mc. Neill J. W., Thompson J. A., Paschal J. C., Mc. Collum F. T., Craig T. M., Adams L. G. Association of serologic status for *Neospora caninum* with postweaning weight gain and carcass measurements in beef calves. J. Am. Vet. Med. Assoc. 2000; 217: 1356-1360.

75- Campero C.M. Pérdidas provocadas por *Neospora caninum* en bovinos. En: reunión de Especialistas en Parasitología Veterinaria de Argentina, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay- 11º Encuentro de Veterinarios Endoparasitólogos Rioplatenses. FAO- AAPAVET, UNCPBA. Tandil; 2002.

76- Hemphill A., Vonlaufen N., Naguleswaran A., Keller N., Riesen M., Guetg N., Srinivasan S., Alaeddine F. Tissue culture and explant approaches to studying and visualizing *Neospora caninum* and its interactions with the host cell. Microsc. Microanal. 2004; 10: 602- 620.

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

- 78-** Sonda S., Fuchs N., Connolly B., Fernández P., Gottstein B., Hemphill A. The major 36 kDa *Neospora caninum* tachyzoite surface protein is closely related to the major *Toxoplasma gondii* surface antigen 1. Mol. Biochem. Parasitol. 1998; 108: 39-51.
- 79-** Fuchs N., Bütikofer P., Sonda S., Hemphill A. Detection of surface- associated and intracellular glycoconjugates and glycoproteins in *Neospora caninum* tachyzoites. Int. J. Parasitol. 1999; 29: 1597- 1611.
- 80-** Louie K., Norhausen R., Robinson T.W., Barr B.C., Conrad P.A. Characterization of a *Neospora caninum* protease, NcSUB1 (NCp65), with rabbit anti- N54. J. Parasitol. 2002; 88: 1113- 1119.
- 81-** Naguleswaran A., Cannas A., Keller N., Vonlaufen N., Björkman C., Hemphill A. Vero cell surface proteoglycan interaction with the microneme protein NcMIC3 mediates adhesion of *Neospora caninum* tachyzoites to host cells unlike that in *Toxoplasma gondii*. Int. J. Parasitol. 2002; 22: 695- 704.
- 82-** Speer C.A., Dubey J.P., McAllister M.M., Blixt J.A. Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. Int. J. Parasitol. 1999; 29: 1509- 1519.
- 83-** Luder C.G., Algnier M., Lang C., Bleicher N., Gross U. Reduced expression of the inducible nitric oxide synthase after infection with *Toxoplasma gondii* facilitates

parasite replication in activated murine macrophages. *Int. J. Parasitol.* 2003; 33: 833-844.

84- Vonlaufen N., Guetg N., Naguleswaran A., Müller N., Björkman C., Schares G., von Blumroeder D., Ellis J., Hemphill A. *In vitro* induction of *Neospora caninum* bradyzoites in Vero cells reveals differential antigen expression, localization, and host- cell recognition of tachyzoites and bradyzoites. *Infect. Immun.* 2004; 72: 576-583.

85- Janeway Ch., Travers P., Walport M., Shlomchik M. *Immunobiology: The immune system in health and disease*. 6ª edición. Garland Science, New York; 2004.

86- Pennimpede E.F.F., Gómez C., Stanchi N. editores. *Introducción a la Inmunobiología*. 1ª edición. Editorial de la Universidad Nacional de la Plata (EduLP), La Plata; 2004.

87- Roitt I. *Inmunología Fundamentos*. 10ª edición. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires; 2003.

88- Brake D.A. Vaccinology for control of apicomplexan parasites: a simplified language of immune programming and its use in vaccine design. *Int. J. Parasitol.* 2002; 32: 509- 515.

