



universidad
de León



Programa de Doctorado
“Ciencias Veterinarias y de los Alimentos”
Universidad de León

Tesis Doctoral

TOXOPLASMOSIS OVINA: INFLUENCIA DEL MOMENTO DE INFECCIÓN EN LA PATOGENIA Y RESPUESTA INMUNITARIA DURANTE LA GESTACIÓN.

Memoria presentada por D. Pablo Castaño Labajo para optar al grado de Doctor en Veterinaria por la Universidad de León.

León, octubre de 2019

Directores:

Valentín Pérez Pérez

Julio Benavides Silván

La realización de este estudio ha sido posible debido a la financiación del Ministerio de Ciencia e Innovación y de la Junta de Castilla y León a través de los proyectos de investigación cuyas referencias son AGL2011-30205 y LE253U13 respectivamente. Además, la Junta de Castilla y León concedió al autor de la presente Tesis Doctoral un contrato predoctoral convocado por la ORDEN EDU/310/2015, de 10 de abril y resuelto en la ORDEN EDU/1006/2015, de 17 de noviembre.

“
...

*Habladme del mar,
habladme del olor ancho del campo,
de las estrellas, del aire.
Recitadme un horizonte sin cerradura
y sin llave, como la choza de un pobre.*

...”

Marcos Ana
(1920-2016)

Agradecimientos.

Agradecimientos.

Después de muchos años de esfuerzo y sacrificio, esta Tesis Doctoral por fin ve la luz. Representa un trabajo conjunto de muchas personas, tanto en el ámbito profesional como personal, y por ello me gustaría agradecerles en estas páginas su apoyo incondicional a lo largo de tanto tiempo.

En primer lugar, a mis directores de Tesis, los doctores Valentín Pérez Pérez y Julio Benavides Silván. Sin su motivación y constancia este día no habría llegado nunca. Gracias a ellos esta Tesis Doctoral ha parecido algo fácil y eso es algo que les agradeceré siempre. Por supuesto, quiero expresar públicamente mi agradecimiento a los organismos oficiales que, a través de la concesión de proyectos al Grupo de Investigación con el que he colaborado durante estos años, han permitido que esta Tesis Doctoral se lleve a cabo. En concreto, este trabajo ha sido realizado gracias los proyectos AGL2011-30205, del Ministerio de Ciencia e Innovación, y LE253U13, de la Junta de Castilla y León. Asimismo, quiero agradecer a este último organismo la concesión de la beca predoctoral que he disfrutado a lo largo de estos años, convocada según la ORDEN EDU/310/2015, de 10 de abril y resuelta por la ORDEN EDU/1006/2015, de 17 de noviembre.

Por supuesto agradezco a toda la Universidad de León y al personal del Departamento de Sanidad Animal su ayuda durante estos años, así como al Instituto de Ganadería de Montaña, al Grupo SALUVET de la Universidad Complutense de Madrid y al Moredun Research Institute por sus valiosas colaboraciones. También quisiera agradecer personalmente el trabajo de la Asociación Nacional de Criadores de Ganado Ovino Selecto de Raza Churra (ANCHE) y de Jorge Gutiérrez González (MSD-Animal Health) por su ayuda en la selección de los animales empleados para la reproducción experimental de la toxoplasmosis ovina, y en la sincronización del celo de estos animales. Además, la autoría de la foto de la portada es de Jorge Gutiérrez González, así que de nuevo muchísimas gracias.

No quiero olvidarme, antes de pasar a un plano más personal, de la enseñanza pública. Sin ella, esta Tesis Doctoral no habría sido posible. Gracias a la educación pública, gratuita y universal he podido completar mi formación académica, empezando por el C.R.A. de Fonfría de Aliste (Zamora), continuando en Zamora en el C.E.I.P.

Agradecimientos.

“Gonzalo de Berceo” y en el I.E.S. “Poeta Claudio Rodríguez”, y finalmente concluyendo mis estudios en la Universidad de León. Gracias de todo corazón a los profesionales que forman parte de ella y que, pese a los numerosos obstáculos que encuentran, al intento de mucha gente por desprestigiarla y a la financiación en muchas ocasiones insuficiente, hacen posible día tras día que miles de personas, sin importar su sexo, raza, religión, o condición socio-económica, adquieran una formación académica completa y se sientan orgullosos, como es mi caso, de formar parte de ella.

En el ámbito más personal quiero destacar de nuevo la figura de Valentín. Tus logros académicos y relacionados con la investigación están ahí, es algo objetivo y poco puedo añadir. Sin embargo, tu aportación personal no es algo tan marcadamente tangible. Tesis tras tesis los ahora doctores no han parado de resaltar tu lado humano y de agradecer tu amistad. Por supuesto, no iba a ser menos. Es difícil condensar en un simple párrafo la amistad que he forjado contigo durante tantos años. De todo corazón te agradezco que hayas antepuesto en tantas ocasiones el ámbito personal y el bienestar de todos tus doctorandos a tus propios intereses. Es muy difícil encontrar a alguien que realmente se preocupe por ti como persona, además de tener en cuenta (de manera impecable, por cierto) tu formación académica. Dignificas día tras día la profesión. Nadie te obliga a echar tantas horas, nadie te obliga a pedir proyectos para formar vez tras vez a nuevos estudiantes y que el Departamento tenga financiación y salga adelante, nadie te obliga a irte a múltiples sitios a impartir cursos, seminarios, comunicaciones en Congresos, etc. Pero lo haces. Lo haces porque crees que eso va en tu trabajo. Lo haces porque eres coherente con la idea que defiendes de la educación/investigación. Mientras algunos intentan tapar su mediocridad con aires falsos de grandeza y de insulsos cargos institucionales, tú trabajas para mejorar el sistema educativo desde su base. Gracias de corazón por tu esfuerzo y por tu dedicación. Eres un verdadero ejemplo a seguir tanto en el ámbito profesional como personal, pues te considero una de las personas más inteligentes, honestas, trabajadoras e íntegras que he conocido.

Gracias de nuevo, Julio. A lo largo de estos años me has demostrado lo gratificante que es trabajar, luchar y abrirse camino en lo que realmente te guste. Me has transmitido tu entusiasmo por la investigación y por el mundillo de la toxoplasmosis ovina y te agradezco enormemente las horas que has pasado en estos últimos meses

Agradecimientos.

corrigiendo cada uno de los apartados de la Tesis. Estoy más que convencido de que en poco tiempo serás el nuevo Dubey de la toxoplasmosis ovina. Desde que te conozco siempre te he visto implicado en múltiples investigaciones, siempre dispuesto a implicarte en otras nuevas y siempre con un entusiasmo y unas ganas de trabajar envidiables. Además, escuchar el típico “campeón” siempre era un estímulo a la hora de ponerse a trabajar. Gracias por tu complicidad y tu amistad, sin las cuales todo habría sido mucho más difícil.

Por supuesto, gracias Maica. No eres directora de esta Tesis, pero trabajando a tu lado he aprendido la importancia de la constancia en el trabajo y del orden. Eres toda una institución entre los alumnos y la viva esencia de la Sanidad Animal. Ha sido un auténtico placer haber trabajado a tu lado.

Gracias a los compañeros que durante estos años he ido conociendo en el Departamento. Miguel, también tú eres un referente. Me enseñaste desde el principio los entresijos de las técnicas de laboratorio, siempre con un entusiasmo y una vitalidad envidiables, y estos últimos años se te ha echado mucho de menos por León. Maikel, has sido un espejo en el que mirarse, siempre trabajando duro muchas horas y ayudando en todo lo que podías. Gracias por tu apoyo incondicional a lo largo de la Tesis. Marcos, has sido un gran compañero y tu ayuda con el Mendeley y Word ha sido muy útil, así como darte abrazos inesperadamente. También quiero agradecer la ayuda de Jose, Mari Tere, Gloria, Eva, Raquel, Noive, Marta, Dani, y por supuesto la de la gente del IGM (María Jesús, Carmen Espinella, Carmen Agudín, etc.)

Finalmente me gustaría centrarme en el ámbito más estrictamente familiar. Gracias a mis padres, Domingo e Isabel y a mi hermano Víctor, por enseñarme la importancia de la educación y del trabajo en el día a día. Gracias a mis abuelos, Ángel, Ernesto, Isabel y María. Os ha tocado vivir tiempos muy difíciles, pero habéis salido adelante y gracias a ello hoy puedo presentar esta Tesis. Gracias a mi Oliver, por tu alegría de vivir y por tu nobleza animal. Gracias a mis suegros, Antonio y Araceli por abrirme vuestros corazones desde el primer minuto.

Finalmente, quiero agradecer a mi mujer, Blanca, todo su apoyo durante estos años. Realizar una Tesis es algo muy muy duro. Lleva mucho trabajo, mucho esfuerzo, mucho tiempo y cansancio físico y mental, en especial en los últimos meses. Gracias por aguantarme, a mí y a mis charlas sobre *Toxoplasma gondii*. A mis ausencias los fines de semana de los últimos meses. Es precioso tener la certeza de que lo has

Agradecimientos.

conseguido, saber que has encontrado en la vida a tu compañera, a la persona con la que deseas compartir todo y con la que compartes una visión común del mundo y de tus aspiraciones vitales. Y yo lo he conseguido. Te he encontrado. Gracias de verdad porque sin tu comprensión y sin tu apoyo este día no habría llegado.

Espero no haberme olvidado de nadie. La razón es muy sencilla: una de las características más destacables de la Ciencia es que los resultados siempre son fruto del trabajo previo en equipo. En esta Tesis figuro como autor, pero detrás de cada página está el esfuerzo de mucha gente. A todos, honestamente, GRACIAS.

Índice.

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.	1
1. Introducción general.	3
2. Etiología.	4
2.1. Clasificación filogenética de <i>T. gondii</i>	4
2.2. Variabilidad genética de <i>T. gondii</i>	7
2.3. Ciclo de vida de <i>T. gondii</i> . Fuentes de infección y modos de transmisión. .	12
3. Epidemiología.	15
3.1. Prevalencia de la toxoplasmosis ovina.....	15
3.2. Prevalencia y epidemiología de la toxoplasmosis en otras especies.	18
4. Estudios experimentales en modelos animales.	27
4.1. Reproducciones experimentales de la toxoplasmosis en la especie ovina.	27
4.2. Infecciones experimentales en modelos murinos.....	34
4.3. Infecciones experimentales en otras especies de interés ganadero.	40
4.3.1. Especie caprina.	40
4.3.2. Especie porcina.	43
4.3.3. Especie bovina.	48
5. Formas de presentación y patogenia de la toxoplasmosis ovina.	51
5.1. Introducción.....	51
5.2. Presentaciones clínicas de la enfermedad.....	51
5.3. Infección y diseminación del parásito.....	53
5.4. Lesiones.....	55
5.5. Respuesta inmunitaria tras la infección con <i>T. gondii</i>	56
5.5.1. Respuesta inmunitaria tras infecciones experimentales <i>in vivo</i> (ratones) e <i>in vitro</i> (líneas celulares humanas y murinas).....	56
5.5.1.1. Respuesta inmunitaria innata.....	56
5.5.1.2. Respuesta inmunitaria adquirida.....	59
5.5.2. Respuesta inmunitaria tras infecciones experimentales con <i>T. gondii</i> en ovejas.	69
5.5.2.1. Respuesta inmunitaria innata.....	69
5.5.2.2. Respuesta inmunitaria adaptativa.	70
5.5.3. Modulación de la respuesta inmunitaria frente a <i>T. gondii</i> durante la gestación.	71
5.5.3.1. Modulación de la respuesta inmunitaria periférica durante la gestación tras la infección con <i>T. gondii</i>	72
5.5.3.2. Modulación de la respuesta inmunitaria en la placenta durante la gestación.....	74
6. Diagnóstico y control de la toxoplasmosis ovina.	78
6.1. Diagnóstico clínico.	78

Índice.

6.2. Diagnóstico laboratorial.....	79
6.2.1. Análisis serológicos.	80
6.2.2. Aislamiento de <i>T. gondii</i>	82
6.2.3. Estudio histológicos e inmunohistoquímicos.	82
6.2.4. Estudios moleculares: PCR.	83
6.3. Prevención y tratamiento de la toxoplasmosis ovina.....	84
Capítulo II. Justificación y objetivos.	91
Capítulo III. Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.	99
1. Introducción.	101
2. Material y métodos.	103
2.1. Consideraciones éticas.	103
2.2. Animales y diseño experimental.....	103
2.3. Seguimiento clínico y recogida de muestras.	103
2.4. Análisis serológico: IFAT.....	104
2.5. Histopatología y valoración de las lesiones.....	105
2.6. Extracción de ADN y PCR para la detección del parásito y su cuantificación en los tejidos.	106
2.7. Análisis estadístico.....	107
3. Resultados.	108
3.1. Observaciones clínicas.	108
3.2. Producción de IgG específicas frente a <i>T. gondii</i>	112
3.3. Estudios anatomopatológicos y cuantificación de las lesiones.	112
3.3.1. Lesiones macroscópicas.	112
3.3.2. Lesiones microscópicas.....	113
3.3.2.1. Fase aguda de la toxoplasmosis ovina.	113
3.3.2.2. Placenta.	114
3.3.2.3. Encéfalo fetal.	115
3.3.2.4. Hígado fetal.....	115
3.3.2.5. Pulmón fetal.	115
3.4. Distribución del parásito y carga parasitaria en la placenta y en los tejidos fetales.	119
3.4.1. Placenta.....	119
3.4.2. Tejidos fetales.....	120
4. Discusión.	122

Índice.

Capítulo IV. Valoración de la respuesta inmunitaria periférica y local en ovejas infectadas experimentalmente con <i>T. gondii</i> en los tres tercios de gestación.	139
1. Introducción.	141
2. Material y métodos.	143
2.1. Animales y diseño experimental.	143
2.2. Seguimiento clínico y recogida de muestras.	144
2.3. Detección de anticuerpos específicos frente a <i>T. gondii</i> en muestras de suero.	145
2.4. Cuantificación de los niveles de IFN- γ , TNF- α , IL4 e IL10 en suero materno.	146
2.5. Extracción de ARN y qPCR.	146
2.6. Análisis estadístico.	147
3. Resultados.	148
3.1. Producción de anticuerpos anti- <i>T. gondii</i> en el suero materno.	148
3.2. Presencia de citoquinas en el suero materno.	148
3.3. Niveles de transcripción de ARN de las citoquinas en la placenta.	151
4. Discusión.	153
Capítulo V. Estudio de las poblaciones celulares presentes en el infiltrado inflamatorio de la placenta en las distintas presentaciones clínicas de la toxoplasmosis ovina.	162
1. Introducción.	164
2. Material y métodos.	165
3. Resultados.	166
4. Discusión.	172
Capítulo VI. Discusión general.	179
Capítulo VII. Conclusiones.	203
Capítulo VIII. Resumen/Summary.	208
Capítulo IX. Referencias bibliográficas.	222
Capítulo X. Anexos: Publicaciones.	272

Listado de abreviaturas.

Listado de abreviaturas.

Ac: Anticuerpo.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADN_c: ADN complementario.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARN_m: ARN mensajero.

Ag: Antígeno.

CD: Células dendríticas.

CPA: Células presentadoras de antígenos.

CSF-1: Macrophage colony-stimulating factor 1. --- Factor estimulador de macrófagos de tipo 1.

CTLA-4: Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4. --- Antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico.

CV: Coeficiente de variación.

DAT: Direct agglutination test. --- Test de aglutinación.

dg: Días de gestación.

DO: Densidad óptica.

dpi: Días post-infección.

E.E.U.U.: Estados Unidos.

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay. --- Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas.

FITC: Fluorescein isothiocyanate. --- Isotiocianato de fluoresceína.

Listado de abreviaturas.

GPI: Glycosylphosphatidylinositol. --- Glicosilfosfatidilinositol.

GRA: Proteínas densas granulares (de *T. gondii*).

G1: Grupo experimental 1.

G2: Grupo experimental 2.

G3: Grupo experimental 3.

HE: Hematoxilina-eosina.

HIER: Heat-induced antigen retrieval. --- Desenmascaramiento de antígeno inducido por calor.

HLA-DR: Human leucocyte antigen DR. --- Antígeno leucocitario humano de tipo DR.

ICOS: Inducible costimulatory. --- Coestimulador inducible.

IDO: Indoleamine 2,3-dioxygenase. --- Indolamina 2, 3-dioxigenasa.

IFAT: Immunofluorescence antibody test. --- Test de inmunofluorescencia.

IFN- γ : Gamma interferon. --- Interferón gamma.

Ig: Inmunoglobulina.

IHQ: Inmunohistoquímica.

IL: Interleuquina.

iNOS: Inducible nitric oxide synthase. --- Óxido nítrico sintetasa inducible.

IO: Índice de densidad óptica.

ISCOM: Immune stimulating complexes. --- Complejos inmunoestimuladores.

ITS: Internal transcribed spacer. --- Espaciador transcrito interno.

kg: Kilogramo.

KO: Knock-out.

Listado de abreviaturas.

LPS: Lipopolisacárido.

MAPAMA: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

MDAT: Modified direct agglutination test. --- Test de aglutinación modificado.

mg: Miligramo.

MHC: Major histocompatibility complex. --- Complejo mayor de histocompatibilidad.

MIF: Macrophage migration inhibitory factor. --- Factor inhibidor de la migración de los macrófagos.

min: Minutos.

MLN: Mesenteric lymph nodes. --- Nódulos linfáticos mesentéricos.

mm: Milímetro.

MST: Músculo semitendinoso.

MyD88: Myeloid differentiation primary response 88. --- Proteína adaptadora 88 de respuesta a diferenciación mieloide primaria.

M1: Macrófago clásicamente activado.

M2: Macrófago alternativamente activado.

N. caninum: *Neospora caninum*.

ND: No disponible.

NK: Natural killer.

NL: Nódulos linfáticos.

nm: Nanómetro.

NO: Nitric oxide. --- Óxido nítrico.

o.e.: Ooquistes esporulados.

Listado de abreviaturas.

PAMPs: Pathogen-associated molecular patterns. --- Patrones moleculares asociados a patógenos.

pb: Pares de bases.

PBMCs: Peripheral blood mononuclear cells. --- Células mononucleares sanguíneas.

PBS: Phosphate buffered saline. --- Tampón fosfato salino.

PCR: Polymerase chain reaction. --- Reacción en cadena de la polimerasa.

PDL-1: Programmed death-ligand 1. --- Ligando 1 de muerte programada.

PGF: Placental growth factor. --- Factor de crecimiento de la placenta.

pi: Post-infección.

PIER: Protein-induced antigen retrieval. --- Desenmascaramiento de antígeno inducido por proteínas.

PSAL: Porcentaje de sección afectada por las lesiones.

qPCR: PCR cuantitativa.

q.t.: Quistes tisulares.

R.D.: Real Decreto.

RFLP: Restriction fragment length polymorphism. --- Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción.

ROP: Proteínas de la roptria (de *T. gondii*).

SAG: Antígeno (de *T. gondii*) de superficie.

SAR: Stramenopiles/ Alveolata/ Rhizaria. --- Estramenópilos/ Alveolados/ Rizarios.

SCID: Severe combined immunodeficiency. --- Inmunodeficiencia combinada grave.

sg: Semanas de gestación.

t.: Taquizoítos.

Listado de abreviaturas.

T. gondii: *Toxoplasma gondii*.

TAP: Transporter associated with antigen processing. --- Transportador asociado al procesamiento de antígeno.

Tc: Cytotoxic T lymphocytes. --- Linfocitos T citotóxicos.

TCR: T cell receptor --- Receptor de células T.

Th: Helper T lymphocytes. --- Linfocitos T colaboradores.

TLR: Toll-like receptor. --- Receptor tipo toll.

TMF: Tamaño medio de los focos.

TNF: Tumor necrosis factor. --- Factor de necrosis tumoral.

TNF- α : Tumor necrosis factor-alpha. --- Factor de necrosis tumoral alfa.

T_{reg}: Regulatory T cells. --- Células T reguladoras.

uNK: Uterine natural killer. --- Células NK uterinas.

UV: Ultravioleta.

v.im.: Vía intramuscular.

v.ip.: Vía intraperitoneal.

v.iv.: Vía intravenosa.

v.o.: Vía oral.

v.sb.: Vía subcutánea.

v.sx.: Vía sexual.

Índice de tablas.

Índice de Tablas.

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

Tabla I.1. Aislados representativos de <i>T. gondii</i> según su genotipo, origen y virulencia en ratones.	11
Tabla I.2. Seroprevalencia individual en ovejas frente a la infección con <i>T. gondii</i> tanto en España como en otras regiones geográficas.	17
Tabla I.3. Seroprevalencia en diferentes especies de animales domésticos y silvestres frente a la infección por <i>T. gondii</i> en España.	23
Tabla I.4. Estudios experimentales de la toxoplasmosis en la especie ovina, según el tipo de aislado empleado.	32
Tabla I.5. Estudios experimentales de la toxoplasmosis en la especie murina, según el tipo de aislado empleado.	38
Tabla I.6. Estudios experimentales de la toxoplasmosis en la especie caprina, según el tipo de aislado empleado.	42
Tabla I.7. Estudios experimentales de la toxoplasmosis en la especie porcina, según el tipo de aislado empleado.	46
Tabla I.8. Estudios experimentales de la toxoplasmosis en la especie bovina, según el tipo de aislado empleado.	50

Capítulo III. Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.

Tabla III.1. Distribución experimental de los animales según el momento de gestación en que fueron infectados (G1, G2 o G3) y el día pi en el que fueron sacrificados o en el que se produjo el aborto.	110
Tabla III.2. Valores medios de la extensión de las lesiones histológicas en la placenta y vísceras fetales de cada grupo experimental infectado.	117

Índice de tablas.

Tabla III.3. Porcentajes de casos con lesiones histológicas y en los que se detectó ADN parasitario en la placenta y vísceras fetales, de los animales infectados a lo largo del experimento.122

Tabla adicional III.1. Títulos serológicos individuales en las ovejas infectadas y en los fetos/mortinatos en el momento de la necropsia.132

Tabla adicional III.2. Cuantificación individual de las lesiones de la placenta y de las vísceras fetales (hígado, pulmón y encéfalo).134

Tabla adicional III.3. Frecuencia individual de detección de ADN parasitario en los fetos.136

Capítulo IV. Respuestas inmunitarias periférica y local en ovejas infectadas de manera experimental con *T. gondii* en los tres tercios de gestación.

Tabla IV.1. Distribución experimental de los animales según el momento de gestación en que fueron infectados (G1, G2 o G3) y el día pi en el que fueron sacrificados o en el que se produjo el aborto.144

Tabla adicional IV.1. Secuencias de cebadores utilizados para analizar los niveles de expresión de las citoquinas mediante qPCR.159

Tabla adicional IV.2. Comparación de los valores medios de la carga parasitaria y de las lesiones histológicas de los animales infectados de G1, G2 y G3 en el día 26 pi.160

Capítulo V. Estudio de las poblaciones celulares presentes en el infiltrado inflamatorio de la placenta en las distintas presentaciones clínicas de la toxoplasmosis ovina.

Tabla V.1. Media (\pm SEM) por campo de células positivas por IHQ en la zona interdigital de los placentomas analizados de los diferentes animales.169

Tabla adicional V.1. Distribución de los animales del estudio según el tercio de gestación en el que fueron infectados, la semana pi cuando se les sacrificó o la presentación clínica observada después de la inoculación de *T. gondii*.176

Índice de tablas.

Tabla adicional V.2. Anticuerpos y técnica inmunohistoquímica empleados en este trabajo.177

Índice de figuras.

Índice de Figuras.

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

- Figura I.1.** Filogenia de *T. gondii* (elaboración propia).6
- Figura I.2.** Representación esquemática de un placentoma característico de la placenta ovina. Imagen tomada de Rocchi *et al.*, 2009.54
- Figura I.3.** Presentación del Ag de *T. gondii* de las CPA a las células CD4 inmaduras presentes en los nódulos linfáticos del animal infectado. Imagen obtenida de Dupont *et al.*, 2012.60
- Figura I.4.** Diferentes subpoblaciones de células CD4 maduras. Imagen obtenida de Golubovskaya y Wu, 2016.61
- Figura I.5.** Presentación del Ag de *T. gondii* de las CPA a las células CD8 inmaduras presentes en los nódulos linfáticos del animal infectado. Imagen obtenida de Dupont *et al.*, 2012.68

Capítulo III. Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.

- Figura III.1.** Temperatura rectal media de los animales infectados y control. Los superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$). dpi: días post-infección.109
- Figura III.2.** Secuencia temporal en la que se analizaron los fetos de las ovejas infectadas. Los cuadrados indican abortos, los triángulos mortinatos y las cruces muestran el momento en el que los fetos fueron estudiados después de la eutanasia de la madre según el momento previsto en el sacrificio secuencial de los animales (representado por una línea continua vertical). DPI: días post-infección.110
- Figura III.3.** Lesiones macroscópicas fetales. **A:** Hemorragia abdominal en fetos gemelos de una oveja infectada en el día 40 pi. Es de destacar la congestión presente en la parte fetal de algunos placentomas. **B:** Fetos gemelos de una oveja no infectada de G1. **C:** Fetos gemelos de una oveja

Índice de figuras.

infectada de G2. Muestran diferente grado de autólisis, lo que sugiere que su muerte ocurrió en diferentes días pi. **D:** Feto abortado de G2 con cierta maceración, así como autólisis de la placenta.111

Figura III.4. Lesiones microscópicas en la placenta. **A:** Placentitis moderada de una oveja infectada a los 40 dg (G1). Se caracteriza por un exudado seroso entre los tejidos materno y fetal, necrosis focal de las vellosidades fetales e inflamación no purulenta en el septo materno adyacente. **B:** Placentitis moderada-grave en una oveja infectada a los 90 dg (G2). La lesión está caracterizada por una gran área de necrosis que afecta tanto a la parte materna como a las vellosidades fetales, con un infiltrado inflamatorio leve.114

Figura III.5. Comparación de las lesiones microscópicas características encontradas en el encéfalo, pulmón e hígado fetal en los días 20-26 pi. Las imágenes muestran los cambios histológicos valorados para la cuantificación de lesiones. Se analizaron tanto los focos necróticos (más evidentes en el hígado de los G1 y G2) como los agregados de células inflamatorias (más evidentes en el pulmón del G1).118

Figura III.6. Diagrama “box-plot” comparando cargas parasitarias de *T. gondii* medidas en diferentes días pi, dentro del mismo grupo experimental, en la placenta y vísceras fetales de los tres grupos experimentales. La raya horizontal de cada caja representa la carga parasitaria media, mientras que la inferior y superior representan los valores mínimo y máximo respectivamente. Los asteriscos indican los niveles de significancia entre cada día pi en los diferentes tejidos analizados: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$). dpi: días post-infección.119

Figura adicional III.1. Diagrama “box-plot” que representa las cargas parasitarias de *T. gondii* medidas en el mismo periodo pi y comparadas entre los tres grupos experimentales en la placenta y vísceras fetales (encéfalo e hígado). La raya horizontal de cada caja representa la carga parasitaria media, mientras que la inferior y superior representan los valores mínimo y máximo respectivamente. Los asteriscos indican los niveles de significancia entre cada día pi en los diferentes tejidos analizados: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$). dpi: días post-infección.135

Índice de figuras.

Capítulo IV. Respuestas inmunitarias periférica y local en ovejas infectadas de manera experimental con *T. gondii* en los tres tercios de gestación.

Figura IV.1. Producción de anticuerpos y citoquinas en muestras de suero de los animales infectados y controles de G1, G2 y G3. Las gráficas representan los valores de IO de los anticuerpos y el cociente las citoquinas en los tres tercios de gestación en que se produjo la infección con *T. gondii*. Las letras que aparecen en la misma columna de las tablas representan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos experimentales al compararlos en el mismo día pi. 150

Figura IV.2. Transcripción del ARN de las citoquinas de los animales infectados y controles de los tres grupos experimentales en muestras de placentoma. Las gráficas representan los niveles de expresión de las citoquinas IFN- γ y TNF- α , de tipo Th1, así como de IL4, de tipo Th2, y de IL10, de tipo T_{reg}, para analizar la influencia del tercio de gestación en que se produjo la infección con *T. gondii* sobre la respuesta inmunitaria a nivel local. 152

Capítulo V. Estudio de las poblaciones celulares presentes en el infiltrado inflamatorio de la placenta en las distintas presentaciones clínicas de la toxoplasmosis ovina.

Figura V.1. Detección de antígeno parasitario por métodos inmunohistoquímicos en un placentoma de un animal del grupo “ovejas sacrificadas positivas por IHQ”. La positividad se observa (color amarillo/marrón) como pequeñas vacuolas parasitóforas o antígeno particulado en el interior del foco de necrosis (puntas de flechas) localizadas en el septo caruncular materno (M). Es de destacar la diferencia en cuanto a la estructura del parásito en las vellosidades coriónicas fetales (F), donde se observan grandes vacuolas parasitóforas (F) en los trofoblastos. 167

Figura V.2. Grupo de animales no infectados. Las células CD3⁺ son escasas y se encuentran en el septo caruncular del placentoma. Es de destacar su ausencia en el mesénquima fetal. 170

Índice de figuras.

- Figura V.3.** Grupo de ovejas que abortaron en la fase temprana de la enfermedad. La inmunotinción asociada a las células CD3 es muy similar, tanto en su distribución como en su número, a la observada en los animales no infectados (Figura V.2).170
- Figura V.4.** Grupo de “ovejas sacrificadas positivas por IHQ”. Se observa un evidente incremento en el número de células CD3⁺ en una vellosidad fetal cotiledonaria.170
- Figura V.5.** Grupo de animales no infectados. Los macrófagos positivos por IHQ se encuentran distribuidos de manera aislada tanto en la carúncula materna como en los compartimentos cotiledonarios del placentoma.170
- Figura V.6.** Grupo de ovejas que abortaron en la fase temprana de la toxoplasmosis. Puede apreciarse un evidente aumento en el número de células CD163⁺ en el tallo caruncular del placentoma.170
- Figura V.7.** Grupo de “ovejas sacrificadas positivas por IHQ”. El incremento en el número de células CD163⁺ está claramente delimitado a las vellosidades fetales cotiledonarias.170

Capítulo I.

Toxoplasmosis ovina:

Revisión bibliográfica.

1. Introducción general.

El censo ovino en la Unión Europea en el año 2018, último del que se tienen datos completos y actualizados, supera ligeramente los 86 millones de cabezas (Oborne, 2018), lo que muestra un leve ascenso en comparación con los tres últimos años (EUROSTAT, 2015). La productividad en la industria ovina depende en gran medida de la eficacia reproductiva, ya que condiciona tanto la obtención de corderos como de leche, por lo que los abortos son una de las principales causas de pérdidas económicas en el sector debido a su elevada prevalencia en todo el mundo (Pérez, 2018). En Gran Bretaña, el país europeo con el sector ovino más importante en la actual Unión Europea, con un 30 % del total del ganado ovino (Oborne, 2018), en los casos de aborto que se investigan se diagnostica la participación de agentes infecciosos en aproximadamente el 70 % de ellos, siendo *Chlamydia abortus* (*C. abortus*), *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) y *Campylobacter* sp. los principales agentes patógenos abortivos (Mearns, 2007; Carson, 2018), seguidos muy de lejos por *Listeria* sp. y *Salmonella* sp. (Carson, 2018). En este sentido, sólo en el Reino Unido se han calculado unas pérdidas económicas en la industria ovina cercanas a los 40 millones de euros al año asociadas a los abortos producidos por *C. abortus* y *T. gondii* (Williams y O'Donovan, 2009).

