


FECHA DE ADQUISICIÓN _____	
NUM. DE INVENTARIO	00286
PROCEDENCIA _____	
NUM. CALIFICACIÓN _____	
PRECIO	
DIST. _____	

	SF959
00286	.E5
	.L53 2006
	TESIS
	Ej.1

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO  
UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**LA NUEVA ETIOLOGÍA DE LA MIELOENCEFALITIS  
PROTOZOARICA EQUINA (EPM)**

**POR**

**David Sinuhé Liévanos Morales**

**TRABAJO DE OBSERVACIÓN**

**PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OBTENER EL TÍTULO DE:**

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO**

**MAYO DE 2006**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
"ANTONIO NARRO"  
UNIDAD LAGUNA**



**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**

**TRABAJO DE OBSERVACIÓN**

**LA NUEVA ETIOLOGÍA DE LA MIELOENCEFALITIS  
PROTOZOARICA EQUINA (EPM)**

**APROBADO POR EL COMITÉ**

**PRESIDENTE DEL JURADO**

  
\_\_\_\_\_  
**MC. FRANCISCO JAVIER CARRILLO MORALES**

**COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL  
DE CIENCIA ANIMAL**

  
\_\_\_\_\_  
**MC. JOSE LUIS FRANCISCO SANDOVAL ELIAS**



Coordinación de la División  
Regional de Ciencia Animal  
UAAAN - UL

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO**

**UNIDAD LAGUNA  
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**LA NUEVA ETIOLOGÍA DE LA MIELOENCEFALITIS  
PROTOZOARICA EQUINA (EPM)**

POR

**David Sinuhé Lievanos Morales**

TRABAJO DE OBSERVACIÓN QUE SE SOMETE A LA  
CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR COMO  
REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA  
APROBADO POR**

  
\_\_\_\_\_  
**MC. FRANCISCO J. CARRILLO MORALES  
PRESIDENTE DEL JURADO**

  
\_\_\_\_\_  
**MC. JOSE LUIS FRANCISCO SANDOVAL ELÍAS  
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL  
TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO**

  
**MAYO DE 2006**  
Regional de Ciencia Animal  
UAAAN - UL

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO  
UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**

**LA NUEVA ETIOLOGÍA DE LA MENINGOENCEFALITIS  
PROTOZOARICA EQUINA (EPM)**

**TRABAJO DE OBSERVACIÓN**



---

MC. FRANCISCO JAVIER CARRILLO MORALES  
PRESIDENTE



---

M.V.Z. JESÚS GAETA COVARRUBIAS  
VOCAL



---

M.V.Z. JUAN MANUEL GUILLÉN SÁENZ  
VOCAL



---

DR. JOSÉ ALFREDO FLORES CABRERA  
VOCAL SUPLENTE

## INDICE

DEDICATORIAS.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
<i>Neospora hughesi</i> .....	3
Diferencias entre <i>N. hughesi</i> y <i>N. caninum</i> .....	7
Objetivos de la investigación.....	9
REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	10
Casos reportados en caballos.....	10
Caso 1.....	11
Caso 2.....	11
Caso 3.....	12
Caso 4.....	12
Caso 5.....	12
Caso 6.....	13
Caso 7.....	13
¿ <i>Neospora hughesi</i> , una nueva especie? .....	14
Experimentación en ratones y gerbos infectados con <i>N. caninum</i> .....	16
Perros como huésped definitivo de <i>N. caninum</i> .....	19
Los gránulos proteicos densos.....	20
Infección experimental en ratones, gerbos y perros con <i>Neospora hughesi</i> .....	22
Antecedentes históricos.....	23
<b>2. MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>24</b>
2.1Preparación de las células.....	24
2.2Prueba de aglutinación de <i>Neospora</i> (NAT).....	25
2.3Inoculación experimental de ratones y gerbos.....	26
2.4Inoculación y examinación de perros.....	28
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
3.1 En la infección de ratón y gerbo.....	29
Fig. 3.1.....	31
Fig. 3.2.....	31
3.2 Infección de perros.....	33
<b>4. DISCUSIÓN.....</b>	<b>34</b>
Diferencias de <i>Neospora hughesi</i> y <i>Neospora caninum</i> basado en las proteínas granulares densas GRA6 y GRA7.....	36
¿Qué son los gránulos densos? .....	36
<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>37</b>
Cultivo de parásitos in Vitro.....	37
Reacción de cadena de la polimerasa.....	38
Tabla 4.1.....	39
Secuenciación.....	40
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
Análisis de la secuencia.....	41
Western blot.....	42
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>43</b>
Índice de figuras	
Figura 4.1.....	46
Figura 4.2.....	47
Figura 4.3.....	48

<b>Figura 4.4.....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 4.5.....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 4.6.....</b>	<b>51</b>
<b>DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>52</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>57</b>

## AGRADECIMIENTOS

A mi "Alma Terra Mater", por darme la oportunidad de prepararme como profesional y permitir que se cumplieran todas mis metas en el periodo de mi carrera como estudiante.

De manera muy especial al M.C. Francisco Javier Carrillo Morales por ser el asesor principal en este trabajo y brindarme su amistad, apoyo y confianza.

Al M.V.Z. Jesús Gaeta Covarrubias, al M.V.Z. Juan Manuel Guillén Sáenz, al DR. José Alfredo Flores Cabrera, por su valiosa participación en la elaboración de este trabajo.

A todas aquellas personas que de alguna manera u otra han participado desinteresadamente en la realización de este trabajo y en mi formación académica.

A todos mis compañeros de grupo nunca olvidare cinco años de valiosa amistad y diversión juntos y en especial a José Alfredo Morales Gonzáles, Francisco Zequera Martínez, Jesús Mejía Acosta, Víctor Maldonado Martín, Ismael Carrillo Vázquez, Fernando Ruíz Aguilera, Juvencio Salvador García Barreto, Jorge Luis Solís Barraza, Napoleón Cabrera Domínguez, Alejo Manuel Téllez Ávila, Tania Berenice Rico Salcido y Daniela Esparza Flores. De manera muy especial a Miguel Ángel García Rodríguez † que fue de gran ayuda en la traducción de información para realizar este trabajo. Donde quiera que estés Mike gracias amigo por siempre.

A mis colegas y amigos que brindaron su apoyo dentro y fuera de mi "Alma Terra Mater" al M.V.Z. Francisco Javier Carrillo Morales, M.V.Z. Eliseo Valencia García, M.V.Z. Alfredo García Amigón, M.V.Z. José Guadalupe Cabello Favela, M.V.Z. Ricardo López Sánchez, M.V.Z. Florencio Israel Sánchez Rodríguez, M.C. Emilio Duarte Ayala, Luis Humberto Hernández Cabello y a



todo aquel que no recuerde en este momento, son como otra familia que nunca olvidare. Siempre tendrán un amigo en mí; cuenten conmigo.

## DEDICATORIAS

### **A mi madre:**

**Balbina Morales Pérez**, con todo mi amor y admiración por ser un ejemplo a seguir, que me ha enseñado y guiado a alcanzar todas las metas y brindarme todo su apoyo, dedicación, esfuerzo, y ternura durante esta etapa tan importante de mi vida. TE QUIERO MUCHO MAMA GRACIAS ☺

*“SIEMPRE VAMOS A ANDAR DE LA MANO”*

### **A toda mi familia:**

A mis abuelitos aunque ya no los tengo, donde quiera que estén esto es para ustedes, jamás los olvidare.

A mis tíos y primos en especial a Aldo Hernán, Yunuén Anamelí, Dany Cuauhtemoc, Perla Yuriria y Cinthya Berenice que los quiero como hermanos, gracias por darme su apoyo y confianza, demostrándolo con palabras de aliento para seguir adelante en mi carrera profesional.

Gracias a todos ustedes compañeros, profesores, colegas, amigos, familiares por ser una base en mi formación profesional y personal, espero algún día poder recompensarlos con algo de lo mucho que me han dado. Estoy infinitamente agradecido con TODOS ustedes.

## RESUMEN

*Neospora hughesi* ha sido descrita en forma reciente como causa de la EPM Equine protozoal Mieloencefalitis, en la presente observación

Las observaciones presentadas en este trabajo soporta la identificación de *Neospora hughesi* como una especie separada de *Neospora caninum* y provee de nuevos métodos para distinguir a las dos especies. La distinción original fue hecha por Marsh et al., 1998 y fue basada sobre características morfológicas, antigénicas y genéticas. Este trabajo contiene el primer reporte diferencial de la actividad de las dos especies de *Neospora* en roedores y perros así como una primera descripción de los genes de GRA6 y GRA7 y proteínas de *N. hughesi*.

De igual forma el estudio proporciona información sobre la susceptibilidad de cepas de ratones y gerbos a Neosporosis por *N. hughesi* demostrando que, de las especies de roedor y de las cepas investigadas solo la cepa interferón gama ( $\gamma$ -IFNOK) fueron mas susceptibles a la enfermedad por *N. hughesi*. El ratón  $\gamma$ -IFNOK se uso como un bioindicador de infección por *N. hughesi*. Infección en ratones BALB/c, CD-1, C57BL/6 y gerbos con *N. hughesi*, tienen menos lesiones que las infecciones por *N. caninum*.

En estos roedores las infecciones con *N. caninum* produjeron signos en el SNC y mortalidad. Los ratones BALB/c, CD-1 inmunosuprimidos y gerbos fueron usados como un modelo estándar de enfermedad del SNC por *N. caninum*. En contraste, no fueron observados signos clínicos o mortalidad en ninguno de estos roedores infectados con *N. hughesi*.

Los perros alimentados con cerebros infectados de *N. hughesi* de ratones CD-1 no liberaron occistos de *N. hughesi*, detectados por análisis coproparasitoscopico y los ratones  $\gamma$ -IFNOK alimentados con materia fecal concentrada de perros, no murieron o desarrollaron títulos de anticuerpos a las especies de *Neospora*. Esto puede indicar que el huésped definitivo de *N. hughesi* esta limitado a Norteamérica.

Los genes de dos antígenos conservados de la familia de proteínas granulares densas de *N. hughesi* y *N. caninum* y fueron secuenciados y comparados entre ellas. Las diferencias observadas en las proteínas GRA6 y GRA7 de las dos especies de *Neospora* por amplificación de y secuenciación de sus genes. Se observo una diferencia del 4.0% en su secuencia de nucleótidos y dio un 9.0% en su secuencia de aminoácidos que se demostraron en GRA6.

Las nuevas proteínas de *N. hughesi*, son la NhGRA6 y la NhGRA7, que después del análisis secuencias se encontró una diferencia en un 14.8% de diferencia en la reducción de la secuencia entre NhGRA7 y de NcGRA7 y de un 4% de diferencia entre NhGRA6 y NcGRA6. En esta observación se soporta la identificación de *N. hughesi* como una especie separada de *N. caninum* y se describen los nuevos métodos de distinción entre las dos especies.

# INTRODUCCIÓN.

## Breve historia de Mieloencefalitis Protozoal Equina (EPM).

Un síndrome clínico llamado mielitis segmental fue descrito por primera vez en detalle por *Roony et al., 1970*, basado en las observaciones de 52 casos de ganado caballar, de los cuales 38 caballos fueron de Lexington, Ky. Y 12 casos que se presentaban en la universidad de medicina veterinaria de Philadelphia Pennsylvania. Y otros dos casos de otras fuentes.

Tres grupos de investigadores que de forma separada, fueron los primeros que informaron lesiones de este tipo de protozoarios en caballos de esta enfermedad (mielitis segmental) estos fueron (*Cusick et al., 1974; Beech y Dodd 1974, Dubey et al., 1974*). en 1974 el escrito por *Cusick et al; 1974*, fue el primero que se presento y describe signos clínicos y gruesas lesiones y proporciona ilustraciones del protozoario típico y que describe y llamo a este padecimiento como mieloencefalitis protozoal equina (EPM); ellos lo confundieron con *Toxoplasma gondii* y esta claro ahora que el parásito que informo *Cusick y et al., 1974*, era *Sarcocystis neurona*; por que ellos ilustraron claramente un merozoito que no contiene rhoptrias en un esquizonte en división por endopoligenia. *Beech y Dodd* en 1974 reportaron lesiones por protozoarios en caballos (light) algunos iguales a los que vieron en el reporte original de *Roony y et al., en 1970*.

*Dubey et al., 1974* informo lesiones similares en caballos y distinguió el parásito de *Toxoplasma gondii*.

*Dubey en 1974 y en 1976* reexaminó las lesiones en caballos de los casos observados anteriormente por *Cusick et al., 1974 y de Beech y Dodd en 1974* y concluye que ese parásito no era *Toxoplasma gondii* y que probablemente era una especie de *Sarcocystis spp.* *Simpson y Mayhew en 1980* proporcionan evidencia estructural de ese protozoario que causa EPM y que era un *Sarcocystis spp.*

Beech en 1974 llamo a esta enfermedad como encefalomiелitis protozoarica equina (Encephalomyelitis Protozoan Equine) pero *Mayhew et al., 1976* le llamo Equine Protozoal Mieloencefalitis “y este nombre ha ganado en los últimos 25 años”.

Estos autores *Beech, 1974.*, y *Mayhew et al., 1976*; introdujeron el uso de una terapia farma-antiprotozoarica.

En 1980 se realizaron esfuerzos para reproducir EPM en condiciones experimentales en caballos por inoculación oral de oocystos y esporozoitos de diferentes parásitos apicomplexos; incluyendo *Sarcocystis* en 1980 (*Fayer y Dubey en 1986*), estos estudios dejaron la evidencia para determinar el agente causal de EPM. Varios casos de EPM fueron examinados por *Dubey* de diferentes localidades de la unión americana; estudios estructurales del parásito indicaban a un solo parásito como agente causal presente de esta enfermedad (*Dubey et al., 1991*).

El nombre de *Sarcocystis neurona* fue el propuesto para el agente causal de EPM en caballos en 1991, y este parásito fue aislado por primera vez de caballos por *Dubey et al.*, en Estados Unidos, Ithaca; NY.

## **Neospora hughesi.**

Antes del reconocimiento de *Neospora hughesi* como un agente potencial casual, todos los casos de Mieloencefalitis Protozoal Equina (EPM), eran atribuidos a *Sarcocystis neurona*.

Sin embargo, en un estudio retrospectivo de caballos diagnosticados con *S. neurona* el organismo solo pudo ser demostrado en el 67% por tinción

inmunohistoquímica de tejido espinal de los equinos analizados (Hamir et al., 1993).

Fluido cerebro espinal y sueros de equinos fueron usados como pruebas de diagnóstico de *Sarcocystis neurona* (EPM), los cuales mostraron reacciones cruzadas con antígenos de *Neospora*.

*Neospora hughesi* esta recientemente descrita como una causa de Mielencefalitis Protozoal Equina (EPM), la enfermedad neurológica mas común de caballos en los EU (Dubey et al., 1991; Fenger et al., 1997; Harmir et al., 1998; Dubey et al., 2000).

El reconocimiento de *Neospora* como agente de EPM ha sido reciente y los eventos se consideran lentos y raros, más en los caballos con EPM analizados con *S. neurona*. Las técnicas de diferenciación entre *N. caninum* y *N. hughesi*. no se han descrito, así sin estudios compararon la prevalencia de dos especies.

Dubey et al., (1999) reportó que 69 de 296 (23%) caballos de los EU tuvo anticuerpos de *Neospora* spp. usando la prueba de aglutinación de *Neospora* (NAT). Un estudio en Alabama EU, mostró una prevalencia del 12% de anticuerpos IgG a *Neospora* en un caballo asintomático por la prueba de fluorescencia indirecta de anticuerpos (IFA) (Ceadle et al., 1996).