- 89-** Brown W.C., Rice-Ficht A.C., Estes D.M. Bovine type 1 and type 2 responses. Vet. Immunol. Immunopathol. 1998; 63: 45-55.
- 90-** Mosmann T.R., Cherwinski H., Bond M.W., Giedlin M.A., Coffman R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J. Immunol. 1986; 136: 2348- 2353.
- 91-** Nishikawa Y., Inoue N., Makala L., Nagasawa H. A role for balance of interferon-gamma and interleukin-4 production in protective immunity against *Neospora caninum* infection. Vet. Parasitol. 2003; 116: 175- 184.
- 92-** Takeda K., Omata Y., Koyama T., Ohtani M., Kobayashi Y., Furuoka H., Matsui T., Maeda R., Saito A. Increase of Th 1 type cytokine mRNA expression in peripheral blood lymphocytes of calves experimentally infected with *Cryptosporidium parvum*. Vet. Parasitol. 2003; 113: 327- 331.
- 93-** Quinn H.E., Miller C.M.D., Ellis J.T. The cell-mediated immune response to *Neospora caninum* during pregnancy in the mouse is associated with a bias towards production of interleukin-4. Int. J. Parasitol. 2004; 34: 723- 732.
- 94-** Fiorentino D.F., Zlotnik A., Mosmann T.R., Howard M., O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. J Immunol. 1991; 147 (11): 3815-3822.

- 95-** Baszler T.V., Long M.T., McElwain T.F., Mathison B.A. Interferon γ and interleukin- 12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. Int. J. Parasitol. 1999; 29: 1635- 1646.
- 96-** Lundén A., Marks J., Maley S.W., Innes E.A. Cellular immune responses in cattle experimentally infected with *Neospora caninum*. Parasite Immunol. 1998; 11: 519- 526.
- 97-** Andrianarivo A.G., Choromanski L., McDonough S.P., Packham A.E., Conrad P.A. Immunogenicity of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite preparation formulated with different adjuvants. Int. J. Parasitol. 1999; 29: 1613- 1625.
- 98-** Andrianarivo A.G., Rowe J.D., Barr B.C., Anderson M.L., Packham A.E., Sverlow K.W., Choromanski L., Loui C., Grace A., Conrad P.A. A POLYGEN- adjuvanted killed *Neospora caninum* tachyzoite preparation failed to prevent foetal infection in pregnant cattle following i.v./i.m. experimental tachyzoite challenge. Int. J. Parasitol. 2000; .30: 985- 990.
- 99-** Eperon S., Bronnimann K., Hemphill A., Gottstein B. Susceptibility of B-cell deficient C57BL/6 (μ MT) mice to *Neospora caninum* infection. Parasite Immunol. 1999; 21: 225- 236.

- 100-** Omata Y., Sakurai H., Izumo M., Saito A., Suzuki N. Interferon production in non- immune and immune mice after *Toxoplasma* infection. Nippon Juigaku Zasshi. 1984; 46 (2): 155- 165.
- 101-** Suzuki Y., Orellana M.A., Schreiber R.D., Remington J.S. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. Science 1988; 240 (4851): 516- 518.
- 102-** Khan I., Schwartzman J.D., Fonseka S., Kasper LI. *Neospora caninum*: Role for immune cytokines in host immunity. Exp. Parasitol. 1997; 85: 24- 34.
- 103-** Long M., Baszler T., Mathison B. Comparison of intracerebral parasite load, lesion development, and systemic cytokines in mouse strains infected with *Neospora caninum*. J. Parasitol. 1998; 84 (2): 316- 320.
- 104-** Tanaka T., Hamada T., Inoue N., Nagasawa H., Fujisaki K., Suzuki N., Mikami T. The role of CD4⁺ or CD8⁺ T cells in the protective immune response of BALB/c mice to *Neospora caninum* infection. Vet. Parasitol. 2000; 90: 183- 191.
- 105-** Innes E.A., Panton W.R., Marks J., Trees A.J., Holmdahl J., Buxton D. Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum*, as shown by incorporation of 3H uracil. J. Comp. Pathol. 1995; 113 (1): 95- 100

106- Kasper LI, Khan I. Antigen-Specific CD8⁺ T Cells Protect against Lethal Toxoplasmosis in mice Infected with *Neospora caninum*. Infect. Immun. 1998; 66: 1554-1560

107- Staska L.M., McGuire T.C., Davies C.J., Lewin H.A., Baszler T. *Neospora caninum* -infected cattle develop parasite-specific CD4⁺ cytotoxic T lymphocytes. Infect. Immun. 2003; 71 (6): 3272- 3279.