En lo que se refiere al censo ovino de España, nuestro país ocupa el segundo lugar en la Unión Europea con una cifra cercana a los 17 millones de cabezas, lo que supone un 0,61 % menos que el año anterior (MAPAMA, 2018). A nivel autonómico Castilla y León ocupa, tras Extremadura, el segundo lugar del censo, con algo más de 3 millones de animales, si bien es la primera comunidad si se considera el número de animales productores de leche (MAPAMA, 2018). En nuestro país se estima que, del total de abortos ocurridos en la especie ovina, alrededor del 50 % de ellos son causados por un agente infeccioso (Pérez, 2018). *C. abortus* supone la principal causa de aborto infeccioso en ovinos en España (Esnaol, 2010; Fernández *et al.*, 2012; Gutiérrez, 2015), estimándose su implicación en algo más del 56 % del total (Gutiérrez, 2015). Los otros cuatro patógenos responsables de causar la gran mayoría de abortos en ganado ovino son *T. gondii*, *Coxiella burnetii*, *Salmonella abortus* y el virus de la

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

enfermedad de la frontera o “Border disease” (Oporto *et al.*, 2006; Valdezate *et al.*, 2007; Esnal, 2010; Fernández *et al.*, 2012; Moreno *et al.*, 2012). Además, se han descrito, aunque con una menor incidencia, casos de abortos asociados a otros agentes infecciosos como *Brucella melitensis*, *Campylobacter* sp. y *Listeria* sp. (Oporto *et al.*, 2006; Esnal, 2010; Fernández *et al.*, 2012; Ocejo *et al.*, 2019).

La importancia del protozoo *T. gondii* como causa de trastornos reproductivos en el ganado ovino se documentó por vez primera en 1957 (Hartley y Marshall, 1957), estimándose actualmente que 1,5 millones de corderos mueren cada año en Europa como consecuencia de la infección con este agente (Innes *et al.*, 2009a). La toxoplasmosis no sólo es importante debido a que provoca fallo reproductivo en las ovejas gestantes (Buxton *et al.*, 2007; Dubey, 2009b), sino que además está considerada de gran relevancia por su riesgo en la salud humana. El primer caso documentado de transmisión congénita de toxoplasmosis en la especie humana fue descrito en 1939 (Wolf *et al.*, 1939). Actualmente se considera una zoonosis muy extendida de forma que un tercio de la población mundial podría estar infectada con *T. gondii* (Flegr *et al.*, 2014; Halonen y Weiss, 2013). No obstante, el porcentaje de personas infectadas varía según la zona geográfica de estudio habiéndose descrito en algunos países de Centroamérica porcentajes de infección superiores al 70 % (Montoya y Liesenfeld, 2004).

2. Etiología.

2.1. Clasificación filogenética de *T. gondii*.

En el año 1908, los investigadores Nicolle y Manceaux descubrieron accidentalmente la presencia en tejidos de un roedor africano (*Ctenodactylus gundi*), que formaba parte de un estudio experimental sobre la leishmaniosis, del protozoo *T. gondii* (Nicolle y Manceaux, 1908). Debido a las diferencias estructurales que este organismo presentaba con respecto a las especies de *Leishmania*, los autores propusieron clasificarlo en un nuevo género al que denominaron *Toxoplasma* (del griego *toxos*=arco), en alusión a su característica forma de arco (Weiss y Dubey, 2009).

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

Desde su descubrimiento, su clasificación filogenética se ha modificado en diversas ocasiones. La más reciente se enmarca dentro de una reestructuración global de la clasificación de los seres vivos que se presentó en el estudio publicado en 2007 por Keeling titulado “*Deep questions in the tree of life*” (Keeling, 2007). Tras haberse descartado la clasificación filogenética clásica de los cinco reinos (*Bacteria*, *Archaea*, *Plantae*, *Fungi* y *Animalia*) debido a que es muy encorsetada y no se ajusta a los hallazgos recientes derivados de las nuevas técnicas moleculares, los organismos se agrupan actualmente en dominios evolutivos (Solomon *et al.*, 2014). No obstante, éste es un campo en continuo cambio y no hay consenso dentro de la comunidad científica sobre si la historia evolutiva de los seres vivos debe encuadrarse dentro de tres (*Bacteria*, *Archaea* y *Eukarya*) o dos (*Bacteria* y *Archaea*, al considerar que los eucariotas evolucionaron de las arqueas) dominios evolutivos (Zhou *et al.*, 2018). En cualquier caso, los organismos eucariotas se clasifican actualmente en cinco supergrupos: *Archaeplastida*, *SAR* (por sus siglas en inglés: *Stramenopiles/Alveolates/Rhizaria*), *Excavata*, *Amoebozoa* y *Opisthokonta* (Clark *et al.*, 2018). En concreto, dentro de este último se clasifican la mayoría de los eucariotas ya que engloba los seres vivos pertenecientes a los antiguos reinos *Fungi* y *Animalia* (Adl *et al.*, 2012; Peña-Díaz y Lukeš, 2018). En el supergrupo *SAR* se incluyen, entre otros, los organismos alveolados, que deben su nombre a la presencia en su interior de alveolos (unas vesículas aplanadas dentro de su membrana plasmática), que a su vez se clasifican en tres phylum: dinoflagelados (*Dinoflagellata*), apicomplejos (*Apicomplexa*) y ciliados (*Cillioophora*) (**Figura I.1**).

Los apicomplejos son en su mayoría parásitos intracelulares obligados con complicados ciclos biológicos y se caracterizan por poseer un complejo apical de microtúbulos cuya función es la adhesión y posterior invasión de células del hospedador (Arisue y Hashimoto, 2015). También tienen en su extremo apical dos orgánulos secretores, roptrias y gránulos densos, que ejercen un importante papel modulador de la respuesta inmunitaria desarrollada en los organismos que infectan (Swapna y Parkinson, 2017), como se explicará en posteriores apartados. La presencia en todos los apicomplejos de un plastidio sin función fotosintética pero esencial para la supervivencia del organismo, ya que codifica sus propios genes independientemente del núcleo, parece confirmar la hipótesis de que estos protozoos

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

se originaron mediante un proceso endosimbiótico de un ancestro común con un alga roja (Fichera y Roos, 1997).

Actualmente, dentro del phylum *Apicomplexa* se incluyen protozoos que causan importantes enfermedades veterinarias (Swapna y Parkinson, 2017). De entre ellas, en el ganado ovino destacan de manera especial las siguientes: toxoplasmosis (causada por *T. gondii*), neosporosis (producida por *Neospora caninum*, *N. caninum*), criptosporidiosis (cuyo agente etiológico es *Cryptosporidium* spp.), la coccidiosis (asociada a la infección por *Eimeria* spp.), teileriosis (causada por *Theileria annulata*) o babesiosis (causada por *Babesia ovis*) (Fehlberg et al., 2017). La especie *T. gondii* es la única existente dentro del género *Toxoplasma*, que pertenece a la familia *Sarcocystidae* y a la subclase *Coccidia* (Reid et al., 2012).

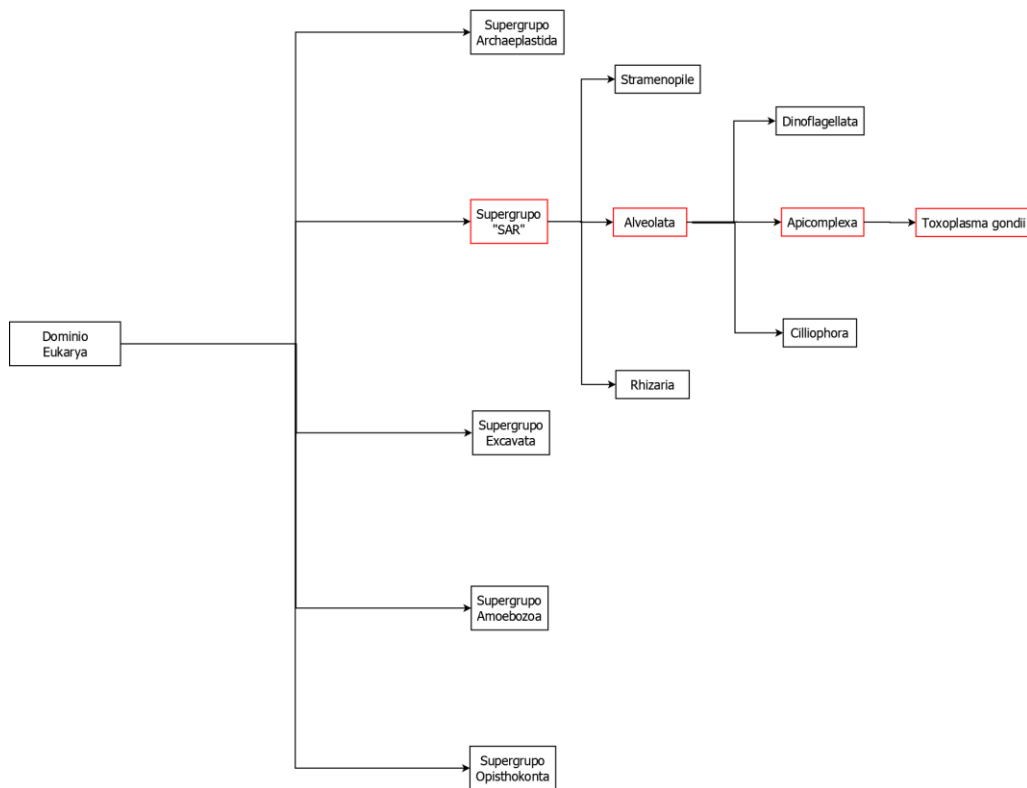


Figura I.1. Filogenia de *T. gondii* (elaboración propia).

2.2. Variabilidad genética de *T. gondii*.

Hasta la fecha se han descrito casi mil aislados diferentes de *T. gondii* (Su *et al.*, 2012). Para tratar de caracterizarlos genéticamente se emplean diferentes técnicas moleculares, como las basadas en los polimorfismos identificados mediante el análisis de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), los microsatélites o la más reciente tipificación de multilocus de secuencias (Su *et al.*, 2010). Gracias a estas herramientas genéticas ha sido posible englobar todos esos aislados en tres grandes líneas clonales denominadas I, II y III (Howe y Sibley, 1995). Asimismo, se han descrito hasta 12 haplotipos, o combinaciones de alelos de un cromosoma que se transmiten juntas, diferentes en las cepas de campo estudiadas de *T. gondii* hasta el momento (Khan *et al.*, 2011). Así, se ha sugerido que el haplotipo 12 es el precursor de los aislados de tipo II actuales, mientras que el cruce de aislados de *T. gondii* con los haplotipos 6 o 9 y 12 originaron los aislados I y III (Khan *et al.*, 2011).

Se ha propuesto que estas tres líneas clonales tienen un acervo genético similar, ya que se ha sugerido que proceden de solamente ocho estirpes ancestrales (Su *et al.*, 2012). De hecho, mediante análisis genéticos se ha demostrado que existen muy pocos polimorfismos de secuencia entre los *loci* del cromosoma la de las tres líneas clonales, lo que ha llevado a sugerir, tras detallados y complejos análisis moleculares, que las líneas clonales I y III adquirieron este cromosoma gracias a un número limitado de cruces con la línea II (Walzer y Boyle, 2012). Además, se ha propuesto que, al contrario de lo sugerido durante muchos años, los orígenes de ese cromosoma de *Toxoplasma* se encuentran en Sudamérica y, por medio de la actividad humana o a través de vectores, principalmente las aves, se introdujo en el continente europeo y en América del Norte (Walzer y Boyle, 2012).

Existe una gran diferencia en las características de los aislados en función del área geográfica de estudio: mientras que en el hemisferio norte (en concreto en Europa y América del Norte, ya que es en estos territorios donde se realizan la mayor parte de los estudios) predominan los aislados con poca variabilidad genética (Sibley *et al.*, 2002), en el hemisferio sur (principalmente en el Caribe, América del Sur y África) existe una gran diversidad genética entre los aislados estudiados (Pena *et al.*, 2008; Al-Kappany *et al.*, 2010), lo que demuestra el hecho de que en estas regiones sean muy abundantes los aislados atípicos de *T. gondii* (Hamilton *et al.*, 2017), como por

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

ejemplo TgCatBr2 (Dubey *et al.*, 2004). No obstante, también se han descrito aislados atípicos de *T. gondii* en otras regiones del mundo (Pomares *et al.*, 2018), incluida España (Fernández-Aguilar *et al.*, 2013a). Se ha sugerido que su presencia estaría relacionada con el consumo carne procedente de animales infectados con origen en aquellas regiones donde son frecuentes los aislados atípicos (Pomares *et al.*, 2011).

Se cree que la variabilidad genética de los aislados está directamente relacionada con el modo en el que, a lo largo de miles de años, el parásito se ha replicado (Sharif *et al.*, 2017): la escasa variabilidad genética se relaciona con la expansión clonal del parásito, por medio de la reproducción asexual a través de hospedadores intermedios, mientras que la reproducción sexual, que se produce solamente en el epitelio intestinal de los gatos, hospedadores definitivos del parásito, y que desencadena la formación de ooquistes esporulados que son expulsados al medio y pueden ser ingeridos por cualquier ser vivo, explicaría la gran tendencia a la recombinación, y por tanto la variabilidad genética (Su *et al.*, 2012). De las tres grandes líneas clonales, parece claro que la que provoca la mayoría de las infecciones por *T. gondii* en el continente europeo tanto en gatos (Montoya *et al.*, 2008; Herrmann *et al.*, 2010), como en humanos (Fuentes *et al.*, 2001; Peyron *et al.*, 2006), rumiantes (Dumètre *et al.*, 2006; Chessa *et al.*, 2014) y animales salvajes (Almería *et al.*, 2018) es la de tipo II.

La virulencia de las líneas clonales varía entre unos hospedadores y otros, pero se suele tomar como referencia la que muestran en ratones (Howe y Sibley, 1995) evaluando la supervivencia de estos animales tras haberlos infectado experimentalmente con el parásito. Así, las de tipo I son muy virulentas, hasta el punto de resultar letales independientemente de la dosis infectiva (Howe *et al.*, 1996; Shwab *et al.*, 2018). La elevada virulencia de estos aislados parece estar relacionada con la proteína ROP18 del parásito (Taylor *et al.*, 2006). Se trata de una proteína producida en las roptrias, un orgánulo secretor de *T. gondii* que participa en la adhesión y posterior invasión de las células del hospedador (Dlugonska, 2008), que se ha comprobado que inhibe la acción de algunos factores de resistencia a la infección por patógenos presentes en el hospedador como las GTPasas (Jensen *et al.*, 2015), impidiendo así la destrucción de la vacuola parasitófora (Etheridge *et al.*, 2014). A este respecto se ha demostrado que los aislados de tipo I, al ser más virulentos, atraviesan la barrera epitelial y se replican de manera más rápida que los de tipo II o III, por lo

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

que la carga parasitaria en los tejidos de animales infectados con este tipo de aislado es mayor (Barragan y Sibley, 2003). Sin embargo, hasta la fecha, y a pesar de haber sido identificado en casos de aborto o infección crónica de animales adultos, no se ha podido obtener y cultivar en laboratorio ningún aislado de *T. gondii* de tipo I procedente de infección en ovejas (Edwards y Dubey, 2013). Uno de los aislados de tipo I más ampliamente utilizados en estudios experimentales murinos es el denominado RH, que fue aislado en 1941 del cerebro de un niño de 6 años (Sabin, 1941). Se ha descrito que un solo taquizoíto infectivo de este aislado es letal en ratones (Dubey, 1998a). Las infecciones experimentales realizadas con este aislado en ovinos son escasas, aunque se ha demostrado que el parásito puede ser transmitido a través del semen de un macho infectado de manera experimental por vía subcutánea con taquizoítos del mismo (Lopes *et al.*, 2013). Cabe destacar que recientemente se han descrito varios casos de aborto en ovejas asociados a infecciones naturales por aislados *T. gondii* pertenecientes al tipo I, sin bien todos ellos han ocurrido en Irán, lo que podría sugerir que existe una mayor presencia de este tipo clonal en esta región geográfica (Habibi *et al.*, 2012; Armand *et al.*, 2017).

La virulencia de los aislados de tipo II parece estar fuertemente relacionada con la dosis infectiva y con el propio hospedador (Mordue *et al.*, 2001). Por ejemplo, el aislado SVS O14, obtenido en 1995 de un feto ovino infectado con el parásito, desencadena abortos en el ganado ovino y no parece ser patógeno en ratones (Jungersen *et al.*, 2002). Del mismo modo, el aislado TgShSp1, obtenido en el año 2015 en Castilla y León y procedente de un rebaño de ovejas en el que se describió un brote de abortos asociado a la infección con *T. gondii*, parece ser responsable de fallo reproductivo en la especie ovina pero no ser patógeno en ratones infectados de manera experimental (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2019). Además, se ha comprobado que cuanto mayor sea la dosis infectiva empleada en la reproducción experimental de la enfermedad en ovejas, mayor es el porcentaje de abortos (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2019). La virulencia de los aislados de tipo II aumenta con los pases en el laboratorio (Sibley y Ajioka, 2008; Sánchez-Sánchez *et al.*, 2019), al igual que sucede con los de tipo III (Klun *et al.*, 2017). Uno de los aislados de tipo II más ampliamente utilizado en estudios experimentales murinos (Araujo y Slifer, 2003; Rocha *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2017) es el denominado ME49, cuyo aislamiento se produjo en 1958 a partir de tejido

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

muscular de una oveja infectada con el parásito (Dubey, 2005). En concreto, en ratones experimentales se ha demostrado que ME49 induce encefalitis, y niveles elevados en sangre de citoquinas pro-inflamatorias, pero con bajos índices de mortalidad (Araujo y Slifer, 2003). En el ganado ovino uno de los aislados más utilizados en infecciones experimentales es de tipo II, denominado M4 (Benavides *et al.*, 2011; O'Donovan *et al.*, 2012; Katzer *et al.*, 2014), obtenido en Escocia en el año 2004 a partir de un aborto natural ovino y que ha sido mantenido en laboratorio mediante cultivo celular y pases en ratón desde entonces (Benavides *et al.*, 2011; O'Donovan *et al.*, 2012). Otro aislado de tipo II empleado en infecciones experimentales en el ganado ovino es el denominado Prugnaiud (PRU), (Mévélec *et al.*, 2010; Verhelst *et al.*, 2014), aislado a partir de un humano con toxoplasmosis congénita en Francia en 1964 (Martrou *et al.*, 1965). Se ha sugerido que la infección con este aislado en hembras gestantes, independientemente de la especie, provoca daños graves en el feto (Barragan y Sibley, 2003).

La infección con aislados de tipo III de *T. gondii* son relativamente frecuentes en los animales, aunque no suelen estar asociadas al desarrollo de la enfermedad, al contrario que en humanos (Howe y Sibley, 1995). Al igual que sucede con los de tipo II, la mortalidad de ratones infectados con aislados de tipo III es dosis-dependiente (Saeij *et al.*, 2006). Uno de los aislados de tipo III más comunes es el denominado VEG, extraído por primera vez en 1989 de un humano infectado con el virus del SIDA que era sospechoso de tener además toxoplasmosis cerebral (Dubey *et al.*, 1996). VEG ha sido utilizado en estudios experimentales tanto murinos (Dubey, 2001; Dubey *et al.*, 2012) como en ovejas (Speer y Dubey, 1998; Dos Santos *et al.*, 2016).

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

Tabla I.1. Aislados representativos de *T. gondii* según su genotipo, origen y virulencia en ratones.

Aislado	Genotipo	Origen	Virulencia en ratón
RH	I	Humano, 1941	Virulenta (Lee <i>et al.</i> , 2017)
SVS O14	II	Ovino, 1995	Avirulenta (Klun <i>et al.</i> , 2017)
TgShSp1	II	Ovino, 2015	Avirulenta (Sánchez-Sánchez <i>et al.</i> , 2019)
ME49	II	Ovino, 1958	Avirulenta (Liesenfeld <i>et al.</i> , 2011)
M4	II	Ovino, 2004	Avirulenta (Hamilton <i>et al.</i> , 2019)
PRU	II	Humano, 1964	Avirulenta (Oliveira <i>et al.</i> , 2016)
VEG	III	Humano, 1989	Avirulenta (Oliveira <i>et al.</i> , 2016)

Dado que, como se ha explicado, existen multitud de aislados diferentes de *T. gondii*, en los estudios experimentales de la toxoplasmosis, en los que diferentes especies animales se inoculan con el parásito, solamente se emplean algunos aislados representativos de cada línea clonal, como los reflejados en la **Tabla I.1**. Eso conlleva que estos aislados deben ser mantenidos en el laboratorio en condiciones óptimas. Debido a que las células que sirven de hospedadores al parásito están en continua división, los nutrientes que tienen en el medio en el que viven se agotan y además se acumulan los productos metabólicos procedentes de células muertas que pueden resultar tóxicos. Por todo ello, se suelen llevar a cabo cambios de medio, comúnmente denominados pases, realizados en cultivos celulares. Además, también se emplea en el laboratorio la infección de ratones con el fin de obtener quistes tisulares, o bradizoítos del parásito. Sin embargo, se ha demostrado que los sucesivos pases en cultivo celular o en ratón de los aislados de *T. gondii* pueden afectar seriamente a sus características biológicas (Saraf *et al.*, 2017). Por ejemplo, tras sucesivos pases en cultivo celular o en ratón del aislado RH, su inoculación en gatos no desencadena la formación de quistes tisulares (Frenkel *et al.*, 1976; Dubey *et al.*, 1999). Asimismo, se ha demostrado que los sucesivos pases de laboratorio del aislado ME49 aumentan su virulencia en ratones (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2019). Estos resultados en conjunto ponen de manifiesto que los análisis de virulencia de los diferentes aislados de *T. gondii* deben siempre realizarse teniendo en cuenta no solamente la susceptibilidad de la especie, la vía de inoculación o la dosis infectiva sino también el número de

pases de laboratorio a los que se ha visto sometido el aislado a emplear (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2019).

2.3. Ciclo de vida de *T. gondii*. Fuentes de infección y modos de transmisión.

El ciclo de vida de *T. gondii* no fue descubierto hasta el año 1970. Se sabe que cuenta con tres estadios infectantes: esporozoítos (en ooquistes), taquizoítos (de 4-8 µm de longitud) y bradizoítos (Halonen y Weiss, 2013).

En 1970 se descubrió que los hospedadores definitivos del parásito son los gatos y otros félidos (Frenkel, 1970). En estos animales la vía de infección más común es la oral, tras el carnivorismo de ratones infectados (Calero-Bernal y Gennari, 2019). Una vez en el interior del gato, el parásito se replica de manera sexual (gametogonia) en las células epiteliales de la mucosa intestinal, dando lugar a la formación de ooquistes no esporulados que carecen de capacidad infectante y que comienzan a ser expulsados al exterior a través de las heces del gato entre los tres y diez días posteriores a la infección (pi) (Halonen y Weiss, 2013), lo que provoca una extensa contaminación de ooquistes de *T. gondii* en el ambiente (Dabritz *et al.*, 2007). Durante la fase aguda de la infección, que puede durar entre dos y tres semanas, un gato puede expulsar en sus heces más de 500 millones de ooquistes (Dubey *et al.*, 2012), cantidad muy elevada si se tiene en cuenta que solo 200 ooquistes esporulados son suficientes para causar abortos en la especie ovina (McColgan *et al.*, 1998). Los ooquistes esporulados constituyen la fase de resistencia del parásito. Se ha demostrado que en condiciones favorables pueden sobrevivir en el medio ambiente hasta 12 meses (Dubey, 2009b) y de manera experimental que no pierden su capacidad infectiva después de haber sido sometidos a una temperatura de -21 °C durante un total de 28 días (Frenkel y Dubey, 1973), o incluso a temperaturas comprendidas entre -5 y -10 °C durante 106 días (Dubey, 1998b) lo que parece demostrar que la capacidad de infección de los ooquistes esporulados no se anula totalmente con la congelación.

La inmensa mayoría de los animales de sangre caliente, incluidos los humanos, pueden ser hospedadores intermedios de *T. gondii*, por lo que se le considera uno de los parásitos de mayor éxito evolutivo del mundo (Ferguson, 2009). Los hospedadores intermedios se infectan bien mediante la ingestión de alimentos o líquidos contaminados con heces de gato que contienen ooquistes esporulados, o bien

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

ingiriendo por carnivorismo quistes tisulares presentes en animales infectados, principalmente en los músculos o en el encéfalo (Hill y Dubey, 2002). Una vez en su interior, el parásito se replica asexualmente (esquizogonia) en prácticamente cualquier célula nucleada (Hehl *et al.*, 2015) originando dos estadios sucesivos de desarrollo: taquizoítos y bradizoítos (Tenter *et al.*, 2000). Los taquizoítos constituyen la forma invasiva del parásito y se replican cada 6-8 horas dentro de un compartimento especializado generado por *T. gondii* en el interior de las células infectadas denominado vacuola parasitófora (Sasai *et al.*, 2018) mediante un proceso denominado endodiodogonia que da lugar a la formación de nuevos taquizoítos que se diseminan por la sangre invadiendo cualquier tipo de célula del hospedador y causando su muerte (Halonen y Weiss, 2013). La vacuola parasitófora permite transportar nutrientes desde las células del hospedador hasta el parásito y prevenir su destrucción mediada por lisosomas (Cesbron-Delauw *et al.*, 2008). El desarrollo de una respuesta inmunitaria efectiva en el hospedador frente a *T. gondii* elimina los taquizoítos extracelulares mientras que los que han logrado infectar las células del hospedador se transforman en bradizoítos, una forma de replicación lenta (Skariah *et al.*, 2010). Estos bradizoítos siguen replicándose en el interior de quistes que pueden alcanzar 100 μm de diámetro y que se localizan fundamentalmente en el cerebro y tejido muscular. Cada quiste puede contener miles de bradizoítos y persistir en el hospedador durante años o incluso durante toda su vida (Dubey *et al.*, 1998). A este respecto se ha demostrado que un solo quiste tisular, que seguramente contenga miles de bradizoítos infectantes, es capaz de causar la infección (Dubey *et al.*, 1998).

Además de estas vías de transmisión horizontal existe un tercer modo de infección de tipo vertical: la transmisión congénita. Tiene lugar cuando los taquizoítos existentes en la sangre de una madre seronegativa atraviesan la placenta e infectan al feto (Halonen y Weiss, 2013). La relevancia de la transmisión congénita de la toxoplasmosis varía mucho entre especies, habiéndose encontrado porcentajes de transmisión de entre el 15 y el 85 % en humanos en función del área geográfica de estudio (Dubey y Beattie, 1988), y hasta del 56 % en ratones (Remington *et al.*, 1961). En la especie ovina existe cierta controversia sobre si este modo de transmisión de la enfermedad es importante. Algunos investigadores le conceden gran relevancia (Duncanson *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2005; Morley *et al.*, 2008; Hide *et al.*, 2009;

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

Dos Santos *et al.*, 2016) y citan porcentajes de transmisión detectada mediante PCR en muestras de cordón umbilical de corderos o vísceras fetales, cercanos al 70 % (Hide *et al.*, 2009), superiores al 90 % (Duncanson *et al.*, 2001) e incluso han observado la transmisión del parásito de madres crónicamente infectadas durante sucesivas gestaciones (Hide *et al.*, 2009). Por el contrario, otros estudios encuentran que la importancia sería bastante menor y citan porcentajes de alrededor del 30 % (Chiebao *et al.*, 2019) o incluso inferiores al 5 % (Edwards y Dubey, 2013), ya que la transmisión vertical únicamente ocurriría en madres seronegativas que se infectan por primera vez durante la ingestión y se asociaría en la gran mayoría de los casos a la muerte fetal (Buxton *et al.*, 2007). Es de destacar que, como se ha comentado, muchos de los estudios que proponen la vía vertical como una de las principales fuentes de infección con *T. gondii* en el ganado ovino han utilizado exclusivamente la detección de ácidos nucleicos mediante PCR para comprobar la presencia del parásito en el feto (Duncanson *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2005; Hide *et al.*, 2009), no aportando ningún otro estudio (serología, histopatología, etc.) que apoye sus resultados. Por tanto, no puede descartarse que, en dichos trabajos, hayan sido otros agentes patógenos los que hayan provocado los abortos (Rodger *et al.*, 2006) a pesar de la presencia de *T. gondii* en esos mismos fetos de manera que no puede afirmarse con rotundidad que la vía vertical sea una de las principales fuentes de infección de la toxoplasmosis ovina, estando actualmente en entredicho su relevancia (Hide, 2016).

Existen también otras vías de infección menos comunes: la venérea y la galactógena (Stelzer *et al.*, 2019). Aunque se ha cuestionado la importancia epidemiológica de la transmisión sexual de la toxoplasmosis ovina (Buxton, 1998), se ha demostrado la presencia de ADN del parásito en muestras de semen de machos infectados de manera natural (Bezerra *et al.*, 2014) o experimental (Lopes *et al.*, 2013). Además, se ha conseguido transmitir de manera experimental el parásito a través del semen mediante monta natural (Lopes *et al.*, 2013) o a través de inseminación artificial (Consalter *et al.*, 2017). Por otro lado, también se ha conseguido detectar la presencia de ADN de *T. gondii* en muestras de leche de ovejas infectadas de manera natural (de Santana Rocha *et al.*, 2015; Saad *et al.*, 2018), aunque, al igual que con la transmisión por vía sexual, su importancia epidemiológica ha sido cuestionada (Dubey y Jones, 2014).

3. Epidemiología.

La infección natural con *T. gondii* es muy frecuente en todo el mundo, no solamente en el ganado ovino sino también en otras especies, tanto de interés ganadero como salvajes. A continuación, se exponen algunos datos epidemiológicos de la infección natural con este parásito en diferentes especies animales.

3.1. Prevalencia de la toxoplasmosis ovina.

Las ovejas son uno de los hospedadores intermedios de *T. gondii* con mayores porcentajes de seroprevalencia (Dubey, 2010). Teniendo en cuenta que el hospedador intermediario principal de *T. gondii* es el ratón, presa del gato, único hospedador definitivo, la alta prevalencia de infección en las ovejas, en principio un hospedador intermediario accidental, que pastan al aire libre podría estar relacionada con la forma en la que estos animales pastan. Las ovejas son capaces de cortar el pasto más cerca del suelo que otros rumiantes, por lo que es más probable que puedan ingerir los ooquistes esporulados del parásito que contaminan el medio ambiente y que se encuentran en el suelo o charcos (Zhang *et al.*, 2016). Sin embargo, la seroprevalencia de la infección con el parásito también es muy alta en ovinos que no salen a pastar al exterior. Por ello, también se cree que los ovinos tendrían una especial susceptibilidad a la infección con *T. gondii* (Innes, 1997). Por lo general, las ovejas suelen infectarse antes de los 4 años de vida (Dubey, 2010) y se ha descrito que la prevalencia de la toxoplasmosis en el ganado ovino aumenta con la edad de los animales (Innes *et al.*, 2009a) puesto que la probabilidad de que el animal haya estado expuesto al parásito se incrementa con el tiempo. En este sentido en un estudio de 2011 en el que se analizaron los porcentajes de seroprevalencia de más de 3000 ovejas pertenecientes a 125 rebaños en Escocia se demostró que el porcentaje de seroprevalencia de las ovejas de menos de un año (37,7 %) era inferior al de los animales mayores de 6 años (73,8 %) (Katzner *et al.*, 2011).

La toxoplasmosis ovina es frecuente en todos aquellos países donde la cría de esta especie es relevante. En Europa, se citan seroprevalencias individuales que varían entre un 4 y un 92 % (Tenter *et al.*, 2000). No obstante, se ha sugerido que la prevalencia de esta infección sería superior a la estimada en los diferentes estudios

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

debido a que el panel de técnicas diagnósticas empleadas no ha sido siempre el más adecuado (Shaapan *et al.*, 2008). En concreto, se estima que la infección natural por *T. gondii* en el ganado ovino es la responsable de entre un 10 y un 23 % de los abortos que ocurren en esta especie en Europa y en América del Norte (Dubey, 2009b). Es de destacar la importancia del estudio de los niveles de seroprevalencia tanto en la especie ovina como caprina, ya que las ovejas y las cabras se consideran indicadores biológicos de la contaminación ambiental con ooquistes del parásito (Al-Kappany *et al.*, 2018).

En la **Tabla I.2** se recogen los resultados de diferentes estudios que han analizado la seroprevalencia de esta enfermedad en rebaños comerciales tanto en España como en otras regiones del mundo.

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

Tabla I.2. Seroprevalencia individual en ovejas frente a la infección con *T. gondii* tanto en España como en otras regiones geográficas.