No se sabe en que proporción los casos de EPM son causados por *Neospora*. El potencial, para un diagnostico falso de *S. neurona* en caso de *Neospora* a EPM es grande debido a la reactividad cruzada entre los dos parásitos en análisis de Western blot (WB). El WB es una prueba comúnmente utilizada para el diagnostico de *S. neurona* EPM. La alta prevalencia de anticuerpos de *S. neurona* en caballos, aproximadamente el 50% en EU y la posible contaminación de sangre de muestras de CSF también contribuyen al potencial de un diagnóstico falso (Dubey et al., 2000).

*Neospora* en estas fechas no estaba reconocida como agente de EPM y no era considerada durante los procesos de diagnóstico como el agente de EPM, el diagnóstico a sido hecho en varios casos por inmunohistoquímica al examen post mortem tiñendo secciones de tejido y no por el procedimiento común para EPM procesado.

Es probable que se den casos de *N. hughesi*. en otros animales que en caballos, que habían sido diagnosticados con *N. caninum*. La prevalencia de *N. hughesi*. en otros animales no se sabe, para entender la distribución de este parásito se necesitan más técnicas que ayudarían a distinguir entre las 2 especies de *Neospora*.

**Patricia A. Conrad.** De la universidad de California UC Davis plantea que el diagnóstico de EPM causado por *Sarcocystis neurona* es confuso e inconcluso y para esto y en consideración a que:

Un nuevo protozoario, *N. hughesi*. , fue recientemente identificado como otra causa de EPM. De tal forma es necesario que los veterinarios realicen pruebas y métodos específicos para el diagnóstico de EPM.

De esta manera se plantea que se realicen los siguientes estudios y objetivos:

- Determinar si la infección de *S. neurona* y *N. hughesi*. pueden ser distinguidos y mejorar el diagnóstico usando nuevas pruebas de anticuerpos. Específicamente:

1. Completar el desarrollo de la prueba de aglutinación modificada (MAT) para detectar anticuerpos equinos a *S. neurona* y *N. hughesi*. (por 1 año).

2. Desarrollo de la prueba de ELISA que se usa para todos los parásitos o para antígenos recombinantes de *N. Hughesi* (cada año).
3. Comparar en la sensibilidad y especificidad de la prueba de IFAT, MAT, antígeno recombinante de ELISA, ELISA para todos los parásitos y el ensayo de Western blot desarrollada para cada parásito usando una "sangre estándar" de suero cerebro espinal de equino CSF (cada dos años).

Bradd C. Barr. De la universidad de California de UC Davis; en el planteamiento del problema cita que un parásito llamado *S. neurona* fue considerado la causa única de EPM. Un nuevo parásito identificado, *N. hughesi*. (llamado así por el Dr. John P. Hughes) ahora ha sido reconocido como otra causa de esta enfermedad. La infección de *N. hughesi*, sus lesiones, y el parásito actual es parecido a *S. neurona* es probable que algunas infecciones de *Neospora* han sido mal interpretadas como infecciones por *Sarcocystis*.

Pruebas serológicas tuvieron que ser desarrolladas en caballos para identificar la exposición a especies de *Neospora* en caballos. Antes los investigadores podían evaluar el rango de exposición y la causa de la enfermedad por *Neospora*, como es necesaria la validez del diagnóstico por prueba de sangre usando suero proveniente de casos de animales positivos. Sin esta validación, los estudios de seroprevalencia y la interpretación de los resultados es confusa como la interpretación de *S. neurona* con Western blot.

Por los primeros estudios en caballos infectados experimentalmente, es posible evaluar la ocurrencia en pruebas de sangre antes de valorar la seroprevalencia.

Para esto plantea los siguientes objetivos para una base de estudio:

- Evaluar varias pruebas de sangre a *Neospora* en caballos infectados experimentalmente. Específicamente:

1. examinar la respuesta de anticuerpos a *Neospora* por cuatro semanas siguiendo la inoculación de caballo con *N. hughesi*. utilizando una prueba de aglutinación, anticuerpos fluorescentes y dos pruebas diferentes de ELISA y el Western blot.
2. Monitorear la *Neospora* de los caballos infectados por 4 meses observando si ellos desarrollan enfermedad clínica y mantienen títulos de anticuerpo persistentes.

El resultado de este estudio piloto indica que entre las dos pruebas de ELISA y la prueba de anticuerpos fluorescentes, solo la prueba de anticuerpos fluorescentes fue efectiva en detectar a *N. hughesi*. y a sus anticuerpos específicos en los dos caballos infectados experimentalmente y en los 2 infectados naturalmente.

Esto provee los primeros datos con los métodos de evaluación serológica usados para determinar la prevalencia de caballos expuestos naturalmente a *N. hughesi*. La prueba de anticuerpos fluorescentes ahora puede ser usada para evaluar la seroprevalencia de *N. hughesi*. y el factor de riesgo.

Con esto entendemos y conocemos que un resultado seropositivo no es evaluación como la causa de la enfermedad clínica, la prueba de anticuerpos fluorescentes puede ser usada a evaluar la relación en caballos con necropsia entre expuestos a *N. hughesi*. y confirmados con encefalomiелitis inducida por *N. hughesi*.

## **Diferencias entre *N. hughesi* y *N. caninum*.**

Quistes conteniendo bradizoitos y taquizoitos fue lo primero observado en tejidos de perros (*Bjerkas et al., 1984; Dubey et al., 1988a, 1988b; Bjerkas y Presthus 1988*). Los oocystos fueron recientemente aislados de heces de perros (*McAllister*



et al., 1998; Lindsay et al., 1999). Los perros son el único huésped definitivo conocido de *N. caninum*, aunque otros cánidos son sospechosos a excretar oocystos.

*N. caninum* se ha manifestado en casos de aborto, partos prematuros y enfermedades congénitas neurológicas en perro, ganado (Marr et al., 1991), gatos (Dubey et al., 1990), venados (Woods et al., 1996), cabras (Barr et al., 1992; Dubey et al., 1992), ovejas (Dubey et al., 1992) y en infecciones experimentales con ratones (Cole et al. 1995).

Esto fue originalmente considerando que el organismo observado de *Neospora* en todos los casos de neosporosis equina fue *N. caninum* (Dubey y Porterfield 1990; Gray et al., 1996; Marsh et al., 1996; Lindsay et al., 1996; Daft et al., 1997), pero esto ha sido bien identificado en los últimos tres casos como una nueva especie llamada *N. hughesi*. (Marsh et al., 1998; Hamir et al., 1998; Cheatle et al., 1999).

Anterior a la descripción por Marsh et al., (1998), el organismo de *Neospora* observada en caballos nunca ha sido caracterizado o clasificado por técnicas moleculares. *N. hughesi* es morfológicamente muy similar a *N. caninum*.

Las 2 especies no pueden ser distinguidas en un microscopio de luz. Sin embargo, al examen ultra estructural por transmisión de microscopio electrónico (TEM) se han demostrando un gran numero de rhoptrias polares en taquizoitos en *N. hughesi* y una membrana muy delgada que envuelve a la pared del quiste *N. hughesi* en etapas de bradizoito.

Las diferencias entre los antígenos fueron ilustradas por el análisis WB y varias diferencias fueron descubiertas en el Espaciador transcriptor interno (ITS-1) usando unidades genéticas selectas de PCR para *N. caninum* ampliando la frecuencia (Marsh et al., 1998).

También se ha observado diferencias en las proteínas SAG1 y SRS2 y en sus genes que las codifican. *Marsh et al., 1999*. Adicionalmente, reactividad específica con el anticuerpo monoclonal 6C11 levantado junto al antígeno CAG1 de *N. caninum*, el cual no reacciona cruzadamente con *N. hughesi*, SAG1 puede ser usada para distinguir las dos especies. (*Marsh et al., 1999*).

Las técnicas serológicas más comúnmente utilizadas para diagnosticar neosporosis es la prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes (IFA1) y la prueba de aglutinación, estas reaccionan contra anticuerpos en suero para *N. caninum*, pero estas no pueden distinguir entre especies de *Neospora*. (*Marsh et al., 1999*). ya que esto solo puede realizarse por técnicas de Western blot, infectando animales vivos.

## **Objetivos de la investigación.**

Para responder adecuadamente a la comunidad veterinaria en la descripción de esta nueva causa de EPM es necesario realizar investigaciones para demostrar claramente la similitud entre *Neospora caninum* y *Neospora hughesi* en su patogenicidad, transmisión y su respuesta a la terapia. Un modelo experimental es necesario para probar la eficacia de terapias contra este nuevo patógeno.

El huésped definitivo de *N. hughesi* no ha sido plenamente identificado para entender el ciclo de vida y la transmisión de este agente y avisar propiamente a los propietarios de caballos sobre la administración de prácticas preventivas. Una simple prueba diagnóstica para distinguir las 2 especies de *Neospora* son malas para desarrollar un claro entendimiento de la distribución de estos 2 parásitos causantes de enfermedades.

Una determinación de la similitud antigénica de las 2 especies de *Neospora* podría ser de mucha ayuda si vacunamos contra *N. caninum* para la protección contra neosporosis por *N. hughesi*.

La propuesta de esta investigación fue la de:

1) desarrollar un modelo experimental con roedores para enfermedades causadas por *N. hughesi*. el cual podría ser utilizado para probar el potencial de agentes terapéuticos y para investigar la patogenicidad e inmunología de neosporosis por *N. hughesi*.

2) determinar si el perro es el huésped definitivo de *N. hughesi*.

3) evaluar la similitud antigénica y genética entre los gránulos densos de la proteína de *N. caninum* NcGRA6 y NcGRA7, y los genes y proteínas de *N. hughesi*.

## REVISIÓN DE LITERATURA.

### **Casos reportados en caballos.**

EPM es caracterizado por los síntomas clásicos de una enfermedad neurológica: cefalea, ataxia, caminado en círculo, desorientación y atrofia muscular, pero esto también se asocia con cualquier disfunción neurológica de cualquier origen (*Dubey et al., 1991*). Los caballos Pueden ser afectados a cualquier edad. EPM ha sido reportada en norte y sur de América, y en Norteamérica se considera como la más común de la enfermedad neurológica en equinos (*Dubey et al., 1991; Mackay et al., 1992; Hamir et al., 1998; Fenger et al., 1997*).

*Sarcocystis neurona* fue anteriormente reconocida como la única causa de EPM y el rango geográfico limitado de la zarigüeya como huésped definitivo, explica como la enfermedad se ha distribuido primeramente en los Estados Unidos de Norteamérica (*Dubey et al., 1991*). Esto esta sin aclarar porque no se

reporta que *Neospora* indujo EPM fuera de América. Detalles de casos de neosporosis en equinos es presentada en la siguiente literatura.

**Caso 1** Dubey y Porterfield en 1991, reportaron los hallazgos de taquizoitos de *N. caninum* en el pulmón de un feto abortado de equino en Carolina del Norte. El organismo fue 3-5µmx2-3µm, y dividido por endodiogénesis, lo cual distinguió de *Sarcocystis* spp. el parásito reaccionó al suero anti-*N. caninum* en una tinción inmunohistoquímica del complejo avidina biotina.

El reporte por *Dubey y Porterfield (1990)* fue el primer reporte de infección por *Neospora* en caballos e indicó que *Neospora* puede ser transmitido transplacentariamente, causando probablemente aborto. Ninguna otra especie de *Neospora* ha sido reportada, por consiguiente ninguna prueba estuvo evaluando la distinción de especies de *Neospora* encontrados en fetos de equinos. Esto no se sabe si *N. hughesi*. es transmitida transplacentariamente, pero las evidencias indican que es una posibilidad.

**Caso 2** La neosporosis visceral fue reportada en un yegua Appaloosa de 10 años de edad con una historia clínica de anemia y bajo peso (*Gray et al., 1996*). Las lesiones fueron encontradas en los nódulos linfáticos mesentéricos e intestino delgado. Etapas de taquizoitos fueron vistas en la lamina propia y la submucosa del intestino delgado y reaccionaron con tinción inmunohistoquímica para *N. caninum*. Algunas inflamaciones se observaron en el colon, enteritis, mala absorción y pérdida de peso. Todos los nódulos linfáticos mesentéricos se encontraron infiltrados con sangre y agregados con neutrófilos y macrófagos. La localización de las lesiones indicó una reciente infección oral que pudo haber sido avanzada por la administración de grandes dosis de un inmunosupresor como los corticosteroides. Se administró dexametasona por 4 días antes de la muerte. Esta se administró porque la historia clínica de pérdida de peso crónico y anemia se desconocía la etiología que no se ha resuelto. Solo la etapa de taquizoito de la *Neospora* fue observada en estos caballos. El caballo tuvo una historia de

inmunosupresión descuidada, el cual podría permitir una más rápida y severa progresión de la enfermedad como fue esta inusual manifestación.

**Caso 3:** Yegua pinta de 19 años de edad, con una historia de 1 día de parálisis lumbar y un proceder anormal fue diagnosticado de neosporosis después de la necropsia por *Daft et al., (1996)*. Los taquizoitos fueron observados por tinción inmunohistoquímica de cerebro, columna vertebral y nervios periféricos. Los bradizoitos llenaron el tejido cístico siendo observados en secciones de nervios periféricos indicando que la infección no era reciente. Se encontraron focos hemorrágicos en la medula espinal. Posiblemente por una compresión debido a una fractura, la yegua también mostró signos de la enfermedad de cushing que pudo haber sido por un mecanismo inmunosupresor seguido a una reactivación latente a una infección de *Neospora*.

**Caso 4:** Neosporosis neonatal fue reportada en un potro cuarto de milla de 1 mes de edad originario de Wisconsin (*Lindsay et al., 1996*). La pared protectora del quiste de *Neospora* fue encontrada en el tálamo, hipotálamo, cerebro y músculos alrededor del ojo del potro. Los parásitos en estos órganos revelaron *N. caninum* por medio de tinción inmunohistoquímica. Lesiones, pero no fueron observados parásitos en el bazo, hígado, nódulos linfáticos mesentéricos y corazón. El potro ha mostrado signos en la vista y problemas neurológicos desde el nacimiento y la infección fue atribuida a ser congénita.

**Caso 5:** En 1996, Marsh et al., describe la *Neospora* en un caballo cuarto de milla de 11 años en California el cual exhibió una incoordinación por tres meses y desarrolló súbitamente incontinencia y una severa incoordinación. El caballo fue diagnosticado con *S. neurona* por la prueba de WB con líquido cefalorraquídeo recomendado por un diagnóstico de laboratorio comercial. Sobre una examinación microscópica de tejido de cerebro y médula espinal el organismo fue identificado como *Neospora*. Cuando el líquido cefalorraquídeo fue repetido con *S. neurona* y *N. caninum* con preparaciones antígenas totales de taquizoitos, solo 2 reacciones en banda sobre el *S. neurona* correspondiente a las bandas reconocidas por el control

de caballos positivos a *S. neurona*. Un buen número de reactivos en banda con *N. caninum* correspondiente a las del control positivo de *N. caninum*. Este resultado mostró que los caballos pueden mostrar ambos agentes, y que ambos, o solo uno pudo haber sido el causante de EPM en este caso.

**Caso 6:** Un organismo de *Neospora* fue reportada en 1998 por Hamir et al., en el cerebro y medula espinal de un caballo de 20 años de edad de Oregon con ataxia severa. El caballo también mostró un adenoma tiroideo y fue tratado con dexametasona una vez diagnosticado el EPM para hacer incrementar el número de protozoarios. Los caballos probados positivos a *S. neurona* por análisis de WB de líquido cefalorraquídeo, pero no por PCR de fluido cerebro espinal usando cebadores (primer) específicos de *S. neurona*. Análisis y microscopía inmunohistoquímica reveló grandes grupos de taquizoitos de *Neospora* asociado con ligeras áreas de inflamación. Estos resultados indican también que estos tienen reacciones cruzadas con anticuerpos de *Neospora* contra algún antígeno de *S. neurona*.