108- Parker S.J., Roberts C.W., Alexander J. CD8⁺ T cells are major lymphocyte subpopulation involved in the protective immune response to *Toxoplasma gondii* in mice. Clin. Exp. Immunol. 1991; 84: 207- 212.

109- Boysen P., Klevar S., Olsen I., Storset A.K. The protozoan *Neospora caninum* directly triggers bovine NK cells to produce gamma interferon and to kill infected fibroblasts. Infect. Immun. 2006; 74 (2): 953- 960.

110- Long M.T., Baszler T.V. Neutralization of maternal IL-4 modulates congenital protozoan transmission: comparison of innate versus acquired immune responses. J. Immunol. 2000; 164: 4768- 4774.

111- Dijkstra T., Barkema H.W., Eysker M., Wouda W. Evidence of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. Int. J. Parasitol. 2001; 31: 209- 215.

- 112-** Anderson, M.L., Reynolds, J.P., Rowe, J.D., Sverlow, K.W., Packham A.E., Barr, B.C., Conrad, P.A. Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp infection in dairy cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1997; 210 (8): 1169- 1172.
- 113-** Schares G., Peters M., Wurm R., Barwald A., Conraths F.J. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analyzed by serological techniques. Vet. Parasitol. 1998; 80: 87- 98.
- 114-** Buxton D., Innes E.A. A commercial vaccine for toxoplasmosis. Parasitology 1995; 110: 11- 16.
- 115-** Nishikawa Y., Xuan X., Nagasawa H., Igarashi I., Fujisaki K., Otsuka H., Mikami T. Prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice by recombinant vaccinia virus carrying NcSRS2 gene. Vaccine 2001; 19: 1710- 1716.
- 116-** Jenkins M., Parker C., Tuo W., Vinyard B., Dubey J.P. Inclusion de Cpg adjuvant with plasmid DNA coding for NcGRA7 improves protection against congenital neosporosis. Infect. Immun. 2004; 72: 1817- 1819.
- 117-** Jenkins M. Advances and prospects for subunit vaccines against protozoa of veterinary importance. Vet. Parasitol. 2001; 101: 291- 310.

- 118-** Lindsay D.S., Lenz S.D., Blagburn B.L., Brake D.A. Characterization of temperature- sensitive strains of *Neospora caninum* in mice. J. Parasitol. 1999; 85: 64- 67.
- 119-** Atkinson R., Harper P.A.W., Ryce C., Morrison D.A., Ellis J.T. Comparison of the biological characteristics of two isolates of *Neospora caninum*. Parasitology 1999; 118: 363- 370.
- 120-** Lundén A., Wright S., Allen J., Buxton D. Immunisation of mice against neosporosis. Int. J. Parasitol. 2002; 32: 867- 876.
- 121-** Liddell S., Jenkins M.C., Collica C.M., Dubey J.P. Prevention of vertical transfer of *Neospora caninum* in BALB/c mice by vaccination. J. Parasitol. 1999; 85: 1072- 1075.
- 122-** Miller C.M., Quinn H.E., Reichel M.P., Ellis J.T. Reduction in transplacental transmission of *Neospora caninum* in outbred mice by vaccination. Int. J. Parasitol. 2005; 35: 821- 828.
- 123-** Pinitkiatisakul S., Mattsson J.G., Wikman M., Friedman M., Bengtsson K.L., Stahl S., Lundén A. Immunization of mice against neosporosis with recombinant NcSRS2 iscoms. Vet. Parasitol. 2005; 129: 25- 34.

124- Haldorson G.J., Mathison B.A., Wenberg K., Conrad P.A., Dubey J.P., Trees A.J., Yamane I., Baszler T.V. Immunization with native surface protein NcSRS2 induces a Th2 immune response and reduces congenital *Neospora caninum* transmission in mice. *Int. J. Parasitol.* 2005; 35: 1407- 1415.

125- Liddell S., Parker C., Vinyard B., Jenkins M., Dubey J.P. Immunization of mice with plasmid DNA coding for NcGRA7 and NcHSP33 confers partial protection against vertical transmission of *Neospora caninum*. *J. Parasitol.* 2003; 89: 496- 500.

126- Cannas A., Naguleswaran A., Müller N., Gottstein B., Hemphill A. Protective effect of vaccination with recombinant microneme protein NcMIC3 in mice following challenge infection with *Neospora caninum* tachyzoites. *J. Parasitol.* 2003; 89: 44- 50.