Técnica de análisis*	Zona geográfica	% Seroprevalencia[#]	Referencia
ELISA y MDAT	Etiopía	58,2 % (148/252)	(Tegegne <i>et al.</i> , 2016)
ELISA	Escocia	56,6 % (1712/3023)	(Katzner <i>et al.</i> , 2011)
DAT	Estonia	41,7 % (667/1599)	(Tagel <i>et al.</i> , 2019)
ELISA	Nepal	36,17 % (85/235)	(Subedi <i>et al.</i> , 2018)
ELISA	Ghana	33,2 % (243/732)	(van der Puije <i>et al.</i> , 2000)
IFAT	Argentina	10,0 % (13/130)	(Hecker <i>et al.</i> , 2018)
ELISA	España	57,4 % (120/209)	(Astorga <i>et al.</i> , 2014)
DAT	España	57,0 % (101/177)	(Panadero <i>et al.</i> , 2010)
ELISA	España	49,3 % (248/503)	(García-Bocanegra <i>et al.</i> , 2013)
DAT	España	41,2 % (80/194)	(Almería <i>et al.</i> , 2018)
ELISA y MDAT	España	40,4 % (82/203)	(Mainar-Jaime y Barberán, 2007)
IFAT y MDAT	España	35,0 % (807/2306)	(Marca <i>et al.</i> , 1996)

*ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas. MDAT: Test de aglutinación modificado. DAT: Test de aglutinación. IFAT: Test de inmunofluorescencia.

[#]: (ovejas positivas/ovejas analizadas).

3.2. Prevalencia y epidemiología de la toxoplasmosis en otras especies.

En **roedores** se han descrito porcentajes de seroprevalencia elevados (Webster, 1994; Dubey y Frenkel, 1998; Dabritz *et al.*, 2008), llegando a ser superiores al 35 % en ratas (Webster, 1994). En ratones, los valores disponibles varían en función del área geográfica estudiada y del tipo de especie: por ejemplo, se ha documentado un porcentaje de seroprevalencia cercano al 35 % en una población natural de *Apodemus sylvaticus*, el “ratón de campo”, en el Reino Unido (Bajnok *et al.*, 2015) y de algo superior al 14 % en el “ratón doméstico”, *Mus musculus*, en un estudio desarrollado recientemente en Córcega (Izquierdo-Rodríguez *et al.*, 2019). Además, diferentes estudios experimentales han sugerido que la transmisión congénita del parásito en ratones es muy importante (Owen y Trees, 1998; Marshall *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2011a) y puede tener lugar en repetidas ocasiones en algunas estirpes de ratones (Owen y Trees, 1998). Este hecho lo apoyan los resultados de un trabajo más reciente en el cual encuentran un porcentaje de transmisión congénita de *T. gondii* del 75 % en una población salvaje de ratones (*Mus domesticus*) del Reino Unido (Marshall *et al.*, 2004). Además, se ha demostrado que el parásito puede persistir en el ambiente sin la necesidad de que en él existan gatos, pues en una zona con una muy baja densidad de estos félicos el porcentaje de seroprevalencia de los ratones analizados, *Apodemus sylvaticus*, fue superior al 40 % (Thomasson *et al.*, 2011). Para estos autores, esa elevada seroprevalencia en los ratones en un ambiente con una escasa población de gatos se debería a la transmisión congénita del parásito, ya que, por un lado, detectaron mediante PCR ADN de *T. gondii* en algunos fetos y por otro no observaron que los porcentajes de seroprevalencia variaran de manera significativa en función de la edad de los animales (Thomasson *et al.*, 2011).

La toxoplasmosis es una enfermedad de especial relevancia en los pequeños rumiantes domésticos en comparación con las especies salvajes (Panadero *et al.*, 2010; Almeria *et al.*, 2018). Al igual que en ovinos, las **cabras** son susceptibles a la infección con *T. gondii* (Innes, 1997) y en ellas puede desencadenar también fallo reproductivo (Dubey *et al.*, 2011). Se ha demostrado que la susceptibilidad a la infección con el parásito es mayor en animales jóvenes (Dubey, 1989). Quizás uno de los aspectos más destacados de la enfermedad

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

en el ganado caprino es que, a diferencia de otras especies como la ovina, las cabras infectadas con el parásito pueden abortar en gestaciones sucesivas (Dubey, 1982). La importancia de la infección por toxoplasma en el ganado caprino se ve reflejada en que incluso se ha documentado el contagio de toxoplasmosis a niños (Skinner *et al.*, 1990) o a mujeres embarazadas (Jones *et al.*, 2009) como consecuencia del consumo en ambos casos de leche caprina no pasteurizada, y es que se ha comprobado que en cabras infectadas por *T. gondii* se puede excretar el parásito a través de la leche (Saad *et al.*, 2018). Al igual que lo descrito en ovejas, la vía horizontal supone también la principal forma de contagio en la toxoplasmosis caprina. También se ha detectado ADN de *T. gondii* en el semen de machos tras una reproducción experimental de la enfermedad (Santana *et al.*, 2010), y se ha conseguido, tras la infección experimental de machos, transmitir el parásito a hembras mediante monta natural (Wanderley *et al.*, 2015) y a través de inseminación artificial (Wanderley *et al.*, 2013).

Existen multitud de estudios donde se confirma la elevada seroprevalencia en cabras (Díaz *et al.*, 2016; Bachan *et al.*, 2018; Moskwa *et al.*, 2018; Shuralev *et al.*, 2018), que llega a ser incluso superior al 70 % en algunos casos (Dubey, 2010). En España existen multitud de estudios sobre seroprevalencia de la toxoplasmosis caprina (Rodríguez-Ponce *et al.*, 1995; García-Bocanegra *et al.*, 2013; Díaz *et al.*, 2016; Almería *et al.*, 2018), destacando los elevados niveles, con porcentajes cercanos al 65 %, en las Islas Canarias (Rodríguez-Ponce *et al.*, 1995).

El **ganado porcino** es susceptible a la infección con *T. gondii*, si bien la mayor parte de las infecciones son subclínicas; cuando aparecen síntomas (fiebre, anorexia, diarrea, etc.), normalmente en cerdos destetados, son inespecíficos (Stelzer *et al.*, 2019). A pesar de que puede provocar fallo reproductivo en esta especie (Dubey, 2009a), en Europa apenas se han descrito casos (Stelzer *et al.*, 2019). La prevalencia a nivel mundial que se estima en un 19 %, siendo Europa el continente donde se detectarían los niveles más bajos (Foroutan *et al.*, 2019). No obstante, en un reciente estudio llevado a cabo en España donde se analizaron sueros de 1200 cerdos pertenecientes a 161 granjas distintas, se documentó un porcentaje de seroprevalencia cercano al 25 % (Herrero *et al.*, 2016), lo que confirma la relevancia de la toxoplasmosis en esta especie. Los

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

porcentajes de seroprevalencia suelen ser mayores en cerdos de mayor edad y en los criados en régimen extensivo debido a que es más probable que estén en contacto bien con hospedadores intermediarios del parásito que presenten quistes tisulares y que pueden ingerir por carnivorismo debido a su naturaleza omnívora (Burrells *et al.*, 2015; Stelzer *et al.*, 2019) o bien con ooquistes esporulados que se encuentren contaminando el ambiente, en líquidos o alimentos (García-Bocanegra *et al.*, 2010b; Basso *et al.*, 2015; Stelzer *et al.*, 2019). No obstante, la transmisión transplacentaria del parásito también sucede en esta especie (Dubey, 2009a). Respecto a la transmisión galactógena a los lechones, aunque se ha documentado (Basso *et al.*, 2017), parece ser algo muy excepcional (Stelzer *et al.*, 2019). Por otro lado, se ha demostrado la presencia de ADN de *T. gondii* en el semen de machos infectados de manera experimental (Moura *et al.*, 2007), lo que sugiere que en esta especie es posible la infección por vía sexual.

Aunque el **ganado vacuno** es susceptible a la infección con *T. gondii* (Esteban-Redondo e Innes, 1997), los valores de seroprevalencia que se han encontrado en esta especie suelen ser muy bajos, lo que se ha atribuido a la poca sensibilidad de las pruebas diagnósticas disponibles en el mercado (Dubey, 2010). En la mayoría de los casos la seroprevalencia individual no supera el 20 % (Moreno *et al.*, 2012; Fajardo *et al.*, 2013; Matsuo *et al.*, 2014; Jokelainen *et al.*, 2017). Estos valores tan bajos han sido también documentados en nuestro país (Panadero *et al.*, 2010), aunque en un estudio reciente desarrollado también en España (García-Bocanegra *et al.*, 2013) se encontró un porcentaje de seroprevalencia individual en vacuno superior al 80 %, extremadamente elevado en comparación con los estudios anteriores, diferencias que para los autores se deberían al uso de diferentes test serológicos y puntos de corte como causa probable. No obstante, se ha demostrado que en el ganado vacuno no existe correlación entre la detección de anticuerpos (Ac) específicos frente al parásito y la detección de ADN de *T. gondii* por PCR en los tejidos del animal (Opsteegh *et al.*, 2011). La ruta de infección más común, al igual que lo descrito en el resto de especies, es la horizontal mediante la ingestión de alimentos o líquidos contaminados con ooquistes esporulados del parásito, mientras que la transmisión vertical es muy poco frecuente en casos de infección natural (Stelzer

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

et al., 2019). No se han descrito signos clínicos evidentes asociados a la infección natural con *T. gondii* en vacunos (Dubey, 1986a) y es muy poco frecuente poder aislar el parásito de tejidos procedentes de vacas infectadas de manera natural (Dubey, 2010), lo que demostraría la gran eficacia del ganado vacuno a la hora de controlar la replicación del parásito (Esteban-Redondo e Innes, 1997). Aunque en algún trabajo se ha propuesto la detección de *T. gondii* en fetos abortados tras una infección natural (Gottstein *et al.*, 1998), esto es muy poco frecuente (Moore *et al.*, 2008) y muchas veces dada la gran similitud morfológica y evolutiva de *T. gondii* y *N. caninum* se suelen producir errores en el diagnóstico (Dubey, 2010), más aun teniendo en cuenta que *N. caninum* es uno de los principales agentes abortivos en el ganado vacuno (Reichel *et al.*, 2013).

Un trabajo desarrollado hace años en España, en el que se comparaban los porcentajes de seroprevalencia de animales domésticos (ovejas y vacas) y silvestres (ciervo) que compartían el mismo hábitat demostró que la seroprevalencia en estas últimas especies era mayor que en las primeras (Panadero *et al.*, 2010). Seguramente este hallazgo pueda explicarse por la misma razón por la que las ovejas o los cerdos criados en extensivo presentan una seroprevalencia mayor que aquellos criados en intensivo: la mayor exposición al medio ambiente facilitaría la ingestión de ooquistes y, por tanto, la infección (Almería *et al.*, 2018; Aguirre *et al.*, 2019). Es de especial relevancia analizar los porcentajes de seroprevalencia en **especies silvestres** porque son un fiel reflejo de la contaminación ambiental con *T. gondii* (Barros *et al.*, 2018). Por ejemplo, un estudio desarrollado recientemente también en España indicó que la elevada seroprevalencia observada en algo más de 600 visones procedentes de las campañas de control de la población de visón americano llevadas a cabo a lo largo de cinco años suponía una clara demostración de la contaminación de los ríos de nuestro país con ooquistes del parásito (Ribas *et al.*, 2018). En la **Tabla I.3** se recogen porcentajes de seroprevalencia de diferentes especies silvestres en hábitats españoles. En ella puede observarse que existe una gran heterogeneidad en dichos valores en función del área geográfica de estudio (Almería *et al.*, 2018). A este respecto, cabe destacar que la infección de animales silvestres se puede ver favorecida por la supervivencia

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

de los ooquistes en condiciones climatológicas de elevada humedad y temperaturas suaves (Gamarra *et al.*, 2008), lo que podría explicar esas diferencias según la zona estudiada. Por ello, y teniendo en cuenta los cambios en los patrones de temperatura y humedad que se relacionan con el cambio climático, se cree que la prevalencia de infección en animales silvestres podría aumentar en determinadas zonas de Europa, entre ellas España (Meerburg y Kijlstra, 2009).

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

Tabla I.3. Seroprevalencia en diferentes especies de animales domésticos y silvestres frente a la infección por *T. gondii* en España.

Orden	Especie	Técnica de análisis*	Zona geográfica	% Seroprevalencia [#]	Referencia
Artiodactyla	Gamo (<i>Dama dama</i>)	MDAT	Varias regiones	24,0 % (18/79)	(Gauss <i>et al.</i> , 2006)
	Cabra (<i>Capra hircus</i>)	DAT	Galicia	48 % (299/638)	(Díaz <i>et al.</i> , 2016)
		ELISA	Andalucía	25,1 % (124/494)	(García-Bocanegra <i>et al.</i> , 2013)
		MDAT	Andalucía	5,6 % (5/89)	(Almería <i>et al.</i> , 2018)
	Cabra montés (<i>Capra pyrenaica</i>)	MDAT	Varias regiones	33,3 % (1/3)	(Gauss <i>et al.</i> , 2006)
		MDAT	Andalucía	27,5 % (146/531)	(García-Bocanegra <i>et al.</i> , 2012b)
	Corzo (<i>Capreolus capreolus</i>)	MDAT	Varias regiones	39,2 % (109/278)	(Gamarra <i>et al.</i> , 2008)
		MDAT	Varias regiones	21,8 % (7/33)	(Gauss <i>et al.</i> , 2006)
		DAT	Galicia	13,7 % (22/160)	(Panadero <i>et al.</i> , 2010)
		IFAT	Castilla y León	2,0 % (5/528)	(San Miguel <i>et al.</i> , 2016)
	Jabalí (<i>Sus scrofa</i>)	MDAT	Varias regiones	38,4 % (185/507)	(Gauss <i>et al.</i> , 2005)
	Rebeco (<i>Rupicapra pyrenaica</i>)	MDAT	Varias regiones	20,0 % (2/10)	(Gauss <i>et al.</i> , 2006)
		IFAT	Castilla y León	4,0 % (6/149)	(San Miguel <i>et al.</i> , 2016)
	Cerdo (<i>Sus scrofa</i>)	MDAT	Cataluña	19,0 % (228/1202)	(García-Bocanegra <i>et al.</i> , 2010b)
MDAT		Varias regiones	16,6 % (49/2970)	(García-Bocanegra <i>et al.</i> , 2010c)	
IFAT		Aragón	24,52 % (301/1200)	(Herrero <i>et al.</i> , 2016)	

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

	Vaca (<i>Bos taurus</i>)	MDAT	Andalucía	18,6 % (37/199)	(Almería <i>et al.</i> , 2018)
		ELISA	Andalucía	83,3 % (420/504)	(García-Bocanegra <i>et al.</i> , 2013)
		DAT	Galicia	7,3 % (13/178)	(Panadero <i>et al.</i> , 2010)
	Ciervo (<i>Cervus elaphus</i>)	MDAT	Varias regiones	15,6 % (69/441)	(Gauss <i>et al.</i> , 2006)
		IFAT	Comunidad de Madrid	13,0 % (17/131)	(San Miguel <i>et al.</i> , 2016)
	Argalí (<i>Ovis ammon</i>)	MDAT	Varias regiones	14,8 % (4/27)	(Gauss <i>et al.</i> , 2006)
Arruí (<i>Ammotragus lervia</i>)	MDAT	Varias regiones	10,0 % (1/10)	(Gauss <i>et al.</i> , 2006)	
Perissodactyla	Burro (<i>Equus africanus</i>)	MDAT	Andalucía	25,6 % (21/82)	(García-Bocanegra <i>et al.</i> , 2012a)
	Caballo (<i>Equus ferus</i>)	MDAT	Andalucía	10,8 % (49/454)	(García-Bocanegra <i>et al.</i> , 2012a)
Carnivora	Marta (<i>Martes martes</i>)	MDAT	Varias regiones	100,0 % (4/4)	(Sobrino <i>et al.</i> , 2007)
	Nutria (<i>Lutra lutra</i>)	MDAT	Varias regiones	100,0 % (6/6)	(Sobrino <i>et al.</i> , 2007)
	Turón (<i>Mustela putorius</i>)	MDAT	Varias regiones	100,0 % (4/4)	(Sobrino <i>et al.</i> , 2007)

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

	Garduña (<i>Martes foina</i>)	MDAT	Varias regiones	85,0 % (17/20)	(Sobrino <i>et al.</i> , 2007)
	Gato montés (<i>Felis silvestris</i>)	MDAT	Islas Baleares	84,7 % (50/59)	(Millán <i>et al.</i> , 2009)
		MDAT	Varias regiones	50,0 % (3/6)	(Sobrino <i>et al.</i> , 2007)
	Lince ibérico (<i>Lynx pardinus</i>)	MDAT	Varias regiones	81,5 % (22/27)	(Sobrino <i>et al.</i> , 2007)
		MDAT	Andalucía	62,8 % (81/129)	(García-Bocanegra <i>et al.</i> , 2010a)
	Visón americano (<i>Neovison vison</i>)	MDAT	Varias regiones	78,8 % (534/638)	(Ribas <i>et al.</i> , 2018)
	Tejón (<i>Meles meles</i>)	MDAT	Varias regiones	70,3 % (26/37)	(Sobrino <i>et al.</i> , 2007)
	Zorro (<i>Vulpes vulpes</i>)	MDAT	Varias regiones	64,7 % (66/102)	(Sobrino <i>et al.</i> , 2007)
	Geneta (<i>Genetta genetta</i>)	MDAT	Varias regiones	61,9 % (13/21)	(Sobrino <i>et al.</i> , 2007)
	Meloncillo (<i>Herpestes ichneumon</i>)	MDAT	Varias regiones	59,1 % (13/22)	(Sobrino <i>et al.</i> , 2007) (Almería <i>et al.</i> , 2004)
	Lobo (<i>Canis lupus</i>)	MDAT	Varias regiones	46,9 % (15/32)	(Sobrino <i>et al.</i> , 2007)
Lagomorpha	Conejo (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	MDAT	Varias regiones	14,2 % (65/456)	(Almería <i>et al.</i> , 2004)
		MDAT	Andalucía	11,9 % (14/85)	(García-Bocanegra <i>et al.</i> , 2010a)
	Liebre	MDAT	Navarra	11,4 % (34/298)	(Fernández-Aguilar <i>et al.</i> , 2013b)

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

	(<i>Lepus granatensis</i>)				
Passeriformes	Cuervo (<i>Corvus corax</i>)	MDAT	Cataluña	80,5 % (91/113)	(Molina-López <i>et al.</i> , 2012)

* ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas. MDAT: Test de aglutinación modificado. DAT: Test de aglutinación. IFAT: Test de inmunofluorescencia.

#: (ovejas positivas/ovejas analizadas).

4. Estudios experimentales en modelos animales.

4.1. Reproducciones experimentales de la toxoplasmosis en la especie ovina.

Hasta la fecha se ha realizado una gran cantidad de estudios en los que se ha reproducido de manera experimental la toxoplasmosis en ovinos, teniendo la mayoría de ellos los siguientes **objetivos** : estudiar la patogenia del aborto tras la primera infección (primoinfección) de ovejas gestantes (Buxton y Finlayson, 1986; Owen *et al.*, 1998; Gutierrez *et al.*, 2010; Marques *et al.*, 2012; Castaño *et al.*, 2014) o bien analizar diferentes aspectos de la interacción patógeno-hospedador en ovejas no gestantes (Buxton *et al.*, 1991; Innes *et al.*, 1995a; Esteban-Redondo e Innes, 1998; Stanley *et al.*, 2004; Verhelst *et al.*, 2014) o en corderos (Benavides *et al.*, 2011; Katzer *et al.*, 2014). Otros objetivos perseguidos en estudios experimentales de la toxoplasmosis ovina, aunque en un número menor de trabajos, han sido analizar la eficacia de la inmunización previa a la infección con el parásito (Mévelec *et al.*, 2010; Katzer *et al.*, 2014), determinar la importancia de la transmisión vertical de *T. gondii* en la especie ovina (Dos Santos *et al.*, 2016) y de la transmisión del parásito por vía sexual (Lopes *et al.*, 2013) o el análisis comparativo de la virulencia de diferentes aislados en modelos murinos y ovinos gestantes (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2019). A continuación, se detallan algunos de los aspectos claves de estas y otras infecciones experimentales, señalando sus resultados. En la **Tabla I.4** se reseñan algunos de los principales trabajos publicados hasta la fecha sobre la reproducción experimental de la toxoplasmosis en el ganado ovino.

Aunque, como ya se ha descrito en párrafos anteriores, la mayor parte de las infecciones naturales con *T. gondii* descritas hasta la fecha en el ganado ovino son debidas a aislados de tipo II (Chessa *et al.*, 2014), en las infecciones experimentales se han empleado **aislados** de las tres principales líneas clonales (Lopes *et al.*, 2011; O'Donovan *et al.*, 2012; Dos Santos *et al.*, 2016), habiéndose conseguido reproducir de manera exitosa en todos los casos la infección de los animales. Como ya se explicó anteriormente, en un reciente estudio en el que se infectaron experimentalmente por vía oral a los animales a mitad de la gestación

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

con ooquistes esporulados de dos aislados de tipo II (ME49 y TgShSp1) se demostró que uno de los principales factores a tener en cuenta al infectar a los animales es conocer el número de pases en cultivo celular o en ratón a los que se ha sometido al aislado que se va a utilizar, ya que un mayor número de pases se relaciona con una mayor virulencia (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2019). En este mismo estudio se demostró que, al menos bajo esas condiciones experimentales, el tipo de aislado empleado no influye en la transmisión vertical de la enfermedad o en la presencia y gravedad de las lesiones fetales asociadas a la toxoplasmosis ovina.

Aunque la vía horizontal a través de la ingestión de ooquistes esporulados que contaminan el alimento o los líquidos es la más común en casos naturales de infección en ovinos (Stelzer *et al.*, 2019), en las infecciones experimentales con *T. gondii* se ha conseguido reproducir con éxito la enfermedad empleando cualquiera de las tres **formas parasitarias**: ooquistes (Owen *et al.*, 1998; Gutierrez *et al.*, 2010; Sánchez-Sánchez *et al.*, 2019), quistes tisulares (Miller *et al.*, 1982; Verhelst *et al.*, 2014; Verhelst *et al.*, 2015) y taquizoítos (Innes *et al.*, 1995b; Lopes *et al.*, 2011; Katzer *et al.*, 2014). A este respecto, se ha demostrado que sea cual sea la forma parasitaria empleada, las ovejas infectadas desarrollan un periodo de hipertermia similar (Esteban-Redondo *et al.*, 1999). Sin embargo, el inicio de la diseminación del parásito por la sangre (parasitemia) del animal infectado depende de la forma parasitaria infectante: así, tras la ingestión oral de quistes tisulares ésta comienza a los 4 días pi (Verhelst *et al.*, 2014), mientras que si se infecta a las ovejas con ooquistes esporulados por vía oral el parásito no se detecta circulando por el torrente sanguíneo hasta el día 6 pi (Dubey y Sharma, 1980). Las **vías de inoculación** empleadas en los estudios experimentales, a su vez, están muy ligadas a la forma parasitaria empleada para reproducir de la manera más fidedigna posible las infecciones que ocurren de manera natural. Los ooquistes esporulados del parásito suelen administrarse por vía oral, siendo esta la vía de inoculación que mejor reproduce las condiciones de infección natural (Benavides *et al.*, 2011; Katzer *et al.*, 2014; Sánchez-Sánchez *et al.*, 2019); los taquizoítos por vía subcutánea (Innes *et al.*, 1995b), por vía intramuscular (Katzer *et al.*, 2014) o por vía sexual (Lopes *et al.*, 2013) y los quistes tisulares por vía oral (Verhelst *et al.*, 2014). En un trabajo

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

experimental desarrollado para estudiar los efectos de la inmunización previa de ovejas gestantes sobre la infección con el parásito (Mévélec *et al.*, 2010), se comprobó que la administración de taquizoítos tanto por vía subcutánea como por vía intraperitoneal para lograr inmunizar a los animales.

La **dosis infectiva** es otro de los factores clave que deben tenerse en cuenta para reproducir la toxoplasmosis en ovejas. Los primeros estudios sugerían que la dosis mínima necesaria para desencadenar abortos en esta especie era de 200 ooquistes esporulados (McColgan *et al.*, 1998). Sin embargo, recientemente se ha descrito la presentación de abortos en la especie ovina tras la infección experimental de hembras a mitad de gestación con dosis infectivas muy bajas (10 y 50 ooquistes esporulados) (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2019). A este respecto, se ha demostrado en estudios experimentales empleando ooquistes esporulados administrados por vía oral que la dosis infectiva es un factor clave en el desarrollo de la infección, pues cuanto mayor sea ésta antes ocurre la seroconversión de las ovejas (Esteban-Redondo e Innes, 1998) y más cantidad de ADN parasitario se detecta en la sangre (Esteban-Redondo *et al.*, 1999) o en los tejidos de los animales infectados (Esteban-Redondo e Innes, 1998; Sánchez-Sánchez *et al.*, 2019). Asimismo, también se ha demostrado su importancia en la patogénesis de los abortos ocurridos en la fase aguda de la enfermedad tras la infección oral con ooquistes esporulados del parásito (Castaño *et al.*, 2014; Sánchez-Sánchez *et al.*, 2019), pues cuanto mayor sea la dosis infectiva mayor es el porcentaje de abortos en esta etapa. En este último estudio, en el que se utilizaron dos aislados diferentes de tipo II (ME49 y TgShSp1) se comprobó además que mayores dosis infectivas provocan una mayor tasa de mortalidad fetal independientemente del aislado con el que se produjera la infección de las madres gestantes (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2019).

La **edad o la gestación** de los animales son otros factores importantes a considerar en las infecciones experimentales con *T. gondii*. A este respecto, se han descrito infecciones en corderos de entre 2 y 4 meses de edad (Benavides *et al.*, 2011; Katzer *et al.*, 2014) o en ovejas adultas no gestantes (Esteban-Redondo e Innes, 1998; Esteban-Redondo *et al.*, 1999) para analizar diferentes aspectos de la interacción patógeno-hospedador y también sobre ovejas gestantes para estudiar la patogenia del aborto (Buxton y Finlayson, 1986;

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

Castaño *et al.*, 2014). En este último caso, en la mayoría de los estudios la infección experimental de los animales se ha producido a mitad de la gestación (Buxton y Finlayson, 1986; Owen *et al.*, 1998; Gutierrez *et al.*, 2010; Castaño *et al.*, 2014 Sánchez-Sánchez *et al.*, 2019). Sin embargo, solamente en un trabajo desarrollado hace algo más de treinta años (Buxton y Finlayson, 1986) se compararon las consecuencias clínicas y patológicas en función de si la infección ocurría a principio o a mitad de la gestación, con una diferencia clara entre ambas: la infección en etapas más tempranas de la gestación desembocaba en un mayor porcentaje de abortos y las lesiones más graves encontradas en la placenta y en los fetos abortados se correspondían con la infección de las madres en el segundo tercio de gestación.

El empleo de distintas **razas** de ovejas en los diferentes estudios experimentales ha estado muy relacionado con la zona geográfica donde se han realizado los estudios. En todos los casos, han sido susceptibles a la infección con *T. gondii*. Diferentes investigadores británicos han infectado experimentalmente con el parásito razas de ovejas propias de las islas británicas como la Suffolk, Blackface o Cheviot (Buxton y Finlayson, 1986; O'Donovan *et al.*, 2012; Katzer *et al.*, 2014). En España se ha reproducido con éxito la infección en ovejas de raza Churra y Rasa Aragonesa (Castaño *et al.*, 2014, Sánchez-Sánchez *et al.*, 2019) y en Francia en ovejas de la raza Bizet o Solognov (Mévélec *et al.*, 2010). Algunos investigadores han sugerido que las ovejas de la raza Charollais son más susceptibles a la transmisión vertical de la toxoplasmosis crónica (Williams *et al.*, 2005; Morley *et al.*, 2008).

En las reproducciones experimentales de la toxoplasmosis ovina se han descrito **signos clínicos** similares a los encontrados en casos de infección natural, consistentes principalmente en un breve episodio febril entre los días 2 y 10 pi (Buxton, 1998; Esteban-Redondo *et al.*, 1999; Castaño *et al.*, 2014) y la aparición de abortos. De manera similar, las **lesiones** descritas en los casos de aborto tras una infección natural o experimental son similares: focos de necrosis en la placenta, que en las reproducciones experimentales de la enfermedad se han descrito a partir de la cuarta semana pi (Gutierrez *et al.*, 2010), y en el feto, principalmente focos de gliosis en el cerebro (O'Donovan *et al.*, 2012).

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

Recientemente se ha observado que en las infecciones experimentales puede desarrollarse una forma clínica de la enfermedad poco conocida en la que aparecen **abortos tempranos** durante la segunda semana pi. En estos casos, las lesiones encontradas, principalmente trombosis e infartos en los placentomas y áreas de leucomalacia isquémica en el encéfalo fetal, difieren de las asociadas a los abortos “clásicos” de la enfermedad, que ocurren aproximadamente un mes después de la primoinfección del animal gestante (Castaño *et al.*, 2014). Como se verá más adelante, el estudio de estas lesiones resulta de gran relevancia diagnóstica, ya que debido al momento en el que se producen estos abortos, entre la primera y segunda semana pi, en la mayoría de los casos aún no se ha producido la invasión de la placenta por el parásito ni la producción de Ac específicos frente al mismo, lo que dificulta el diagnóstico etiológico de estos casos (Trees *et al.*, 1989; Owen *et al.*, 1998) y el estudio histológico sería la única prueba capaz de identificar, o al menos orientar, la causa del aborto (Castaño *et al.*, 2014).

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

Tabla I.4. Estudios experimentales de la toxoplasmosis en la especie ovina, según el tipo de aislado empleado.