**Caso 7:** Un caballo Palomino, cuarto de milla de 13 años con *Neospora* indujo a la EPM siendo reportada por Cheadle et al. 1999. el caballo reportó ataxia y debilidad lumbar de 5 meses de duración el análisis cefalorraquídeo por WB fue positivo por la presencia de anticuerpos de *Neospora* pero no de *S. neurona*. Sobre la necropsia, no se encontraron lesiones. Los parásitos fueron recuperados de cultivos celulares inoculados con secciones homogenizadas de secciones de medula espinal que correspondieron a los cuartos traseros débiles exhibidos por el caballo. Los parásitos divididos por endodiogénia reaccionaron a un suero positivo conocido de *N. caninum*. El parásito fue identificado como *N. hughesi*. basado en el perfil de WB y a la falta de reacción con el anticuerpo monoclonal 6C11 específico de *N. caninum* antígeno SAG1.

## **¿*Neospora hughesi*, una nueva especie?**

En base a los resultados y las observaciones realizadas y analizadas en los 7 casos anteriores *N. hughesi*, se manifiesta como una perspectiva de un nuevo genero de *Neospora*.

En 1998, *Marsh et al.*, publicaron una detallada descripción de *Neospora* aislada y cultivada que perjudicó neurológicamente a un cuarto de milla. Ellos lo nombraron como una nueva especie *N. hughesi*. (*Marsh et al.*, 1998). Diferencias morfológicas entre *N. hughesi* y *N. caninum* son fácilmente extraviadas por microscopio de luz. Distinciones ultra estructurales pueden ser en el numero de rhoptrias: 13-27 en *N. hughesi* y 8-18 en *N. caninum*. El grosor de la pared cística también difiere: 0.43  $\mu\text{m}$  para *N. hughesi* y 0.5-1.0  $\mu\text{m}$  para *N. caninum*.

Mas reportes de *Neospora* en caballos aparecieron antes de la descripción de *N. hughesi*. Los organismos de *Neospora* en estos casos fueron atribuidos a *N. caninum* y una retrospectiva distinción de especies no pudo ser en mas de estos casos. Tres únicos antígenos de *N. hughesi*, de aproximadamente 63, 29 y 16kDa se observaron, y un antígeno proteico de aproximadamente 45kDa de *N. caninum* no se ve para ser expresado por *N. hughesi*. (*Marsh et al.*, 1998) anticuerpos monoclonados de 6C11 elevaron al antígeno de *N. caninum* SAG1 sin reaccionar con el antígeno SAG1 de *N. hughesi*. (*Marsh et al.*, 1999).

El reporte de casos de neosporosis reveló importantes aspectos al diagnosticar la EPM. Reacciones cruzadas de anticuerpos de *Neospora* contra *Sarcocystis neurona* dieron resultados falsos positivos. La presencia de anticuerpos en suero o líquido cefalorraquídeo con *S. neurona* puede indicar una previa infección, y *S. neurona* podría no ser el agente causal de la enfermedad.

Mas del 50% de los caballos de Norteamérica tienen anticuerpos de *S. neurona* y de estos muy pocos muestran signos (*Hamir et al.*, 1998). En un estudio retrospectivo inmunohistoquímico realizado con el Colegio de Medicina Veterinaria de la Universidad del estado de Oregon, fueron presentados

organismos de *S. neurona* en tejido cerebral y espinal de solo 67% de los caballos diagnosticados con EPM (Hamir et al., 1998).

El otro 30%, no se detectó ningún estadio de *S. neurona* en la medula espinal. El resultado sugirió que arriba del 30% de los diagnosticados por WB, podrían ser diagnosticados como falsos positivos. Las pruebas diagnosticas demostraron actividad de anticuerpos contra *S. neurona* en el líquido cefalorraquídeo de caballos presentando EPM, esto podría desenmascarar los casos de EPM por *N. hughesi*.

El reconocimiento de *Neospora* como agente de EPM ha sido reciente y los eventos se consideran lentos y raros, y más en los caballos con EPM probados con *S. neurona*. Técnicas simples para diferenciar entre *N. caninum* y *N. hughesi*. no se han descrito, y no han servido para comparar la prevalencia de las dos especies que han sido reportados. Dubey et al., (1999) reportó que 69 (23%) de 296 caballos de los EU tuvieron anticuerpos de *Neospora* spp. usando la prueba de aglutinación de *Neospora* (NAT).

Un estudio en Alabama EU, mostró una prevalencia del 12% de anticuerpos IgG a *Neospora* en un caballo asintomático por la prueba de fluorescencia indirecta de anticuerpos (IFA) (Ceadle et al., 1996). Este grado de exposición de caballos de EU a un agente potencial que causa una enfermedad severa fueron los objetivos para realizar investigaciones en el futuro.

En estudios realizados por Dubey et al 1999; en argentina y brasil detecta anticuerpos contra *Neospora* spp. en caballos usando la técnica de NAT.

No se encontró una explicación en la propuesta realizada para hacer las diferencias en prevalencia entre Norteamérica y Sudamérica. Estas diferencias podrían ser debido a las diferentes practicas de manejo de los equinos o bien a la limitación geográfica de el huésped definitivo de *Neospora hughesi*.



## ***Experimentación en ratones y gerbos infectados con N. caninum.***

Los roedores facilitaron la investigación sobre *N. caninum* y fueron descritos en métodos quimioterapéuticos, produciendo una vacuna, descubriendo el huésped definitivo y comprendiendo la patogenicidad e inmunología de *N. caninum*. Similares experimentos pero utilizando *N. hughesi*, podrían ser usados para el mismo propósito. Los métodos descritos en esta investigación son basados en un trabajo con *N. caninum* en un esfuerzo para comparar la actividad biológica y patológica de las dos especies de *Neospora*.

En tres modelos estándar de roedores infectados con *N. caninum*: ratones criados e inmunosuprimidos con acetato de metilprednisolona (MPA), ratones BALB/c y gerbos. Estos modelos también fueron aplicados en ratones C57BL/6, y fueron descritos detalladamente y usados rutinariamente. Se documentó de las infecciones de *N. caninum* en ratones en la literatura, y fue usada para comparar la patogenicidad de las infecciones de las dos especies de *Neospora*. La infección de ratones gama interferón ( $\gamma$ -INFKO) con *N. caninum* no fue bien descrita.

Técnicas estándar de inoculación en ratones blancos con *Neospora caninum* se realizaron en este experimento por Lindsay y Dubey 1989 y 1990. Se comparó la infección de acuerdo con el modo de administración observándose que con infección intraperitoneal con taquizoitos fue más consistente y causó la muerte más rápida. Sin embargo, cuando los ratones fueron infectados en forma diferente, la muerte ocurrió antes de que los signos clínicos de neosporosis fueran observados. Las inoculaciones con taquizoitos en forma oral y subcutánea crearon más lentamente el progreso de la enfermedad. La infección con bradizoitos en forma oral y subcutánea crearon condiciones similares de la enfermedad a los taquizoitos, pero el número administrado de parásitos a cada animal dificultó la estandarización de la infección.

Solo los taquizoitos pudieron mantenerse en cultivos celulares en dichos experimentos. La inyección subcutánea de taquizoitos fue usada para asegurar la

infección y asegurar la concentración de estos organismos (taquizoitos de *Neospora*), que a la vez fueron encontrados en las lesiones encontradas.

En ratones Swiss Webster, *Lindsay y Dubey (1989)* encontraron que cuando los inmunosuprimían con 4mg de MPA en inyección intramuscular y los infectaron con taquizoitos de *N. caninum*  $2 \times 10^5$ , los ratones desarrollaban una severa neosporosis con neumonía, poliomiositis, hepatitis, encefalitis y pancreatitis. Estos ratones murieron en 13 días post infección. Los ratones Swiss Webster con 2mg de MPA y la misma dosis de taquizoitos desarrollaron un movimiento incoordinado con 14 días post infección. Estos desarrollaron neosporosis crónica, con encefalitis, neumonía y poliomiositis, haciéndose evidentes en la necropsia. Los quistes fueron encontrados en el cerebro de estos ratones.

Ratones Swiss Webster cuando no fueron inmunosuprimidos no desarrollaron enfermedad, ni se observaron parásitos en sus tejidos, pero desarrollaron anticuerpos contra *N. caninum*. la inmunosupresión en el ratón con neosporosis aguda o crónica ha sido utilizada extensivamente para la investigación de la *N. caninum* (*Lindsay y Dubey, 1989, 1990a, 1990b, 1990c; Lindsay et al., 1991*).

*Lindsay et al., (1995)* infectó a un ratón BALB/c con *N. caninum* y encontró que manifestaciones del SNC podrían ser inducidas en este ratón sin el uso de MPA. La infección del ratón BALB/c con taquizoitos  $2 \times 10^5$  de la cepa NC-1 de *N. caninum* causó enfermedad en el SNC caracterizados por parálisis lumbar, debilidad y muerte entre 26-70 días. Las lesiones en el cerebro estaban dispersadas no con preferencia regional. Los taquizoitos fueron vistos en algunas lesiones, pero los quistes de *N. caninum* no fueron demostrados. El ratón BALB/c infectado con la cepa NC-3 de *N. caninum* no desarrollo signos clínicos y solo mostró raras lesiones en el cerebro de moderada intensidad. Los ratones BALB/c son mas usados que el modelo inmunosuprimido para probar las terapias contra neosporosis, porque de lo observado sobre todos los signos y la larga duración de la enfermedad, aunque permite a la vez tiempo para la intervención para el

tratamiento eficaz y las facilidades de evaluación. El ratón BALB/c es menos probable a sufrir una infección oportunista que los ratones inmunosuprimidos.

Enfermedades del SNC pueden ser inducidas en ratones C57BL/6 libres de MPA administrando altas dosis de taquizoitos  $5 \times 10^7$  de la cepa NC-1 de *N. caninum* (Long et al., 1998).

Las lesiones vistas en estos ratones fueron similares a las vistas en los ratones BALB/c en todos los niveles de infección. En un estudio comparando la patogenicidad de la cepa NC-1 de *N. caninum* en los ratones C57BL/6 y BALB/c, no se observaron diferencias significativas. En ambos, la infección primeramente fue marcada por una formación de un granuloma pulmonar no fatal y necrosis hepática no asociada con la mortalidad. La muerte debido a la encefalitis solo ocurrió en los grupos que recibieron altas dosis de taquizoitos  $5 \times 10^7$  y ocurrió más a menudo después de la sexta semana de infección (Long et al., 1998).

En contraste, Eperon et al., (1999) encontró que un tipo salvaje en ratones C57BL/6 infectado intraperitonealmente con taquizoitos  $10^5$  de la cepa NC-1 fueron resistentes a neosporosis pero deficientes en células B, los ratones C57BL/6 muriendo dentro de los 29 días cuando se les administró la misma dosis.

Las diferencias en los resultados en los ratones C57BL/6 con infecciones de *N. caninum* podría ser debido a disminución de la virulencia del parásito debido a los continuos pases del parásito en los cultivos celulares o bien a una respuesta inconsistente de estos ratones a las infecciones por *N. caninum*. Por consiguiente el ratón C57BL/6 no es usado como modelo para la infección de *N. caninum*. El ratón gama interferon  $\gamma$ -INFKO no es usado como modelo para la infección de *N. caninum* porque la mortalidad ocurre rápidamente y no se presentan los signos del SNC. En estos ratones la infección de *N. caninum* causa severos daños en hígado, vísceras y a menudo pulmón. El ratón  $\gamma$ -INFKO es usado como un bioensayo para la presencia de oocistos de *N. caninum*.

Los gerbos son susceptibles a infecciones con taquizoitos y oocistos de *N. caninum* (Gondim et al., 1999; Dubey y Lindsay 2000). Los taquizoitos de *N. caninum* pudieron ser retirados de los tejidos del gerbo cuando se infectaron intraperitonealmente (Gondim et al., 1999). Los gerbos fueron propuestos como una ventajosa alternativa al ratón  $\gamma$ -INFKO como un bioensayo para la detección de oocistos de *N. caninum* en las heces de perros por su alta sensibilidad a pocos oocistos y bajo costo.

### **Perros como huésped definitivo de *N. caninum*.**

McAllister et al., en 1998 demostró que el perro es el huésped definitivo de *N. caninum*. Los tejidos con quistes de *Neospora* de las cepas NC-2 y NC-Beef fueron producidos inmunosuprimiendo ratones blancos. Los cerebros de los ratones fueron cultivados por un mes post infección y suministrados a perros de la raza Beagle de 8 semanas de edad. Los oocistos fueron observados entre los 8 y 27 días después de la infección de los perros por el método de flotación glucosada. Los oocistos fueron puestos en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 2% agitados y aireados por 3-7 días, después se inocularon subcutánea y oralmente dentro de los ratones. Los taquizoitos fueron observados en estos ratones y fueron identificados a *N. caninum* por el método de PCR usando cebadores (de las siglas en ingles primers) específicos a *N. caninum*. Este experimento fue confirmado por Lindsay et al. en 1999 usando las cepas NC-Liverpool y NC-Beef de *N. caninum*.

Los perros no aparentan ser los huéspedes definitivos óptimos para *N. caninum* porque el porcentaje de infección es bajo y pocos produjeron oocistos (McAllister et al., 1998). *Neospora caninum* puede ser que permanezca presente en ganado por repetida transmisión congénita. Sin embargo, la prevalencia de anticuerpos a *Neospora* en una amplia variedad de mamíferos herbívoros y carnívoros repitió la transmisión congénita siendo documentada, indicando que estos, además son una infección de *Neospora* de origen ambiental. Lindsay et al., (2000) propuso que algún otro cánido puede ser un mejor huésped definitivo.

con granuloma proteico denso único a *N. caninum* el cual se aisló por selección de un banco genético de DNA de *N. caninum* en *E. coli* (Hempill et al., 1998; Liddell et al., 1998). La codificación y caracterización de los genes de estas proteínas ha sido completado (Banco Genetico, número de acceso AW119252 y AF029350).

La proteína GRA7 de *N. caninum* y la proteína GRA7 de *T. gondii* comparte un 42% de homología (Jacobs et al., 1997) y debería ser llamada NcGRA7 (Howe et al., 1999).

Células infectadas con *T. gondii* TgGRA7 son asociadas con la membrana parasitófora y pueden ser detectadas extendiéndose dentro del citoplasma de la célula huésped (Jacobs et al., 1999). TgGRA7 ha sido detectada en el sobrenadante de células infectadas y puede ser un indicador de una infección intracelular con *T. gondii* (Fischer et al., 1998). NcGRA7 juega un importante rol en la penetración de la célula huésped y en el mantenimiento de la membrana de la vacuola parasitófora la cual se encuentra en las etapas de bradizoitos y taquizoitos de *N. caninum* (Hempill et al., 1998).

NcDG2 comparte un 36% de homología con GRA6 de *T. gondii* y es una referencia para NcGRA6 (Howe et al., 1999). Ambas proteínas GRA6 de *T. gondii* y *N. caninum* tiene una región hidrofóbica que es un dominio débil de tras membrana sugiriendo que esta proteína esta asociada con la membrana de la vacuola parasitófora (Lecordier et al., 1995, Liddell et al., 1998.)

Formas recombinantes de NcGRA6 y NcGRA7 son los antígenos utilizados para el diagnóstico en la técnica de rELISA producida por la infección de *N. caninum* (Rally et al., 1996).