127- Choromanski L.J. *Neospora caninum* vaccine field safety evaluation. Intervet Bulletin 2002; 1- 3.

128- Romero J.J., Perez E., Frankena K. Effect of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite vaccine on the crude abortion rate of Costa Rican dairy cows under field conditions. *Vet. Parasitol.* 2004; 123: 149- 139.

129- Guy C.S., Williams D.J.L., Kelley D.F., McGarry J.W., Guy F., Björkman C., Smith R.F., Trees A.J. *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows:

spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody. Vet. Record 2001; 149: 443- 449.

130- Shafer-Weaver K.A., Corl C.M., Sordillo L.M. Shifts in bovine CD4+ subpopulations increase T-helper-2 compared with T-helper-1 effector cells during the postpartum period. J. Dairy Sci. 1999; 82: 1696– 1706.

ANEXO: TÉCNICAS UTILIZADAS

Prueba de Inmunofluorescencia indirecta para *Neospora caninum*

Solución buffer de fosfatos (P.B.S.)

Solución madre:

Sodium chloride.....(NaCl).....	40 g
Potassium chloride...(KCl).....	1 g
Di-sodium hidrogen phosphate..(Na ₂ HPO ₄).....	5,75 g
Potassium di-hidrogen phosphate..(KH ₂ PO ₄).....	1 g
Agua destilada.....	500 ml

Solución de trabajo: utilizar la solución madre diluida 1:10 en agua destilada. El pH final será de 7,2.

Solución buffer de carbonatos (Rinse buffer)

Solución madre:

Na ₂ CO ₃	11,4 g
NaHCO ₃	33,6 g
NaCl.....	8,5 g
H ₂ O destilada.....	c.s.p. 1 l.

El pH es de 9.

Solución de trabajo: diluir la solución madre en agua destilada en proporción de 1: 4.

Antígeno:

Colectar los parásitos, lavarlos en PBS y llevarlos a una concentración de 10×10^6 /ml. Colocarlos en los portaobjetos y fijarlos. Conservar a -20°C .

Procedimiento:

- Diluir el suero problema y los sueros controles positivos y negativos con PBS
- Incubar el antígeno con el suero problema y los controles a 37°C durante 30 minutos en cámara húmeda.
- Realizar un solo lavado de 10 minutos con solución buffer de carbonatos, pH 9, en agitador.
- Incubar con el conjugado anti- Ig G bovina marcada con fluoresceína, 30 minutos a 37°C , en cámara húmeda.
- Lavar una vez con buffer de carbonatos durante 10 minutos y con agitación.
- Montar con glicerina al 50 % en buffer de carbonatos.
- Observar con microscopio de fluorescencia.

Prueba de Angus y Barton (BPA) para brucelosis bovina

Antígeno de BPA(cepa 1119/3 de *Brucella abortus*, vol.celular 11%, pH 3,63)

Procedimiento:

- Colocar sobre el vidrio del aglutinoscopio 0,08 ml de suero
- Agregar 0,03 ml de antígeno
- Homogeneizar, rotar.
- Incubar en aglutinoscopio con luz apagada 5 minutos

- Rotar
- Leer a los 8 minutos, rotando la placa, con luz encendida.

Lectura:

Positivo: Presencia de grumos

Negativo: Ausencia de grumos

Cultivo de células

Materiales utilizados: Medio RPMI 1640 con glutamina, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) para crecimiento o 3% SFB para mantenimiento y con 1 % de antibiótico (penicilina- estreptomicina) y antimicótico (anfotericina B).

RPMI 1640: marca PAA (1 x) N° Catálogo E15-840.

Suero equino (SE) (para preparación de antígeno para IFI, al 10 %): marca PAA N° Catálogo B15-023.

Suero fetal bovino libre de anticuerpos para *Neospora caninum*: marca PAA N° Catálogo A15-042.

Tripsina-EDTA (10x): PAA N° Catálogo L11-003.

Solución antibiotico-antimicótico (100x): PAA N° Catálogo P11-002.