Aislado de <i>T. gondii</i>	Dosis infectiva [^]	Nº de animales	Raza	Edad	Momento de infección	Referencia
S48 (tipo I)	10 ⁵ – 10 ⁷ t. (v.sb.)	6* -- 6*	Finnish Landrace y Scottish Blackface	No especificada	No especificado	(Innes <i>et al.</i> , 1995b)
	1 x 10 ⁶ t. (v.sb.)	5*	Finnish Landrace	Entre 18 meses y 2 años	No especificado	(Innes <i>et al.</i> , 1995a)
	1 x 10 ⁶ t. (v.sb.)	13 ^{&}	Romanov	Entre 12 y 14 meses	Mitad de la gestación	(Mévélec <i>et al.</i> , 2010)
	1 x 10 ⁶ t. (v.im.)	12** -- 6**	Suffolk	4 meses	4 meses de vida	(Katzer <i>et al.</i> , 2014)
RH (tipo I)	1 x 10 ⁶ t. (v.sb.)	3 ⁺	No especificado	14 meses	14 meses de vida	(Lopes <i>et al.</i> , 2009a)
	10 ⁵ t. (v.sb.) – 2 x 10 ⁶ t. (v.sb.)	46 ^{&} -- 12 ^{&}	Romanov y Bizet -- Solognot	Entre 12 y 14 meses	Mitad de la gestación	(Mévélec <i>et al.</i> , 2010)
	1 x 10 ⁶ t. (v.sb.)	4 ⁺	Cruce	14 meses	14 meses de vida	(Lopes <i>et al.</i> , 2011)
	1 x 10 ⁶ t. (v.sb.)	1 ⁺	No especificado	Entre 15 y 18 meses	15-18 meses de vida	(Lopes <i>et al.</i> , 2013)
	1 x 10 ⁶ t. (v.sx.)	5 ⁺	No especificado	Entre 14 y 20 meses	14-20 meses de vida	(Lopes <i>et al.</i> , 2013)
ME49 (tipo II)	2,5 x 10 ³ o.e. (v.o.)	20*	Santa Inês	No especificada	Antes de la monta	(Dos Santos <i>et al.</i> , 2016)
	10 ¹ – 5 x 10 ¹ – 5 x 10 ² o.e. (v.o.)	5 ^{&} – 5 ^{&} - 5 ^{&}	Rasa Aragonesa	12 meses	90 dg	(Sánchez-Sánchez <i>et al.</i> , 2019)
M1 (tipo II)	200 q.t. (v.sb.)	3 ^{&} -- 13 ^{&} -- 11 ^{&} - 3 ^{&}	Cheviot y Scottish Blackface	No especificada	40 dg – 60 dg – 90 dg	(Buxton y Finlayson, 1986)
	2 x 10 ³ o.e. (v.o.)	28 ^{&}	Blackface	5 años	90 dg	(Buxton <i>et al.</i> , 1989)
	2 x 10 ³ o.e. (v.o.)	15 ^{&}	Welsh Halfbred	No especificada	Entre los 80 y 90 dg	(Owen <i>et al.</i> , 1998)

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

M3 (tipo II)	$10^5 - 10^4 - 10^3$ o.e. (v.o.)	4 ⁺ - 4 ⁺ -- 4 ⁺	Greyface	9 meses	No especificado	(Esteban-Redondo e Innes, 1998)
	10^3 o.e. (v.o.) - 10^5 o.e. (v.o.)	4 ⁺ -- 6 [*]	No especificado	Entre 2 y 5 años	No especificado	(Esteban-Redondo <i>et al.</i> , 1999)
M4 (tipo II)	3×10^3 o.e. (v.o.)	18 ^{&}	Cruce	No especificada	90 dg	(Gutierrez <i>et al.</i> , 2010)
	$5 \times 10^3 - 5 \times 10^5$ o.e. (v.o.)	5 ^{**} -- 5 ^{**}	Suffolk	2 meses	2 meses de vida	(Benavides <i>et al.</i> , 2011)
	3×10^3 o.e. (v.o.)	5 [*]	Suffolk y Cheviot	No especificada	90 dg	(O'Donovan <i>et al.</i> , 2012)
	3×10^3 o.e. (v.o.)	15 [*]	No especificado	No especificada	90 dg	(Marques <i>et al.</i> , 2012)
	$5 \times 10^2 - 2 \times 10^3$ o.e. (v.o.)	16 ^{&} -- 16 ^{&}	Churra	12 meses	120 dg --90 dg	(Castaño <i>et al.</i> , 2014)
	5×10^5 o.e. (v.o.)	12 ^{**} -- 3 ^{**}	Suffolk	4 semanas después de la inmunización con S48	4 meses de vida	(Katzner <i>et al.</i> , 2014)
PRU (tipo II)	$1 \times 10^2 - 4 \times 10^2 - 4 \times 10^2$ o.e. (v.o.)	33 ^{&} - 36 ^{&} -- 54 ^{&}	Solognot - Romanov y Bizet	Entre 12 y 14 meses	Mitad de la gestación	(Mévélec <i>et al.</i> , 2010)
	3×10^3 q.t. (v.o.)	11 [*]	Cruce	7 semanas	7 semanas de vida	(Verhelst <i>et al.</i> , 2014)
	3×10^3 q.t. (v.o.)	3 [*]	Cruce	No especificada	No especificada	(Verhelst <i>et al.</i> , 2015)
TgShSp1 (tipo II)	$10^1 - 5 \times 10^1 - 5 \times 10^2$ o.e. (v.o.)	6 ^{&} - 6 ^{&} -- 6 ^{&}	Rasa Aragonesa	12 meses	90 dg	(Sánchez-Sánchez <i>et al.</i> , 2019)
VEG (tipo III)	$2,5 \times 10^3$ o.e. (v.o.)	15 ^{&}	Santa Inês	No especificada	40 dg - 80 dg - 120 dg	(Dos Santos <i>et al.</i> , 2016)

^o.e.: ooquistes esporulados. / t.: taquizoítos. / q.t.: quistes tisulares. / v.o.: vía oral. / v.sb.: vía subcutánea. / v.im.: vía intramuscular. / v.sx.: vía sexual. / *: ovejas adultas (no gestantes). / **: corderos.

&: ovejas adultas gestantes. / +: machos. / dg: días de gestación.

4.2. Infecciones experimentales en modelos murinos.

Las razones por las cuales se reproduce de manera experimental la infección con *T. gondii* sobre estos roedores son muy sencillas: la placenta tiene una gran similitud histológica con la humana, la duración de la gestación es corta y su manejo relativamente fácil, sin grandes costes económicos y sin significativos problemas éticos asociados (Wang *et al.*, 2011a; Dubey *et al.*, 2012). En la **Tabla I.5** se citan las referencias y principales características de algunos de los trabajos publicados hasta la fecha sobre la reproducción experimental de la toxoplasmosis en modelos murinos.

Dado que, como se ha comentado en el apartado de *Epidemiología*, la transmisión congénita de la toxoplasmosis murina es elevada (Marshall *et al.*, 2004), uno de los **objetivos** que con más frecuencia se ha abordado en las infecciones experimentales en ratones es analizar los factores implicados en la transmisión del parásito de la madre gestante al feto (Roberts y Alexander, 1992; Johnson, 1994; Owen y Trees, 1998; Wang *et al.*, 2011a). Por otro lado, y dado que la infección por *T. gondii* es capaz de desencadenar abortos en esta especie durante la primera mitad de la gestación (Dubey *et al.*, 2012), otro de los objetivos habituales en este tipo de trabajos ha sido conocer la patogenia del aborto (Shiono *et al.*, 2007; Ge *et al.*, 2008; Senegas *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2013). También se han realizado estudios encaminados a estudiar otros aspectos de la interacción patógeno-hospedador (Dubey, 2001; Couper *et al.*, 2009; Meyer *et al.*, 2013) o la eficacia de vacunas frente a la toxoplasmosis (Cong *et al.*, 2010, 2011).

Además, como ya se ha indicado anteriormente, la infección experimental en ratones se ha empleado para clasificar la virulencia de los diferentes aislados de *T. gondii*. Los del tipo I han demostrado ser siempre letales, independientemente de la **dosis infectiva** empleada (Shwab *et al.*, 2018). A este respecto se ha demostrado que un solo ooquiste de la cepa GT-1, de tipo I, es capaz de provocar la muerte de los ratones (Dubey *et al.*, 2012). Por su parte, la virulencia de las de tipo II y III depende de la dosis empleada (Saeij *et al.*, 2006).

Aunque en roedores, al igual que en los mamíferos, la ingestión de ooquistes de *T. gondii* es la principal fuente de contagio de la toxoplasmosis (Dubey *et al.*, 2012), se ha conseguido reproducir de manera experimental con éxito la

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

enfermedad utilizando las tres **formas parasitarias** (Senegas *et al.*, 2009; Dubey *et al.*, 2012; Meyer *et al.*, 2013). Por otro lado, existe una clara influencia de **vía de inoculación** sobre las consecuencias de la toxoplasmosis murina: un estudio experimental en el que se infectó a ratones SCID (siglas en inglés que significan inmunodeficiencia combinada severa) con bradizoítos de un mismo aislado (RH, de tipo I) de *T. gondii* mediante dos vías de inoculación diferentes, oral e intraperitoneal, demostró que mientras la infección por vía oral no producía síntomas en los animales, la infección por vía intraperitoneal desembocaba en la muerte del animal a los pocos días de haber sido infectado (Meyer *et al.*, 2013). Esto confirma los resultados de estudios previos en los que se aseguraba que la capacidad infectiva de los bradizoítos por vía oral en ratones es muy baja (Dubey, 1997, 2001). Además, se ha demostrado que la inoculación por vía intravenosa con taquizoítos es la mejor forma de reproducir la infección placentaria en ratones (Carlier *et al.*, 2012).

Un estudio epidemiológico desarrollado recientemente en el Reino Unido demostró que la seroprevalencia frente a la toxoplasmosis era muy similar en ratones jóvenes y adultos (Bajnok *et al.*, 2015), lo que ha hecho suponer que la susceptibilidad de los ratones a la infección con *T. gondii* es muy similar independientemente de cuál sea la **edad** del roedor. Sin embargo, en estudios experimentales desarrollados en hembras gestantes infectadas con el parásito sí se ha demostrado que las consecuencias de la toxoplasmosis murina están determinadas por el momento de gestación en que ocurre la infección (Ge *et al.*, 2008; Senegas *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2013): si sucede en las etapas finales de la gestación se detecta una mayor carga parasitaria en la placenta (He *et al.*, 1997) y en diferentes órganos fetales (Chen *et al.*, 2013), mientras que si la infección ocurre al principio de la gestación el porcentaje de abortos es mayor que si sucede en fases más tardías (Senegas *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2013). Además, la tasa de supervivencia fetal aumenta si la infección ocurre en etapas más tardías de la gestación (Wang *et al.*, 2011a).

Las **estirpes** de ratón a inocular tienen una gran influencia sobre la patogenia de la toxoplasmosis murina. Se ha demostrado que no todas ellas son igual de susceptibles. En un estudio en el que se infectaron diferentes estirpes de ratón con varios aislados y dosis infectivas, aunque en todos los

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

casos administradas por vía oral, se demostró que los ratones transgénicos eran más susceptibles a la infección (Dubey *et al.*, 2012), quizás porque los transgenes introducidos en el roedor disminuyeron la capacidad protectora de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) murinas (Witola *et al.*, 2011). Por otro lado, diferentes estudios experimentales han demostrado que la estirpe de ratones C57/BL/6 es más susceptible a la infección con *T. gondii* que la estirpe BALB/c (Liesenfeld *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 2005; Coutinho *et al.*, 2012), confirmando un estudio previo en el que se documentó la resistencia de los ratones BALB/c a la infección por las vías oral e intraperitoneal (Johnson, 1984). Asimismo, la estirpe Swiss Webster se considera bastante susceptible (Dubey *et al.*, 2012; Burrells *et al.*, 2015), al contrario que los ratones de tipo NMRI (Dukaczewska *et al.*, 2015). También se han descrito diferencias en la transmisión congénita de la toxoplasmosis de manera experimental: mientras que la estirpe NIH se asocia con elevados porcentajes de transmisión, la estirpe BALB/c parece tener una mayor resistencia a transmitir el parásito a la progenie (Wang *et al.*, 2011a) y se ha documentado que, a diferencia de otras estirpes, ésta sólo puede transmitir el parásito de manera congénita una vez (Roberts y Alexander, 1992).

El principal **signo clínico** descrito en las reproducciones experimentales de la toxoplasmosis en ratones es la pérdida de peso de los animales infectados (Couper *et al.*, 2009) así como de los fetos de madres infectadas (Wang *et al.*, 2011b; Sánchez-Sánchez *et al.*, 2019). Además, también muestran una menor capacidad de memoria (Witting, 1979) y cambios en el comportamiento, pues se ha demostrado que tras la infección cometen una gran cantidad de errores en juegos de habilidad (Porte *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011b). Como ya se ha explicado, en casos de infecciones durante las primeras etapas de la gestación, el aborto es un signo clínico característico de la toxoplasmosis murina (Senegas *et al.*, 2009; Coutinho *et al.*, 2012).

Las **lesiones** de la toxoplasmosis en ratones son similares, independientemente del tipo de aislado empleado, la dosis infectiva o el tipo de ratones (transgénicos o no) (Dubey *et al.*, 2012). En la fase aguda de la infección, se observa una enteritis localizada principalmente en el íleon que es la causa de la muerte de muchos animales (Dubey y Frenkel, 1973; Dubey *et al.*, 2012). A partir de ese

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

momento, el parásito se extiende por otros tejidos y aparecen infiltrados inflamatorios en diferentes órganos como hígado, corazón, bazo y cerebro (Ferguson *et al.*, 1991; Fuentes-Castro *et al.*, 2017) o incluso en el ojo (Dukaczewska *et al.*, 2015). En el caso de la placenta, la infección por toxoplasma desemboca en una importante reacción inflamatoria que causaría necrosis en los sitios de implantación del embrión con el consiguiente fallo reproductivo (Coutinho *et al.*, 2012).

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

Tabla I.5. Estudios experimentales de la toxoplasmosis en la especie murina, según el tipo de aislado empleado.

Aislado de <i>T. gondii</i>	Dosis infectiva	Nº de animales	Estirpes	Edad	Momento de infección	Referencia
GT-1 (tipo I)	De 1 a 10 ⁵ o.e. (v.o.)	* (nº no especificado)	KO, HLA, Swiss Webster, C57/black, BALB/c	No especificada	No especificado	(Dubey <i>et al.</i> , 2012)
RH (tipo I)	200 t. (v.ip.)	** y & (nº no especificado)	BALB/c	< 48 horas	No especificado	(Johnson, 1994)
	10 ⁴ t. (v.ip.)	+ y & (no especificado)	C57/BL/6 (B6)	*: Entre 8 y 10 semanas &: Entre 6 y 8 semanas	*: No especificado &: 8 dg	(Ge <i>et al.</i> , 2008)
	10 ⁴ t. (v.ip.)	** (nº no especificado)	SCID	Entre 6 y 8 semanas	Entre 6 y 8 semanas de vida	(Meyer <i>et al.</i> , 2013)
ME49 (tipo II)	20 q.t. (v.ip.)	** (nº no especificado)	BALB/c	< 48 horas	< 48 horas de vida	(Johnson, 1994)
	20 q.t. (v.o.)	& (nº no especificado)	BALB/c	No especificada	11 dg	(Johnson, 1994)
	100 q.t. (v.o.)	+ (no especificado)	C57/BL/6, Swiss Webster	Entre 6 y 8 semanas	No especificado	(Liesenfeld <i>et al.</i> , 1997)
	10 q.t. (v.o.)	+ (no especificado)	C57/BL/6 (B6)	Entre 6 y 12 semanas	No especificado	(Couper <i>et al.</i> , 2009)
	10 q.t. (v.o.)	& (nº no especificado)	Swiss Webster	Entre 6 y 8 semanas	1 día después del coito	(Senegas <i>et al.</i> , 2009)
	De 1 a 10 ⁵ o.e. (v.o.)	* (nº no especificado)	KO, HLA, Swiss Webster, C57/black, BALB/c	No especificada	No especificado	(Dubey <i>et al.</i> , 2012)
	5 --- 10 --- 20 q.t. (v.o.) 20 --- 100 q.t. (v.o.)	16* --- 32* --- 10* 5* --- 5*	C57/BL/6 (B6) NMRI	No especificada No especificada	No especificado No especificado	(Dukaczewska <i>et al.</i> , 2015)

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

	25 q.t. (v.o.)	30*	NIH	Entre 6 y 8 semanas	No especificado	(Fuentes-Castro <i>et al.</i> , 2017)
	De 1 a 10 ⁵ t. (v.ip.)	5*	CD1	8 semanas	8 semanas de vida	(Sánchez-Sánchez <i>et al.</i> , 2019)
M1 (tipo II)	50 o.e. (v.o.)	& (nº no especificado)	<i>Mus musculus</i> [^] <i>Apodemus sylvaticus</i> [^]	No especificada	No especificado	(Owen y Trees, 1998)
M3 (tipo II)	30 q.t. (v.ip.)	60*	Porton	No especificada	No especificado	(Nicoll <i>et al.</i> , 1997)
Fukaya (tipo II)	30 q.t. (v.o.)	* (nº no especificado)	C57/BL/6 (B6) --- BALB/c	Entre 8 y 10 semanas	7 y 11 dg	(Shiono <i>et al.</i> , 2007)
PRU (tipo II)	5 q.t. (v.o.)	5 ^{&} --- 5 ^{&} --- 5 ^{&}	NIH	No especificada	5 dg --- 10 dg --- 15 dg	(Wang <i>et al.</i> , 2011a)
TgShSp1 (tipo II)	De 1 a 10 ⁵ t. (v.ip.)	5*	CD1	8 semanas	8 semanas de vida	(Sánchez-Sánchez <i>et al.</i> , 2019)
	2000 --- 500 --- 100 --- 25 o.e. (v.o.)	9 ^{&} --- 9 ^{&} --- 10 ^{&} --- 10 ^{&}	CD1	9 semanas	7 días después del apareamiento	
VEG (tipo III)	De 1 a 10 ⁵ o.e. (v.o.)	* (nº no especificado)	KO, HLA, Swiss Webster, C57/black, BALB/c	No especificada	No especificado	(Dubey <i>et al.</i> , 2012)

o.e.: ooquistes esporulados. / t.: taquizoítos. / q.t.: quistes tisulares. / v.o.: vía oral. / v.ip.: vía intraperitoneal. / *: ratones adultos (no gestantes). / **: crías de ratón. &: ratones adultas gestantes. / +: machos. / dg: días de gestación. / ^: En este estudio la infección experimental no se desarrolló sobre ninguna estirpe concreta de ratón, sino sobre ratones silvestres.

4.3. Infecciones experimentales en otras especies de interés ganadero.

Además del modelo experimental ovino, la toxoplasmosis ha sido reproducida experimentalmente en otras especies ganaderas, como la caprina, porcina y en el ganado vacuno.

4.3.1. Especie caprina.

Existen diversos trabajos en los que se ha reproducido de manera experimental la toxoplasmosis en cabras con el **objetivo** de analizar distintos aspectos de la interacción patógeno-hospedador (Dubey, 1989; Vitor *et al.*, 1999; Conde *et al.*, 2001). Además, dado que la especie caprina es susceptible a la infección natural por *T. gondii* (Innes, 1997) y que ésta se asocia frecuentemente a fallo reproductivo (Chhabra *et al.*, 1981), con la particularidad de que una cabra puede abortar más de una vez por toxoplasmosis (Dubey, 1982), muchos trabajos experimentales se han encaminado a estudiar la patogenia del aborto (Dubey, 1981, 1988a), o incluso analizar la importancia de la transmisión congénita del parásito por vía sexual (Santana *et al.*, 2010; Wanderley *et al.*, 2013, 2015). En la **Tabla I.6** se muestra la reseña de algunos de los principales trabajos publicados hasta la fecha sobre la reproducción experimental de la toxoplasmosis en cabras.

Se ha conseguido producir de manera exitosa la infección de las cabras con cualquiera de las tres principales **líneas clonales** (I, II y III) de *T. gondii* (Dubey, 1989; Santana *et al.*, 2010; Wanderley *et al.*, 2015). Al igual que lo descrito en ovinos, la vía horizontal a través de la ingestión de ooquistes esporulados del parásito que se encuentran contaminando la comida o bebida del animal es la principal forma de contagio de la infección en el ganado caprino. Por ello, esta ha sido la **forma parasitaria** empleada mayoritariamente en las infecciones experimentales (Dubey, 1981, 1988a; Santana *et al.*, 2010). No obstante, también se ha conseguido infectar con éxito a cabras empleando taquizoítos (Vitor *et al.*, 1999; Conde *et al.*, 2001). Respecto a las **vías de inoculación** empleadas, también están muy ligadas a la forma parasitaria usada como inóculo: oral en el caso de ooquistes esporulados (Dubey, 1981, 1989) y subcutánea (Conde *et al.*, 2001; Santana *et al.*, 2010) e incluso sexual (Wanderley *et al.*, 2013) si se emplean taquizoítos. Se ha demostrado que la respuesta inmunitaria humoral desarrollada en las cabras infectadas de manera

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

experimental con el parásito no está influenciada por la forma parasitaria empleada, pues los Ac aparecen alrededor del día 10 pi, independientemente de si la infección experimental se realiza con ooquistes o con taquizoítos (Santana *et al.*, 2010). Sin embargo, sí existiría una clara influencia de la vía de inoculación ya que se ha encontrado que la vía sexual sería la menos indicada para conseguir que los animales adquieran inmunidad frente al parásito (Wanderley *et al.*, 2013).

La **dosis infectiva** es un factor clave en la patogenia de la enfermedad de forma que los signos clínicos relacionados con la toxoplasmosis en cabras son dependientes de la dosis infectiva (Dubey, 1981, 1989). Por otro lado, **la edad** a la que se infectan los animales también parece desempeñar un papel clave, puesto que se ha demostrado que los cabritos son más susceptibles a la infección con el parásito que las cabras adultas (Dubey, 1989). No existen estudios que indiquen la mayor o menor susceptibilidad a la infección por toxoplasma de las diferentes **razas** caprinas.

Respecto a los **signos clínicos** descritos en las reproducciones experimentales de la toxoplasmosis en cabras, éstos son similares a los de la infección natural (Dubey, 2010) y consisten principalmente en un breve periodo de hipertermia desarrollada en la primera semana pi y que dura escasos días, independientemente de si se emplean ooquistes esporulados (Nishi *et al.*, 2001; Santana *et al.*, 2010) o taquizoítos (Wanderley *et al.*, 2013) para la infección de los animales, y la aparición de abortos (Dubey, 1982).

Las **lesiones** características de la toxoplasmosis caprina tras la infección experimental con ooquistes son la enteritis (Dubey, 1989) y la necrosis de la placenta en casos de infección en animales gestantes (Dubey, 1988). La enteritis no se observa en casos de transmisión congénita de la enfermedad (Dubey, 1988), ya que cuando la infección es parenteral el parásito se multiplica en otros tejidos, como los pulmones y cerebro fetal (Dubey, 1981, 1989).

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

Tabla I.6. Estudios experimentales de la toxoplasmosis en la especie caprina, según el tipo de aislado empleado.

Aislado de <i>T. gondii</i>	Dosis infectiva	Nº de animales	Raza	Edad	Momento de infección	Referencia
GT-1 (tipo I)	10 ¹ -- 10 ² -- 10 ³ o.e. (v.o.)	4 [♂] - 6 [♂] - 5 [♂]	No especificada	No especificada	No especificado	(Dubey, 1981)
	Entre 10 ¹ y 10 ³ o.e. (v.o.)	15 [♂]	No especificada	No especificada	No especificado	(Dubey, 1988)
	10 ³ - x 10 ⁵ o.e. (v.o.)	20 ^{**}	No especificada	Entre 2 y 4 meses	Entre 2 y 4 meses de vida	(Dubey, 1989)
	10 ² - x 10 ⁴ o.e. (v.o.)	17 [*]	No especificada	Entre 2 y 4 años	Entre 2 y 4 años de vida	(Dubey, 1989)
C4 (tipo I)	1 x 10 ⁷ t. (v.sb.)	7 [*]	Cruce	Entre 3 y 4 años	Entre 3 y 4 años de vida	(Vitor <i>et al.</i> , 1999)
RH (tipo I)	2 x 10 ⁶ t. (v.sb.)	21 ^{**}	Majorera	1 mes	1 mes de vida	(Conde <i>et al.</i> , 2001)
	1 x 10 ⁶ t. (v.sb.)	2 ⁺	Cruce	Entre 1 y 2 años	Antes de la monta	(Santana <i>et al.</i> , 2010)
ME49 (tipo II)	2,5 x 10 ³ o.e. (v.o.)	20 [♂]	Cruce	Entre 18 meses y 3 años	Antes de la monta	(Silva <i>et al.</i> , 2015)
	2 x 10 ⁶ o.e. (v.o.)	1 ⁺	Saanen	Entre 2 y 5 años	No especificado	(Wanderley <i>et al.</i> , 2015)
CZ-Tiger (tipo II)	2 x 10 ⁴ o.e. (v.o.)	16 ⁺	White Shorthair	Entre 64 y 68 días	Entre 64 y 68 días de vida	(Juránková <i>et al.</i> , 2013)
P (tipo III)	2 x 10 ⁵ o.e. (v.o.)	2 ⁺	Cruce	Entre 1 y 2 años	Antes de la monta	(Santana <i>et al.</i> , 2010)
CPG (tipo III)	1 x 10 ⁵ t. (v.sx.)	5 [*]	Cruce	No especificada	No especificado	(Wanderley <i>et al.</i> , 2013)
VEG (tipo III)	2,5 x 10 ³ o.e. (v.o.)	15 [♂]	Cruce	Entre 18 meses y 3 años	40 dg – 80 dg – 120 dg	(Silva <i>et al.</i> , 2015)

o.e.: ooquistes esporulados. / t.: taquizoítos. / v.o.: vía oral. / v.sb.: vía subcutánea. / v.sx.: vía sexual. / *: cabras adultas (no gestantes). / **: cabritos. [♂]: cabras adultas gestantes. / +: machos. / dg: días de gestación.

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

4.3.2. Especie porcina.

Dado que los cerdos comparten con los seres humanos una gran cantidad de características anatómicas y fisiológicas, como por ejemplo su sistema cardiovascular (Gutierrez *et al.*, 2015), muchas de las reproducciones experimentales de la toxoplasmosis en porcino se han realizado con el **objetivo** de servir como modelo desde el que extrapolar aspectos de la enfermedad a la especie humana (Jungersen *et al.*, 2001; Miranda *et al.*, 2015; Garcia *et al.*, 2017). No obstante, también han sido frecuentes las infecciones experimentales de cerdos para analizar factores propios de la toxoplasmosis porcina: evaluar la eficacia de la vacunación (Dubey *et al.*, 1991; da Cunha *et al.*, 2012; Burrells *et al.*, 2015), estudiar la interacción patógeno-hospedador (Wingstrand *et al.*, 1997; Jungersen *et al.*, 1999) o la transmisión congénita de la enfermedad (de Meuter *et al.*, 1975; Dubey *et al.*, 1990; Dubey y Urban, 1990). En la **Tabla I.7** se recoge información obtenida a partir de algunos de los principales trabajos publicados hasta la fecha sobre la reproducción experimental de la toxoplasmosis en el ganado porcino.

De las tres grandes **líneas clonales** de *T. gondii*, parece que los aislados de tipo I no son muy eficaces a la hora de conseguir la infección congénita en cerdos (Work *et al.*, 1970; Dubey y Urban, 1990). En este sentido, en un estudio en el que se administraron por vía subcutánea diferentes aislados (4 de tipo II y uno de tipo III) de *T. gondii* a cerdos a las 8 semanas de gestación se comprobó que uno de los de tipo II, SVS O14, era el más eficaz en atravesar la placenta e infectar al feto (Jungersen *et al.*, 2001). Por otro lado, se ha demostrado que, al igual que sucede en ovinos (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2019), no existe correlación entre la virulencia de aislados en cerdos y ratones: por ejemplo, el aislado de tipo III NED es avirulento en ratón (Dardé, 1996) y virulento en cerdos (Jungersen *et al.*, 1999).

Aunque la principal fuente de contagio de *T. gondii* en cerdos es el consumo de alimentos o líquidos contaminados con ooquistes del parásito, es frecuente que los cerdos criados al aire libre ingieran restos de roedores o diferentes especies salvajes que puedan estar infectados (Burrells *et al.*, 2015). Por ello, también se han utilizado las tres **formas parasitarias** para infectar de manera experimental a los cerdos (Burrells *et al.*, 2015; Garcia *et al.*, 2017). Se ha comprobado que

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

los ooquistes tienen una capacidad infectiva mayor que las otras dos formas parasitarias (Wingstrand *et al.*, 1997) y que los signos clínicos son más graves cuando se emplean ooquistes que quistes tisulares (Dubey, 1986b). Sin embargo, la producción de Ac en los animales infectados es mayor si la forma parasitaria empleada son quistes tisulares (Dubey, 1986b; Garcia *et al.*, 2017). Por otro lado, se ha demostrado que la infección con ooquistes y quistes tisulares de *T. gondii* es capaz de establecer una infección crónica en el ganado porcino (Wingstrand *et al.*, 1997).

La **dosis infectiva** es un factor clave que determina las consecuencias de la infección, pues la gravedad de los signos clínicos es dosis-dependiente (Wingstrand *et al.*, 1997), al igual que la producción de Ac si la infección se debe a la ingestión de ooquistes (Dubey, 1986b). La **edad** a la que se infectan los animales también juega un importante papel ya que se ha demostrado que, aunque los cerdos jóvenes son más susceptibles a la infección que los adultos (Dubey, 1986b), las consecuencias clínicas son más graves en estos últimos (Work *et al.*, 1970).

No existe ninguna evidencia experimental que sugiera que una **raza** de cerdo sea más susceptible a la infección que otra. No obstante, es de destacar que en muchos de los estudios biomédicos (Vodička *et al.*, 2005), y por tanto también en los de la toxoplasmosis porcina (Jungersen *et al.*, 2001; Miranda *et al.*, 2015), se utiliza una variedad de cerdo denominada “minipig” por su fácil manejo (Vodička *et al.*, 2005). Algunos de los estudios experimentales realizados sobre toxoplasmosis porcina se han llevado a cabo en animales de la raza de cerdo Göttingen, que fue creada exclusivamente para su uso en investigación biomédica (Gutierrez *et al.*, 2015).

Aunque muchas infecciones naturales (Dubey, 2010) y experimentales (Basso *et al.*, 2017) por *T. gondii* en porcinos son subclínicas, en algunos casos se suelen observar **síntomas**, siendo el estado depresivo el más común en ambos tipos de infección (Dubey, 2010; Garcia *et al.*, 2017). Otros signos clínicos descritos en reproducciones experimentales de la toxoplasmosis porcina, y también en casos de infección natural (Dubey, 2010), son disnea, diarrea y lesiones oculares (Pinckney *et al.*, 1994).

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

Se ha demostrado que tras la infección experimental de cerdos con ooquistes el parásito se distribuye ampliamente por los tejidos del animal, encontrándose sobre todo en el cerebro y órganos musculares muy vascularizados como la lengua o el corazón (Burrells *et al.*, 2015). Respecto a las **lesiones** se detectan en la placenta (placentitis necrotizante) si se trata de infecciones de hembras gestantes, o en diferentes órganos fetales como el corazón o los pulmones, donde se observa inflamación (Dubey *et al.*, 1990). En un estudio en el que se infectaron lechones en diferentes momentos (1, 8 y 10 días de vida), por vía subcutánea, con una dosis infectiva de 100 quistes tisulares de una cepa no virulenta en ratón, se comprobó que las lesiones más graves, de tipo inflamatorio, eran aquellas encontradas en los lechones infectados en el primer día de vida y se encontraban fundamentalmente en el corazón y cerebro (Beverley y Henry, 1978). Sin embargo, en otro estudio experimental en el que lechones de 8 semanas de vida fueron infectados con taquizoítos, quistes tisulares u ooquistes de cepas virulentas (RH) y avirulentas (SSI-119 y R92) en ratón no se describieron lesiones microscópicas, independientemente de la forma parasitaria utilizada (Wingstrand *et al.*, 1997).

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

Tabla I.7. Estudios experimentales de la toxoplasmosis en la especie porcina, según el tipo de aislado empleado.

Aislado de <i>T. gondii</i>	Dosis infectiva	Nº de animales	Raza	Edad	Momento de infección	Referencia
RH (tipo I)	7 x 10 ⁷ t. (v.im)	10**	Cruce	Entre 6,5 y 7,5 semanas	Entre 6,5 y 7,5 semanas de vida	(Garcia <i>et al.</i> , 2006)
	1 x 10 ⁷ t. (v.im)	4**	BR-1	8 meses	8 meses de vida	(Miranda <i>et al.</i> , 2015)
S48 (tipo I)	1,2 x 10 ⁵ t. (v.sb)	10**	Large White y Landrace	6 semanas	6 semanas de vida	(Burrells <i>et al.</i> , 2015)
	1,2 x 10 ⁵ t. (v.sb)	5*+*	Large White y Landrace	6 semanas	6 semanas de vida	(Garcia <i>et al.</i> , 2017)
M4 (tipo II)	1 x 10 ³ o.e. (v.o.)	10**	Large White y Landrace	6 semanas	4 semanas después de la vacunación con 1,2 x 10 ⁵ taquizoítos de S48 administrados (v.sb.)	(Burrells <i>et al.</i> , 2015)
	1 x 10 ³ q.t. (v.o.)	5*+*	Large White y Landrace	6 semanas	6 semanas de vida	(Garcia <i>et al.</i> , 2017)
ME49 (tipo II)	660 q.t. (v.o.)	4**	BR-1	8 meses	8 meses de vida	(Miranda <i>et al.</i> , 2015)
SVS O14	3 x 10 ⁴ t. (v.iv.)	2&	Göttingen	Entre 6 y 8 meses	8 sg	(Jungersen <i>et al.</i> , 2001)
VEG (tipo III)	4 x 10 ⁴ o.e. (v.o.)	10**	Cruce	Entre 6,5 y 7,5 semanas	Entre 6,5 y 7,5 semanas de vida	(Garcia <i>et al.</i> , 2008)
NED (tipo III)	10 ⁴ t. (v.iv.)	5**	Cruce	Entre 6 y 7 semanas	Entre 6 y 7 semanas de vida	(Jungersen <i>et al.</i> , 1999)
	3 x 10 ⁴ t. (v.iv.)	2&	Göttingen	Entre 6 y 8 meses	8 sg	(Jungersen <i>et al.</i> , 2001)
SSI-119 (tipo III)	10 ³ -- 10 ⁴ o.e. (v.o.) ---	10** – 10**	Cruce	8 meses	8 meses de vida	(Wingstrand <i>et al.</i> , 1997)

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

	q.t. (v.o.) con una dosis infectiva no especificada	8**	Cruce	8 meses	8 meses de vida	(Wingstrand <i>et al.</i> , 1997)
	3 x 10 ⁴ t. (v.iv.)	2&	Göttingen	Entre 6 y 8 meses	8 sg	(Jungersen <i>et al.</i> , 2001)

o.e.: ooquistes esporulados. / t.: taquizoítos. / q.t.: quistes tisulares. / v.o.: vía oral. / v.sb.: vía subcutánea. / v.im.: vía intramuscular. / v.iv.: vía intravenosa. / *: cerdos adultos (no gestantes). / **: cerditos. / &: cerdos adultos gestantes. / +: machos. / sg: semanas de gestación.