En la siguiente observación se puede apreciar que el ganado experimentalmente infectado con *N. caninum* tuvo altos títulos de anticuerpos a ambos antígenos a los 52 días post infección y regresando a niveles de

preinfección dentro de los 103 días post infección. Cuando el suero fue probado para reacciones con cada antígeno separadamente, los títulos a NcGRA6 fueron bajos y los de NcGRA7 fueron altos y viceversa. Esto indica que los dos antígenos pueden estar liberados por lapsos separados por el parásito o que estos salgan de la célula huésped por tiempo separado en la infección. Reacciones cruzadas no fueron observadas cuando el suero de ganado infectado con occistos de *T. gondii* o por esporocistos de *S. neurona* fueron probados.

Los genes y proteínas GRA6 y GRA7 de *N. hughesi*. no fueron previamente caracterizados.

Las diferencias en estos antígenos pueden servir para el fundamento de diagnostico serologico para distinguir entre las dos especies de *Neospora* y entender mejor la distribución de estos dos parásitos. La homología entre las dos proteínas GRA de las dos especies de *Neospora*, especialmente la proteína GRA7 ha sido expuesta para ser protectora de ratones, y esto puede guiar a la producción de una vacuna que podría proteger contra ambos patógenos.

### ***Infección experimental en ratones, gerbos y perros con Neospora hughesi.***

En este estudio, se examino la susceptibilidad de los ratones y gerbos de tipo BALB/c  $\gamma$ -INFKO, BALB/c, CD-1 y C57BL/6 con taquizoitos de la cepa Nh-A1 de *N. hughesi*., aislada de caballos de Alabama EU.

*Neospora hughesi* recientemente se describió como causa de mieloencefalitis protozoal equina (EPM).

Se experimento en modelo de roedor para valorar la patogenicidad que pudiera facilitar el desarrollo de terapias para ser usado en caballos. Solo los ratones  $\gamma$ -INFKO desarrollaron severas enfermedades clínicas siguiendo la

abortado. *Marsh et al., (1998)* y *Cheadle et al., (1999)* tienen exitosamente un aislado y reconocieron a *N. hughesi.*, de caballos con EPM.

*Neospora hughesi*, es morfológicamente similar, pero ultraestructuralmente, antigenicamente y genéticamente diferente del otro miembro del género: *N. caninum* (*Marsh et al., 1998; 1999*).

Poco se sabe del ciclo de vida o prevalencia de *N. hughesi*. *Dubey et al., (1999c)* reportó que 69 de 196 (23%) caballos de los EU tuvieron anticuerpos a taquizoitos de *Neospora* spp. usando la prueba el NAT. *Cheadle et al., (1999)* encontró que 62 de 536 (12%) caballos de Alabama EU, tuvieron anticuerpos a taquizoitos de *Neospora* spp. por la prueba IFA. Anticuerpos a *Neospora* spp. no fueron detectados en 76 caballos de Argentina (*Dubey et al., 1999a*) ó 101 caballos de Brasil (*Dubey et al., 1999b*) usando el NAT.

El presente estudio fue hecho para determinar la susceptibilidad de ratones y gerbos a la infección con taquizoitos de la cepa Nh-A1 de *N. hughesi*. Adicionalmente, los perros fueron infestados con cerebros de ratón con *N. hughesi*. para determinar si podrían excretar occistos en sus heces como había reportado al consumir tejido cístico de *N. caninum* (*McAllister et al., 1998; Lindsay et al., 1999*).

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS.**

Para poder realizar el experimento se puede apreciar la siguiente metodología:

### **2.1 Preparación de las células y preparación del inoculado.**

Los taquizoitos de la cepa Nh-A1 de *N. hughesi.* (*Cheadle et al., 1999*) fueron cultivados y mantenidos en células de riñón del mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*), (célula CV-1, ATCCCL-70, colección de un tipo Americano, Rockville, Maryland EU).

Las células CV-1 fueron cultivadas en celdas plásticas de 75cm<sup>2</sup> tipo matraz, la media de crecimiento consistió del 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS) en un medio suplementado de RPMI-1640 con 25mM HEPES y 100U Gml<sup>-1</sup> de penicilina y 100 mgml<sup>-1</sup> de estreptomina. Los cultivos celulares fueron mantenidos en un medio de crecimiento en el cual el FBS fue disminuido al 2%. Los cultivos celulares fueron incubados a 37°C. para hacer estudios comparativos de patogenicidad, los taquizoitos de la cepa NC-Liverpool y NC-1 de *N. caninum* (Barber *et al.*, 1997) fueron cultivadas en células CV-1 usando procedimientos idénticos.

Para el entendimiento general de los taquizoitos monoseparados fueron examinados con un microscopio invertido para el desarrollo de ninguna lesión (carecía de áreas de células huésped causadas por la replicación del parásito) o la presencia de muchos taquizoitos extracelulares. Algunas lesiones fueron observadas y algunos parásitos extracelulares estuvieron presentes, el monoseparado fue raspado con un raspador de células y 5ml de fluido conteniendo taquizoitos que fueron transferidos a 2 frascos de células CV-1 en donde los taquizoitos de *N. hughesi*. fueron pasados en esta forma siempre cada 3-7 días.

## **2.2 Prueba de aglutinación de Neospora (NAT).**

Los taquizoitos de la cepa NC-1 de *N. caninum* fueron utilizados como antígeno para e NAT (Packham *et al.*, 1998). Los taquizoitos fueron colectados de cultivos celulares infectadas y fijados en 2ml de una solución de formaldehído al 37% el cual se diluyó al 6% en una solución salina buferada (PBS) al 6% y almacenado a 4°C. hasta su uso directo para la prueba de aglutinación. Los taquizoitos fueron lavados dos veces en PBS y resuspendidos en un bufer alcalino conteniendo eosina a 4X10<sup>7</sup> taquizoitos por ml. La eosina ayuda a la visualización de la aglutinación de la reacción de aglutinación. El suero testigo fue diluido con PBS y 25µl de diluciones fueron añadidas a 25µl de 0.2 ml Mercaptoetanol.



Esto fue hecho para destruir todos los anticuerpos IgM y la prevención no específica de aglutinación causada por las moléculas IgM.

Esta solución fue combinada con 50µl de solución de antígeno y completamente mezclado. El control positivo y negativo de suero cada uno fue plateado. Estos fueron cubiertos e incubados a 37°C en un incubador de CO<sub>2</sub>. La reacción fue tomada a la mañana siguiente. Una opacidad difusa blanca con diámetro completo fue considerada como reacción positiva. Un punto o botón discreto opaco en el centro fue considerado como reacción negativa.

### **2.3 Inoculación experimental de ratones y gerbos.**

Todos los ratones y gerbos utilizados fueron hembras y todas fueron inoculadas subcutáneamente. Los ratones que se utilizaron fueron de las cepas BALB/c, γ-INFKO, BALB/c, CD-1 y C57BL/6 y 6 ratones suplentes comerciales. Los ratones y gerbos fueron enjaulados en jaulas de plástico con agua al limitum.

Todos fueron inoculados con taquizoitos de *N. hughesi*. (5x10<sup>4</sup>, 2x10<sup>5</sup> y 5x10<sup>5</sup>). Los 2 grupos de ratones CD-1 fueron inmunosuprimidos con 2 ó 4mg MPA en los días -7, 0 y 7 post inoculación como previamente se describió (Lindsay y Dubey 1989).

Los grupos controles de ratones de BALB/c, CD-1 y C57BL/6 fueron inoculados con un volumen igual de solución salina balanceada de Hanks (HBSS) un grupo de ratones de γ-INFKO fueron inoculados con taquizoitos 1x10<sup>5</sup> de la cepa NC-Liverpool de *N. caninum* y un grupo de ratones γ-INFKO fueron inoculados con taquizoitos 5x10<sup>4</sup> de la cepa NC-1 de *N. caninum*.

Todos los ratones fueron sacrificados por asfixia con CO<sub>2</sub> después de 8 semanas post infección con la excepción de los ratones BALB/6 quienes fueron

sacrificados con 17 semanas post infección. Los gerbos fueron sacrificados con 7 semanas post infección.

Cepa de ratón	Dosis de taquizoito de <i>N. hughesi</i>	Dosis de MPA	Rangos	Numero de ratones con lesiones / numero total de ratones en el grupo	Numero de ratones que murieron / numero total de ratones en el grupo
$\gamma$ -IFNKO	$5 \times 10^7$	NA	NA	5/5	5/5
$\gamma$ -IFNKO	$2 \times 10^5$	NA	NA	4/4	4/4
CD-1	$2 \times 10^5$	2mg	25-200	3/5	0/5
CD-1	$2 \times 10^5$	4mg	25-50	4/4	0/4
CD-1	$2 \times 10^5$	NA	25-200	3/5	0/5
CD-1	None	NA	<25	0/5	0/5
C57BL/6	$2 \times 10^5$	NA	<25-50	0/5	0/5
C57BL/6	None	NA	<25	0/5	0/5
BALB/c	$2 \times 10^5$	NA	<25-50	0/5	0/5
BALB/c	$5 \times 10^5$	NA	25-50	1/5	0/5
BALB/c	None	NA	<25	0/5	0/5
GERBIL	$5 \times 10^5$	NA	>800	2/4	0/4

Tabla 3.1 protocolo de ratones para la incubación de taquizoitos con *N. hughesi*, rangos y prevalencia de lesiones.

La susceptibilidad a la infección fue evaluada por mortalidad, presencia de lesiones y títulos de anticuerpos a los taquizoitos de *N. caninum*, evaluados por el NAT. Porciones de cerebro si fijar de ratones CD-1 inmunodeprimidos fueron suspendidos en HBSS vertidos y pasados a través de 22 punciones he inoculados sobre células CV-1 o dentro de ratones tipo interferón  $\gamma$ -INFKO por la presencia de bajos números de estadios del parásito.

Muestra de hígado, pulmón, lengua, riñón, glándula adrenal, ojo, cerebro, músculo del muslo y piel fueron colectadas de ratones y fijados en formalina buferada, procesado a través de grados de etanol un sustituto de selenio he implantada en parafina. Todos los animales moribundos fueron sacrificados y se colectaron muestras. Las muestras fijadas fueron procesadas para la examinación histológica y teñidos con hematoxilina y eosina.

## **2.4 Inoculación y examinación de perros.**

Para esto se llevo a cabo en treinta ratones CD-1 que fueron divididos entre 6 jaulas de 5 ratones cada una y fueron inmunosuprimidos con 2mg de MPA por 7 días preinfección, 4mg de MPA el día de la infección y 2mg de MPA 7 días post infección. Fueron infectados con taquizoitos  $2.5 \times 10^5$  de *N. hughesi*. Dos ratones de cada grupo fueron sangrados a 74 días postinfección y 133 días postinfección. Todos los ratones de los 6 grupos fueron sacrificados por asfixia con CO<sub>2</sub> el día 133 post infección y sus cerebros fueron removidos, un cerebro de ratón de cada grupo (6 ratones en total) fueron homogenizados por repetidas ocasiones con una jeringa de 10ml con aguja del # 22. El homogenado de cada ratón fue dividido en 2 y la mitad usada se infectó a CV-1 y la otra mitad al los ratones  $\gamma$ -INFKO. Los 24 restos de cerebro de ratón fueron dados a perros.

Dos cruza de camadas de perros de 15 semanas de edad fueron usadas. Antes de su uso ambas cruza fueron negativas para anticuerpos de *N. caninum* determinada por IFA (Cole et al., 1995), y por NAT, y para *T. gondii* se uso una prueba de aglutinación directa modificada (Dubey y Desmots. 1987).

Ambas cruza de camadas de perros se les dio 100mg de MPA intramuscular en los días -7 y 0 post alimentación (PA) con cerebros de ratones infectados, para incrementar potencialmente la susceptibilidad de la infección intestinal. Cada perro fue alimentado con 12 cerebros de ratones. La sangre fue recolectada de cada perro, en los días -14, -7, 0, 5, 10, 14, 19 y 27 PA, el suero se separo y se examino para los anticuerpos IgG por la prueba IFA y NAT. El suero fue examinado con una disolución inicial de 1:25 y luego el punto final por disoluciones dobles. Las muestras fecales fueron colectadas en los días -2, -1, 0, 3, 27 PA y examinadas con un método de flotación de oocistos con solución glucosada de sheather para visualizar los oocistos (Ernst y Benz 1981).

Todas las heces fueron colectadas los días 4-18 PA, preparados y mezclados en ácido sulfúrico al 2 % colado a través de un paño doble separándolo y colocado en un matraz Erlenmeyer abierto hasta el tope en una rotación lentamente en un agitador por 4 a 5 días para permitir que los oocistos esporulen.

Después de la agitación las muestras fueron refrigeradas por arriba de 6 semanas. Las muestras se procesaron para la concentración de oocistos como previamente se describió (*Lindsay et al., 1999*), y alimentó a 2 grupos de 3 ratones  $\gamma$ -INFKO, el primer grupo recibió material de los días 4-11 PA y el segundo grupo recibió material de los días 12 y 18 PA.

Los perros fueron sacrificados por sobredosis de pentobarbital sodico el día 42 PA. Porciones de tejido de cerebro, ojos, corazón, lengua, pulmón, hígado, bazo, riñón, glándula adrenal, nódulos linfáticos mesentéricos, músculo esquelético e intestino fueron colectadas, fijados en una solución neutra de formalina buferada al 10% y procesado como se describió previamente. Las secciones fueron cortadas y teñidas con hematoxilina y eosina.

### **3. RESULTADOS.**

#### **3.1 En la infección de ratón y gerbo.**

Solo los ratones  $\gamma$ -INFKO experimentaron mortalidad como resultado de la infección con *N. hughesi.*, todos los ratones  $\gamma$ -INFKO inoculados con taquizoitos  $5 \times 10^4$  ó  $2 \times 10^5$  murieron dentro de 19 días de infección respectivamente.

Estos ratones exhibieron un pelaje áspero, el lomo rizado, letargia y pérdida de apetito, los ratones CD-1 inmunosuprimidos con 4mg de MPA exhibieron signos poco severos consistiendo en pelaje áspero a los 17 días post infección pero recuperándose. Ninguno de los otros grupos de ratones exhibieron signos clínicos.

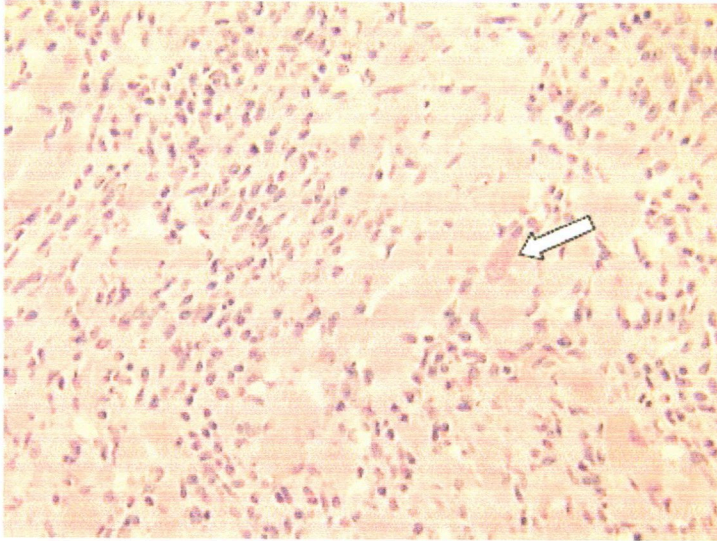
En todos los ratones  $\gamma$ -INFKO inoculados con taquizoitos de *N. hughesi* tuvieron lesiones en varios órganos incluyendo corazón, cerebro, hígado, pulmón, lengua, páncreas, timo, bazo y músculo esquelético.