Botellitas de cultivo: marca CELLSTAR Tissue Culture Flask, 50 ml, 25 cm², estériles. N° Catálogo: 690 170.

Procedimiento

1- Eliminar el medio de la botella de 25 cm² a tripsinar, donde la monocapa está completamente formada.

2- Agregar PBS pH 7,2 y enjuagar

3- Eliminar el PBS.

4- Agregar 2,7 ml de PBS y 0,3 ml de Tripsina- EDTA sol. 10 x (5 g de tripsina/l 1:250, 2g EDTA/l) e incubar a 37° 30 min.

5- Una vez desprendidas las células completar hasta 5 ml con RPMI.

6- Colocar 1 ml de esa suspensión en cada nueva botella de cultivo con 5 ml de medio con 10 % de SFB colocado previamente.

7- Incubar a 37° bajo una atmósfera con 5 % de CO₂.

8- Las células deben multiplicarse una vez por semana. En dos a cinco días puede estar formada la monocapa.

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Soluciones stock

Todas las soluciones se preparan con agua tridestilada.

A) Acrilamida- Bisacrilamida (30-08)

Acrilamida	30 g
Bis	0,8 g
Agua c.s.p.	100 ml

B) Buffer Tris-ClH 1,5 M pH 8,8

Tris	18,15 g
HCl c.s.p. pH 8,8	
Agua c.s.p.	100 ml

Disolver el Tris en la mitad del volumen final de agua. Ajustar el pH con ClH puro, retirar el imán y completar el nivel de agua indicado. Enfrascar en frascos rotulados y guardar a 4°C.

C) Buffer Tris-ClH 0,5 M pH 6,8

Tris 3 g

ClH c.s.p. pH 6,8

Agua c.s.p. 50 ml

Disolver el Tris en la mitad del volumen final de agua en un erlenmeyer o vaso de precipitado con imán. Ajustar el pH al valor indicado, retirar el imán y completar el volumen con agua. Guardar en frasco rotulado a 4° C.

D) SDS al 10 %

Disolver 10 g de SDS en 50 ml de agua en erlenmeyer con agitación, y si es necesario en Baño María a 50° C aproximadamente. Completar el volumen con agua. Guardar en frasco color caramelo a temperatura ambiente.

E) APS al 1%

Se prepara en el momento de usar.

Se ponen 100 mg de Persulfato de Amonio en 1 ml de agua.

La droga pura se guarda en heladera.

F) Buffer para reservorios de corrida, concentración 10x

Tris	30,2 g
Glicina	144 g
Agua c.s.p.	1000 ml

Buffer de uso en la electroforesis:

100 ml + 10 ml SDS + agua c.s.p. 1000 ml

G) Azul de bromofenol 0,10 %

10 mg de la droga en 10 ml de agua

H) Buffer de muestra (S. B.)

Para condiciones reducidas:

Tris- ClH 1 M pH 6,8	6,25 ml
SDS	2,3 g
2- mercaptoetanol	5 ml
Glicerina	10 ml
Azul de Bromofenol 0,3 %	1 ml
Agua destilada c.s.p.	50 ml

Técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS- PAGE)

Los vidrios a utilizar deben estar perfectamente limpios y desengrasados. Se colocan los espaciadores entre los vidrios y se ajustan con broches, cuidando de que queden bien sujetos para que no se escurra la solución de polacrilamida.

A) Gel de corrida o resolving gel

Se puede aplicar en diferentes concentraciones según el tamaño de la molécula a correr. Para *Neospora caninum* se utiliza al 12 o 12,5 %.

	<u>12,5 %</u>
Acrilamida-bis (30-08)	12,5 ml
Tris- ClH pH 8,8	7,5 ml
Agua	9,5 ml
TEMED	20 µl
SDS 10%	0,3 ml
APS	0,2 ml

La mezcla se prepara en un vaso de precipitado con imán y se agita suavemente en los distintos pasos. La mezcla se vuelca con mucho cuidado entre las placas y se coloca suavemente con jeringa entre las placas agua destilada para favorecer la polimerización. Las cantidades de TEMED y APS pueden variar si no se logra una polimerización adecuada en un tiempo aproximado de 20 o 30 minutos. Se deja polimerizar a temperatura ambiente, si es invierno o el clima está frío colocar las placas en estufa a 37° C para favorecer la polimerización.