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

4.3.3. Especie bovina.

Dado que el ganado vacuno es susceptible a la infección con *T. gondii* (Innes, 1997), aunque es muy poco frecuente que cause fallo reproductivo (Dubey, 1986a), la mayoría de las reproducciones experimentales de la toxoplasmosis en esta especie se han llevado a cabo con el **objetivo** de estudiar la interacción patógeno-hospedador, si bien se han realizado en diferentes modelos animales: terneros (Dubey, 1983), vacas adultas no gestantes (Esteban-Redondo *et al.*, 1999; Burrels *et al.*, 2018) o gestantes (Munday, 1978; Dubey, 1983; Costa *et al.*, 2011). En la **Tabla I.8** se reseñan algunos de los principales trabajos publicados hasta la fecha sobre la reproducción experimental de la toxoplasmosis en la especie bovina.

La **forma parasitaria** infectante tiene una gran importancia en la patogenia de la enfermedad, pues en un ensayo experimental en el que se infectó a vacas adultas gestantes y no gestantes con las diferentes formas parasitarias (ooquistes esporulados, quistes tisulares y taquizoítos) se detectó un breve proceso febril sólo en aquellos animales infectados con ooquistes esporulados (Munday, 1978). En este mismo estudio se demostró también que la infección con ooquistes desencadenaba una aparición más temprana de Ac específicos frente al parásito y además los niveles eran más elevados (Munday, 1978). En cuanto a las **vías de inoculación**, en un estudio experimental en el que se utilizaron tres vías diferentes (vía oral, intravenosa, e inoculación directa en el amnios) en vacas gestantes se demostró que la transmisión congénita del parásito sólo ocurría cuando se infectaba el parásito directamente en el saco amniótico (Stalheim *et al.*, 1980).

Un estudio experimental desarrollado en vacas infectadas con una dosis alta o baja (10^5 y 10^3 respectivamente) de ooquistes esporulados demostró que la **dosis infectiva** empleada influye sobre la detección de ADN parasitario en la sangre circulante (mayor en los animales infectados con mayores dosis), pero no sobre su presencia en los tejidos, ni tampoco sobre el proceso febril desarrollado por los animales (Esteban-Redondo *et al.*, 1999). La edad a la que los animales son infectados también parece influir en la respuesta inmunitaria humoral. Se ha descrito, tras una infección experimental en terneros y vacas adultas empleado una misma dosis infectiva, que la producción de Ac circulantes

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

es más intensa y duradera en los terneros (Dubey *et al.*, 1985). Finalmente, respecto a la **raza**, parece que no existen diferencias en susceptibilidad (Dubey, 1986a).

Puesto que la aparición de abortos tras casos de infección experimental con *T. gondii* en el ganado vacuno es bastante poco frecuente (Stalheim *et al.*, 1980), el único **signo clínico** destacable de la toxoplasmosis vacuna es el breve proceso febril desarrollado en las primeras etapas de la infección (Scarpelli *et al.*, 2009). En concreto, de manera similar a lo que sucedería en infecciones naturales (Dubey, 1986a), comienza en la primera semana pi y dura pocos días (Dubey, 1983; Esteban-Redondo *et al.*, 1999; Burrels *et al.*, 2018). Las **lesiones** descritas en casos de infección experimental con *T. gondii* en vacunos (Koestner y Cole, 1961; Munday, 1978), empleando cualquiera de las formas parasitarias, son de tipo nervioso (encefalitis y meningitis no purulenta) aunque no se han detectado en todos los estudios (Beverley *et al.*, 1977; Costa *et al.*, 1977, 2011).

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

Tabla I.8. Estudios experimentales de la toxoplasmosis en la especie bovina, según el tipo de aislado empleado.

Aislado de <i>T. gondii</i>	Dosis infectiva	Nº de animales	Raza	Edad	Momento de infección	Referencia
RH (tipo I)	2 x 10 ⁶ t. (v.im.)	1*	Jersey	5 meses	5 meses de vida	(Munday, 1978)
	10 ⁵ o.e. (v.o.) -- 10 ⁵ o.e. (v.sb.)	17 ⁺ * -- 1*	Holstein	No especificada	No especificado	(Dubey, 1983)
	5 x 10 ⁶ t. (v.sb.)	6 [§]	No especificada	Entre 11 y 12 meses	Entre 11 y 12 meses de vida	(Scarpelli <i>et al.</i> , 2009)
M4 (tipo II)	10 ⁶ o.e. (v.o.)	6**	Holstein	6 semanas	6 semanas de vida	(Burrells <i>et al.</i> , 2018)
M3 (tipo II)	10 ³ -- 10 ⁵ o.e. (v.o.)	4* -- 6*	No especificada	Entre 6 y 7 meses	Entre 6 y 7 meses de vida	(Esteban-Redondo <i>et al.</i> , 1999)
AS-28 (tipo desconocido)	10 ⁵ o.e. (v.o.)	9 ^{&}	No especificada	No especificada	En los tres tercios de gestación	(Costa <i>et al.</i> , 2011)

o.e.: ooquistes esporulados. / t.: taquizoítos. / v.o.: vía oral. / v.sb.: vía subcutánea. / v.im.: vía intramuscular. / *: vacas adultas (no gestantes). / **: terneros. / &: vacas adultas gestantes. / §: novillos.

5. Formas de presentación y patogenia de la toxoplasmosis ovina.

5.1. Introducción.

Las ovejas son susceptibles a la infección natural con *T. gondii*, que se manifiesta principalmente con abortos con las consiguientes pérdidas económicas (Innes, 1997). A pesar de la importancia mundial de toxoplasmosis ovina (Dubey, 2009b), aún se desconocen los mecanismos precisos que explicarían por qué suceden los abortos. Se han propuesto distintas hipótesis, como la replicación directa del parásito en la placenta o bien una alteración hormonal o de la respuesta inmunitaria desarrollada en este tejido tras la infección (Buxton, 1990; Dubey, 2010).

Se ha demostrado que durante la gestación la hembra no desarrolla un rechazo inmunológico hacia el feto para asegurar su viabilidad (Hansen, 2011), aunque al contrario de lo sugerido en ratones (Chaouat, 2003), no existen evidencias de que eso ocurra mediante la modulación de la respuesta inmunitaria materna a nivel periférico (McClure *et al.*, 2005; Wattedgedera *et al.*, 2008).

La infección con *T. gondii* abarca dos fases completamente diferentes: la fase aguda y la fase crónica. La **fase aguda** se caracteriza por la diseminación del parásito a distintos tejidos del hospedador infectado durante los primeros estadios de la infección (Verhelst *et al.*, 2014), en concreto durante las dos primeras semanas pi (Owen *et al.*, 1998). Durante la **fase crónica** ya se han formado los quistes tisulares que pueden permanecer en los tejidos del hospedador durante años, incluso durante toda su vida (Verhelst *et al.*, 2014).

5.2. Presentaciones clínicas de la enfermedad.

La clínica asociada a la toxoplasmosis se observa tras la primoinfección de la oveja gestante (Innes, 1997). Al igual que en humanos (Innes, 1997), y de manera contraria a lo que sucede en ratones (Owen y Trees, 1998; Marshall *et al.*, 2004), la inmunidad adquirida tras esa primoinfección de la oveja gestante es suficiente para evitar la transmisión del parásito al feto en sucesivas gestaciones (Buxton, 1990).

Lo que sí se ha demostrado en la especie ovina es que las consecuencias de la infección por *T. gondii* están directamente relacionadas con el momento de gestación

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

en que ésta se produce (Esteban-Redondo e Innes, 1997; Innes *et al.*, 2009b). Si la infección sucede en las fases más tempranas de la gestación (primer tercio), el parásito invade la placenta y, dado que el feto aún no ha desarrollado un sistema inmunitario activo, causa su muerte y en muchas ocasiones acaba siendo reabsorbido (Buxton, 1998). Cuando la infección ocurre a mitad de la gestación, se observan las lesiones más graves tanto en la placenta como en el feto (Buxton y Finlayson, 1986) y, como consecuencia de la reducción en la llegada de nutrientes y oxígeno causada por la reacción inflamatoria, la viabilidad fetal se ve comprometida teniendo como resultado su muerte y posterior expulsión en forma de aborto (Dubey, 2009b). Por el contrario, si la infección sucede en las etapas finales de la gestación, el feto ya es capaz de controlar la replicación del parásito, puesto que su sistema inmunitario ya tiene cierta madurez, si bien no sería suficiente para evitar su infección, por lo que es frecuente el nacimiento de corderos sanos, aunque congénitamente infectados (Innes *et al.*, 2009a).

Clásicamente, el **aborto** por toxoplasma se suele desencadenar a partir de las cuatro semanas posteriores a la primoinfección de las ovejas gestantes, frecuentemente cuando se produce a mitad de gestación, sin que se aprecie ningún otro signo clínico evidente antes (Buxton, 1998). También es habitual el nacimiento de corderos muertos y/o de débiles, a menudo acompañados de otro feto momificado de pequeño tamaño (Buxton *et al.*, 2007).

Hay un número muy escaso de estudios, todos ellos infecciones experimentales (Trees *et al.*, 1989; Owen *et al.*, 1998; Castaño *et al.*, 2014; Sánchez-Sánchez *et al.*, 2019), en los que se describió la aparición de abortos durante las dos primeras semanas pi. En esos estudios no se detectó ADN parasitario en las muestras de tejido de la placenta o feto estudiadas ni tampoco Ac específicos frente al parásito en suero materno en el momento del aborto, pero sí en días posteriores (Owen *et al.*, 1998; Castaño *et al.*, 2014; Sánchez-Sánchez *et al.*, 2019). Debido a esto, y puesto que normalmente la placenta y vísceras fetales, junto a suero sanguíneo materno, son las muestras que se toman para realizar un diagnóstico de casos naturales de aborto, es probable que en existan casos de aborto temprano asociados a toxoplasmosis ovina en los que no se haya podido realizar un diagnóstico etiológico, por lo que la frecuencia real de esta forma de presentación pueda estar siendo subestimada. De hecho, se

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

estima que, en condiciones naturales, hasta uno de cada siete abortos asociados a la toxoplasmosis ovina podría aparecer bajo esta forma de presentación clínica (Owen *et al.*, 1998). Además, hay que tener en cuenta que la única forma fiable de diagnosticar estos abortos tempranos es la identificación de las lesiones asociadas, lo que se puede resultar complicado ya que el estudio de las muestras de placenta o del feto se suele ver complicado por su avanzado estado de autólisis (Castaño *et al.*, 2014; Sánchez-Sánchez *et al.*, 2019). Las lesiones características descritas en casos de aborto temprano son trombosis en vasos de la placenta junto con leucomalacia periventricular en el feto (Castaño *et al.*, 2014). Estas son muy distintas a las observadas en los casos de aborto que aparecen de manera clásica en la toxoplasmosis ovina (focos de necrosis acompañados de infiltrados inflamatorios) por lo que se ha propuesto que la patogenia de ambos tipos de abortos sería diferente de forma que en estos abortos tempranos la presencia del parásito en la placenta no sería necesaria para que ocurran (Castaño *et al.*, 2014). Recientemente, en un estudio experimental en el que se infectaron ovejas gestantes con diferentes dosis de ooquistes esporulados, se ha demostrado que la aparición de abortos tempranos está directamente relacionada con la dosis infectiva (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2019).

5.3. Infección y diseminación del parásito.

De manera experimental se ha comprobado que tras la infección de las ovejas con ooquistes (Dubey y Sharma, 1980) o quistes tisulares (Verhelst *et al.*, 2014) de *T. gondii* administrados por vía oral, el parásito invade el intestino delgado, donde se detecta ya en el día 4 pi (Verhelst *et al.*, 2014). Una vez dentro de los enterocitos, se reproduce en el interior de una vacuola parasitófora rápidamente por endodiogenia y se producen taquizoítos que se liberarán al torrente sanguíneo (Lingelbach y Joiner, 1998; Tenter *et al.*, 2000). La forma parasitaria infectante determina que la detección del parásito en sangre se produzca de manera más temprana o tardía: tras la infección con quistes tisulares por vía oral, el parásito se detecta en el día 4 pi en los enterocitos, en la lámina propia intestinal, los nódulos linfáticos mesentéricos y la sangre (Verhelst *et al.*, 2014), mientras que si ocurre mediante la ingestión de ooquistes esporulados por vía oral el parásito no se detecta en la sangre hasta el día 6 pi y en los nódulos linfáticos mesentéricos hasta el día 7 pi (Dubey y Sharma, 1980). Ello sugiere que los quistes tisulares atraviesan más rápidamente la barrera epitelial del intestino para así

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

diseminarse por la sangre del animal (Verhelst *et al.*, 2014). Una vez en el torrente sanguíneo, los taquizoítos invaden diferentes tejidos, principalmente el muscular (Dubey y Sharma, 1980). La llegada de los taquizoítos a la placenta sucede en el día 15 pi, tal y como se ha documentado en un estudio experimental en el que se reprodujo la enfermedad infectando a ovejas gestantes en la fase inicial y media de la gestación con ooquistes esporulados por vía oral (Buxton y Finlayson, 1986).

En las ovejas, el componente fetal de la placenta se forma a partir de la fusión del corion avascular y el alantoides vascular. Esto aumenta la superficie de contacto al desarrollar proyecciones vellosas, que se agrupan en áreas discretas, conocidas como cotiledones (Sammin *et al.*, 2009). Por ello, la placenta ovina se clasifica como corioalantoidea, vellosa y cotiledonaria (Sammin *et al.*, 2009; PrabhuDas *et al.*, 2015). Una estructura clave de la anatomía de la placenta ovina es placentoma (ver **Figura I.2**), formado por la combinación de cotiledones fetales con la carúncula de la pared uterina materna (Sammin *et al.*, 2009). Dichos placentomas suelen tener forma cóncava, adquieren un tamaño y peso máximo a los 90 dg y su número total en la placenta varía entre 60 y 100 (Hansen, 1998).

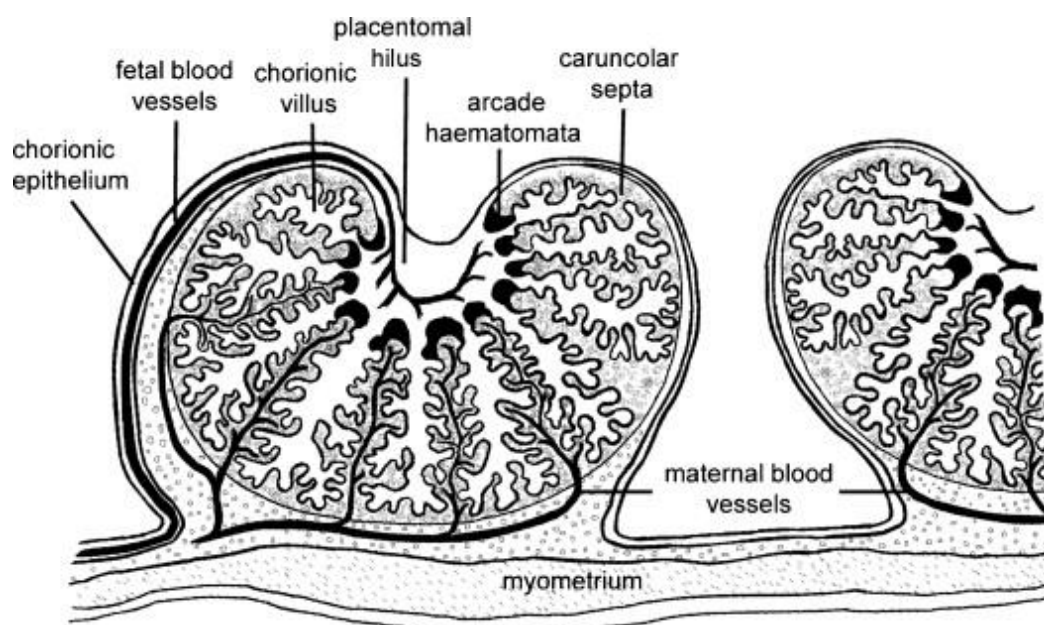


Figura I.2. Representación esquemática de un placentoma característico de la placenta ovina. Imagen tomada de Rocchi *et al.*, 2009.

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

Cuando ha alcanzado la placenta, *T. gondii* se multiplica e invade las células del trofoblasto (Buxton y Finlayson, 1986), tras lo cual los taquizoítos atraviesan la placenta e invaden el feto (Dos Santos *et al.*, 2016). De forma similar a lo que ocurre en la placenta materna, la multiplicación del parásito en los tejidos fetales, ocurre principalmente en el cerebro, corazón y músculo cardiaco (Esteban-redondo e Innes, 1998) y va a depender del estado de maduración de su sistema inmunitario. Se ha estimado que es alrededor del día 70 de gestación cuando el feto ya es inmunocompetente (Silverstein *et al.*, 1963) y, por tanto, es capaz de hacer frente a la infección por *T. gondii*, lo que explicaría el hecho de que la muerte fetal sea menos frecuente si la infección de la madre sucede al final de la gestación, ya que, como se ha explicado, el sistema inmunitario fetal ya se ha desarrollado y, aunque no puede impedir la infección con *T. gondii*, sí es capaz de controlar su replicación, por lo que es habitual el nacimiento de corderos sanos, pero congénitamente infectados (Innes *et al.*, 2009a).

5.4. Lesiones.

Las **lesiones** producidas en ovejas gestantes tras la infección con *T. gondii*, tanto en casos naturales (Hurtado *et al.*, 2001; Weissman, 2003; de Moraes *et al.*, 2011) como experimentales (Buxton y Finlayson, 1986; O'Donovan *et al.*, 2012), afectan tanto a la placenta como a las vísceras fetales, especialmente al cerebro, aunque también al corazón, pulmones e hígado. En ambas localizaciones (placenta y feto), se caracterizan por la necrosis e inflamación no purulenta, independientemente del momento de gestación en que se produzca la infección (Benavides *et al.*, 2017). No obstante, la gravedad de estas lesiones y el momento en que aparecen sí está relacionada con el estado de gestación (Buxton, 1998) de forma que las infecciones ocurridas durante el segundo tercio, en comparación con el primero, están asociadas con lesiones más graves, tanto en la placenta como en el feto (Buxton y Finlayson, 1986).

En la **placenta** las lesiones características de la toxoplasmosis ovina son focos de necrosis que son más numerosos a medida que la gestación progresa (Buxton y Finlayson, 1986). Si la infección tiene lugar al principio de la gestación estos focos afectan el septo caruncular y las células inflamatorias, principalmente macrófagos y linfocitos, son muy abundantes en las vellosidades fetales adyacentes a las lesiones

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

(Benavides *et al.*, 2017). Cuando la infección de las ovejas se ha producido en los últimos estadios de gestación es común observar macroscópicamente, en los cotiledones placentarios, un punteado blanquecino, en un número variable, que se corresponde con focos necróticos. Asimismo, a diferencia de las fases tempranas de la gestación, hay un abundante infiltrado de células inflamatorias en la parte fetal de la placenta (Benavides *et al.*, 2017).

En el **feto** predominan las lesiones necróticas si la infección ocurre al principio de la gestación mientras que si tiene lugar en etapas posteriores predominan los infiltrados de células inflamatorias (Benavides *et al.*, 2017). Esto se aprecia claramente en el encéfalo del feto donde, en infecciones al principio de la gestación, las lesiones características son focos de necrosis aislados, mientras que en etapas más tardías la infección con *T. gondii* se relaciona con focos de gliosis con áreas centrales de necrosis a veces mineralizadas (Benavides *et al.*, 2017). En cuanto a la localización de dichas lesiones, en fetos de ovejas gestantes infectadas experimentalmente con el parásito se comprobó que la mayoría se localizaba a nivel del tracto óptico y en el tronco del encéfalo mientras que no se encontraron en la porción caudal del cerebelo (O'Donovan *et al.*, 2012). En el resto de órganos fetales las lesiones características son focos de necrosis (Buxton y Finlayson, 1986).

5.5. Respuesta inmunitaria tras la infección con *T. gondii*.

La mayor parte del conocimiento de la respuesta inmunitaria que desarrolla el hospedador frente a la infección por *T. gondii* procede de estudios experimentales tanto *in vivo* (realizados en ratones) como *in vitro* (en líneas celulares humanas y murinas), cuyos hallazgos más importantes se exponen a continuación.

5.5.1. Respuesta inmunitaria tras infecciones experimentales in vivo (ratones) e in vitro (líneas celulares humanas y murinas).

Una vez que *T. gondii* entra en contacto con las células del hospedador, empieza a desarrollarse en el animal infectado una respuesta inmunitaria que tiene dos componentes que actúan de manera conjunta: la respuesta inmunitaria innata y la adquirida.

5.5.1.1. Respuesta inmunitaria innata.

Tras la infección con cualquier patógeno, el hospedador desarrolla una respuesta inmunitaria no específica, o innata, como primer mecanismo de defensa que cumple

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

tres funciones básicas: a) previene la infección por medio de barreras físicas, b) en caso de que la infección ocurra, favorece la formación de compuestos antimicrobianos cuyo propósito es limitar la replicación del patógeno y, por último, c) favorece que se inicie la respuesta inmunitaria adquirida y ya específica frente al agente causante de la infección, mediante la producción de diversas moléculas como las interleuquinas (IL) (Entrican y Wheelhouse 2006).

En ratones infectados de manera experimental con *T. gondii* se ha comprobado que la primera etapa de esta respuesta inmunitaria innata es, al igual que frente a otros patógenos, el reconocimiento de **patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs)**, como lipoproteínas o proteínas transmembrana presentes en la mayoría de los microorganismos (Yarovinsky y Sher, 2006). Esta función la llevan a cabo los **receptores tipo “toll” (TLRs)** (Sher *et al.*, 2017). En mamíferos se han identificado al menos 13 familias de TLRs que reconocen los principales PAMPs de patógenos (Oshiumi *et al.*, 2008). Tras a la infección por *T. gondii*, en ratón participan tres TLRs en la respuesta inmunitaria innata: TLR2, TLR4 y TLR11 (Denkers, 2010; Dupont *et al.*, 2012), éste último no presente en humanos (Sasai *et al.*, 2018). Los TLR2 y 4 reconocen unos complejos moleculares denominados glicosilfosfatidilinositoles (GPI) que se encuentran anclados a la superficie del parásito (Debierre-Grockiego *et al.*, 2007; Lima y Lodoen, 2019), mientras que TLR11 reconoce una proteína de *T. gondii* de unión a la actina, que también poseen otros protozoos parasitarios, denominada profilina (Yarovinsky *et al.*, 2005; Menzies *et al.*, 2008). Una vez que los TLR han detectado la presencia de PAMPs asociados a *T. gondii*, reclutan una proteína adaptadora denominada **MyD88** (Torres *et al.*, 2013; Sasai *et al.*, 2018), clave en la respuesta inmunitaria no específica desarrollada tras la infección por *T.gondii* (Egan *et al.*, 2009). En este sentido, diversos estudios han demostrado que tras la infección experimental por vía intraperitoneal (Scanga *et al.*, 2002) y oral (Sukhumavasi *et al.*, 2008) de ratones modificados genéticamente de modo que no expresaran esta proteína adaptadora (MyD88^{-/-}), estos animales morían durante la fase aguda de la infección al no poder controlar la replicación del parásito. También se ha demostrado que para que se desarrolle una respuesta inmunitaria del todo efectiva, deben de activarse de manera conjunta los tres TLRs citados anteriormente, pues la inactivación de alguno de ellos o de los tres permite a los ratones sobrevivir durante la fase aguda

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

de la infección, pero el parásito se enquistaba en su cerebro (Egan *et al.*, 2009; Dupont *et al.*, 2012).

El complejo TLR/MyD88 permite que las células dendríticas (CD), monocitos, neutrófilos y células “natural killer” (NK) sean reclutados hasta el sitio de infección donde producirán la interleuquina 12 (IL12), el principal mecanismo de la respuesta inmunitaria innata frente a la infección por *T. gondii* en ratones (Dupont *et al.*, 2012). En ratones modificados genéticamente que no expresaban la proteína adaptadora MyD88 (MyD88^{-/-}) se comprobó, tras su infección experimental con quistes tisulares de *T. gondii* administrados por vía intraperitoneal, que la producción de IL12 era muy reducida, lo que demostraría la importancia de dicha proteína en la respuesta inmunitaria innata (Scanga *et al.*, 2002).

El papel desempeñado por las **CD** durante la respuesta inmunitaria no específica de la toxoplasmosis murina ha sido demostrado *in vivo*: la ausencia total de este tipo de células en los ratones (CD^{-/-}) aumentaba su susceptibilidad a la infección con el parásito como consecuencia de una reducción en los niveles sistémicos de IL12, lo cual podía revertirse administrando esta IL a los animales (Liu *et al.*, 2006).

Por su parte, los **monocitos** ejercen un papel clave en la respuesta inmunitaria de ratones frente a la infección por *T. gondii* de tres maneras distintas: por un lado, estudios *in vivo* (Mordue y Sibley, 2003; Dunay *et al.*, 2010) e *in vitro* (Aldebert *et al.*, 2007) han demostrado que estas células son capaces de producir grandes cantidades de IL12 tras su estimulación con el parásito; por otro lado, los monocitos también son capaces de expresar la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), responsable de la producción de óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés), que *in vitro* se ha demostrado que es capaz de inhibir la replicación de *T. gondii* y matar al parásito (Mordue y Sibley, 2003; Hunter y Sibley, 2012); finalmente, también se ha demostrado *in vitro* que los monocitos, en respuesta a antígenos (Ags) solubles de *T. gondii*, producen IL1 (Gov *et al.*, 2017; Lima *et al.*, 2018). Esta IL es capaz de estimular una mayor producción de IL12 durante la fase aguda de la infección (Hunter *et al.*, 1995).

Los **neutrófilos** producen IL12 durante las primeras fases de la toxoplasmosis murina (Bliss *et al.*, 1999). Además, se ha demostrado que son capaces de fagocitar al parásito (Abi Abdallah *et al.*, 2012; Coombes *et al.*, 2013), controlando de esta manera la infección.

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

Por último, las **células NK** ejercen un importante efecto citotóxico sobre el parásito (Hauser y Tsai, 1986) y se ha demostrado en modelos murinos que tras su estimulación con *T. gondii* producen grandes cantidades de IFN- γ (Gigley, 2016; Kupz *et al.*, 2019), una citoquina clave de la respuesta inmunitaria desarrollada en los ratones tras esta primera fase de defensa innata: la respuesta inmunitaria adquirida, que se explicará a continuación.

5.5.1.2. Respuesta inmunitaria adquirida.

Una vez que el parásito ha infectado a su hospedador y en éste se han desarrollado una serie de mecanismos inmunitarios inespecíficos frente al patógeno, se desarrolla una respuesta inmunitaria específica frente a éste, denominada respuesta inmunitaria adquirida o adaptativa. Además de específica, esta respuesta es duradera y está mediada por las células T (respuesta inmunitaria celular) y B (respuesta inmunitaria humoral).

Las células T inmaduras son los linfocitos que expresan en su superficie diferentes moléculas. Una común a todos ellos es el receptor de células T (TCR, por sus siglas en inglés) pero luego existen otras específicas según la población, como el CD4, presente en las denominadas células T cooperadoras o Th (por el adjetivo en inglés “helper”) o el CD8, que se encuentra en las denominadas células T citotóxicas o Tc (por el adjetivo en inglés “cytotoxic”). Comúnmente estas poblaciones de linfocitos, Th o Tc, se denominan también según el receptor de superficie que expresan, es decir CD4 o CD8 respectivamente. Dichos linfocitos residen en diferentes órganos linfoides, como el timo, el bazo, los nódulos linfáticos o los tejidos linfoides asociados a mucosas.

Para que los linfocitos ejerzan su función es necesario que se activen. Esto se consigue gracias a la acción simultánea de tres mecanismos: por un lado, las células presentadoras de antígeno (CPA) deben poner en contacto el Ag parasitario con estas células CD4 y CD8 inmaduras a través de su MHC (MHCII y MHCI respectivamente) que interactúa con los receptores de superficie encontrados en las células T, el receptor TCR y los receptores CD4 o CD8 según corresponda; en segundo lugar, deben existir señales co-estimuladoras para las células CD4 y CD8 (por ejemplo, el receptor CD28 en ambos casos) y, por último, es necesaria la participación de IL

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

(principalmente IL1 e IL12 respectivamente) (Dupont *et al.*, 2012; Golubovskaya y Wu, 2016).

Las CPA que interactúan con las **células CD4** son principalmente las CD (Steinman *et al.*, 1997) aunque también ejercen esta función los macrófagos y las células B (Jenkins *et al.*, 2001). Se ha demostrado que las CD murinas infectadas con *T. gondii* expresan en su superficie bajos niveles de MHCII. Para que se produzca la presentación del Ag parasitario por parte de las CPA se requiere que estas capturen previamente, mediante fagocitosis o endocitosis, el parásito intacto, o bien sus Ag, de forma que puedan procesarlo y presentarlos en su superficie unidos al MHC II (McKee *et al.*, 2004; Goldszmid y Sher, 2010; Dupont *et al.*, 2012). En la **Figura I.3** se muestra este proceso de manera esquemática.

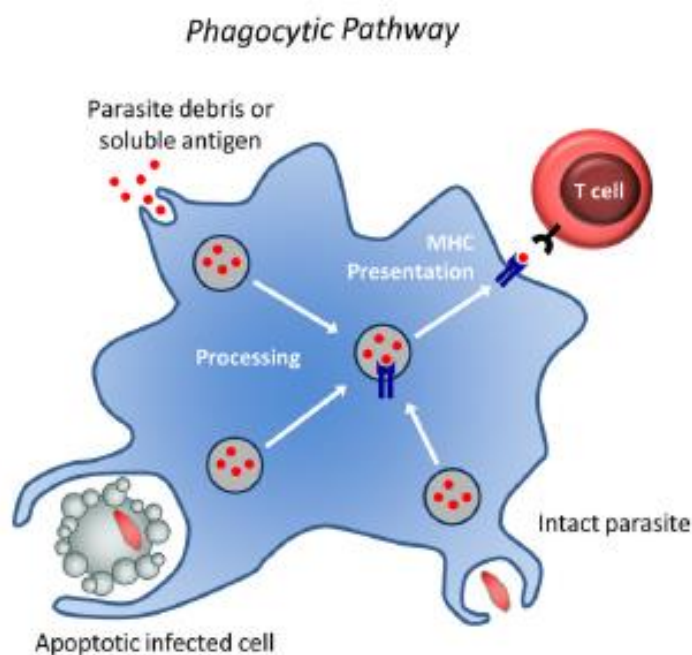


Figura I.3. Presentación del Ag de *T. gondii* de las CPA a las células CD4 inmaduras presentes en los nódulos linfáticos del animal infectado. Imagen obtenida de Dupont *et al.*, 2012.