Las lesiones más severas fueron en el corazón y podrían ser vistas totalmente como grandes áreas pálidas. Microscópicamente tuvieron severas miocarditis, trombosis atrial, fibroplasia, fiebre, atrofia miocárdica, pérdida e infiltración de macrófagos, neutrofilia y eosinofilia (Fig. 1). Los parásitos fueron escasos en las lesiones y en forma ocasional se presentaron grupos de taquizoitos (Fig.1), las lesiones en cerebro fueron de pocas a moderadas, meningoencefalitis multifocal con infiltrado perivascular de neutrófilos, macrófagos y eosinófilos.

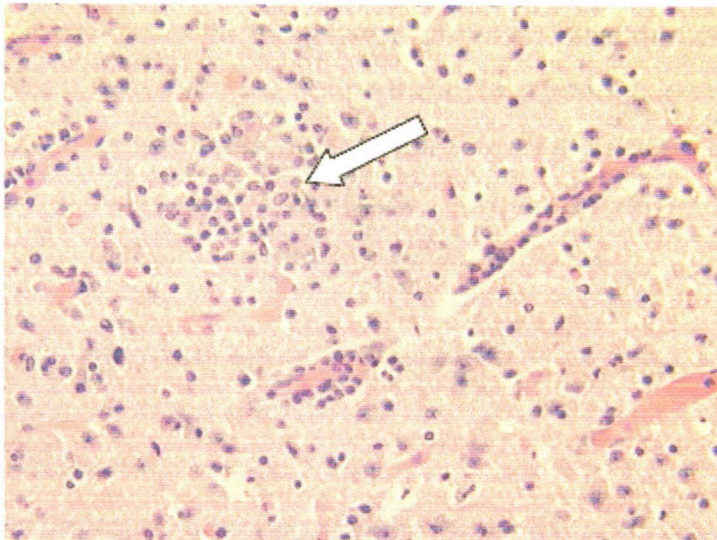
Áreas focal y multifocales de congestión vascular, hipertrofia de células endoteliales, gliosis y espongirosis, fueron también comúnmente observadas en el cerebro de estos ratones (Fig. 2). El tejido cístico definitivo no fue identificado en el cerebro o en otro tejido. Fue variando severamente la neumonía intersticial presente en los pulmones. Pequeños agregados de neutrófilos, eosinófilos y macrófagos fueron presentes en el portal e intersticio centro lobular y en los sinusoides hepáticos del hígado. El bazo tuvo poca hiperplasia folicular linfocítica y los folículos tuvieron necrosis linfocítica multifocal. Lesiones en el páncreas consistieron de poca a moderada pancreatitis con infiltrados intersticiales de macrófagos, neutrófilos y eosinófilos con mínima a poca atrofia exocrina.

Fue observada en el timo moderada necrosis linfocítica, necrosis multifocal de miositos con infiltrado de macrófagos, neutrófilos y eosinófilos fueron observados en el músculo esquelético y lengua.

Fue observada en el timo moderada necrosis linfoide, necrosis multifocal de miositos con infiltrado de macrófagos, neutrófilos y eosinófilos fueron observados en el músculo esquelético y lengua.



**Fig. 3.1** corazón de ratón  $\gamma$ -INFKO infectado con *N. hughesi*. Un grupo de taquizoitos (flecha) esta presente y más de las fibras miocardiales tienden a ser remplazadas por tejido nervioso.



**Fig. 3.2** cerebro de ratón  $\gamma$ -INFKO infectado con *N. hughesi*. Un área de gliosis (flecha) esta presente.

agregados sinusoides multifocales de linfocitos en los ratones y necrosis hepatocelular subaguda en un ratón, cuatro ratones de 5 en este grupo tuvieron un título de 1:25; un ratón lo tuvo de <1:25.

De los ratones CD-1 inmunosuprimidos con 2mg de MPA, uno exhibió un poco menos de linfocitos intersticiales en una porción del corazón. Otro ratón mostró marcada granulopoyesis en bazo e hígado. Los restos de estos dos ratones no tuvieron lesiones. Los ratones CD-1 de este grupo tuvieron títulos de 1:200 (2 ratones), 1:50 (2 ratones), y uno 1:25 (un ratón).

Todos los ratones CD-1 inmunosuprimidos con 4mg MPA tuvieron una baja de linfoplasmocitos perivasculares en el cerebro. Sus otros tejidos fueron normales. Los títulos de este grupo fueron de 1:50 (2 ratones) y de 1:25 (2 ratones). De los ratones CD-1 no inmunosuprimidos, 3 de 5 tuvieron una inflamación linfocítica sinusoidal menor en el hígado, 1 también tuvo inflamación linfohistolítica del epicardio y 2 no tuvieron lesiones. Los ratones CD-1 inmunosuprimidos, 2 tuvieron títulos de 1:200 y tres tuvieron títulos de 1:25.

Los cultivos celulares inoculados con los cerebros de ambos grupos de ratones CD-1 inmunosuprimidos demostraron la presencia de etapas de *N. hughesi* dentro de las dos semanas de inoculación. Todos los ratones  $\gamma$ -INFKO los cuales fueron subinoculados con cerebros homogenizados de ratones CD-1 inmunosuprimidos con MPA murieron dentro de 42 días.

Los ratones C57BL/6 no tuvieron lesiones. Los títulos fueron 1:50 (1 ratón), 1:25 (2 ratones) y <1:25 (2 ratones).

Ninguno de los ratones del grupo control infectado BALB/c, CD-1 y C57BL/6 tuvieron lesiones y tuvieron títulos de <1:25 en el NAT.

Dos de 4 gerbos tuvieron lesiones en el cerebro. Uno tuvo poca meningoencefalitis focal linfoplasmocítica y el otro tuvo una mínima meningitis linfoplasmocítica. Todos los gerbos tuvieron pequeñas áreas sinusoidales de inflamación crónica consistiendo de linfocitos, plasma, macrófagos y células multinucleadas. No fueron observados parásitos en los gerbos por examinación histológica, y no exhibieron signos clínicos. Todos los gerbos tuvieron títulos de  $\geq 1:800$  en el NAT.

Los ratones  $\gamma$ -INFKO infectados con la cepa NC-1  $5 \times 10^4$  ó la cepa NC-Liverpool  $1 \times 10^5$  de *N. caninum* murieron o fueron sacrificados por daños severos de 8 a 10 días post infección. Lesiones en estos ratones fueron encontradas en múltiples órganos excepto en cerebro. Estos fueron más severas en bazo y hígado. Una severa necrosis esplénica multifocal asociada con los taquizoitos fue observada en el bazo. Las lesiones en hígado consistieron en necrosis hepática multifocal asociada con taquizoitos. Poca neumonía intersticial fue presente en pulmones. Las lesiones en corazón fueron pequeñas y raras consistiendo de necrosis miocárdial.

### **3.2 Infección de perros.**

Los cultivos celulares separados de cerebros homogenizados del grupo de ratones ingeridos por los perros fueron positivos a *N. hughesi*, y los ratones  $\gamma$ -INFKO inoculados con el homogenizado murieron dentro de los 36 días. Ninguno de los dos excretó oocistos de *Neospora* en sus heces. En los días 11-21 después de la infección fueron observados oocistos de *Isospora ohioensis* en las heces de ambos perros. Los parásitos de *Neospora* no fueron vistos en los tejidos de los dos perros. Las lesiones microscópicas sugestivas de neosporosis no fueron observadas en ninguno de los dos perros. En los ratones  $\gamma$ -INFKO no encontraron concentrados de materia fecal de perros muertos ó que tuvieron anticuerpos en el NAT.



## 4. DISCUSIÓN.

El presente estudio provee información sobre la susceptibilidad de las cepas de ratón y gerbos utilizadas para neosporosis de *N. hughesi*. De las cepas investigadas, solo los ratones con el interferón  $\gamma$ -INFKO son susceptibles a enfermedades severas causadas por *N. hughesi* y que la infección producida es marcadamente diferente de la que causa *N. caninum*.

Las lesiones asociadas con *N. caninum* en los ratones  $\gamma$ -INFKO es mas severa en bazo, hígado y pulmón. En contraste, las lesiones asociadas con neosporosis por *N. hughesi*, en ratones  $\gamma$ -INFKO son más severas en el corazón guiándolo a la atrofia muscular estructural. La diferencia drástica en el curso de la infección entre las dos especies de *Neospora* suministra una validación futura para la distinción entre ellas.

Se propone que de este único, y consistente patógeno, el ratón  $\gamma$ -INFKO es utilizado como un bioindicador de la infección por *N. hughesi* y para probarla como terapia y ser utilizada en contra de neosporosis por *N. hughesi* en caballos.

Los ratones BALB/c son susceptibles a *N. caninum*, especialmente a la cepa NC-1 el cual causa, múltiples lesiones de cerebro y muerte (*Lindsay et al., 1995; Baszler et al., 1999*). Tres de 5 ratones BALB/c que recibieron altas dosis de taquizoitos, desarrollaron ligeras lesiones multifocales en hígado. Los ratones BALB/6 que recibieron dosis bajas de taquizoitos no desarrollaron lesiones. Todos los títulos de los ratones BALB/c fueron bajos, los ratones no murieron en las 17 semanas del periodo experimental. *N. hughesi*. aparenta ser menos patógeno para los ratones BALB/c que *N. caninum*.

Los ratones son resistentes a neosporosis por *N. caninum* a menos que sean tratados con MPA (*Lindsay y Dubey 1989, 1999a, 1999b; Lindsay et al., 1992*).

Los ratones CD-1 utilizados en el presente estudio fueron resistentes a una neosporosis fatal aún cuando estuvieron inmunosuprimidos con MPA.

Todos los ratones CD-1 infectados con *N. hughesi* desarrollaron títulos detectables para la prueba de NAT. El MPA suprimió a los ratones utilizados para probarlo terapéuticamente contra neosporosis por *N. caninum* (Lindsay y Dubey 1992a), podría no ser útil para *N. hughesi*, por la poca patogenicidad.

No fueron observadas lesiones en ratones C57BL/6 y solo 1 de 5 de los ratones C57BL/6 desarrolló un título. Esto indica que ellos son resistentes a la infección de *N. hughesi*.

Los gerbos son susceptibles a la infección con taquizoitos de *N. caninum* (Cuddon et al., 1992; Gondim et al., 1999), y oocistos (Dubey y Lindsay 2000). Los gerbos infectados con un número de taquizoitos de la cepa de NC-1 de *N. caninum* pueden morir dentro de 14 días de infección (Lindsay sin publicar). Los gerbos en este estudio mostraron menores lesiones en cerebro e hígado causados por *N. hughesi*. Todos los gerbos mostraron títulos altos ( $\geq 1:800$ ) en el NAT. No se mostraron signos clínicos o gerbos muertos.

Los perros alimentados con cerebros infectados de *N. hughesi* de ratones CD-1 no arrojaron oocistos detectables por flotación fecal, y los ratones  $\gamma$ -INFKO no se encontraron concentrados en la materia fecal de estos perros, muertos o desarrollando títulos a las especies de *Neospora*. Esto sugiere que el perro no es el huésped definitivo de *N. hughesi*. Sin embargo, estudios indican que no todos los perros excretan oocistos de *N. caninum* después de alimentarse de tejido enquistado (McAllister et al., 1998).

Estudios adicionales en perros necesitan ser conducidos a determinar su rol en la transmisión de *N. hughesi*. Es interesante anotar que la neosporosis equina solo ha sido observada en Norteamérica (Dubey y Porterfield 1990; Daft et al., 1998).

Esto puede indicar que el huésped definitivo de *N. hughesi* está limitado a Norteamérica.

### **Diferencias de *Neospora hughesi* y *Neospora caninum* basado en las proteínas granulares densas GRA6 y GRA7.**

*Neospora hughesi* es nuevamente reconocida como causante de EPM. Este parásito está fuertemente relacionado a *N. caninum*, el cual causa enfermedades en el sistema nervioso central.

La doctora *Catherine P. Walsh* y sus colaboradores en su modelo experimental, sugieren que los dos géneros de especies de *Neospora* pueden ser distinguidos por sus diferencias genéticas en los genes ITS-1, SAG1 y SRS2, y por expresión diferencial de varios antígenos indefinidos por (WB) Western blot. Esta información puede ser usada para diferenciar a las dos especies y contribuir a un entendimiento futuro de la prevalencia y biología de *N. hughesi*. En estudios preeliminares realizados por *Marsh et al.*, en 1998 y 1999, determino en su experimento que anticuerpos monoclonales 6C11 producidos contra las proteínas SAG1 contra *Neospora caninum* no reaccionaron con las proteínas SAG1 de *N. hughesi*. Esto sirve como un elemento de juicio rápido y claro descrito para distinguir a las dos especies descritas a la fecha. Sin embargo se proponen más pruebas para diferenciar estas especies en animales vivos para comprender mejor la distribución de estos dos parásitos.

### **¿Que son los gránulos densos?**

Los organelos granulares densos están presentes en todos los parásitos apicomplexa (*Cesbron-Delauw 1994*). Después de que el parásito ha penetrado y se ha establecido en la célula huésped de la vacuola parasitófora (PV), la proteína contenida en los organelos de los gránulos densos es liberada. Esta proteína es específica y blanco para la vacuola parasitofora PV o el espacio vacuolar.

Y participan en el canal nutricional y en la excreción de residuos de intercambio entre el parásito y la célula huésped (*Cesbron-Delauw 1994*).

La proteína granular densa es antigénica y es detectada por anticuerpos séricos del animal infectado. El huésped es expuesto a la proteína granular densa cuando ellas son excretadas de las células infectadas o cuando las células infectadas se rompen con un resultado de una inmensa infección parasitaria (*Fisher et al., 1998*). Las formas recombinantes de la proteína granular densa GRA6 y GRA7 son los antígenos que fueron usados en una prueba de ELISA para *N. caninum* (*Rally et al., 1998*). La prueba rELISA no mostró reacción cruzada con suero de ganado infectado con oocistos de *T. gondii* o esporozoitos *S. cruzi* (*Rally et al., 1998*). Diferencias entre las proteínas granulares densas de las dos especies de *Neospora* pueden servir como las bases para un ensayo de diagnóstico diferencial que podrían distinguirse entre ellas.

Anticuerpos contra las proteínas granulares densas fueron también examinadas para su evaluación protectora. Para esto en estudios preliminares con ratones inmunizados con GRA2 y GRA5 purificado de *T. gondii* están protegidos de toxoplasmosis letal (*Cesbron-Delauw 1994*). Ratones inmunizados con GRA7 de *N. caninum* están protegidos contra neosporosis letal (*Lindsay, 1999*). La homología entre las proteínas granulares densas de las dos especies de *Neospora* necesitan ser evaluadas para determinar el potencial de una vacuna simple basada en los gránulos densos contra ambos patógenos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS.**

### ***Cultivo de parásitos in Vitro.***

Taquizoitos de la cepa Nh-A1 de *N. hughesi*. (*Cheadle et al., 1999*), y de *N. caninum* NC-1, NC-2, Liverpool y Swiss fueron mantenidas y criadas en un mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*), células de riñón (célula CV-1, ATTC

CCL-70, colección de tipo Americano, Rockville, Maryland, EU). Las células CV-1 fueron mantenidas en frascos plásticos de 75cm<sup>2</sup> en un medio de crecimiento que consistió de 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS) en RPMI 1640, medio suplementado con 25mM HEPES buferada, 100U de penicilina G/ml y 100mg de estreptomycin/ml. este tipo de células fueron mantenidas y criadas en un medio en el cual el contenido FBS fue por debajo de 2%. Todas las células fueron incubadas a 37°C.