B) Gel de siembra o stocking- gel

Se puede usar al 4 o 5 %. En este trabajo se utilizó al 4 %.

Acrilamida-bis (30-08)	0,66 ml
Tris- ClH pH 6,8	1,25 ml
Agua	3 ml
TEMED	5 μ l
SDS 10%	0,05 ml
APS	0,05 ml

Se vuelca el agua de la placa, se enjuaga con pipeta Pasteur la superficie del gel de corrida (usando gel concentrador), inmediatamente se vuelca el gel concentrador sobre el de corrida hasta casi el borde de la placa. Se coloca el peine con cuidado de no formar burbujas. Se deja a temperatura ambiente y si es posible con luz directa para facilitar la polimerización.

C) Se retira el peine y se enjuaga la superficie de las cavidades con el buffer de reservorios, luego se colocan las placas en el aparato de electroforesis, se sujetan y se completan los reservorios con el buffer.

Sembrar las muestras en cantidad apropiada de 15- 20 μ l por calle.

Sembrar el marcador de peso molecular: 5 μ l por calle

Realizar la corrida: se corre 60 min. a 50 mA de corriente constante, aproximadamente. Si se necesita se puede dar más tiempo de corrida.

Tinción de plata para geles

Soluciones stock:

1) Fijador: 30 % (v/v) etanol, 10 % (v/v) ácido acético, completar con agua tridestilada.

2) Reductor: buffer de Tiosulfato.

A 300 ml de etanol (96 % p.A. grado), agregar 650 ml de agua tridestilada y 2,5 ml de acetato de sodio 4 M.

Ajustar el pH a 6 con ácido acético glacial y llevar a 1 litro con agua tridestilada. Guardar a 4°C.

Antes de usar: agregar 100 mg de tiosulfato de sodio a 100 ml de buffer Tiosulfato.

3) Nitrato de plata:

Preparar una solución 0,1 % (p/v) de AgNO_3 en agua tridestilada.

Antes del uso (10 minutos) agregar 25 μl de formaldehído a 100 ml de la solución de plata.

4) Revelador:

Preparar una solución al 2,5 % (p/v) de Na_2CO_3 y agregar cada 100 ml de esta solución 50 μl de formaldehído.

El revelador debe ser hecho directamente antes del uso, pero una solución stock al 12,5 % de Na_2CO_3 puede ser guardada a temperatura ambiente.

Procedimiento:

Incubar los geles a teñir con:

- Fijador: dos cambios de 15 minutos cada uno. Lavar con agua tridestilada.
- Reductor: 30 minutos, en agitación.
- Agua tridestilada: tres lavados de 10 minutos cada uno, en agitación.
- Solución de Nitrato de plata: 30 minutos en agitación.
- Rápidamente, enjuagar el gel en agua y luego realiza dos cambios del revelador.
- Revelador: 2 minutos. Vigilar la aparición del color.
- Detener la reacción con el agregado de ácido acético glacial a una concentración final de 1 % (0,5 ml/ 50 ml). Mezclar por 5 minutos.
- Lavar 3 veces con agua tridestilada de 5 minutos cada una.

Concentración de proteínas mediante tubos de celulosa

Se utilizó el tubo N° 8/32 (Viskase Sales Corp.).

- Cortar el tubo del largo adecuado y prepararlo hirviéndolo 5 minutos en una solución de EDTA 5mM y Bicarbonato de sodio 200 mM.
- Lavarlo con agua destilada y hervir nuevamente con la misma solución, 5 minutos.
- Atar un extremo del tubo con hilo de algodón, rellenarlo con la solución a concentrar y atar el otro extremo.
- Colocar el tubo en un recipiente que contenga Polietilenglicol 6000 y taparlo con éste.
- Esperar hasta lograr el volumen deseado, vigilar constantemente porque es un procedimiento muy rápido

Medición de la concentración proteica del lisado de taquizoítos (Bio-Rad protein assay)

- 1- Preparar tres a cinco diluciones del testigo (albúmina bovina)
- 2- Poner en los pocillos de la microplaca 160 µl de cada dilución del testigo y de las muestras.
- 3- Agregar 40 µl del reactivo a cada pocillo. Mezclar por agitación o por pipeteo.
- 4- Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se puede extender la incubación, pero no se debe pasar más de una hora.
- 5- Medir la densidad óptica de los pocillos en un lector de ELISA a 595 nm.