Además de la presentación del Ag a través de las CPA, para que las células CD4 se activen es necesaria la presencia de señales co-estimuladoras, como el receptor CD28 en la superficie de las CPA (Villegas *et al.*, 2002), y de IL como la IL1 (Curtsinger

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

et al., 1999). Una vez activadas, las células CD4, o linfocitos Th, producen la citoquina gamma-interferón (IFN- γ) (Denkers y Gazzinelli, 1998) y se expanden de manera clonal (Gazzinelli *et al.*, 1991; Jenkins *et al.*, 2001). Además, el hecho de que tras la infección experimental con ooquistes de *T. gondii* administrados por vía oral de ratones modificados genéticamente que carecen de células CD4 (CD4^{-/-}), éstos produjeran unos niveles muy bajos de Ac específicos frente al parásito sugiere que las células CD4 maduras son esenciales también para la producción de inmunoglobulinas (Ig) por las células B (Johnson y Sayles, 2002). Dicha interacción se ha demostrado que sucede gracias a la unión del receptor CD40, expresado en los linfocitos B, entre otras poblaciones celulares, y su ligando CD40L (también denominado CD154) que fundamentalmente se expresa en las células CD4 activadas y representa un factor co-estimulador en esta interacción (Subauste y Wessendrap, 2006; Bhadra *et al.*, 2013).

Las células T de tipo CD4 se dividen en diferentes subpoblaciones de acuerdo a las IL que producen, tal y como puede apreciarse en la **Figura I.4**. Dichas subpoblaciones se forman gracias al estímulo que, sobre las células CD4 inmaduras, ejercen las diferentes IL (Golubovskaya y Wu, 2016).

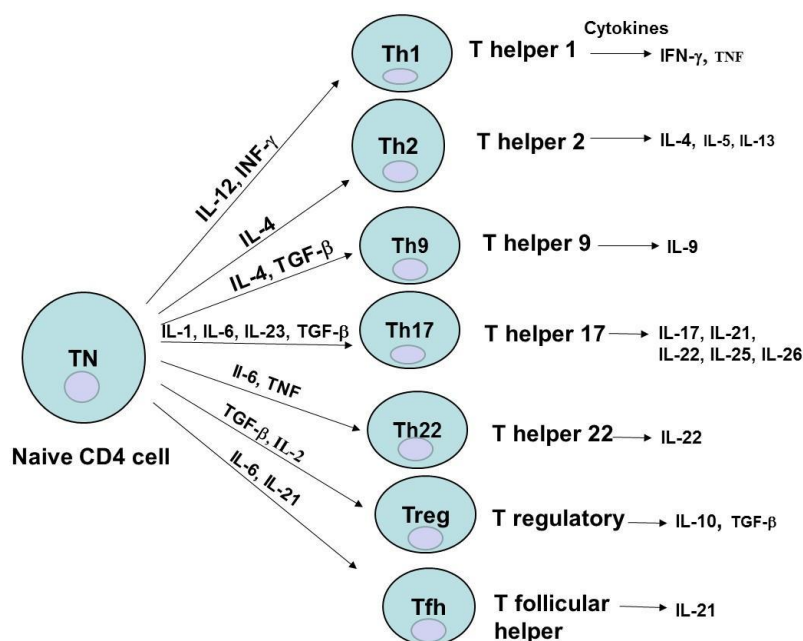


Figura I.4. Diferentes subpoblaciones de células CD4 maduras. Imagen obtenida de Golubovskaya y Wu, 2016.

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

De entre todas esas subpoblaciones de células CD4 maduras destacan especialmente tres: Th1, caracterizada por la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IFN- γ y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), Th2, con una clara predominancia de IL anti-inflamatorias como IL4, y T_{reg}, una subpoblación de células T de tipo CD4 que producen principalmente IL10 que ejerce un importante papel en la regulación de la respuesta inmunitaria desarrollada frente infecciones. A continuación, se detalla el papel que desempeñan estas citoquinas frente a la infección experimental por *T. gondii* en ratones y humanos.

IFN- γ es la principal citoquina pro-inflamatoria que interviene en la respuesta inmunitaria desarrollada por el hospedador tras la infección con *T. gondii* (Suzuki *et al.*, 1998), y es sintetizada en las primeras fases de la infección gracias a la producción de IL12 por parte de las CPA y de las células CD4 maduras (Denkers y Gazzinelli, 1998; Pearce y Shen, 2007), tal y como se ha explicado previamente. En concreto, esta citoquina activa a los macrófagos que han sido reclutados hasta el sitio de infección para que fagociten al parásito y a las células que ha infectado (Dupont *et al.*, 2012). Para que esto suceda, IFN- γ incrementa la producción de la enzima iNOS en estos macrófagos activados (Sasai *et al.*, 2018) la cual produce NO, un compuesto muy tóxico que daña el ADN de *T. gondii* e impide su replicación (Cabral *et al.*, 2018). A este respecto, se demostró que en ratones modificados genéticamente que no expresaban la enzima iNOS (iNOS^{-/-}) la infección experimental de ooquistes esporulados del parásito administrados por vía intraperitoneal desembocaba en una elevada carga parasitaria en su cerebro (Hayashi *et al.*, 1996). También en humanos, pero no en ratones (Meisel *et al.*, 2011), se ha demostrado *in vitro* que la citoquina IFN- γ es capaz de estimular la expresión de la enzima indolamina 2, 3-dioxigenasa (IDO) en una gran variedad de células (Ufermann *et al.*, 2019), como por ejemplo los fibroblastos (Pfefferkorn, 1984). En concreto, esta enzima degrada el triptófano, un aminoácido esencial para el crecimiento del parásito ya que es auxótrofo para él, es decir, no lo puede sintetizar y para poder sobrevivir debe infectar células que lo sintetizan por sí mismas (Sibley *et al.*, 1994).

TNF- α es otra citoquina pro-inflamatoria que interviene en la respuesta inmunitaria desarrollada por el hospedador tras la infección por *T. gondii* (Schlüter *et al.*, 2003). En concreto, se trata de un receptor de la superfamilia de receptores de necrosis

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

tumoral (TNF), a la que también pertenece el ligando CD40L (Van Grol *et al.*, 2013). La citoquina TNF- α es producida por una gran variedad de células como neutrófilos, macrófagos y células T (Dupont *et al.*, 2012) tras la infección con el parásito y ejerce una función de sinergia junto a IFN- γ al incrementar la actividad anti-parasitaria de células no hematopoyéticas y macrófagos (Degrandi *et al.*, 2009). Con respecto a estos últimos, y de manera muy similar a lo explicado en el párrafo anterior, TNF- α incrementa la producción de la enzima iNOS en los macrófagos activados (Liesenfeld *et al.*, 1999), como demuestra el hecho de que los niveles de expresión de esta enzima en ratones modificados genéticamente que carecen de las citoquinas IFN- γ y TNF- α estén muy reducidos tras la inoculación experimental con lipopolisacárido (LPS) (Salkowski *et al.*, 1997). Por otro lado, en una infección experimental con quistes tisulares de *T. gondii* administrados por vía intraperitoneal a ratones modificados genéticamente que no expresaban IFN- γ se observó que la acción conjunta de TNF- α e iNOS no era suficiente para prevenir la encefalitis asociada a la infección, pero que esto podía revertirse administrando a estos animales esta citoquina (IFN- γ) (Suzuki *et al.*, 2000).

La **IL10** es una IL que ejerce una función clave en la regulación de la respuesta inmunitaria desarrollada en el hospedador tras la infección con diferentes patógenos, *T. gondii* entre ellos (Denkers y Gazzinelli, 1998). En concreto, ejerce tres funciones: inhibe las respuestas inflamatorias exacerbadas asociadas a las primeras fases de la infección, favorece las acciones desencadenadas por la respuesta inmunitaria innata y mantiene la homeostasis de los tejidos del organismo infectado al favorecer mecanismos de reparación tisular (Ouyang y O’Gara, 2019). Durante la fase aguda de la toxoplasmosis las células NK constituyen la principal población celular productora de IL10 (Dupont *et al.*, 2012), aunque también es sintetizada en fases posteriores por las células T y B (O’Gara y Vieira, 2007). Se ha sugerido que es el propio parásito el que estimula su producción durante la fase inicial de la infección como una estrategia para evadir el control ejercido por el sistema inmunitario del hospedador (Sher *et al.*, 1992). Esta aparente contradicción se explica por el hecho de que IL10 es una potente antagonista de la síntesis de IFN- γ , lo que consigue al inhibir la síntesis de IL12 por las CPA (D’Andrea *et al.*, 1993; Denkers y Gazzinelli, 1998). Así, se ha demostrado en ratones modificados genéticamente de modo que no

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

expresan IL10 (IL10^{-/-}) que la elevada mortalidad observada en las primeras fases tras la infección experimental con *T. gondii* no se debe a la replicación incontrolada del parásito en los tejidos del hospedador sino a una exacerbada respuesta inflamatoria que produce daños irreparables en el hospedador (Khan *et al.*, 1995; Gazzinelli *et al.*, 1996b; Neyer *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 2005). Todo ello pone de manifiesto que la IL10 es beneficiosa tanto para el hospedador, al impedir el desarrollo de una respuesta inflamatoria excesiva que pueda resultar perjudicial por el daño tisular que cause, como para el parásito ya que le permite replicarse (Lang *et al.*, 2007). No obstante, en las fases más avanzadas de la infección el papel desempeñado por IL10 parece no ser muy relevante (Gazzinelli *et al.*, 1996b). En este sentido, un estudio en el que ratones modificados genéticamente que no expresaban el receptor para esta IL demostró que, durante la fase crónica de la infección, la carga parasitaria encontrada en los animales era similar a la observada en los ratones no modificados genéticamente y que, además, presentaban lesiones tisulares asociadas a la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Jankovic *et al.*, 2007).

La **IL4** ejerce funciones muy similares a la IL10, destacando su importancia en la fase aguda de la toxoplasmosis murina (Villard *et al.*, 1995). En un estudio en el que se reprodujo de manera experimental la toxoplasmosis infectando por vía oral con quistes tisulares de *T. gondii* a ratones normales y ratones modificados genéticamente para que no expresaran esta IL (IL4^{-/-}) se observó que la IL4 inhibe la respuesta inflamatoria, desarrollada principalmente por IFN- γ , durante la fase inicial de la toxoplasmosis lo que, de forma similar a lo visto en para la IL10, provocó una elevada tasa de mortalidad solamente en los ratones modificados genéticamente (Roberts *et al.*, 1996). Sin embargo, en las fases más avanzadas de la gestación, al inhibir la respuesta inmunitaria inflamatoria, esta IL favorece que el parásito colonice los tejidos del hospedador, lo que es coherente con el hecho de que se observaran mayor cantidad de quistes tisulares en el cerebro de los ratones normales que en el de aquellos modificados genéticamente y que no pueden expresarla (Roberts *et al.*, 1996). No obstante, diferentes estudios experimentales en ratones infectados con quistes tisulares por vía intraperitoneal (Calabrese *et al.*, 2008; Dogruman-Al *et al.*, 2011) han demostrado que no hay diferencias significativas entre los niveles séricos de esta IL entre los ratones infectados y no infectados, lo que sugiere que es la

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

producción local de IL4, o bien los niveles basales de la misma, la que ejerce el control inmunológico tras la infección con el parásito y que por tanto no sería necesario su presencia a nivel sistémico.

La producción de Ac por parte de las **células B** parece jugar también un papel relevante en la respuesta inmunitaria tras la infección por *T. gondii* (Johnson y Sayles, 2002). Actualmente se reconocen cinco clases de Ig, de los tipos A (IgA), B (IgB), E (IgE), G (IgG) y M (IgM), (Gupta *et al.*, 2013). La infección con *T. gondii* provoca el desarrollo de una respuesta inmunitaria humoral caracterizada por la producción de Ac específicos como las IgG, IgA e IgM (Hassan *et al.*, 2014), que ejercen su acción frente bien opsonizando al parásito y luego facilitando su fagocitosis (Vercammen *et al.*, 1999) o bien activando el sistema del complemento por la vía clásica (Schreiber y Feldman, 1980).

Las **IgM** son los primeros Ac en aparecer y se detectan en el suero de animales infectados al final de la primera semana pi (Filisetti y Candolfi, 2004). Las IgM incrementan la capacidad de los neutrófilos de matar los taquizoítos del parásito y además son un potente activador del sistema del complemento durante la fase aguda de la infección (Couper *et al.*, 2005). Su excelente capacidad de aglutinación es utilizada para el diagnóstico serológico de la toxoplasmosis (Filisetti y Candolfi, 2004), y dado que no pueden atravesar la placenta, se ha propuesto que su detección en el suero fetal o en el cordón umbilical sería de gran utilidad para el diagnóstico de la transmisión congénita de la toxoplasmosis (Hurley y Theil, 2011).

Las **IgG** son el segundo tipo de Ig en aparecer en los animales infectados con *T. gondii*, aproximadamente hacia la segunda semana pi. Existen cuatro tipos de IgG, siendo las IgG1 (de tipo anti-inflamatorio), IgG2 (de carácter pro-inflamatorio) e IgG3 (también pro-inflamatoria) (Ek *et al.*, 2012) las predominantes en la respuesta inmunitaria desarrollada frente a la infección parasitaria (Filisetti y Candolfi, 2004; Lee *et al.*, 2017). En concreto, se ha demostrado que las IgG específicas frente a *T. gondii* pueden activar el sistema del complemento o bien interferir en la invasión celular del parásito al bloquear sus receptores celulares provocando en ambos casos la muerte del parásito (Hassan *et al.*, 2014). También ejercen un papel clave en la protección del feto frente a infecciones pues pueden pasar desde la sangre materna a la fetal a través de la placenta (Filisetti y Candolfi, 2004). En ratones infectados

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

experimentalmente con *T. gondii* se ha documentado un aumento considerable en los niveles séricos de IgG desde los 45 días pi hasta el día 120 pi y se correlacionan negativamente con la carga parasitaria, lo que demostraría su importancia en el control de la infección (Zorgi *et al.*, 2016). Estos autores han sugerido que el hecho de que las IgG puedan detectarse en el suero de los ratones infectados hasta 120 días pi podría relacionarse con la migración de células plasmáticas específicas frente al parásito desde el bazo o nódulos linfáticos hasta la médula ósea, donde podrían persistir durante años (Zorgi *et al.*, 2016).

La **IgA** es el tipo de Ac más abundante en los mamíferos y su función primaria es mantener la homeostasis en las superficies mucosas, así como participar en la neutralización de toxinas y microbios patógenos (Stanley *et al.*, 2004; Macpherson *et al.*, 2012). Al igual que las IgM, las IgA no son capaces de atravesar la placenta (Filisetty y Candolfi, 2004). Existe cierta controversia sobre la utilidad de esta Ig en el diagnóstico de la toxoplasmosis, pues mientras algunos autores afirman que permanecen meses e incluso años en el hospedador infectado, por lo que no sería útil para el diagnóstico de infecciones recientes (Gorgievski-Hrisoho *et al.*, 1996; Nascimento *et al.*, 2008), otros investigadores afirman que es de gran utilidad para el diagnóstico de la enfermedad durante la fase aguda de la infección en mujeres embarazadas (Decoster *et al.*, 1992).

Respecto al papel que pueden desempeñar los Ac en el control de la toxoplasmosis, se pudo comprobar que, tras la infección experimental con ooquistes esporulados administrados por vía oral a ratones modificados genéticamente que carecen de células B ($B^{-/-}$), aunque producían elevados niveles de IFN- γ en la fase aguda de la enfermedad, morían a las 3-4 semanas pi al no ser capaces de controlar la replicación del parásito, lo que se puso de manifiesto al observar una gran cantidad de quistes tisulares en el cerebro de estos animales (Kang *et al.*, 2000). Estos resultados ponen de manifiesto la relevancia de las Ig en la patogenia de esta enfermedad y que las respuestas inmunitaria celular y humoral trabajan conjuntamente para controlar la infección con *T. gondii*.

Las **células CD8** reconocen y destruyen células infectadas con virus, bacterias y parásitos, por lo que ejercerían un papel clave en la respuesta inmunitaria desarrollada por el hospedador tras la infección con *T. gondii* (Gigley *et al.*, 2011; Dupont *et al.*,

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

2012). Para que esto suceda, las células CD8 inmaduras, presentes en los tejidos linfáticos, deben activarse (Gigley *et al.*, 2011) lo que se consigue, al igual que en el caso de las células CD4, mediante la conjunción de tres factores. En primer lugar, la presentación de Ag de *T. gondii* a las células CD8 inmaduras. Se ha demostrado que solamente los Ags secretados por el parásito, como las proteínas densas granulares (GRA) de tipo 4 (GRA4) y 6 (GRA6) (Oledzka *et al.*, 2017) o las proteínas de la ropria (ROP), un orgánulo secretor que participa en la adhesión a las células del hospedador (Picchio *et al.*, 2018), de tipo 7 (ROP7), o el Ag de superficie (SAG) de tipo 1 (SAG1) (Khosroshahi *et al.*, 2012) son capaces de estimular a las células CD8 inmaduras. Estos Ags, presentes en el citosol de las CPA son transportados a la superficie y presentados a los linfocitos CD8 mediante el MHCI (Gubbels *et al.*, 2005; Gigley *et al.*, 2011; Lopez *et al.*, 2015; Buillon *et al.*, 2017). Esto en conjunto explica que solamente las CPA infectadas, y no aquellas que han fagocitado al parásito, sean capaces de estimular la maduración de los linfocitos CD8 (Buillon *et al.*, 2017). En la **Figura I.5** se muestra este proceso de manera esquemática. Las CPA que participan en el proceso son fundamentalmente CD (Buillon *et al.*, 2017). Posteriormente, los linfocitos CD8 activados serían capaces de reconocer los Ags de *T. gondii* frente a los que han sido sensibilizados y que se estén presentando, unidos a MHCI, en la superficie de células infectadas, como los fibroblastos o los astrocitos, por ejemplo, y destruirlas, limitando de este modo la propagación del parásito (Dzierszinski *et al.*, 2007).

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

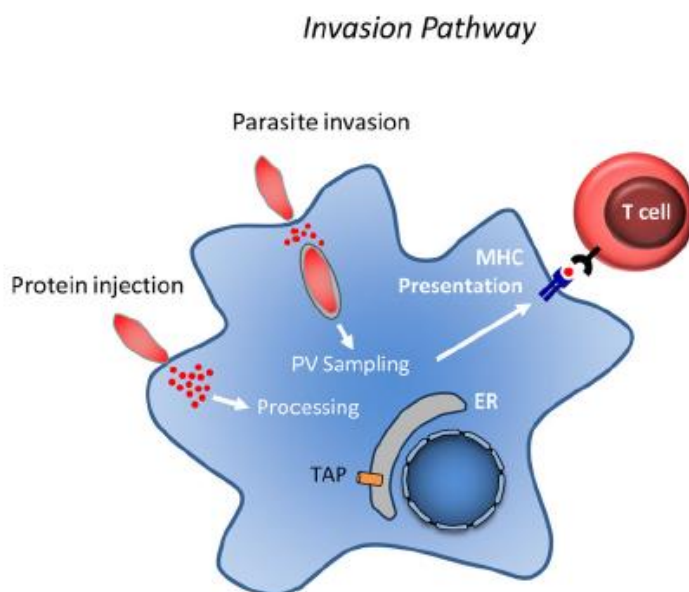


Figura I.5. Presentación del Ag de *T. gondii* de las CPA a las células CD8 inmaduras presentes en los nódulos linfáticos del animal infectado. Imagen obtenida de Dupont *et al.*, 2012.

Un aspecto muy relevante de este proceso de presentación del Ag relacionado con el MHC I es el hecho de que parece estar relacionado con la diferente susceptibilidad de diversas estirpes de ratones a la infección por *T. gondii*. Concretamente, la estirpe de ratones C57/BL/6 es más susceptible a la infección con *T. gondii* que los ratones BALB/c (Liesenfeld *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 2005) y esto se ha relacionado con el hecho de que éstos últimos presentan un alelo dentro del complejo proteico MHC I capaz de reconocer a la proteína GRA6 de *T. gondii*, mientras que los primeros no la poseen (Blanchard *et al.*, 2008; Gigley *et al.*, 2011).

Además de la presentación de Ag por parte de las CPA, el segundo mecanismo por el cual se activan las células CD8 es mediante señales co-estimuladoras, como la que proporciona el receptor CD28 y el co-estimulador inducible (ICOS) (Gigley *et al.*, 2011; O'Brien *et al.*, 2019). El tercer mecanismo responsable de la activación de las células CD8 inmaduras son las IL, en especial la IL12 que es producida por neutrófilos, macrófagos y CD (Pearce y Shen, 2007; Wilson *et al.*, 2008; Henry *et al.*, 2008). Otras IL que participan en este proceso son IL2, IL7 e IL15 (Gigley *et al.*, 2011). Además de estos tres factores, un cuarto y último mecanismo que interviene en la maduración de las células CD8 inmaduras es la participación en el proceso de las células CD4,

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

gracias fundamentalmente a la producción de IL2 (Khan *et al.*, 2019). En resumen, gracias a estos cuatro mecanismos, las células CD8 maduran y ejercen dos funciones principales: una especial actividad citotóxica (Gigley *et al.*, 2011), y la producción de la citoquina IFN- γ (Reichmann *et al.*, 2000).

5.5.2. Respuesta inmunitaria tras infecciones experimentales con *T. gondii* en ovejas.

Como se ha expuesto en el apartado anterior, el conocimiento de la respuesta inmunitaria en la toxoplasmosis se ha obtenido fundamentalmente a partir de modelos murinos, mientras que son escasos los estudios que analizan la respuesta inmunitaria desarrollada en ovejas tras la infección experimental con *T. gondii* (Verhelst *et al.*, 2014). Sin embargo, dichos resultados no pueden extrapolarse a la especie ovina debido a las diferencias anatómicas y fisiológicas que existen entre ambas especies (Innes, 1997). Por ejemplo, la duración de la gestación en ratones es de 20 días (Erlebacher, 2013; Krishnan *et al.*, 2013), mientras que en ovejas es de alrededor de 147 (Entrican y Wheelhouse, 2006). También la estructura morfológica de la placenta difiere, tal y como se explicará en el siguiente apartado. En lo que respecta al sistema inmunitario, una diferencia muy importante entre ambas especies es que el receptor TLR11, fundamental en la respuesta inmunitaria innata que desarrollan los ratones frente a *T. gondii* (Dupont *et al.*, 2012), no existe en las ovejas (Sasai *et al.*, 2018). Además, en los ratones también es frecuente que la transmisión vertical del parásito se repita en sucesivas gestaciones, salvo en los ratones de la estirpe BALB/c (Roberts y Alexander, 1992), mientras que esto no sucede en el caso de la especie ovina (Innes, 1997).

5.5.2.1. Respuesta inmunitaria innata.

Al igual que lo expuesto en el caso de los ratones, en la respuesta inmunitaria innata desarrollada en ovejas tras las infecciones frente a patógenos desempeñan un papel clave los TLR. En este sentido, se ha demostrado que existe una gran similitud genética entre los TLR de los mamíferos, incluidos ovinos, humanos y ratones (Chang *et al.*, 2009). Existen numerosas evidencias que demuestran el importante papel desempeñado por los receptores TLR2 y TLR4 en las células mononucleares sanguíneas (PBMCs) de ovejas tras la infección de los animales con diferentes patógenos (Deng *et al.*, 2016; Nefefe *et al.*, 2017). Sin embargo, recientemente se ha cuestionado el papel que desempeñan en la respuesta inmunitaria innata desarrollada

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

en la placenta tras la infección experimental con taquizoítos de *N. caninum* de ovejas en los tres tercios de gestación (Arranz-Solís *et al.*, 2016). Sin embargo, se desconoce el papel que los TLR desempeñan en ovejas infectadas con *T. gondii*. De hecho, existe muy poca información sobre la respuesta inmunitaria no específica o innata desarrollada en ovinos tras la infección con *T. gondii*. Un estudio reciente ha sugerido que, en especies diferentes de ratones, en concreto en humanos y en la especie bovina, la respuesta inmunitaria innata desarrollada durante la toxoplasmosis estaría muy poco desarrollada (Tombácz *et al.*, 2018).

5.5.2.2. Respuesta inmunitaria adaptativa.

Tras los mecanismos de defensa no específicos, las ovejas desarrollan una respuesta inmunitaria adaptativa para hacer frente a la infección con *T. gondii*. Ha sido estudiada en mayor profundidad que la respuesta inmunitaria innata, y emplea estrategias específicas que se engloban dentro de dos vertientes que trabajan de manera conjunta para proteger al animal: mecanismos celulares y humorales. A pesar de la importancia de ambos, se ha demostrado que es la respuesta inmunitaria de tipo celular la que ejerce el principal mecanismo de defensa durante la toxoplasmosis ovina (Innes y Wastling, 1995; Buxton *et al.*, 2007).

La mayoría de los conocimientos sobre la respuesta inmunitaria adaptativa en la toxoplasmosis ovina proceden de estudios realizados tras la canulación de nódulos linfáticos de ovejas infectadas de manera experimental con *T. gondii* (McColgan *et al.*, 1987; Wastling *et al.*, 1993; Buxton *et al.*, 1994; Innes *et al.*, 1995a, 1995b). De esta manera se ha puesto de manifiesto que la citoquina IFN- γ se detecta en estos órganos desde el día 2 pi hasta el día 9 pi (Innes *et al.*, 1995a). Teniendo en cuenta que a partir del día 6 pi también se detectan células CD4 en esa localización (Innes *et al.*, 1995a) diferentes estudios han sugerido la importancia de esta subpoblación de linfocitos a la hora de controlar la replicación del parásito en la fase inicial de la enfermedad mediante la producción de IFN- γ (Buxton *et al.*, 1994; Innes *et al.*, 1995a, 1995b). Los linfocitos CD4 suponen el tipo celular predominante en los nódulos linfáticos hasta el día 9 pi, pues a partir de ese momento predominan las células CD8 (Innes *et al.*, 1995a), cuya actividad citotóxica fue demostrada *in vitro* por esos mismos investigadores (Innes *et al.*, 1995a). Ese aumento en la población celular de células de tipo CD8 coincide con el momento en el que el parásito deja de detectarse en los

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

nódulos linfáticos (Buxton *et al.*, 1994) y con el descenso en los niveles circulantes de IFN- γ (Innes *et al.*, 1995a; Verhelst *et al.*, 2014) y de IL12 (Verhelst *et al.*, 2014). No obstante, en un estudio posterior en el que se estudió la distribución del parásito y la respuesta inmunitaria periférica entre las 4 y 8 semanas pi de cerdos y ovejas infectados de manera experimental con quistes tisulares de *T. gondii*, se comprobó que los niveles de IFN- γ producidos por las PBMCs ovinas aumentaron desde la segunda semana pi hasta el final del experimento (Verhelst *et al.*, 2015). Este mismo aumento también se había descrito previamente tras la re-estimulación *in vitro* de células mononucleares con Ag de *T. gondii*, como GRA7 (Verhelst *et al.*, 2014). Además de IFN- γ también se incrementó la expresión de IL4 e IL10, pero de manera menos acentuada y con una gran variación entre animales (Verhelst *et al.*, 2015).

En la segunda semana pi comienzan a detectarse Ac específicos frente al parásito, en concreto IgG e IgM, (Blewet *et al.*, 1983; McColgan *et al.*, 1987; Verhelst *et al.*, 2014) lo que indicaría que la respuesta inmunitaria humoral participaría en el control de la infección después de la producción temprana de IFN- γ . Tres semanas después de la infección, las IgM específicas frente al parásito aumentan, como se ha visto en ovejas infectadas de manera experimental con ooquistes esporulados. (Trees *et al.*, 1989) o con quistes tisulares (Verhelst *et al.*, 2015) administrados por vía oral. Dicho aumento en las IgM precede una respuesta mucho mayor caracterizada por la producción de IgG como se ha visto en ovejas infectadas de manera experimental con ooquistes esporulados administrados por vía oral (Trees *et al.*, 1989; Esteban-Redondo e Innes, 1998; Esteban-Redondo *et al.*, 1999) e incluso tras su infección experimental con taquizoítos administrados por vía parenteral (Payne *et al.*, 1988). Estas IgG pueden persistir en la oveja durante meses e incluso durante toda su vida (Dubey, 2009b).

5.5.3. Modulación de la respuesta inmunitaria frente a *T. gondii* durante la gestación.

Durante la gestación, la respuesta inmunitaria materna de los mamíferos sufre una modulación para tolerar la presencia del feto y de este modo evitar el rechazo inmunológico por parte del sistema inmunitario de la madre y asegurar la supervivencia fetal (Morelli *et al.*, 2015). Como consecuencia, la respuesta inmunitaria de las hembras gestantes podría ser diferente a la de aquellas que no lo están y

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

además sufrirían fluctuaciones a medida que la gestación progresa (Denney *et al.*, 2011; Shah *et al.*, 2018).

5.5.3.1. Modulación de la respuesta inmunitaria periférica durante la gestación tras la infección con *T. gondii*.

Se ha demostrado en ratones y en humanos que a medida que la gestación progresa la respuesta inmunitaria materna se modula hacia una de tipo anti-inflamatoria, o de tipo Th2, para así asegurar la viabilidad fetal (Wegmann *et al.*, 1993; Raghupathy, 1997; Reinhard *et al.*, 1998). Asimismo, en estas dos especies se ha comprobado la importancia que ejercen algunas hormonas sexuales como la progesterona en la modulación de la respuesta inmunitaria materna a medida que la gestación progresa (Beagley y Gockel, 2003). En ambas especies la progesterona es esencial para asegurar el transcurso normal de la gestación (Arck *et al.*, 2007; Aisemberg *et al.*, 2013). De hecho, se ha demostrado en modelos murinos que al inhibir los sitios a los que se une esta hormona se producen abortos en esta especie (Winer *et al.*, 2009). Además, a medida que avanza la gestación sus niveles aumentan y como consecuencia de ello se produce un incremento en la expresión de IL anti-inflamatorias, o de tipo Th2, como IL4 (Piccini *et al.*, 2000; Shah *et al.*, 2018). El efecto anti-inflamatorio de esta hormona en ratones gestantes se ha demostrado tanto *in vivo* como *in vitro*, pues actúa disminuyendo los niveles de NO tras la inoculación de los animales gestantes con LPS bacteriano (Aisemberg *et al.*, 2013). También se ha demostrado que la progesterona suprime la actividad citotóxica de las células T de tipo CD8 (Laškarin *et al.*, 2002; Lissauer *et al.*, 2015) y la acción pro-inflamatoria de las citoquinas IFN- γ y TNF- α (Shah *et al.*, 2018).

Esta modulación de la respuesta inmunitaria, observada en personas y ratones, se traduce en cambios en el perfil de las citoquinas producidas tras la infección por *T. gondii*. Se ha observado, por ejemplo, que en las madres predomina una respuesta pro-inflamatoria, principalmente mediada por la producción de IFN- γ e IL12, al principio de la gestación pero que a medida que ésta avanza la respuesta inmunitaria periférica materna desarrollada frente a la infección por el parásito se ve modulada hacia una de tipo Th2, con una elevada producción de IL4 en las últimas etapas de la gestación (Prigione *et al.*, 2006; Rezende-Oliveira *et al.*, 2012). Este extremo también ha sido comprobado en la especie murina evaluando la producción de citoquinas *in*

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

vitro por los esplenocitos tras la infección experimental de ratones gestantes con quistes tisulares del parásito (Thouvenin *et al.*, 1997).

En lo que respecta al ganado ovino, no se ha podido comprobar la existencia clara de una inmunomodulación de la respuesta inmunitaria durante la gestación (Entrican *et al.*, 2015). Por un lado, un estudio donde se compararon los niveles séricos de las citoquinas IFN- γ , de tipo Th1, IL4, de tipo Th2, e IL10, de tipo T_{reg}, tras la estimulación *in vitro* de las PBMCs en ovejas, tanto antes como durante y posteriormente a la gestación, comparándose además con ovejas no gestantes, demostró que los niveles de todas esas citoquinas eran muy similares, independientemente de la existencia de gestación, lo que demostraría que este estado fisiológico no ejerce una modulación de la respuesta inmunitaria periférica materna en esta especie, al menos en las condiciones experimentales de dicho trabajo (Wattegedera *et al.*, 2008). Además, otros estudios previos, desarrollados hace casi treinta años, comprobaron que las hormonas, como la progesterona, parecen no ejercer un efecto modulador de la respuesta inmunitaria (Aiumlamai *et al.*, 1990; Fredriksson *et al.*, 1990).