Por lo general el mantenimiento de taquizoitos monoseparados, fueron examinados con microscopio invertido para el desarrollo de lesiones (áreas carentes de células huésped causado por la replicación parasitaria) pueden en los monoseparados o en la presencia de taquizoitos extracelulares. Algunas lesiones fueron observadas o parásitos extracelulares fueron presentes, el monoseparado fue desechado con una célula desechadora 5ml conteniendo fluidos de taquizoitos, fue transferido a 2 frascos de células CV-1. Los taquizoitos fueron pasados en esta manera cada 3 a 7.

En este estudio, los taquizoitos fueron cultivados de células infectadas removiendo el medio y remplazando con solución salina balanceada de Hanks' libre de calcio y magnesio. Las células CV-1 fueron removidas de la superficie del contenedor plástico con el uso de un removedor de células. Estas células mezcladas fueron pasadas utilizándose una jeringa de 10ml para romper las células huésped. La suspensión fue filtrada a través de un filtro de 3µm para remover los restos celulares. El número de taquizoitos en el filtrado fue determinando usando un hemocitómetro.

### ***Reacción de cadena de la polimerasa.***

Parásitos preparados para usarse en reacciones de PCR, estos fueron lavados en PBS y suspendido en agua con una concentración de 20x10<sup>6</sup> en 500µl de agua; y fueron almacenados y congelados a -20°C hasta ser usados.

En un tubo estéril de 1.5ml con 20µl de taquizoitos descongelados descritos arriba fueron agregados a 200µl de removedor instantáneo (Instagene matriz) (BioRad) calentado a 56°C por 30min en una platina caliente y puestos en baño de agua caliente por 8min. Los tubos fueron centrifugados por 2min con alta velocidad. Para esta preparación, 10µl del sobrenadante fue añadido a la (Ready-to Go PCR bead). De sus cifras en ingles, cuenta lista de PCR (BioRad). 13µl de agua estéril y 2 µl de cebadores (primers) a 0.5 µl cada cebador (primer). La mezcla fue completada con 50 µl de aceite mineral estéril cargado al termociclador.

Los parámetros del termociclador consistieron de 94°C por 5 minutos seguidos por 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por un minuto, templando por un minuto a 60°C para GRA6 y 50°C para GRA7 y a un minuto de extensión a 72 °C y al final 10 minutos de extensión prolongada a 72°C y después de 40 ciclos fue completada.

Cebadores (primer) específicos basados sobre la secuencia publicada de los genes NcGRA6 (AF029350) y NcGRA7 (AW119252) fueron usados para amplificar a los genes del ADN geonómico de los taquizoitos (*Rally et al., 1997*). El cebador (primer) usado para ampliar GRA6 fue el cebador (preimer) delantero, GRA6F y el cebador (preimer) reverso, fue el GRA6R. El cebador (preimer) específico para GRA7 fue el cebador (preimer) delantero, GRA7F y el cebador (preimer) reverso, GRA7R. Referido en la tabla 1 para el texto de secuencias. Los productos de PCR fueron purificados usando el kit de limpieza Quiagen PCR.

Nombre	Texto elemental de la secuencia
GRA7F	5'-GGC TTT TCC ATA TTA TTT TTC GTC GTC TCT-3'
GRA7R	5'-GAG CTC CGG AAC TCA TCG GCC AGG TAG G-3'
GRA6F	5'-GAC CGC GAG GGC TAA ACA GTC AGA AGC-3'
GRA6FI	5'-TCT TCC GAG TTA GCA GGC AGT C-3'
GRA6RI	5'-CGC GTT CCT CCG TAT CAA TCG TCA C-3'
GRA6R	5'-CCG CGG CTC TCC CAC AAG TGC ATT CTC CA-3'

**Tabla 4.1:** Texto de secuencias

## **Secuenciación.**

La secuencia de ADN fue transportada del tecnológico de Virginia facilitando la secuencia, utilizando una tintura fluorescente (ABI systems). El cebador (preimer) interno fue designado para GRA6 para enlazar las secuencias rehabilitando al inserto. Estas dos secuencias, GRA6FI y GRA6RI, se muestran en la tabla 1.

Las secuencias fueron analizadas usando el Seqman, Megaline, y Protean programas de LaserGene, paquete software (DNASar Inc.). Todas las distancias reportadas de las secuencias fueron generadas en Megaline usando el método Clustal de alineamiento y la secuencia de función de distancia.

*SDS ( Dodecyl Sulfato de Sodio) Electroforesis y Western Blot usando proteínas específicas de anticuerpos GRA6 y GRA7.*

Los taquizoitos fueron cultivados con el procedimiento descrito anteriormente, después de un mínimo de 2 horas en un medio libre para evitar reacción con anticuerpos de *N. caninum* común en todos los sueros bovinos. Una concentración de taquizoitos fue ajustada a un contenido de  $3 \times 10^6$  de taquizoitos. Las muestras fueron mezcladas 1:1 v/v con 95% de Leammli buferada conteniendo 5.0% 2- $\beta$  mercaptoetanol, y establecidos en un baño de agua caliente por 5 minutos. La solución fue sometida a electroforesis en una solución de geles SDS poliacrilamida al 12.0% a 25mAmp por gel, usando el BioRad Mini Protean Cell y el BioRad powerpac una fuente de poder de 300 mAmp. El estándar de los pesos moleculares (BioRad MultiMark™) se corrió en una línea separada como una referencia para la determinación del peso molecular de la proteína.

Las proteínas separadas fueron transferidas a una membrana nitrocelulosa con poros 0.22  $\mu$ m usando el BioRad transblot SDS traslado semi seco con 70mAmps por 45 minutos. La membrana fue bloqueada a las 18 horas con temperatura ambiente en suero albumina bovina al 2.0% (BSA) y TBS (solución de twin) (pH 7.4) e inmediatamente se colocó el suero específico de conejo contra las

dos proteínas NcGRA6 y NcGRA7 a una dilución de 1:200 en TBS y colocado sobre un agitador por 4 horas con temperatura ambiente. La membrana fue lavada dos veces por 5 minutos cada una en TBS. El kit vectastain anti-conejo ABC fue utilizado para detectar anticuerpos de conejo (Vectastain). El inmunoblot fue lavado como se describió y revelado previamente usando una mezcla de 4-cloro-1-naphthol, TBS, MeOH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## RESULTADOS.

### ***Análisis de la secuencia.***

La secuencia de nucleótidos para NhGRA6 mostró una consistencia 4.0% diferente de la cepa *N. caninum* examinada, variaciones entre las cepas de *N. caninum* fueron solo 0.0-0.3%. Fueron aproximadamente 24 nucleótidos 540 bases en la región codificada del gen NhGRA6 que no correspondió con los genes NcGRA6 (Figura 1). Las secuencias alineada también después de esta región y el primer sitio de unión, cada una fue localizada después de detener el código en ambos genes, los restos de NhGRA6 y NhGRA7 quedaron intactos.

La banda de migración del producto de PCR para NhGRA6 fue aproximadamente 850bp, cada una fue vista mas lento que los productos NhGRA6, y cada una emigrando aproximadamente 800pb (figura 4.2). La reducida secuencia de aminoácidos para NcGRA6 fue 8.8-9.4% diferente de la deducida proteína NhGRA6 de todas las cepas de *N. caninum* en las regiones que podrían ser comparadas, y fueron 33 aminoácidos mas largos que cualquiera de las proteínas de *N. caninum* (figura 3). Variaciones entre las secuencias de aminoácidos de NhGRA6 fueron 0.0-0.5%. Las dos regiones hidrofóbicas descritas como residuos 17-32 y 155-172 en NcGRA6 (Liddell *et al.* 1998) se conservaron en NhGRA6.



La secuencia de nucleótidos para NhGRA7 mostraron una consistencia de 6.0% de diferencia de todas las cepas de *N. caninum* examinadas, las variaciones entre las cepas de *N. caninum* fueron del 0.2%. La deducida secuencia de aminoácidos para NhGRA7 mostró una consistencia de 14.8% diferente de las cepas *N. caninum*, donde la variación entre las cepas de *N. caninum* fueron solo 0.5-0.9% (figura 4). Todas las secuencias deducidas de aminoácidos para GRA7 fueron aproximadamente de 200 aminoácidos. Las tres regiones hidrofóbicas con residuos 7-28, 98-111 y 139-160 son conservados (Rally et al 1997).

### **Western blot.**

La proteína mayor reconocida por anticuerpos monoespecíficos policlonales mostrada contra GRA6 en la preparación de *N. caninum* fue aproximadamente 37kDa como ha sido reportada previamente (Liddell et al., 1998), y la banda correspondiente en la preparación de *N. hughesi*. mostró un peso molecular aproximado de 42kDa (figura 4.5). Una proteína pequeña fue tímidamente reconocida por el anticuerpo en cada preparación, de aproximadamente 31kDa en la preparación de *N. caninum* y 37kDa en la preparación de *N. hughesi*.

Anticuerpos policlonales monoespecíficos se usaron en Wester blot contra productos recombinantes NcGRA7 produjeron un resultado similar al inmunoblot para *N. hughesi*. y *N. caninum*. La proteína de mayor reconocimiento por estos anticuerpos fueron aproximadamente 33kDa, cada consentimiento con reporte previo. Una ligera diferencia en la banda de migración de *N. hughesi*. fue observada (figura 6). Dos bandas adicionales con pesos bajos a 33kDA fueron tímidamente reconocidos en ambas líneas antigénicas de los taquizoitos *N. hughesi*. y *N. caninum* que no pudieron ser descritas en reportes previos.

## DISCUSIÓN.

El NcGRA6 y NcGRA7, son proteínas antigénicas exclusivas a *N. caninum* las cuales fueron aisladas por una biblioteca genómica de *E. coli* cADN resguardando los genes de *N. caninum* (Rally et al., 1996, 1997; Hemphill et al., 1998; Liddell et al., 1998). La secuenciación genética de éstas proteínas se llevo a efecto en forma completa (Números de acceso al Banco Genético AW119252 y AF02950).

Los genes de los dos antígenos conservados de la familia de proteínas de los gránulos densos fueron secuenciados y comparados entre *N. hughesi* y *N. caninum*. Las proteínas GRA6 y GRA7 de *N. caninum* son homologas a las de *T. gondii*. Ellas reconocieron la secuencia señal de sus dominios hidrofóbicos indicando que sus funciones podrían ser similares en los dos grupos de parásitos. La GRA6 y la GRA7 de *T. gondii* y *N. caninum* comparten un 32% y 28.4% de similitud respectivamente, esto fue determinado utilizando el método clustal de alineamiento Magaline. *N. hughesi*. GRA6 y GRA7 mostró un 30.4% y un 28.9% de similitud de compartimiento con las proteínas homólogas de *T. gondii* y mostrándose igualmente por el método clustal. La variación entre *T. gondii* y cada una de las especies de *Neospora* aparentemente son similares.

En células infectadas de *T. gondii*, TgGRA7 es asociada con la membrana parasitófora (PV) y puede ser detectada extendiéndose dentro del citoplasma de la célula huésped (Jacobs et al., 1997). TgGRA7 también ha sido detectada en el sobrenadante de las células infectadas y esto quizá es un indicador de infección intracelular por *T. gondii* (Ficher et al., 1998). NcGRA7 aunque si bien juega un rol en la penetración de las células huésped y el mantenimiento de la membrana de la vacuola parasitófora siendo expresado por ambas etapas de taquizoitos y los bradizoitos de *N. caninum* (Hemphill et al., 1998).

Ambas GRA6 de *T. gondii* y de *N. caninum* tienen una región hidrofóbica, que se sugiere que es un dominio transmembranoso sugiriendo que la proteína

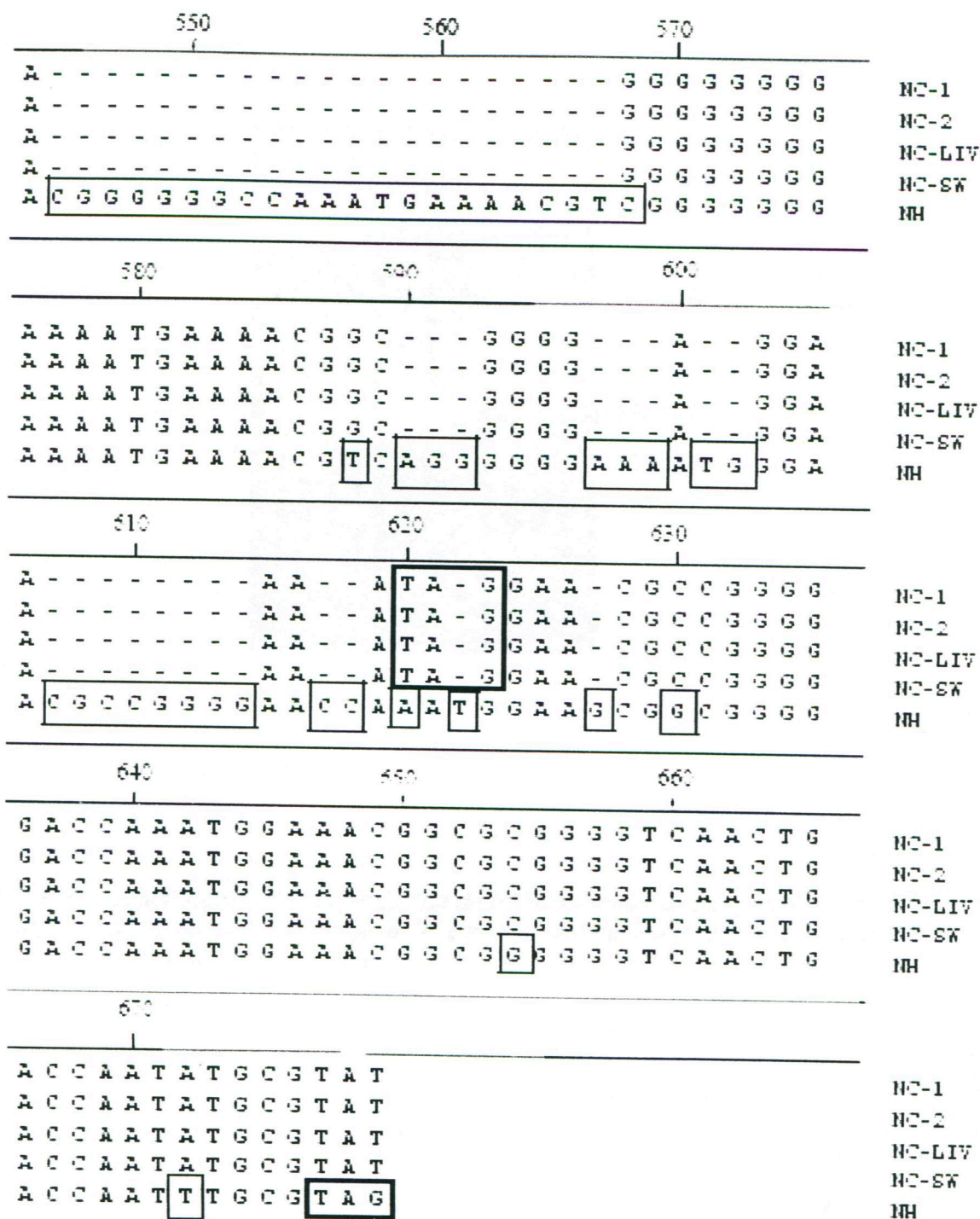
esta en asociada con la membrana parasitófora en sus mecanismos de ampliación (PV) de la red membranosa (*Lecordier et al., 1995; Liddell et al., 1998*).