Prueba de ELISA para IFN γ bovino (BOVIGAM™. CLS, Australia)

Preparación de reactivos:

- Placas: dejar 30 minutos a temperatura ambiente las tiritas que se vayan a usar, el resto guardarlas en heladera con el desecante.
- Controles: guardar a 2 a 8 °C.
- Diluyente verde: llevar a temperatura ambiente y mezclar bien.
- Conjugado (100 X): reconstituir con agua destilada, mezclar con cuidado y mantener a 2 a 8 °C. Usar dentro de los tres meses de reconstituido.
- Diluyente azul (concentrado 5 X): llevar a temperatura ambiente y mezclar bien. Preparar mezclando 1 parte del diluyente con 4 partes de agua destilada. Puede guardarse hasta 3 meses a 2 a 8 °C.

- Preparar la solución de trabajo con el conjugado 100 X. Usar dentro de los 5 minutos y descartar lo que no se use.

Para diluir el conjugado o el cromógeno: por cada tirita de la placa: 10 µl de conjugado 100 X o cromógeno 100 X + 1 ml de diluyente azul o buffer de sustrato de enzima

- Buffer de lavado: agregar 1 parte de buffer a 19 partes de agua destilada. Mezclar bien, disolver si tiene cristales a 37° C. Puede guardarse la solución preparada a 2 a 8 °C.
- Solución de enzima- sustrato: llevar a temperatura ambiente el buffer de enzima y la solución de cromógeno 100 X. Preparar la solución como se indica anteriormente. Una vez preparada debe mezclarse bien y no debe tener color. Usar dentro de los 10 minutos de la preparación.

Procedimiento:

1. Equilibrar a temperatura ambiente los reactivos y la placa.
2. Agregar 50 µl de diluyente verde a los pocillos a usar.
3. Agregar 50 µl de muestras y controles a los pocillos que contienen diluyente verde. Los controles deben ser agregados después de las muestras. Mezclar por pipeteo 5 veces o 1 minuto en un vortex o shaker.
4. Cubrir cada placa con una tapa e incubar a temperatura ambiente por 60 minutos.
5. Descartar el contenido y lavar 6 veces a temperatura ambiente. Poner sobre papel absorbente para sacar todo el buffer remanente.

6. Agregar 100 μ l de conjugado recién preparado, diluido en el diluyente azul.
Mezclar como en el paso 3.
7. Cubrir e incubar como en el paso 4, 60 minutos.
8. Lavar como en el paso 5. La solución de enzima-sustrato es mejor prepararla después de este paso.
9. Agregar 100 μ l de solución de enzima- sustrato a los pocillos. Mezclar como en el paso 3.
10. Cubrir e incubar como en el paso 4, 30 minutos. Proteger de la luz directa.
11. Agregar 50 μ l de solución stop de enzima a cada pocillo. Mezclar cuidadosamente.
12. Leer la absorbancia dentro de los 5 minutos de terminada la reacción, usando un filtro de 450 nm.

Rango aceptable:

Control negativo: < 0.130 . Los replicados del control negativo no deben variar más que en 0.040

Control positivo: > 0.700 . Los replicados del control positivo no deben desviarse más que el 30 % de su promedio de absorbancia.

Coloración de Giemsa

- Fijar el extendido con metanol durante 5 min.
- Dejar secar en posición vertical.
- Cubrir el preparado con la solución de Giemsa 1/ 10 en buffer de Sorensen.

- Dejar colorear durante 15 min.
- Enjuagar con agua destilada y dejar secar.
- Montar y observar.

Solución buffer de Sorensen

Solución A:

Fosfato monopotásico..... 9,078 g
 Agua bidestilada..... 1 litro

Solución B:

Fosfato disódico anhidro..... 9,476 g
 Agua bidestilada..... 1 litro

En el momento de utilizar el buffer mezclar 4 partes de la solución A con 6 partes de la solución B, ésta es la solución de trabajo.