En ovejas tampoco existe ningún estudio en el que se analice si la respuesta inmunitaria periférica materna se modula durante la gestación como consecuencia de la infección con *T. gondii*. No obstante, esto sí ha sido evaluado recientemente tras la infección experimental de ovejas con taquizoítos de *N. caninum*, un apicomplejo muy relacionado en términos evolutivos con *T. gondii* (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2018), en los tres tercios de gestación (Arranz-Solís *et al.*, 2016). En este estudio se detectaron unos niveles similares tras la infección en los tres tercios de gestación de las citoquinas IFN- γ e IL4, lo que indicaría que, tras la infección de ovejas gestantes con *N. caninum*, no existiría una modulación de la respuesta inmunitaria materna hacia una de tipo Th2, demostrando a la vez que ambas ramas de la respuesta inmunitaria (Th1 y Th2) participan en la patogenia de esta enfermedad. En vacas, tras la infección experimental con este mismo parásito, se ha comprobado que, de forma similar a lo observado en ovejas, ambas ramas, Th1 y Th2, de la respuesta inmunitaria participarían en la respuesta del hospedador frente al parásito y que tampoco parece existir una modulación de la respuesta inmunitaria materna hacia una de tipo Th2 a medida que progresa la gestación (Rosbottom *et al.*, 2007; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014).

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

5.5.3.2. Modulación de la respuesta inmunitaria en la placenta durante la gestación.

La placenta es una localización muy activa inmunológicamente y ejerce un papel clave en el control de diferentes agentes patógenos infecciosos para asegurar la viabilidad fetal y la gestación (Entrican y Wheelhouse, 2006; Fair, 2015). De hecho, se ha demostrado en ratones y humanos que la respuesta inmunitaria local en este tejido varía a lo largo de la gestación (Dealtry *et al.*, 2000) y que las respuestas inmunitarias periférica y local no actúan de la misma manera (Chaouat, 2003). Sin embargo, existen importantes diferencias estructurales y fisiológicas entre las placentas de humanos y ratones en comparación con la de las ovejas que hace que no se puedan extrapolar directamente estos datos.

Las placentas de los mamíferos se clasifican a nivel histológico en cuatro tipos: epitelocorial, sinepitelocorial, endotelocorial y hemocorial (Wattegedera *et al.*, 2019). En concreto, la placenta de los roedores y humanos es de tipo hemocorial: la formación de la placenta es un proceso invasivo, existiendo un contacto directo entre el trofoblasto fetal y la sangre materna, ya que las células fetales invaden las estructuras vasculares maternas. Sin embargo, en rumiantes existe un menor contacto entre los tejidos materno y fetal, ya que la formación de la placenta es un proceso no invasivo, de modo que el epitelio fetal entra en contacto únicamente con el epitelio materno, aunque existe un proceso de fusión el trofoblasto fetal y las células epiteliales de las carúnculas maternas, por lo que la placenta se denomina de tipo sinepiteliocorial. Además, también existen diferencias en cuanto a la estructura macroscópica de la placenta entre estas especies, ya que en ratones y humanos se trata de una placenta discoidal, en la que el corion fetal forma un disco en la zona en la que entra en contacto con el endometrio materno, mientras que la placenta de los rumiantes es cotiledonaria, en la que la vellosidades del corion fetal se agrupan en penachos, denominados cotiledones, que entran en contacto con crecimientos del endometrio materno en forma de copa, denominadas carúnculas (Dantzer y Leiser, 2006).

Además de estas diferencias anatómicas, existen otras a nivel fisiológico. La decidua de la placenta (la parte donde están en contacto las células maternas y fetales) presenta un elevado grado de especialización inmunitaria (Erlebacher, 2013). En la decidua humana y murina abundan los leucocitos y en especial las **células NK**

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

uterinas (uNK) que representan el 60 % del total de la población leucocitaria en esta localización (Veenstra van Nieuwenhoven *et al.*, 2003; Gaynor y Colucci, 2017). Estas células llegan desde la sangre periférica al útero materno, donde interactúan con moléculas de adhesión de los vasos sanguíneos de la decidua y proliferan *in situ* de forma que adquieren un fenotipo distinto al de las células NK circulantes en sangre (Veenstra van Nieuwenhoven *et al.*, 2003). Se ha demostrado que las uNK no atacan el feto debido a que su actividad citolítica es muy baja de manera normal (Erlebacher, 2013) y a que además se unen al complejo MHC I de las células del trofoblasto fetal, no reconociéndoles por tanto como extraños y dañinos para el organismo (Kang *et al.*, 2000). Sin embargo, tienen un importante papel inmunitario ya que se ha demostrado que las células uNK activas producen grandes cantidades de IL10 (Baines *et al.*, 1997). Mientras que en las placentas de ratones y humanos se ha descrito la infiltración de células NK en el útero materno (Croy *et al.*, 2010), en ovejas únicamente se han detectado de manera esporádica en el útero de ovejas no gestantes (Connelley *et al.*, 2011) pero no en el de ovejas gestantes, al menos en la fase final de la gestación (Wattegedera *et al.*, 2019).

Otra diferencia fisiológica hace referencia a la **enzimaIDO**. Esta molécula juega un papel clave en el control de la respuesta inmunitaria en las placentas humana y murina (Shayda *et al.*, 2009; Kudo, 2013). Se ha demostrado su presencia de manera constitutiva en las células del trofoblasto murino (Hönig *et al.*, 2004) y en humanos se expresa en grandes cantidades en la placenta al principio de la gestación e incluso en los momentos previos al parto (Sedlmayr *et al.*, 2014). Tras ser producida por las CPA como las CD, la enzima IDO es capaz de inhibir la proliferación de las células T al degradar el aminoácido L-triptófano, esencial para que suceda dicha proliferación (Moffet y Namboodiri, 2003), controlando de esta manera la actividad citotóxica de las células CD8 (Munn *et al.*, 1998). Sin embargo, aún no se ha podido demostrar la expresión constitutiva de esta enzima en las placentas ovinas, al menos durante la última fase de la gestación (Wattegedera *et al.*, 2019).

Otra de las poblaciones relevantes en la placenta son los **macrófagos**, que representan el 20 % de los leucocitos presentes en este órgano en la especie humana (Erlebacher, 2013) y que también en las ovejas han demostrado tener una presencia notable (Buxton *et al.*, 2002). No obstante, en los ratones se ha observado que su

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

número decrece drásticamente tras la transformación del endometrio en la decidua, en la que no representan una población estable (Brown *et al.*, 2014). Estas diferencias se cree que son debidas a que en la placenta de los ratones existen unos niveles muy bajos de expresión del factor estimulador de macrófagos de tipo 1 (CSF-1) en comparación con los observados en la placenta de humanos (Erlebacher, 2013). Además, se ha demostrado que durante la gestación en humanos los macrófagos evolucionan hacia un fenotipo M2, es decir producen interleuquinas anti-inflamatorias como IL4, en respuesta a la respuesta inflamatoria desarrollada en los primeros momentos tras la infección con agentes patógenos, para poder asegurar la viabilidad fetal (Nagamatsu y Schust, 2010; Li *et al.*, 2016). Al contrario que en ratones, en ovejas se ha demostrado que los macrófagos son muy abundantes en la decidua de la placenta (Buxton *et al.*, 2002; Arranz-Solís *et al.*, 2016), y además representan un subtipo celular muy importante de los infiltrados inflamatorios asociados a la presencia de *N. caninum* lo que sugiere que desempeñan un papel clave en la respuesta inmunitaria a nivel local (Arranz-Solís *et al.*, 2016).

En la decidua humana y murina también predominan las **células T**, especialmente las T_{reg} que juegan un papel decisivo en la modulación de la respuesta inmunitaria de la placenta durante la gestación (Krishnan, 2013; Liu *et al.*, 2014). Su origen puede ser periférico (Allan *et al.*, 2008) y tanto en ratones como en humanos el descenso en su número se ha asociado fallos reproductivos (Saito *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2014). A este respecto, se ha demostrado que la transferencia de T_{reg} procedentes de ratones gestantes reducía el número de abortos observado en otras propensas al mismo (Zenclussen *et al.*, 2006). En ovejas no existe ningún estudio que analice el papel de las células T_{reg} en la modulación de la respuesta inmunitaria en esta localización durante la gestación.

Finalmente, tanto en la placenta de humanos como de ratones (Erlebacher, 2013) y de ovejas (Buxton *et al.*, 2002; Arranz-Solís *et al.*, 2016) las células B son muy escasas y parecen no desempeñar un papel clave en la modulación de la respuesta inmunitaria desarrollada durante el proceso gestante.

Teniendo en cuenta estas diferencias anatómicas y fisiológicas de la placenta de ratones y humanos en comparación con la de rumiantes es lógico asumir que los mecanismos de modulación de la respuesta inmunitaria a nivel local también difieran

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

entre estas especies tras el contacto con agentes patógenos (Entrican y Wheelhouse, 2006). En ratones se ha demostrado que en los primeros momentos de la gestación tras la infección con *T. gondii* se detectan niveles muy elevados de IFN- γ y TNF- α en la placenta, lo que se relaciona con una exacerbada respuesta inflamatoria capaz de controlar la replicación del parásito pero responsable de un elevado porcentaje de abortos (Shiono *et al.*, 2007; Coutinho *et al.*, 2012). No obstante, se ha demostrado que la expresión de dichas citoquinas disminuye considerablemente a medida que la gestación progresa, mientras que la de IL10, inductora de procesos anti-inflamatorios, o la de IL4 se incrementa de manera muy notable lo que contribuiría a la modulación de la respuesta inmunitaria hacia una de tipo Th2 (Lin *et al.*, 1993).

En ovejas no existe ningún trabajo que analice si la respuesta inmunitaria a nivel local en la placenta es modulada a lo largo de la gestación tras la infección de los animales con *T. gondii*. No obstante, este objetivo sí se ha abordado en un estudio experimental de ovejas infectadas con *N. caninum* (Arranz-Solís *et al.*, 2016) y más ampliamente tras infecciones experimentales con este apicomplejo en el ganado vacuno al principio (Rosbottom *et al.*, 2008; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014) y final de la gestación (Rosbottom *et al.*, 2008; Almería *et al.*, 2011). Dada la similitud evolutiva entre *T. gondii* y *N. caninum* (Reid *et al.*, 2012) y entre la anatomía de las placentas bovina y ovina es conveniente analizar los resultados derivados de estos estudios. En la reproducción experimental de la neosporosis ovina se observó que, como consecuencia de la infección, la respuesta inmunitaria en la placenta no era modulada claramente hacia una de tipo Th1 o Th2, sino que, independientemente del momento de gestación en que fueron infectadas, se detectó una gran expresión, medida mediante la técnica molecular de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa (qPCR), de citoquinas pro-inflamatorias (principalmente IFN- γ , aunque también TNF- α e IL12), estimuladoras de células T_{reg} (IL10) y anti-inflamatorias (principalmente IL4) (Arranz-Solís *et al.*, 2016). Resultados muy similares fueron encontrados en las reproducciones experimentales de la neosporosis en el ganado vacuno (Rosbottom *et al.*, 2008; Almería *et al.*, 2011; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014).

Teniendo en cuenta todos estos precedentes, parece lógico pensar que la estructura, tanto macroscópica como histológica, de placenta pueda influir directamente en la

modulación de la respuesta inmunitaria desarrollada en esta localización tras la infección con patógenos.

6. Diagnóstico y control de la toxoplasmosis ovina.

El diagnóstico de la toxoplasmosis en rebaños de ovejas es especialmente importante teniendo en cuenta, como ya se ha señalado, las pérdidas económicas asociadas a esta enfermedad y es, por lo tanto, necesario para establecer medidas de control que reduzcan el porcentaje de animales infectados.

6.1. Diagnóstico clínico.

Las ovejas infectadas con *T. gondii* no muestran **signos clínicos específicos** que permitan sospechar la presencia del parásito en el rebaño, siendo la apatía, anorexia e hipertermia la principal sintomatología descrita en estudios experimentales (Lopes *et al.*, 2009b; Benavides *et al.*, 2011; Dos Santos *et al.*, 2016). En este sentido, el periodo de hipertermia suele desarrollarse durante la primera semana pi coincidiendo con la diseminación del parásito por la circulación sanguínea para poder infectar nuevas células (Innes *et al.*, 2009a). No obstante, tras un segundo contacto con el Ag las ovejas no experimentan un aumento de temperatura, o éste es muy leve (Buxton *et al.*, 1993b; Stanley *et al.*, 2004).

En la toxoplasmosis ovina los abortos pueden asociarse a diferentes presentaciones clínicas. Lo más frecuente es que ocurran en forma de **brotes abortivos**. Esto quiere decir que las ovejas de un mismo rebaño que no ha estado expuesto de manera previa al parásito se suelen infectar de manera casi simultánea, generalmente tras el acceso a una partida de comida contaminada con ooquistes, por lo que la mayoría de ellas aborta en un periodo corto de tiempo. Además, estos abortos son más frecuentes en los animales jóvenes, ya que es más probable que no hayan estado expuestos antes al parásito, y cuyo manejo reproductivo se realice mediante la sincronización o agrupamiento de gestaciones. Por otro lado, los abortos asociados a toxoplasmosis también pueden aparecer en forma de **casos aislados**, o goteo, cuando la infección

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

se produce en un rebaño en el que ya ha habido contactos previos con el parásito, y por tanto hay animales ya protegidos frente a nuevas infecciones, o en rebaños en los que no se agrupan las gestaciones y coexisten tanto ovejas gestantes y no gestantes, y dentro de estas últimas, en diferente estado de gestación (Dubey, 2010).

Como ya se ha indicado anteriormente, las consecuencias clínicas de la infección del feto dependen en gran medida de que la madre se infecte por primera vez durante la gestación y del momento en que se produzca dicha infección. Si ésta ocurre durante el primer tercio, la muerte y reabsorción fetal suelen pasar desapercibidas siendo interpretadas erróneamente por el ganadero como un problema de infertilidad (Pereira-Bueno *et al.*, 2005). Los abortos asociados a la infección en el segundo tercio de gestación son habituales, estando en ocasiones acompañados de la presencia de fetos momificados o en estado de descomposición (Buxton, 1998), hallazgo que representa una clara sospecha de aborto provocado por la infección con *T. gondii*. Si la infección ocurre al final de la gestación no suelen producirse manifestaciones clínicas evidentes ya que, aunque infectados y en muchos casos débiles, los corderos que nacen son viables (Buxton *et al.*, 2007).

En aquellos casos en los que se produzca el aborto, el **examen macroscópico de la placenta** es de gran utilidad en el diagnóstico de la toxoplasmosis ovina, pues la multiplicación en ella del parásito origina focos de necrosis en los cotiledones que en ocasiones son visibles a simple vista como pequeños puntos blanquecinos (Dubey, 2010). Estos focos suelen aparecer tras la infección al final de la gestación, siendo poco frecuente cuando esta sucede en los primeros estadios (Buxton, 1998). En el feto no se observan lesiones macroscópicas que permitan una orientación del diagnóstico de toxoplasmosis.

6.2. Diagnóstico laboratorial.

El estudio en el laboratorio del feto completo con la placenta y una muestra de suero materno constituye el procedimiento más apropiado para el diagnóstico exitoso de la toxoplasmosis ovina (Pereira-Bueno *et al.*, 2005). No obstante, es frecuente que la placenta se omita para su remisión, por lo que en la mayoría de las ocasiones el diagnóstico se realiza teniendo en cuenta las lesiones, o la identificación de ADN parasitario, en el sistema nervioso del feto (O'Donovan *et al.*, 2012).

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

Después de haber concluido el examen macroscópico de la placenta y del feto es conveniente recoger muestras adecuadas para su posterior análisis. En concreto, se recomienda seleccionar al menos dos cotiledones placentarios y diferentes muestras de tejido fetal, en especial pulmones y encéfalo (Gutierrez *et al.*, 2010), para su conservación en formol tamponado y posterior estudio histopatológico y de detección de ADN parasitario. Asimismo, es aconsejable la extracción de suero fetal y/o fluidos corporales para su análisis serológico (Pereira-Bueno *et al.*, 2005). No obstante, ninguna prueba por sí sola permite identificar al parásito como causa de fallo reproductivo en el ganado ovino, por lo que se recomienda basar éste en la realización de diferentes técnicas laboratoriales (Liu *et al.*, 2014; Pereira-Bueno *et al.*, 2004).

6.2.1. Análisis serológicos.

La toma de muestras de sangre en el animal vivo para la posterior detección de Ac específicos frente a *T. gondii* constituye uno de los métodos de diagnóstico más frecuentes de la toxoplasmosis ovina, ya que la toma de muestras serológicas de los animales es muy sencilla y los resultados se obtienen de manera relativamente rápida, siendo además una técnica económicamente accesible para la gran mayoría de ganaderos. En los rumiantes, los Ac maternos no pueden atravesar la placenta para proteger al feto de agentes infecciosos (Sammin *et al.*, 2009) y se ha demostrado que los fetos ovinos adquieren inmunocompetencia a partir de los 66 dg (Silverstein *et al.*, 1963), por lo que la identificación de Ac específicos en los fluidos fetales es considerada como una de las pruebas más fiables de la existencia de infección reciente.

El diagnóstico *in vivo* de la toxoplasmosis ovina se realiza mediante el análisis de la respuesta inmunitaria humoral (suero materno principalmente) y celular. El estudio de la respuesta inmunitaria humoral valora la producción de Ac específicos frente a *T. gondii*. Para su análisis, se recogen **muestras de suero materno**, donde se valoran los niveles de Ig específicas frente al parásito. Las IgM pueden detectarse una semana después de que el animal haya contraído la infección, son las primeras en aparecer, pero al igual que las IgG específicas frente a *T. gondii*, una vez el animal ha sido infectado, se pueden detectar en el suero materno durante años, por lo que su presencia indica que el animal ha estado expuesto al parásito, pero no necesariamente el momento en que ha contraído la infección (Liu *et al.*, 2015). Este

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

hecho hace que el análisis serológico sea tremendamente útil a la hora de diagnosticar rápidamente qué animales están infectados con toxoplasma, pero a la vez supone un claro problema al no poder determinar si la infección ha ocurrido de manera reciente o no. La toma de dos muestras consecutivas de suero, con una diferencia de dos o tres semanas, y su posterior titulación permitiría identificar infecciones recientes que se asocian a títulos altos (Dubey, 2010).

Otra muestra que se puede utilizar es el **suero sanguíneo precalostral** del cordero o el **líquido torácico fetal** en caso de aborto. No obstante, un resultado serológico negativo en estas muestras no es indicativo de que el feto no esté infectado, pudiendo deberse bien a que la especificidad de la técnica es baja o a que el sistema inmunitario del feto aún no se hubiera desarrollado en el momento de la infección y, por tanto, no fuese capaz de producir Ac.

Existen diferentes técnicas serológicas para detectar la presencia de Ac específicos frente a *T. gondii*. Las más frecuentemente empleadas en la especie ovina son las **IFAT** (Hecker *et al.*, 2013, 2018), y **ELISA** indirecto (Hiszczyńska-Sawicka *et al.*, 2011; Verhelst *et al.*, 2014). En la primera prueba, se incuban taquizoítos muertos de *T. gondii* con el suero problema tras lo cual se añade el Ac específico frente al parásito unido a un fluorocromo y el resultado se observa bajo la luz de un microscopio de fluorescencia (Liu *et al.*, 2015). En la técnica de ELISA indirecto los micropocillos de cada placa se tapizan con Ag parasitario a los que se añaden posteriormente los sueros a testar y proteína G a continuación (Hiszczyńska-Sawicka *et al.*, 2011). Ambas técnicas tienen una alta sensibilidad y especificidad (Pereira-Bueno *et al.*, 2004).

El **test de liberación de IFN- γ** es la prueba inmunológica *in vitro* más empleada para estudiar la respuesta inmunitaria periférica celular. Presenta una mayor complejidad técnica y un coste económico más elevado que el ELISA indirecto. Debido a esto, y a que no aporta información adicional de importancia de cara al diagnóstico de la enfermedad su uso se restringe exclusivamente al ámbito de la investigación. Esta prueba se basa en la valoración de la producción de IFN- γ por los linfocitos previamente sensibilizados presentes en la sangre o en tejidos linfoides (como nódulos linfáticos), tras un segundo contacto con el Ag parasitario (Hiszczyńska-Sawicka *et al.*, 2011; Verhelst *et al.*, 2014).

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

*6.2.2. Aislamiento de *T. gondii*.*

Este es un procedimiento que también se emplea exclusivamente en estudios de carácter experimental, por su complejidad y coste económico. Para ello, se digieren con tripsina fragmentos tisulares procedentes de animales infectados con *T. gondii* y se inoculan en ratones, generalmente por vía intraperitoneal, para posteriormente realizar la eutanasia de los animales y examinar su cerebro en busca de quistes tisulares, que suelen aparecer a las 6-8 semanas pi, lo que indicaría su infección con el parásito, o bien analizar su suero sanguíneo para comprobar la seroconversión frente al parásito (Rêgo *et al.*, 2017). Para conseguir aislar el parásito se recomienda utilizar ratones knockout (KO) para IFN- γ debido a la alta susceptibilidad de estos animales a la infección con *T. gondii* (Liu *et al.*, 2015).

6.2.3. Estudio histológicos e inmunohistoquímicos.

Los estudios histológicos de las muestras sospechosas de aborto por *T. gondii* en el ganado ovino se realizan mediante la técnica histológica convencional y tinción de las secciones tisulares con **hematoxilina-eosina (HE)**. Las lesiones histológicas características, tanto en estudios experimentales como en casos de infección natural con *T. gondii*, se encuentran en la placenta y en el feto y son más extensas y de mayor gravedad cuando la infección ocurre en el segundo tercio de gestación (Buxton y Finlayson, 1986).

Las placentas procedentes de ovejas infectadas con el parásito suelen presentar múltiples focos de necrosis en los cotiledones, donde el infiltrado inflamatorio es escaso y, de estar presente, está constituido por linfocitos y macrófagos (Buxton y Finlayson, 1986). En el feto las lesiones histológicas características suelen encontrarse en el encéfalo y en menor medida en el corazón, pulmones e hígado (O'Donovan *et al.*, 2012). También se ha descrito la leucomalacia como una lesión fetal frecuente en las últimas etapas de la gestación, causada por las alteraciones vasculares y el fallo en el intercambio gaseoso en la placenta asociados a la multiplicación del parásito en este órgano (Buxton, 1990).

La visualización de los quistes intracelulares de *T. gondii* en tejidos de animales infectados es difícil de realizar mediante técnicas histológicas convencionales. Sin embargo, los **métodos inmunohistoquímicos** permiten identificar de manera específica la presencia de Ag parasitario en las muestras de tejido y además también

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

estudiar su asociación con las posibles lesiones encontradas (Gontijo da Silva *et al.*, 2015). Para ello, se emplean Ac monoclonales o policlonales específicos y se pone de manifiesto la unión Ag-Ac mediante el empleo de conjugados inmunoenzimáticos, como la avidina-biotina o polímeros marcados con enzimas (Uggla *et al.*, 1987).

Cabe destacar que el estudio histológico es, por el momento, el único método capaz de diagnosticar los **abortos tempranos** ocurridos a las pocas semanas tras la infección. Como ya se ha indicado anteriormente, esta presentación clínica está asociada a la aparición de abortos poco después de producirse la infección, entre 1 y 2 semanas, cuando en la mayoría de los casos aún no ha dado tiempo a que el parásito invada la placenta ni a que aparezcan Ac específicos detectables en la sangre, lo que dificulta su diagnóstico (Trees *et al.*, 1989; Owen *et al.*, 1998). Sin embargo, sí que se pueden encontrar lesiones que permiten orientar el diagnóstico y sospechar sobre la causa del aborto. La identificación de trombosis e infartos en la placenta, junto a áreas de leucomalacia en el encéfalo fetal, y en ausencia de lesiones o resultados analíticos indicativos de otras causas de aborto, son sugerentes de una infección reciente por *T. gondii* como causa de aborto (Castaño *et al.*, 2014; Sánchez-Sánchez *et al.*, 2019).

6.2.4. Estudios moleculares: PCR.

Aunque los métodos descritos hasta el momento constituyen una buena herramienta para el diagnóstico de la toxoplasmosis ovina, la identificación de *T. gondii* como causa del aborto puede estar condicionada por algunos factores (nivel de infección, respuesta inmunitaria del hospedador en el momento de recogida de muestras serológicas, tipo y estado de conservación del tejido examinado, etc.), lo que hace que las técnicas indicadas anteriormente puedan ofrecer valores bajos de sensibilidad o especificidad.

Las técnicas basadas en la biología molecular, como la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR, han permitido desarrollar métodos de diagnóstico con una alta sensibilidad para la detección de ADN parasitario en muestras de animales infectados tanto de forma natural (Hurtado *et al.*, 2001; Gutierrez *et al.*, 2012) como experimental (Gutierrez *et al.*, 2010; Mason *et al.*, 2010). Este procedimiento permite identificar y también cuantificar fragmentos genéticos específicos de *T. gondii* como el elemento repetitivo de 529 pares de bases (pb) (nº de secuencia AF146527 en

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

GenBank) (Homan *et al.*, 2000), el gen B1 (Wastling *et al.*, 1993), cuyo nº de secuencia en GenBank es AF179871, o el espaciador interno transcrito 1 (ITS-1) (Hurtado *et al.*, 2001; Rouatbi *et al.*, 2016), con nº de secuencia en GenBank es AY14314. A este respecto se ha demostrado que, utilizando una secuencia concreta, el nº de secuencia AF487550 en GenBank, de 404 pb, que se encuentra dentro del fragmento de 529 pb, la sensibilidad de la técnica es entre 10 y 100 veces mayor en comparación con el gen B1 (Reischl *et al.*, 2003). La idoneidad de utilizar esta secuencia en los estudios de PCR ha sido demostrada ampliamente en estudios posteriores (Cassaing *et al.*, 2006; Menotti *et al.*, 2010). Actualmente se utiliza la qPCR, que presenta una mayor sensibilidad que la qPCR convencional (Gutierrez *et al.*, 2012). En ella el producto amplificado en cada ciclo se mide y cuantifica utilizando para ello una concentración estándar conocida (Liu *et al.*, 2015).

Al igual que sucedía con las otras pruebas de diagnóstico explicadas, un resultado negativo en la PCR no implica necesariamente la ausencia de ADN parasitario en el tejido y puede ser debido a que la carga parasitaria existente sea inferior al límite de detección de la PCR (Verhelst *et al.*, 2014) o a que la muestra empleada (generalmente placenta y encéfalo fetal) no esté bien conservada. Por todo ello, lo aconsejable para diagnosticar la toxoplasmosis en el ganado ovino es utilizar diferentes pruebas lo que evita las desventajas de cada una de ellas y permite obtener un resultado mucho más fiable (Pereira-Bueno *et al.*, 2004).

6.3. Prevención y tratamiento de la toxoplasmosis ovina.

El establecimiento de una serie de medidas encaminadas a tratar la infección por *T. gondii* o a controlar la expansión del parásito en el rebaño de ovejas y evitar así la infección de nuevos animales se hace necesario para intentar disminuir las repercusiones económicas negativas de la toxoplasmosis.

El **tratamiento medicamentoso** solamente es efectivo durante la fase de parasitemia, de modo que no es útil una vez que el parásito ha colonizado los tejidos del animal y se ha enquistado (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2018). Además, los medicamentos deben administrarse durante toda la gestación para conseguir una mayor eficacia. Uno de los que mejores resultados ha dado en reproducciones experimentales de la infección en ovejas gestantes es el decoquinato (Buxton *et al.*, 1996). Tras infectar con 200 ooquistes esporulados del aislado M3 de *T. gondii* a ovejas a los 90 dg, se les

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

administró una dosis de 1 y 2 miligramos (mg) de decoquinato por kilogramo (kg) de peso junto al pienso durante un periodo de 10 días (Buxton *et al.*, 1996). En este estudio se demostró que empleando la dosis de 2 mg de decoquinato por kg de peso se redujo la respuesta febril desarrollada en los animales infectados y además desarrollaron Ac específicos frente al parásito de manera más temprana que los que no recibieron tratamiento. Además, la administración de decoquinato también redujo el daño causado por el parásito en la placenta y aumentó el peso de los corderos al nacer (Buxton *et al.*, 1996). Su mecanismo de acción ha sido investigado en la coccidiosis ovina y bovina, donde se emplea habitualmente (Taylor y Bartram, 2012) y consiste en interferir con la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias de los coccidios, lo que impide que puedan respirar (Lindsay *et al.*, 1998). En España este producto se comercializa como ayuda a la prevención de abortos y muertes perinatales debido a toxoplasmosis mediante la medicación del pienso de ovejas.

Otro medicamento empleado con éxito también en estudios experimentales es la monensina (Buxton *et al.*, 1987; 1988). En estos estudios, tras infectar con 100 quistes tisulares del aislado M1 de *T. gondii* a ovejas a los 90 dg, se les administró una dosis de 15 mg de monensina diaria junto al pienso hasta el momento del parto (Buxton *et al.*, 1987). De manera similar al decoquinato, la monensina es útil a la hora de reducir el periodo febril en las ovejas gestantes infectadas, así como las lesiones histológicas en la placenta (Buxton *et al.*, 1988) y se consiguió también un aumento del 43 % de supervivencia fetal en las 72 primeras horas de vida (Buxton *et al.*, 1987). Sin embargo, a pesar de su eficiencia se ha documentado que resulta tóxico si se emplea en dosis elevadas (Buxton *et al.*, 1996), por lo que no se recomienda su uso. También se ha demostrado que puede prevenir la eliminación de ooquistes del parásito en las heces de los gatos (Frenkel y Smith, 1982), aunque para que sea efectivo debe administrarse de manera continua durante toda la vida del gato, por lo que realmente no es práctico ni rentable.

Otros medicamentos empleados con éxito en la toxoplasmosis ovina experimental son la espiamicina, pirimetamina o sulfadimidina (Buxton *et al.*, 1993a; Sánchez-Sánchez *et al.*, 2018), aunque su uso veterinario en el mundo ganadero es más escaso. En infecciones naturales sí es más frecuente el uso de la sulfonamida para reducir el porcentaje de abortos asociados a *T. gondii* (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2018), así como

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

de toltrazuril, un medicamento anticoccidiósico, que es capaz de reducir los quistes tisulares en corderos congénitamente infectados (Kul *et al.*, 2013).

En la actualidad se están probando **nuevos fármacos** para el tratamiento de la toxoplasmosis en el ganado ovino, muchos de ellos derivados de estudios *in vitro* en los que se prueba su eficacia frente a otros patógenos como *Plasmodium*, *Trypanosoma* o *Leishmania*, pues tienen un amplio espectro de actividad anti-parasitaria (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2018). No obstante, todos ellos tienen una menor eficacia frente a *T. gondii* (Guiguemde *et al.*, 2010), lo que parece sugerir que el desarrollo de nuevos fármacos frente a la toxoplasmosis ovina es un campo de estudio aún en desarrollo. También se han probado con éxito frente *T. gondii* **tiazolidas**, como el fármaco RM4847 (Müller *et al.*, 2009), y **diamidinas**, como arilimidamidas dicatiónicas (Kropf *et al.*, 2012). Los fármacos que han demostrado tener una mayor actividad anti-*T. gondii* en estudios *in vitro* son aquellos derivados de la familia de las **artemisininas** (Gomes *et al.*, 2012). En la especie murina, se ha comprobado que las **naftoquinonas** son efectivas para el tratamiento de la toxoplasmosis tanto en su fase aguda (Romand *et al.*, 1993) como crónica (Ferguson *et al.*, 1994). Asimismo, algunos medicamentos anticancerosos como la **miltefosina** reducen la cantidad de quistes tisulares en el cerebro de ratones infectados con el parásito durante la fase crónica de la enfermedad, así como las lesiones propias de la infección (Eissa *et al.*, 2015). También se ha demostrado que algunas **quinolonas** son efectivas para controlar la infección experimental con *T. gondii* en ratones, pues reducen la formación de quistes tisulares al interactuar con el citocromo bc₁ del parásito (Doggett *et al.*, 2012). Finalmente, algunos **inhibidores de la proteína kinasa dependientes de calcio** parecen ser efectivos a la hora de prevenir la transmisión vertical de *T. gondii* en ratones infectados de manera experimental con el parásito (Müller *et al.*, 2017).