Este grado de variación entre *N. caninum* y *N. hughesi*. reportadas aquí es consistente con la variación observada en otros genes entre las dos especies. El 14.8% de variación en la proteína GRA7 es el mayor título de variación descrito antes entre proteínas de las dos especies. Este es un segmento adicional de 33 aminoácidos con el carboxilo final de la proteína deducida NhGRA6 que no podría ser considerada en la comparación de alineamiento y no se representó en lo reportado 9.0% de variación.

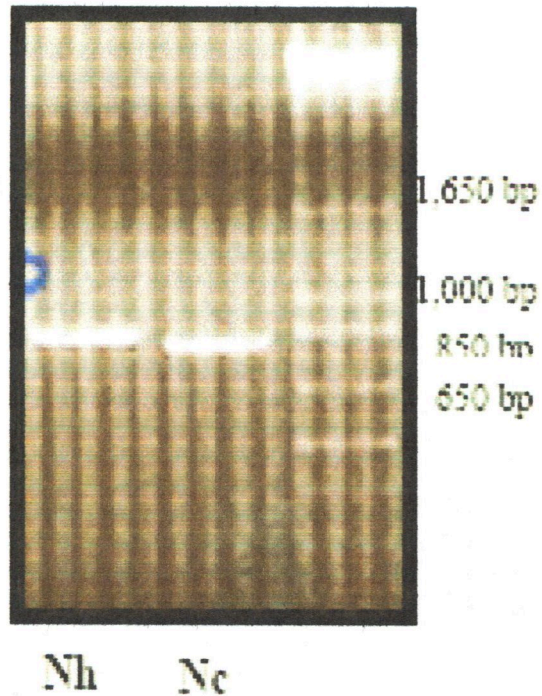
El tamaño de variación en los genes GRA6 para *N. caninum* y *N. hughesi*. fue visualmente demostrado por una migración lenta del NhGRA6 de la amplificación de PCR como se ve en gel de agarosa 1.0% (figura 4.2). El tamaño de variación en las proteínas GRA6 de *N. caninum* y *N. hughesi*. fue confirmado por 10.0% gel *Dodecyl Sulfato de Sodio* de poliacrilamida para electroforesis (SDS PAGE) y análisis de Western blot usando anticuerpos específicos para NcGRA6. Las diferencias en los genes GRA6 y GRA7 y las proteínas deducidas de *N. hughesi*. y *N. caninum* previeron un soporte adicional a la distinción de *N. hughesi*. como una especie separada. La diferencia visible en migración de la proteína GRA6 en gel SDS podría servir como una herramienta de diagnóstico en diferenciación entre las dos especies.

El segmento adicional de 33 aminoácidos presentes en la proteína NhGRA6 tuvo fuerza antigénica potencial en las tres áreas en relación al Jameson-olf index (Protean). Esto es altamente hidrofílico en relación al Kyte-Doolittle index (Protean). Y altamente flexible debido al 30% de contenido de residuos de glicina en esta sección. Este segmento adicional podría proveer las bases para el desarrollo de un anticuerpo monoclonal capaz de distinguir a las dos especies de *Neospora*.

El cebador (primer) de sus siglas en inglés usado es específico a las especies de *Neospora* y no produce ninguna reacción cuando el ADN de *T. gondii* o *S. neurona* fue adicionado como patrón. Este ensayo podría eventualmente ser usado sobre CSF (fluido cerebro espinal) en casos de EPM donde se sospeche de especies de *Neospora*. Los datos de la secuencia de nucleótidos han demostrando las diferencias entre el tamaño de los genes de GRA6 y las proteínas de *N. hughesi*. y *N. caninum*, además servirán de métodos adicionales de distinción entre las dos especies de *Neospora* que ayudaría a la investigación futura y al desarrollo de pruebas de diagnóstico.



**Figura 4.1:** Alineamiento de nucleótidos de GRA6 de cepas de *N. caninum* y *N. hughesi*. El alineamiento inicia con 630bp e inserciones ilustradas dentro del ge *NhGRA6*. Los nucleótidos en el *NhGRA6* que difieren con las cepas de *N. caninum* están el cuadro con las líneas delgadas. Y en el cuadro de líneas más oscuras se detiene la membrana.



**Figura 4.2:** Amplificación de los productos de PCR con manuales específicos de GRA6; *N. hughesi* migra aproximadamente a la posición 850bp mientras *N. caninum* migra aproximadamente a la posición 800bp.

	10	20	30	40	
1	MANNRTLARRRRRAFSPLTVVHLAVTLVAFMGGVPLSSTGAA				NC-1
1	MANNRTLARRRRRAFSPLTVVHLAVTLVAFMGGVPLSSTGAA				NC-2
1	MANNRTLARRRRRAFSPLTVVHLAVTLVAFMGGVPLSSTGAA				NC-LIV
1	MANNRTIARRRRRAFSPLTVVHLAVTLVAFMGGVPLSSTGAA				NC-SW
1	MANNRTIARRRRRAFSPLTVVHLAVTLVAFMGLPFSSTGAA				NH DG2
<hr/>					
	50	60	70	80	
41	DAADPVESVEANPRGYTSEYGEPPVAVGTSE EYVNSSELAG				NC-1
41	DAADPVESVEANPRGYTSEYGEPPVAVGTSE EYVNSSELAG				NC-2
41	DAADPVESVEANPRGYTSEYGEPPVAVGTSE EYVNSSELAG				NC-LIV
41	DAADPVESVEANPRGYTSEYGEPPVAVGTSE EYVNSSELAG				NC-SW
41	DAADPVESHEANPRGYTSEYGEPPVAVGTSE EYVNSSELAG				NH
<hr/>					
	90	100	110	120	
81	SRDKGNAAEAEAEAEVETDVQPSSVTIDTEERAAPSQVQV				NC-1
81	SRDKGNAAEAEAEAEVETDVQPSSVTIDTEERAAPSQVQV				NC-2
81	SRDKGNAAEAEAEAEVETDVQPSSVTIDTEERAAPSQVQV				NC-LIV
81	SRDKGNAAEAEAEAEVETDVQPSSVTIDTEERAAPSQVQV				NC-SW
81	SRDEGNAAEADGEAEAEVETEVPQPSSVTIDTEERAALSQVQV				NH
<hr/>					
	130	140	150	160	
121	QQERNHEEADDAPKPVVRS AVPSTVAKRQQARHRVIGTAV				NC-1
121	QQERNHEEADDAPKPVVRS AVPSTVAKRQQARHRVIGTAV				NC-2
121	QQERNHEEADDAPKPVVRS AVPSTVAKRQQARHRVIGTAV				NC-LIV
121	QQERNHEEADDAPKPVVRS AVPSTVAKRQQARHRVIGTAV				NC-SW
121	QQERNHEEAEAEAPKPVVRS AVPSTVAKRQQARHRVIGTAV				NH
<hr/>					
	170	180	190	200	
161	IAAVVAALLWKFERRRSGAPREGGENENGGE EK .				NC-1
161	IAAVVAALLWKFERRRSGAPREGGENENGGE EK .				NC-2
161	IAAVVAALLWKFERRRSGAPREGGENENGGE EK .				NC-LIV
161	IAAVVAALLWKFERRRSGAPREGGENENGGE EK .				NC-SW
161	IAAVVAALLWKFWRRRSGAPRDGGPNENWGGENENVRGEN				NH
<hr/>					
	210	220	230	240	
194					
194					
194					
194					
201	GNAGEPNGSGGGPNNGGGSTDQFA .				NH

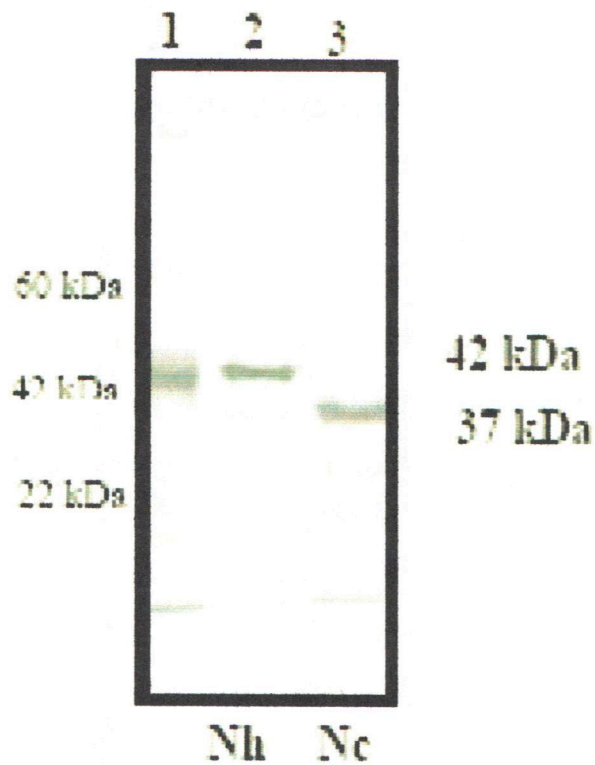
**Figura 4.3:** Deduciendo la secuencia de aminoácidos para GRA6 de las cepas de *N. caninum* y *N. hughesi*.

Figure 4.4: Deduced amino acid sequences for GRA7 from *N. caninum* strains and *N. hughesi*

	10	20	30	40	
1	MARQATFIVALCVCGLA	IAGLPRLASAGDLATE	QHEG	DIG	NE-1
1	MARQATFIVALCVCGLA	IAGLPRLASAGDLATE	QHEG	DIG	NE-2
1	MARQATFIVALCVCGLA	IAGLPRLASAGDLATE	QHEG	DIG	NE-LIV
1	MARQATFIVALCVCGLA	IAGLPRLASAGDLATE	QHEG	DIG	NE-SW
1	MARQATFIVALCVCGLA	IAGLPRLASAGDLATE	QHEG	DIG	NH
	50	60	70	80	
41	YGVRAYAGVSNYDGGDDA	AGNPFVDESDVTDDA	ITDGE	KPRV	NE-1
41	YGVRAYAGVSNYDGGDDA	AGNPFVDESDVTDDA	ITDGE	KPRV	NE-2
41	YGVRAYAGVSNYDGGDDA	AGNPFVDESDVTDDA	ITDGE	KPRV	NE-LIV
41	YGVRAYAGVSNYDGGDDA	AGNPFVDESDVTDDA	ITDGE	KPRV	NE-SW
41	YGVRAYAGVSNYDGGDDA	AGNPFVDESDVTDDA	ITDGE	KPRV	NH
	90	100	110	120	
81	VSGQKPHHTTQKGS	LIKKLAVPVV	GALTSYLVADR	VLPELT	NE-1
81	VSGQKPHHTTQKGS	LIKKLAVPVV	GALTSYLVADR	VLPELT	NE-2
81	VSGQKPHHTTQKGS	LIKKLAVPVV	GALTSYLVADR	VLPELT	NE-LIV
81	VSGQKPHHTTQKGS	LIKKLAVPVV	GALTSYLVADR	VLPELT	NE-SW
81	VSGQKPHHTTQKGS	LIKKLAVPVV	GALTSYLVADR	VLPELT	NH
	130	140	150	160	
121	SAEEEGT	ESIPGKKR	VKTAVGIAALV	AAAAAFAGLGLARTF	NE-1
121	SAEEEGT	ESIPGKKR	VKTAVGIAALV	AAAAAFAGLGLARTF	NE-2
121	SAEEEGT	ESIPGKKR	VKTAVGIAALV	AAAAAFAGLGLARTF	NE-LIV
121	SAEEEGT	ESIPGKKR	VKTAVGIAALV	AAAAAFAGLGLARTF	NE-SW
121	SAEEEGT	ESIPGKKR	VKTAVGIAALV	AAAAAFAGLGLARTF	NH
	170	180	190	200	
161	RHFVPPKKS	KTVASEDSALGNS	EEQYVEGSTV	NGSSDPEQER	NE-1
161	RHFVPPKKS	KTVASEDSALGNS	EEQYVEGSTV	NGSSDPEQER	NE-2
161	RHFVPPKKS	KTVASEDSALGNS	EEQYVEGSTV	NGSSDPEQER	NE-LIV
161	RHFVPPKKS	KTVASEDSALGNS	EEQYVEGSTV	NGSSDPEQER	NE-SW
161	RHFVPPKKS	KTVASEDSALGNS	EEQYVEGSTV	NGSSDPEQER	NH
	210				
201	AGGPLI	PEGDEQ	EV	DTE.	NE-1
201	AGGPLI	PEGDEQ	EV	DTE.	NE-2
201	AGGPLI	PEGDEQ	EV	DTE.	NE-LIV
201	AGGPLI	PEGDEQ	EV	DTE.	NE-SW
201	AGGPLI	PEGDEQ	EV	DTE.	NH

Figura 4.4: Deduciendo la secuencia de aminoácidos para GRA7 de las cepas de *N. caninum* y *N. hughesi*.





**Figura 4.5:** Western blot usando anticuerpos mono-específicos de GRA6. La línea uno contiene el peso molecular estándar. La línea 2 contiene toda la preparación de taquizoitos de *N. hughesi*. La línea 3 contiene toda la preparación de taquizoitos de *N. caninum*.



**Figura 4.6:** *Wester blot* usando anticuerpos monoespecíficos de GRA7. la línea uno contiene el peso molecular estándar. La línea 2 contiene toda la preparación de taquizoitos de *N. hughesi*. La línea 3 contiene toda la preparación de taquizoitos de *N. caninum*.

## DISCUSIÓN GENERAL.

Las observaciones presentadas en este trabajo soporta la identificación de *Neospora hughesi* como una especie separada de *Neospora caninum* y provee de nuevos métodos para distinguir a las dos especies. La distinción original fue hecha por *Marsh et al., 1998* y fue basada sobre características morfológicas, antigénicas y genéticas. Este trabajo contiene el primer reporte diferencial de la actividad de las dos especies de *Neospora* en roedores y perros así como una primera descripción de los genes de GRA6 y GRA7 y proteínas de *N. hughesi*.

De igual forma el estudio proporciona información sobre la susceptibilidad de cepas de ratones y gerbos a Neosporosis por *N. hughesi*. Demostrando que, de las especies de roedor y las cepas investigadas solo el interferón gama ( $\gamma$ -IFNOK) BALB/c fueron susceptible a la enfermedad por *N. hughesi*. y que el sitio de predilección fue marcadamente diferente de las de *N. caninum*.

En ratones  $\gamma$ -IFNOK *N. hughesi*. exhibió un único tropismo al corazón guiados a la distinción patológica marcada por miocarditis necrosante con trombosis atrial y remplazamiento fibroplastico de miocitos, como lesiones e inflamación de otros organos y eventualmente guiados a la muerte de los ratones.

En los ratones  $\gamma$ -IFNOK *N. caninum* se observo necrosis multifocal hepática y esplénica, neumonía y muerte rápida. Este reporte soporta previas investigaciones indicando que el interferón gamma es un mediador esencial de resistencia a la infección con las especies de neospora (*Long et al., 1998, baszler et al., 1999*).

La diferencia drástica en el sitio de predilección entre las dos especies de *Neospora* provee futuras validaciones de la distinción entre ellas. El sitio de predilección específico de *N. hughesi*. en los ratones  $\gamma$ -IFNOK separa esta infección de las causas por la relación estrecha de los organismos que pudieran ser confundidos usando en otros ensayos. Proponemos que por esta única, obvia y consistente patogenicidad el ratón  $\gamma$ -IFNOK se uso como un bioindicador de

infección por *N. hughesi*. Esto es el tiempo suficiente entre el principio de la enfermedad y muerte para la intervención de los signos clínicos obvios haciendo un modelo valuable para las pruebas preliminares de terapias para ser usadas en caballos con infecciones de EPM producidas por *N. hughesi*.