Protocolo de extracción de ARN de células animales (RNeasy QIAGEN kit)

- No utilizar más de 1×10^7 células/ ml
- Centrifugar las células y agregar al pellet 350 µl de buffer de lisis (RLT)
- Homogeneizar la muestra pasándola a través de agujas de 20G, al menos cinco veces.
- Agregar 350 µl de etanol 70 % y mezclar por pipeteado.
- Aplicar 700 µl del homogeneizado en una columna de RNeasy dispuesta en un tubo colector.

- Centrifugar 15 segundos a 10.000 rpm. Descartar el líquido filtrado del tubo colector.
- Agregar 700 µl de buffer RW1 a la columna.
- Centrifugar 15 segundos a 10.000 rpm para lavar la columna.
- Descartar el líquido filtrado y el tubo colector.
- Transferir la columna en un tubo colector nuevo. Agregar 500 µl de buffer RPE en la columna.
- Centrifugar por 15 segundos a 10.000 rpm para lavar la columna. Descartar el líquido filtrado.
- Agregar otros 500 µl de buffer RPE en la columna.
- Centrifugar 2 minutos a 10.000 rpm.
- Para eluir, transferir la columna a un nuevo tubo colector. Agregar 30 a 50 µl de agua libre de ARNasa directamente sobre la membrana de la columna.
- Centrifugar 1 minuto a 10.000 rpm.
- Si el volumen de ARN es menor a 30 µg, repetir los últimos dos pasos.

Protocolo de PCR

Preparación del Master Mix, por muestra de ARN:

Agua.....34,4 µl

Buffer.....10 µl

MgCl₂..... 2,5 µl

dNTP's.....2 µl

Primer 1.....0,3 µl

Primer 2.....0,3 μ l

Mezcla de enzimas.....2 μ l

Muestra.....1 μ l

Multiplicar el volumen de cada componente por el número de muestras a procesar.

Realizar la mezcla en un tubo (Mastermix). Mantener y preparar todas las soluciones sobre hielo hasta cargar el termociclador. Fraccionar el Mastermix en microtubos de 0,2 ml a razón de 23 μ l por microtubo en la habitación de Mastermix.

Geles de Poliacrilamida al 6 %

Agua destilada 9 ml

TBE 5X 3 ml

Poliacrilamida 30% (19-1) 3 ml

APS 10% 150 μ l

TEMED 15 μ l

Con los 15 ml preparados es suficiente para formar 2 geles.

TBE 5X

54 gr de Tris base

27,5 gr de Ácido Bórico

20 ml de EDTA 0.5 M (PH=8) se prepara con 3,72 gr EDTA 2Na y c.s.p. 20 ml agua destilada.

Completar hasta 1 litro con agua destilada.

Poliacrilamida al 30% (19-1)

28,43 gr de Acrilamida

1,57 gr de bisacrilamida

Agua destilada cantidad suficiente para 100 ml.

Siembra y corrida electroforética de los geles

Para la siembra se colocan en cada pocillo del gel 5 o 6 µl de solución compuesta del amplificado de ADN (4 o 5 µl) y 1 µl de Buffer de muestra. Si se usa el Buffer 6 X orange Loading Dye Solution (Fermentas), se prepara una gota de 5µl del amplificado de ADN con 1µl del buffer. Si se usa el Nucleic Acid Sample Loading Buffer 5 X (Bio-Rad) se mezclan 4 µl de ADN con 1µl del buffer.

Se deben colocar controles negativos como así también los marcadores de peso molecular (Ladder de 50 pb O'range ruler Fermentas y de 100 pb EZload molecular ruler, se colocan 5µl de los marcadores).

Realizar la corrida a 150 V durante aprox. 45 minutos a temperatura ambiente. Para la corrida, llenar la cuba con buffer TBE 1 x (diluir 1 en 4 el buffer TBE 5 x). Controlar durante la corrida que el buffer siempre cubra los geles.

Tinción con nitrato de plata

- 1- Sumergir el gel en el fijador durante 10 minutos (puede ser más).
- 2- Sumergir en ácido nítrico (HNO_3) 1 % durante 3 minutos.
- 3- Lavar 2 veces con agua bidestilada.
- 4- Poner el gel en solución de tinción durante 20 minutos.