Infección en ratones BALB/c, CD-1, C57BL/6 y gerbos con *N. hughesi*. tienen menos lesiones que las infecciones por *N. caninum*. En estos roedores las infecciones con *N. caninum* produjeron signos en el SNC y mortalidad. Los ratones BALB/c, CD-1 inmunosuprimidos y gerbos son usados como un modelo estándar de enfermedad del SNC por *N. caninum*. En contraste, no se observaron fueron observados signos clínicos o mortalidad en ninguno de estos roedores infectados con *N. hughesi*. Estos roedores no produjeron lesiones o mínimas lesiones y no se pudo ver especificidad en los tejidos por las cepas de ratones y gerbos. Las diferencias en patogenicidad en estos tipos de roedores proveen una distinción biológica adicional entre las dos especies de *Neospora*.

Los perros alimentados con cerebros infectados de *N. hughesi*. de ratones CD-1 no liberaron oocistos de *N. hughesi* detectados por flotación y los ratones  $\gamma$ -IFNOK alimentados con materia fecal concentrada de perros, no murieron o desarrollaron títulos de anticuerpos a las especies de *Neospora*.

La presencia y actividad de parásitos en la inoculación fue confirmada por reconocimiento de los organismos de *N. hughesi*. de las células y ratones  $\gamma$ -IFNOK infectados con cerebros homogenizados de ratones CD-1 infectados. Esto sugiere que los perros puede no ser el huésped definitivo de *N. hughesi*. Sin embargo, no todos los perros excretan oocistos de *N. caninum* después de ser alimentados con tejido cístico (McAllister et al., 1998). Estudios adicionales en perros necesitan ser conducidos para determinar su rol en la transmisión de *N. hughesi*. Es interesante anotar que la *Neosporosis* equina solo ha sido observada en las Americas (Dubey y Porterfield 1990; Daft et al., 1997 Gray et al., 1996, lindsay et al., 1996, Marsh et al., 1996, Hamir et al., 1998).

Esto puede indicar que el huésped definitivo de *N. hughesi* está limitado a Norteamérica.

Los genes de dos antígenos conservados de la familia de proteínas granulares densas fueron secuenciados y comparados entre *N. hughesi* y *N. caninum*. Estas proteínas se conservaron en una señal de secuencia e indicando en su dominio hidrofóbico que sus funciones pueden ser similares entre los dos grupos de parásitos. Después de que el parásito apicomplejo penetra las células huésped y se establece en la vacuola parasitofora (PV), la proteína contenida en los organelos de los gránulos densos (la proteína GRA) es liberada. Estas proteínas son específicamente blanco a la membrana PV, o del espacio vacuolar. Las proteínas granulares densas de la membrana de la vacuola participan en el intercambio de la entrada de los nutrientes y la excreción entre el parásito y la célula huésped (Cesbron-Denlauw 1994).

La proteína granular densa es antigénica y es detectada por anticuerpos en suero de animales infectados. El huésped es expuesto a las proteínas cuando ellos están excretando las células infectadas o cuando se rompen las células infectadas como un resultado de una inmensa infección parasitaria (Fisher et al., 1998).

Formas recombinantes de las proteínas GRA6 y GRA7 están siendo usadas como antígenos en una prueba de ELISA para la infección de *N. caninum* (Rally et al., 1998). Las diferencias entre las proteínas de las dos especies de neospora puede servir como base para un diagnóstico diferencial que podrían distinguirlas entre ellas.

Las diferencias observadas en las proteínas GRA6 y GRA7 de las dos especies de *Neospora* por amplificación de y secuenciación de sus genes. Hubo una diferencia del 4.0% en su secuencia de nucleótidos y dio un 9.0% en su secuencia de aminoácidos que se demostraron en GRA6. La variación en la

proteína reducida de GRA7 para cepas de *N. caninum* examinadas fue de 0-0.5%. Al 6.0% de diferencia en su secuencia de nucleótido y aun de 14.8% en la composición de sus aminoácidos, que fueron demostrados en la proteína GRA7. la variación en la proteína GRA7 en su secuencia de aminoácidos reducidos para *N. caninum* examinadas fue 0.5-0.9%. los gránulos densos GRA6 y GRA7 son antígenos homólogos para *T. gondii* y *N. caninum* con un 32 y 28.4% de similitud cuando fueron analizados usando el método clustal de alineamiento. *N. hughesi*. GRA6 y GRA7 comparten el 30.4% y el 28.9% de similitud con las proteínas homologas de *T. gondii* en el método clustal. La variación de *T. gondii* y cada una de las especies de *Neospora* parecen ser similares.

Este grado de variación entre *N. caninum* y *N. hughesi*. es consistente con variación observada en otros genes de las dos especies. La variación en la proteína de la GRA7 es la gran prueba de variación observada a distancia entre las proteínas de las dos especies.

Esto es un segmento de aminoácidos 33 adicional para la parte carboxiterminal de la proteína reducida NhGRA6 que podría no haber sido considerada en la comparación de alineamiento y no ha sido representada en el reporte del 9.0% de su variación. La variación en los genes de *N. caninum* y *N. hughesi*. GRA6 fue visualmente demostrado por diferencias en la migración en la aplicación de la prueba PCR en gel de agarosa al 1.0%. La variación en la proteína GRA6 de *N. caninum* y *N. hughesi*. fue confirmada por SDS en geles de poliacrilamida y al análisis del Western blot usando anticuerpos específicos para NcGRA6. Un 6.0% de diferencia en su secuencia de nucleótidos y un 14.8% en su secuencia de aminoácidos fue la diferencia demostrada en GRA7. Las diferencias entre los genes GRA6 y GRA7 y sus proteínas reducidas de *N. hughesi*. y *N. caninum* proporciona un soporte adicional para la distinción de que *N. hughesi*. es una especie separada o distinta. La visible diferencia en migración de las proteínas GRA6 en SDS gel podría servir como una diferencia entre las dos especies.

El segmento adicional de 33 aminoácidos presentes en la proteína NhGRA6 es potencialmente antigénica en las 3 áreas en relación al Jameson-Wolf index (Protean). Es altamente hidrofílica en relación al Kyte-Doolittle index y altamente flexible debido a un 30 % de contenido de residuos de glicina. Este segmento adicional puede ser la base de un anticuerpo monoclonal capaz de distinguir entre las dos especies de *Neospora*.

El cebador o primer usado es específico a las especies de neospora y no produce productos con el ADN de *T. gondii* o *S. Neurona* fue adicionado como patrón.

Este ensayo puede ser eventualmente usado como prueba CSF (fluido cerebro espinal) de los casos de EPM donde las especies de *Neospora* son sospechosas.

Las secuencias de nucleótidos y la demostración diferencial entre el tamaño de los genes GRA6 y las proteínas de *N. hughesi* y *N. caninum* proporciona métodos adicionales para distinguir entre las dos especies de *Neospora* que ayudaran a investigaciones futuras y su diagnóstico.

## LITERATURA CITADA

Barber, J.S., Holmdahl, O.J.M., Owen, M.R., Guy, F., Uggla, A., Trees, A.J., 1997. Characterization of the first European isolate of *Neospora caninum* (Dubey, Carpenter, Speer, Topper, and Uggla). *Parasitol.* 111,563-568.

Baszler, T.V., Long, M.T., McElwain, T.F., Mathison, B.A., 1999. Interferon-gamma and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. *Int. J. Parasitol.* 29,1635-1646.

Bjerkas, I., Mohn, S.F., Presthus, J., 1984. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z. Parasitenkd.* 70, 271-274.

Bjerkas, I., Presthus, J., 1988. Immuno-histochemical and ultrastructural characteristics of a cyst-forming sporozoan associated with encephalomyelitis and myositis in dogs. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 96, 445-454.

Cesbron-Delauw, M-F., 1994. Dense granule organelles of *Toxoplasma gondii*: Their role in the host-parasite relationship. *Parasitol. Today* 10, 294.

Cheadle, M.A., Lindsay, D. S., Rowe, S., Dykstra, C. C., Williams, M. A., Spencer, J. A., Toivio-Kinnucan, M., Lenz, S. D., Newton, J. C., Rolsma, M. D., Blagburn, B. L., 1999. Serosurvey of antibodies to *Neospora caninum* in horses from Alabama and biological characterization of an isolate recovered from a naturally infected horse. *Int. J. Parasitol.* 29, 1537-1543.

Cole, R.A., Lindsay, D.S., Blagburn, B.L., Dubey, J.P., 1995. Vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *J. Parasitol.* 81, 208-211.

Cole, R.A., Lindsay, D.S., Blagburn, B.L., Dubey, J.P., 1995. Vertical transmission of *Neospora caninum* in mice. *J. Parasitol.* 81, 730-732.

Cuddon, P., Lin, D.S., Bowman, D.D., Lindsay, D.S., Miller, T.K., Duncan, I.D., de Lahunta, A., Cummings, J., Suter, M., Cooper, B., King, J.M., Dubey, J.P., 1992. *Neospora caninum* infection in English Springer Spaniel littermates: Diagnostic evaluation and organism isolation. *J. Vet. Int. Med.* 6, 325-332.

Daft, B.M., Barr, B.C., Collins, N., Sverlow, K., 1997. *Neospora* encephalomyelitis and polyradiculoneuritis in an aged mare with Cushing's disease. *Equine Vet. J.* 29, 240-243.

Darcy, F., Maes, P., Gras-Masse, H., Auriault, C., Bossus, M., Deslee, D., Godard, I., Cesbron-Delauw, M.F., Tartar, A., Capron, A., 1992. Protection of mice and nude rats against toxoplasmosis by a multiple antigenic peptide construction derived from *Toxoplasma gondii* P30 antigen. *J. Immunol.* 149, 3636-3641.

Dubey, J.P., Davis, S. W., Speer, C.A., Bowman, D.D., de Lahunta, A., Granstrom, D.E., Topper, M.J., Hamir, A.N., Cummings, J.F., Suter, M.M., 1991. *Sarcocystis neurona* (Protozoa: Apicomplexa), the etiologic agent of equine protozoal myeloencephalitis. *J. Parasitol.* 77, 212-218.

Dubey, J.P., Hattel, A.L., Lindsay, D.S., Topper, M.J., 1988. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 193, 1259-1263.

Dubey, J. P., Kerber, C. E., Granstrom, D. E., 1999b. Serologic prevalence of *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* in horses in Brazil. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 215, 970-972.



- Dubey J.P., Lindsay D.S., 2000. Gerbils (*Meriones unguiculatus*) are highly susceptible to oral infection with *Neospora caninum* oocysts. *Parasitol. Res.* 86, 165-168.
- Dubey, J.P., Miller, S., 1986. Equine protozoal myeloencephalitis in a pony. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 188, 1311-1312.
- Dubey, J.P., Porterfield, M.L., 1990. *Neospora caninum* (Apicomplexa) in an aborted equine fetus. *J. Parasitol.* 76, 732-734.
- Dubey, J.P., Romand, S., Thulliez, P., Kwok, O.C., Shen, S.K., Gamble, H.R., 1999c. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in horses in North America. *J. Parasitol.* 85, 968-969.
- Dubey, J. P., Venturini, M. C., Venturini, L., McKinney, J., Pecoraro, M. 1999a. Prevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in horses from Argentina. *Vet. Parasitol.* 86, 59-62.
- Ernst, J.V., Benz, G.W., 1981. Coccidiosis. *In Diseases of cattle in the tropics*, Ristic M., McIntyre I., eds., Martinus Nijhoff, The Hague, The Netherlands, pp. 337-392.
- Fenger, C.K., Granstrom, D.E., Langemeier, J.L., Stanper, S., 1997. Epizootic of equine protozoal myeloencephalitis on a farm. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 210, 923-927.
- Fischer, H.G., Stachelhaus, S., Sahm, M., Meyer, H.E., Reichmann, G., 1998. GRA7, an excretory 29kDa *Toxoplasma gondii* dense granule antigen released by infected host cells. *Mol. Biochem. Parasitol.* 91, 251-262.
- Gondim, L.F.P., Saeki, S., Onaga, H., Haritani, M., Yamane, I., 1999. Maintenance of *Neospora caninum* tachyzoites using Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *New Zeal. Vet. J.* 47, 36.
- Gray, M.L., Harmon, B.G., Sales, L., Dubey, J.P., 1996. Visceral neosporosis in a 10-year-old horse. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8, 130-133.
- Hamir, A.N., Tornquist, S.J., Gerros, T.C., Topper, M.J., Dubey, J.P., 1998. *Neospora caninum* associated equine protozoal myeloencephalitis. *Vet. Parasitol.* 79, 269-274.
- Howe, D.K., Sibley, D.L., 1999. Comparison of the major antigens of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 29, 1489-1496.
- Lecordier, L., Moleon-Borodowsky, I., Dubremetz, J.F., Tourvielle, B., Mercier, C., Deslee, D., Capron, A., Cesbron-Delauw, M.F., 1995. Characterization of a dense granule antigen of *Toxoplasma gondii* (GRA6) associated with the network of the parasitophorous vacuole. *Mol. Biochem. Parasitol.* 70, 85-94.
- Liddell, S., Lally, N.C., Jenkins, M.C., Dubey, J.P., 1998. Isolation of the cDNA encoding a dense granule protein associated antigen (NCDG2) of *Neospora caninum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 93, 153-158.
- Lindsay, D.S., Blagburn, B.L., Dubey, J.P., 1992. Factors affecting the survival of *Neospora caninum* bradyzoites in murine tissues. *J. Parasitol.* 78, 70-72.
- Lindsay, D.S., Dubey, J.P., 1989. *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) infections in mice. *J. Parasitol.* 75, 772-779.
- Lindsay, D.S., Dubey, J.P., 1990. Effects of Sulfadiazine and Amprolium on *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) infections in mice. *J. Parasitol.* 76, 177-179.
- Lindsay, D.S., Dubey, J.P., 1990. Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa). *J. Parasitol.* 76, 410-413.
- Lindsay, D.S., Dubey, J.P., Blagburn, B.L., 1991. Characterization of a *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) isolate (NC-3) in mice. *J. Ala. Acad. Sci.* 62, 1-8.

Lindsay, D.S., Dubey, J.P., Duncan, R.B., 1999. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 82, 327-333.

Lindsay, D.S., Lenz, S.D., Cole, R.A., Dubey, J.P., Blagburn, B.L., 1995. Mouse model for central nervous system *Neospora caninum* infections. *J. Parasitol.* 81, 313-315.

Lindsay, D.S., Steinberg, H., Dubielzig, R.R., Semrad, S.D., Konkle, D.M., Miller, P.E., Blagburn, B.L., 1996. Central nervous system neosporosis in a foal. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8, 507-510.

Long, M.T., Baszier, T.V., Mathison, B.A., 1998. Comparison of intracerebral parasite load, lesion development, and systemic cytokines in mouse strains infected with *Neospora caninum*. *J. Parasitol.* 84, 316-320.

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

Marsh, A.E., Barr, B.C., Packham, A.E., Conrad, P.A., 1998. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). *J. Parasitol.* 84, 983-991.

Marsh, A.E., Howe, D.K., Wang, G., Barr, B.C., Cannon, N., Conrad, P.A., 1999. Differentiation of *Neospora hughesi* from *Neospora caninum* based on their immunodominant surface antigen, SAG1 and SRS2. *Int. J. Parasitol.* 29, 1575-1582.

McAllister, M.M., Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Jolley, W.R., Wills, R.A., McGuire, A.M., 1998. Dogs are the definitive host of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 28, 1473-1478.

Packham, A.E., Sverlow, K.W., Conrad, P.A., Loomis, E.F., Rowe, J.D., Anderson, M.L., Marsh, A.E., Cray, C., Barr, B.C., 1998. 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.* 5, 467-473.