Las medidas de **prevención** más habituales son de tipo higiénico-sanitarias, impidiendo que las ovejas, en especial las gestantes, puedan tener ningún tipo de contacto con alimento o agua contaminados con heces de gato infectado, pues ésta es la principal vía de contagio en el ganado ovino (Pappas *et al.*, 2009). Esto es sumamente complejo en el caso de las explotaciones de ovino en régimen extensivo, debido a la imposibilidad de controlar lo que comen los animales. En las explotaciones intensivas, una posible solución sería eliminar los gatos de ellas o impedir que

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

podieran acceder a las instalaciones donde se encuentran las ovejas. Sin embargo, esto tampoco parece evitar la infección porque la población de ratones aumentaría, al no existir en el ambiente un depredador, y se ha demostrado que estos pueden actuar como reservorios del parásito sin que sea necesaria la intervención de ningún agente externo (Benavides, 2018). También se ha documentado la existencia de lotes de comida adquiridos fuera de la explotación y contaminados con ooquistes de *T. gondii*, por lo que, en función del método empleado para dar de comer a los animales, se puede expandir de forma involuntaria la infección por todo el rebaño (Benavides, 2018). Otra medida de control muy eficaz es la eliminación, ya sea por enterramiento o incineración, de los ratones muertos o de los fetos abortados o de las placentas para evitar la propagación del parásito (Shaapan, 2016; Sánchez-Sánchez *et al.*, 2018). También se ha sugerido la utilidad de comprobar que los machos no estén infectados antes de llevar a cabo su manejo con fines reproductivos por la posibilidad que existe de transmitir el parásito a través de su semen (Lopes *et al.*, 2013). No obstante, dado que la vía sexual es una forma excepcionalmente rara de transmisión de la toxoplasmosis en ovinos, la relevancia de esta medida de control es menor que las mencionadas previamente.

La otra estrategia empleada para prevenir la infección por *T. gondii* en el ganado ovino es la **vacunación** (Innes *et al.*, 2007). Sus dos objetivos principales son prevenir o reducir la transmisión congénita de la enfermedad y prevenir o reducir la formación de quistes tisulares en los animales infectados (Innes *et al.*, 2019). Además, se ha demostrado en estudios de campo que la fertilidad de los animales vacunados es muy similar a la de los animales no infectados y muy superior a la de los animales que no estaban vacunados (Buxton *et al.*, 1991).

Actualmente, existe una única vacuna comercial frente a la toxoplasmosis en el ganado ovino (Ovilis® Toxovax, Intervet). Es una vacuna viva atenuada obtenida a partir de taquizoítos aislados de un cordero abortado en Nueva Zelanda en 1988 (O'Connell *et al.*, 1988) tras la infección natural con *T. gondii* y que ha sido sometida a sucesivos pases en el laboratorio, lo que ha hecho que dichos taquizoítos sean incapaces de diferenciarse a bradizoítos u ooquistes (Katzner *et al.*, 2014). A esa cepa incompleta de *T. gondii* obtenida en el laboratorio se le denomina S48 y se ha demostrado su eficacia en la prevención del aborto en el ganado ovino (Buxton e

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

Innes, 1995) durante un periodo mínimo de 18 meses (Buxton *et al.*, 1993b). En concreto, esta vacuna es muy efectiva ya que evita que el parásito complete su ciclo vital, induciendo una respuesta inmunitaria de memoria (Innes *et al.*, 2011), aunque su principal inconveniente, al tratarse de una vacuna viva, es su peligrosidad a la hora de su manejo. En su uso veterinario normal se recomienda utilizar la vacuna al menos 3 semanas antes de la cubrición de las ovejas y, dado que se trata de una vacuna viva, es muy aconsejable administrarla en el tiempo indicado por el laboratorio que la produce ya que en caso contrario los taquizoítos no serán viables y por tanto no resultarán efectivos para que las ovejas adquieran inmunidad frente a la infección (Innes *et al.*, 2019). Actualmente esta vacuna sólo se comercializa en Gran Bretaña, Irlanda, Francia y Nueva Zelanda (Innes *et al.*, 2019).

La utilización de vacunas muertas frente a la toxoplasmosis ovina no parece ser un método de control eficaz (Innes *et al.*, 2019) ya que no estimulan de manera tan efectiva la respuesta inmunitaria celular en los animales a los que se les administra en comparación con las vacunas vivas (Innes *et al.*, 2011). En este sentido, se demostró en dos estudios experimentales desarrollados hace más de treinta años que la administración de una vacuna muerta consistente en una preparación de taquizoítos del parásito no protegía a los animales frente a nuevas infecciones (Beverley *et al.*, 1971; Wilkins *et al.*, 1987).

Otra estrategia empleada frente a la infección por *T. gondii* en ovejas es el uso de complejos inmunoestimuladores (ISCOM, por sus siglas en inglés), unas partículas de 30-40 nanómetros (nm) que contienen saponinas a las que se incorporan Ag de membrana del parásito (Innes *et al.*, 2019). Sin embargo, su eficacia a la hora de prevenir la infección y posterior transmisión del parásito a la descendencia es muy baja (Buxton *et al.*, 1989), por lo que apenas se usan en la actualidad (Innes *et al.*, 2019).

También se han empleado vacunas de ADN, elaboradas tras la inserción de ADN del parásito en un plásmido que se inyecta en los animales para inducir en ellos una respuesta inmunitaria efectiva frente a *T. gondii* (Innes *et al.*, 2019). No obstante, al tratarse de vacunas que emplean ADN del parásito su manejo resulta peligroso. Un estudio experimental desarrollado hace pocos años demostró la utilidad de administrar por vía intramuscular una vacuna viva con Ag procedente de cuatro proteínas densas

Capítulo I. Toxoplasmosis ovina: Revisión bibliográfica.

granulares distintas de *T. gondii* (GRA1, GR4, GRA6 y GRA7), pues conseguía inducir en los animales una respuesta inmunitaria humoral efectiva, así como una elevada producción de IFN- γ (Hiszczyńska-Sawicka *et al.*, 2011). No obstante, en este estudio no se evaluó la eficacia de la vacuna frente a futuras infecciones (Innes *et al.*, 2019).

En conjunto, estos resultados ponen de manifiesto que para evitar las pérdidas económicas asociadas a la toxoplasmosis en el sector ovino la vacunación es un método muy eficaz. Pero para poder desarrollar vacunas que ofrezcan una protección adecuada a los animales es necesario conocer muy bien los aspectos epidemiológicos de la enfermedad, el ciclo de vida del parásito, las posibles rutas de transmisión y sobre todo las bases de la respuesta inmunitaria desarrollada en ovejas para hacer frente a la infección por toxoplasma, aspectos que se van a abordar en los trabajos que conforman esta Tesis Doctoral.

Capítulo II.

Justificación y objetivos.

Justificación y objetivos.

La toxoplasmosis ovina es una enfermedad infecto-contagiosa que ocasiona importantes pérdidas económicas en el sector ovino asociadas a problemas reproductivos, principalmente infertilidad, abortos y muerte perinatal tras la infección de hembras gestantes con el parásito *T. gondii*. Se han propuesto medidas de control, que tratan de impedir el contagio de nuevos animales, y únicamente existe una vacuna comercial, viva, que, aunque útil, presenta inconvenientes de empleo. El desarrollo de nuevos tratamientos o vacunas está lastrado porque, a pesar de la importancia de esta enfermedad, aún se desconocen gran parte de sus mecanismos patogénicos (Tait y Hunter, 2009).

El **planteamiento** general de esta Tesis Doctoral se enmarca dentro de la línea de investigación sobre la patogenia de la toxoplasmosis que lleva a cabo el grupo de trabajo donde se ha realizado. Dicho grupo cuenta con amplia experiencia en el estudio de la respuesta inmunitaria de rumiantes frente a enfermedades infecciosas causadas por patógenos intracelulares, principalmente la paratuberculosis y toxoplasmosis.

En un estudio desarrollado hace ya más de treinta años en el que se infectaron experimentalmente con el parásito ovejas gestantes en el primer y segundo tercio de gestación se demostró que existe una clara influencia entre el momento de infección y sus consecuencias (patología fetal y de placenta) de forma que son más graves cuando la infección tiene lugar a mitad de la gestación (Buxton y Finlayson, 1986). Sin embargo, desde la publicación de dicho estudio no se ha realizado ningún trabajo en el que se analicen los mecanismos patogénicos que explicarían esas diferencias. Uno de ellos podría ser la respuesta inmunitaria tanto materna como fetal, y las variaciones que ésta sufre. Se ha demostrado que dicha respuesta, especialmente la de tipo celular, desempeña un papel clave a la hora de controlar la progresión de la toxoplasmosis ovina (Buxton *et al.*, 1993b; Innes *et al.*, 2009a). En este sentido, se ha comprobado, en modelos experimentales murinos, que la respuesta inmunitaria materna es modulada a lo largo de la gestación hacia una de tipo Th2 para asegurar la viabilidad fetal (Krishnan *et al.*, 2013). Además, el sistema inmunitario del feto

Justificación y objetivos.

madura a medida que progresa la gestación (Innes y Vermeulen, 2006). En la especie ovina, sin embargo, los estudios sobre este aspecto son escasos. A pesar de que la respuesta inmunitaria periférica en la toxoplasmosis ovina ha sido analizada en profundidad, se desconoce cuál sería su papel en la transmisión del parásito al feto y la aparición o no de abortos. A este respecto, la mayor parte del conocimiento sobre los procesos inmunológicos que ocurren en madres gestantes infectadas con *T. gondii* proviene de modelos murinos. Lamentablemente, las diferencias entre ambas especies en la estructura de la placenta, duración de la gestación o en el propio sistema inmunitario (Krishnan *et al.*, 2013), además de la variabilidad genética de las ovejas frente a las estirpes de ratones empleadas en laboratorios, impiden que estos resultados puedan extrapolarse directamente a la especie ovina (Entrican *et al.*, 2010). El estudio de dichos factores podría contribuir a elucidar algunos de los interrogantes que aún hoy existen sobre la patogenia de la enfermedad. Teniendo en cuenta lo anterior, la *hipótesis* de este trabajo es que la respuesta inmunitaria, tanto fetal como materna, desarrollada frente a la infección por *T. gondii* determinaría el resultado de la infección y que el estado de gestación influiría en dicha respuesta inmunitaria. Por todo ello, el **objetivo general** de esta Tesis Doctoral es **estudiar la influencia del periodo de gestación en distintos aspectos de la patogenia de la toxoplasmosis ovina, principalmente en la respuesta inmunitaria materna y fetal, con especial interés sobre aquella que se desarrolla en la placenta, desencadenada tras la infección experimental por *T. gondii* en ovejas, así como la relación existente entre dicha respuesta inmunitaria y la invasión de la placenta por parte del parásito.**

Como ya se ha explicado, estudios previos indican que existe correlación entre el momento de gestación en que se produce la infección de las ovejas y las consecuencias clínicas de la toxoplasmosis ovina. Parece claro que la aparición de abortos es más frecuente cuando la infección sucede en etapas tempranas de la gestación (Buxton y Finlayson, 1986). Sin embargo, apenas se han realizado nuevos estudios para conocer cómo influye el momento de gestación en muchos otros aspectos de la toxoplasmosis ovina. En este mismo estudio se demostró que las lesiones características de la enfermedad son focos de necrosis tanto en la placenta como en órganos fetales y que éstas son de mayor gravedad cuando la infección ocurre a mitad de la gestación (Buxton y Finlayson, 1986). Aunque de gran utilidad en

Justificación y objetivos.

el conocimiento de la enfermedad, se desconoce cuál es la relación entre la patogenia de estas lesiones y la presencia de *T. gondii* en los tejidos del hospedador. En este sentido, se ha demostrado que existe una fuerte correlación entre la cantidad de ADN parasitario y la gravedad de las lesiones encontradas tanto en tejidos maternos como fetales cuando la infección por *T. gondii* tiene lugar en el segundo tercio de gestación (Gutierrez *et al.*, 2010). No obstante, existe un total desconocimiento sobre si estos hallazgos serían similares si la infección de las ovejas gestantes sucediera en otros momentos de la gestación diferentes a los de dicho estudio o si por el contrario existirían diferencias en la cantidad del parásito y gravedad de las lesiones en los diferentes tercios de gestación. De este modo, el **primer objetivo** planteado fue **analizar cómo influye el tercio de gestación en el que se produce la infección de las hembras por *T. gondii* en la presentación clínica de la toxoplasmosis, la distribución de las lesiones, tanto en la placenta como en las vísceras fetales, así como en la carga del parásito en los tejidos de los animales infectados.**

Tras la infección por el parásito, el hospedador desarrolla una respuesta inmunitaria tanto innata como adquirida. Respecto a esta última, se conoce que, a pesar que *T. gondii* induce una respuesta inmunitaria periférica tanto humoral como celular, es esta última la principal responsable de controlar su multiplicación (Buxton e Innes, 1995; Buxton, 1998). Sin embargo, aún se desconoce si la respuesta inmunitaria desarrollada a nivel local guarda relación con la periférica, ni qué otras citoquinas, además del IFN- γ , pueden participar en la patogenia de esta enfermedad. Es más, la mayoría de los estudios llevados a cabo a este respecto en ovejas se han realizado en cultivos celulares *ex vivo* o en modelos experimentales no gestantes (Oura *et al.*, 1993; Buxton *et al.*, 1994; Innes *et al.*, 1995a), lo que podría no ser representativo de la respuesta del hospedador frente a la infección durante la gestación. Por otra parte, es un hecho conocido que la gestación es un proceso complejo en el que, entre otros fenómenos, se produce la presencia de tejidos con un fondo genético propio (fetales) dentro del organismo de la madre, lo que supone un desafío a la respuesta inmunitaria materna. Para explicar la ausencia de un rechazo inmunológico por parte de la madre hacia los tejidos fetales, se ha propuesto que en la placenta tienen lugar una serie de mecanismos inmunomoduladores durante la gestación (Medawar, 1953), lo cual podría influir notablemente en la respuesta de la hembra gestante frente a la infección por *T. gondii*. El número de estudios que abordan este aspecto en ovejas es muy

Justificación y objetivos.

limitado, y la mayor parte de la información sobre la influencia de la gestación en la respuesta inmunitaria proviene de modelos murinos (Entrican, 2002; Tait y Hunter, 2009). En estos modelos, de carácter experimental, se ha sugerido que a medida que avanza la gestación predominaría una respuesta inmunitaria local en la placenta de tipo Th2, y por tanto con un gran predominio de citoquinas anti-inflamatorias que evitarían el desarrollo de una respuesta agresiva frente al feto (Wegmann *et al.*, 1993; Krishnan *et al.*, 2013). En cambio, este fenómeno no ha podido ser comprobado en ovinos; de hecho, los pocos estudios desarrollados en esta especie sobre este aspecto no han encontrado diferencias en la secreción de citoquinas anti- y pro-inflamatorias entre ovejas gestantes y no gestantes (Mcclure *et al.*, 2005; Wattedgedera *et al.*, 2008). Por todo ello, el **segundo objetivo** de este trabajo fue **analizar cómo evoluciona la respuesta inmunitaria, tanto a nivel periférico como local, en ovejas tras su infección experimental con *T. gondii* en los tres tercios de gestación, evaluando el papel desempeñado por las citoquinas de tipo Th1 y Th2.**

La placenta ovina supone una barrera de separación entre la madre gestante y el feto y en esta localización se ha comprobado que se ejerce un importante control inmunológico de algunas infecciones por apicomplejos (Gibney *et al.*, 2008). En este sentido, se ha sugerido que la infección de ovinos con patógenos asociados a fallo reproductivo desencadenaría una serie de mecanismos inmunológicos en la placenta con el objetivo de combatir la infección, lo que podría desembocar colateralmente en la expulsión del feto (Entrican, 2002; Quinn *et al.*, 2002). Se ha comprobado que los abortos ocurridos como consecuencia de la toxoplasmosis ovina están relacionados con la aparición de focos necróticos e infiltrados inflamatorios no purulentos, formados principalmente por linfocitos y macrófagos, en la placenta, independientemente del momento de gestación en que se produjo la infección (Buxton y Finlayson, 1986; Buxton *et al.*, 2007). En el caso de los abortos tempranos, las lesiones son diferentes a las descritas clásicamente asociadas a la enfermedad, pues consisten en trombosis placentaria y leucomalacia periventricular fetal (Castaño *et al.*, 2014). Como ya se ha explicado, dentro de los linfocitos y los macrófagos, existen distintas subpoblaciones celulares con funciones diferentes. En el caso de la toxoplasmosis ovina no se conoce cuáles son las poblaciones específicas de células inflamatorias que constituyen dichos infiltrados, y su posible relación con la distribución del parásito en este tejido. Así, el

Justificación y objetivos.

tercer objetivo fue **caracterizar mediante técnicas inmunohistoquímicas las poblaciones celulares que intervienen en la respuesta inmunitaria desarrollada en la placenta de ovejas gestantes infectadas experimentalmente con *T. gondii*, analizando su posible relación con la distribución del parásito en este tejido.**

Para la realización de todos estos estudios se han empleado muestras de suero y de tejidos procedentes todos ellos de una misma infección experimental en ovejas gestantes, tras la inoculación oral de los animales con 50 ooquistes esporulados del aislado M4 de *T. gondii* en los tres tercios de gestación.

Capítulo III.

Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.

Trabajo publicado en el año 2016 en la revista *Veterinary Research*.

Castaño P, Fuertes M, Regidor-Cerrillo J, Ferre I, Fernández M, Ferreras MC, Moreno-Gonzalo J, González-Lanza C, Pereira-Bueno J, Katzer F, Ortega-Mora LM, Pérez V, Benavides J. (2016). Experimental ovine toxoplasmosis: influence of the gestational stage on the clinical course, lesion development and parasite distribution. *Vet. Res.* 47, 43.

Capítulo III. Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.

1. Introducción.

La toxoplasmosis ovina es una enfermedad infecciosa causada por el protozoo *T. gondii*, que provoca importantes pérdidas económicas en el sector ovino a nivel mundial debido a los abortos que suceden tras la primoinfección de las ovejas gestantes (Dubey, 2010). En las hembras que han sufrido abortos, se observan múltiples focos de necrosis en la placenta y en diversos órganos fetales, principalmente el hígado y el encéfalo, con infiltración moderada de células inflamatorias (Buxton *et al.*, 1982; Buxton y Finlayson, 1986). La expulsión de la placenta y el feto abortado tiene lugar generalmente un mes tras la infección de las ovejas, aunque en un número muy reducido de estudios experimentales se ha descrito que los abortos pueden ocurrir tan solo dos semanas después, por lo que se les ha denominado “abortos en la fase aguda” y las lesiones asociadas son diferentes a las descritas clásicamente en la toxoplasmosis ovina (Trees *et al.*, 1989; Owen *et al.*, 1998). En estos abortos tempranos, las lesiones características de los placentomas son trombosis e infartos, mientras que en los fetos es la leucomalacia, sin reacción glial (Castaño *et al.*, 2014).

A pesar de la gran relevancia a nivel mundial de esta enfermedad, los mecanismos implicados en el aborto no se conocen por completo. Las lesiones no aparecen en todos los tejidos fetales y algunos corderos nacen aparentemente sanos, pero las placentas muestran graves daños histológicos. Por otro lado, no está claro si la causa del aborto es consecuencia directa de la multiplicación del parásito en la placenta o en el feto, o si por el contrario es debido a un desequilibrio de las hormonas o de la respuesta inmunitaria en la placenta (Buxton, 1990; Dubey, 2010). Sin embargo, parece claro que la presencia del parásito en este tejido es un factor clave en su patogenia y que es necesaria para que sucedan los abortos (Dubey, 2010). Un estudio previo, basado en la infección experimental de ovejas gestantes en diferentes periodos de la gestación demostró que las consecuencias de la infección están

Capítulo III. Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.

determinadas por el momento en que se produce y son más graves si tiene lugar en las etapas iniciales (Buxton y Finlayson, 1986). Entonces, el riesgo de transmisión intrauterina del parásito al feto se incrementa y además los efectos en el feto son también más graves en este momento (Buxton y Finlayson, 1986). Por otra parte, aunque el mismo estudio mostró, en dos infecciones experimentales diferentes, que las lesiones fetales y placentarias eran más graves en las ovejas infectadas a mitad de la gestación en comparación con las que lo fueron en el primer tercio, no se ha desarrollado ningún estudio posterior para conocer los mecanismos que explicarían esas diferencias.

Hay similitudes, en términos histopatológicos y clínicos, entre la toxoplasmosis y la neosporosis ovina, una enfermedad que afecta a las ovejas y que está estrechamente relacionada con la toxoplasmosis pues ambos agentes etiológicos son, en términos evolutivos, muy cercanos (Arranz-Solís *et al.*, 2016). La infección experimental de ovejas con *N. caninum* ha puesto de manifiesto que hay una relación muy cercana entre la carga parasitaria y la gravedad de las lesiones en la placenta o en el feto, y cómo estos parámetros pueden condicionar el curso clínico de la enfermedad (Arranz-Solís *et al.*, 2016). En ovejas infectadas de manera experimental con *T. gondii* a mitad de la gestación también se ha demostrado, mediante qPCR, que el desarrollo de lesiones está relacionado con la presencia del parásito (Gutierrez *et al.*, 2012). No obstante, no se ha investigado aún si existen diferencias en la cantidad de parásito y la gravedad de las lesiones en diferentes momentos de la gestación durante la toxoplasmosis ovina.

El objetivo de este trabajo es dar respuesta al primer objetivo de esta Tesis Doctoral. Esto es, investigar cómo el momento de gestación en que ocurre la infección por *T. gondii* de la oveja influye en el curso clínico de la enfermedad, en el desarrollo de lesiones y en la distribución del parásito, así como en la carga parasitaria. Para ello, se han infectado ovejas gestantes, de la misma raza y origen, a principio, mitad y final de gestación con ooquistes esporulados del aislado M4 de *T. gondii*.

Capítulo III. Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.

2. Material y métodos.

2.1. Consideraciones éticas.

Todos los protocolos relacionados con el manejo de los animales fueron aprobados por el Comité de Bienestar Animal del Instituto de Ganadería de Montaña (IGM, ULE-CSIC), de León, siguiendo los procedimientos establecidos en las legislaciones tanto a nivel nacional como europeo (Ley 32/2007, R.D. 1201/2005 y Directiva 2010/63/UE). El manejo de los animales se realizó de acuerdo con la legislación en vigor, de modo que el sufrimiento de éstos fue el mínimo posible.

2.2. Animales y diseño experimental.

Para llevar a cabo este estudio se seleccionaron ovejas primíparas de raza Churra de entre 24 y 30 meses de edad, seronegativas a *T. gondii*, *N. caninum*, virus de la enfermedad de la frontera, *C. burnetii* y *C. abortus*. Posteriormente, se sincronizó el celo de las ovejas mediante tratamiento hormonal con esponjas y fueron cubiertas por monta natural con machos de raza Churra durante dos días, tras lo cual los machos fueron apartados del rebaño. A los 40 días tras su retirada, se comprobó el estado de gestación y la viabilidad fetal mediante ecografía. Un total de 36 ovejas gestantes se distribuyeron al azar en tres grupos experimentales: (G1; n=9), (G2; n=9) y (G3; n=9). Cada una de estas ovejas fue infectada por vía oral con 50 ooquistes esporulados del aislado M4 de *T. gondii* (Castaño *et al.*, 2014) a los 40, 90 y 120 dg respectivamente. Otras nueve ovejas no infectadas se distribuyeron también en grupos similares, 3 en cada uno, y se les administraron 50 ml de tampón fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés) como control negativo de la inoculación.

En el diseño experimental inicial estaba previsto el sacrificio secuencial de 3 ovejas infectadas y 1 control de cada grupo los días 9, 12 y 26 pi.

2.3. Seguimiento clínico y recogida de muestras.

Se observó diariamente a los animales después de su infección y se les midió la temperatura rectal desde el día en que fueron infectados hasta el día 12 pi. Tanto en

Capítulo III. Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.

los días inicialmente previstos para el sacrificio secuencial de las ovejas (9, 12 y 19 pi) como en los casos en los que se produjeron abortos espontáneos, los animales fueron sedados con xilacina comercial (ROMPUN®, Bayer, Mannheim, Alemania), e inmediatamente después se les sacrificó mediante la inyección intravenosa de una sobredosis de una solución comercial de embutramida e ioduro de mebezonio: T-61® (Intervet, Salamanca, España).

Inmediatamente después de la eutanasia, se llevaron a cabo los estudios post-mortem de las ovejas y de los fetos, los cuales fueron separados de la placenta. Para poder llevar a cabo los estudios serológicos, se recogió sangre mediante punción yugular de las madres gestantes antes de la eutanasia y de las venas del cordón umbilical o del corazón en el caso de los fetos. Estas muestras de sangre fueron recogidas en tubos Vacutainer (Becton Dickinson and Company, Plymouth, Reino Unido) sin anticoagulante y se les dejó coagular a temperatura ambiente, tras lo cual fueron sometidas a centrifugación y se almacenaron a -80 °C hasta que fueron analizadas. En el caso de los abortos o del nacimiento de mortinatos, la sangre fetal ya estaba coagulada, por lo que en lugar de extraerla de las venas del cordón umbilical o del corazón se recogió una muestra del líquido torácico y, de manera similar a lo comentado anteriormente, se almacenó a -80°C hasta su posterior análisis. Tras la necropsia, se seleccionaron al azar cinco placentomas de cada placenta y se cortaron transversalmente en secciones de 2-3 mm de grosor que se fijaron por inmersión en formalina al 10% para su análisis histológico posterior. Además, muestras de tejido adyacentes a las ya mencionadas se almacenaron a -80 °C para la detección de ADN parasitario mediante PCR. De forma similar, las muestras fetales (encéfalo, hígado, corazón y pulmón) se almacenaron también a -80 °C para la extracción de ADN y se fijaron en formalina al 10% para su análisis histológico posterior.

2.4. Análisis serológico: IFAT.

Esta prueba se utilizó para la detección de Ig específicas frente a *T. gondii* en fluidos fetales o en muestras serológicas tanto fetales como de la madre, adaptando la técnica

Capítulo III. Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.

previamente descrita en una reproducción experimental de la neosporosis ovina (Álvarez-García *et al.*, 2003).

De manera resumida, los fluidos fetales/suero fetal y las muestras de suero materno se diluyeron en diluciones seriadas 1:2 en PBS, comenzando en 1:8 y 1:200 respectivamente hasta el punto final del título sanguíneo. Los taquizoítos purificados de *T. gondii* (aislado M49) de cultivos celulares se dispensaron en placas de vidrio IFAT de 18 pocillos, se secaron al aire a temperatura ambiente y se fijaron con solución de acetona. Tras la incubación con las diluciones de suero a 37 °C y dos lavados en PBS, se añadió a los pocillos un conjugado frente a IgG ovina (Sigma-Aldrich) marcado con el colorante isotiocianato de fluoresceína (FITC por sus siglas en inglés) diluido a 1:200 en “Evans Blue” (Sigma-Aldrich) y se dejó incubar a 37°C durante 30 minutos (min). A continuación, se hicieron dos nuevos lavados en PBS, otro en agua y finalmente las preparaciones fueron montadas con glicerina tamponada (Fluoprep®, BioMérieux, Francia) para su visualización microscópica. Se consideró como reacción positiva la fluorescencia en la membrana intacta de los taquizoítos a un título ≥ 8 para los fluidos fetales y ≥ 200 para las muestras de suero maternas.

2.5. Histopatología y valoración de las lesiones.

Tras una fijación de cinco días en el formol tamponado, los encéfalos maternos y fetales fueron seccionados transversalmente e incluidos en parafina, para su procesamiento junto con el resto de muestras y posterior tinción con HE. Se llevó a cabo su estudio histológico. Para cuantificar las lesiones en los tejidos fetales y en la placenta se calculó el número y el tamaño de los focos de necrosis, así como el área total de la lesión a través de un análisis morfométrico sobre fotografías digitales, según indicaciones previas (Arranz-Solís *et al.*, 2015). En este caso, se analizaron tanto los focos necróticos como inflamatorios encontrados en la placenta, encéfalo, hígado y pulmón fetal.

Capítulo III. Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.

2.6. Extracción de ADN y PCR para la detección del parásito y su cuantificación en los tejidos.

Para extraer el ADN, se tomaron cantidades de entre 50 y 100 mg de las muestras de tejido (cinco placentomas y muestras fetales: encéfalo, hígado, corazón, pulmón, región femoral del músculo esquelético), empleándose el kit comercial Maxwell® 16 Mouse Tail DNA Purification Kit, desarrollado por Maxwell® 16 System (Promega, Wisconsin, E.E.U.U.), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. La concentración de ADN final fue ajustada mediante un espectrofotómetro de luz ultravioleta para que fuese de 50-100 ng/μL. La extracción de ADN de *T. gondii* se realizó mediante PCR, amplificando en un solo tubo la región ITS-1, tal y como fue descrito en un estudio previo (Hurtado *et al.*, 2001). Cada reacción de PCR fue realizada en un volumen final de 25 μL usando 5 μL de ADN genómico como molde según lo descrito previamente por otros autores (Hurtado *et al.*, 2001). La detección de *T. gondii* se realizó mediante la amplificación del gen ITS-1 (Hurtado *et al.*, 2001). Para la PCR se utilizaron finalmente cinco muestras de placentomas, tres muestras de hígado y encéfalo fetal y una de pulmón y corazón fetal. En el estudio se incluyeron controles negativos, que consistieron en reacciones sin el ADN y muestras de ADN de fetos no infectados. A su vez, se incluyeron controles positivos con una cantidad de ADN genómico de *T. gondii* equivalente a 10 y 1 taquizoíto parasitario. Los productos de la PCR fueron visualizados bajo luz UV en un gel de 1.5% de agarosa/bromuro de etidio, y se consideró la reacción como positiva si se observaba una banda de 227 pb.

El ADN procedente de la placenta o de las muestras fetales de encéfalo e hígado positivo a la PCR se ajustó hasta alcanzar una concentración de 20 ng/μl y se cuantificó mediante qPCR. Para ello, se utilizaron cebadores específicos de la región de repetición de 529 pb de *T. gondii*, así como el gen normalizador de la β-actina de ovino de acuerdo un estudio previo (Gutierrez *et al.*, 2012). Posteriormente, se llevó a cabo la PCR a tiempo real para cada muestra en un volumen final de 20 μl que contenía 10 μl de la mezcla comercial “Power SYBR®PCR Master Mix” (Applied

Capítulo III. Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.

Biosystems, Foster City, Carolina del Norte, E.E.U.U.), 20 pmol de cada cebador y 100 ng de ADN en el sistema ABI 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems). La amplificación se llevó a cabo mediante un protocolo estándar (10 min a 95°C, 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos, y 60°C durante 1 min). El número de taquizoítos de *T. gondii* se calculó interpolando los valores promedio de Ct en dos curvas estándar: 1) equivalente a 5×10^5 a 5×10^{-1} taquizoítos con diluciones seriadas de 10 en una solución de ADN genómico ovino y 2) una curva de 320, 160, 80, 40, 20, 10 y 5 ng de ADN genómico para las cuantificaciones de ADN ovino. La carga parasitaria fue expresada como nº de parásitos/ mg de tejido ovino. Las curvas estándar para el ADN de *T. gondii* y de las ovejas mostraron una pendiente promedio de -3,38 y -3,34, respectivamente, y un $R^2 > 0.99$.

2.7. Análisis estadístico.

Los datos de temperatura rectal se analizaron mediante análisis de medidas repetidas utilizando el procedimiento MIXED de SAS (SAS Inst. Inc., Cary, Carolina del Norte, E.E.U.U.). Como se usaron diferentes grupos control para cada grupo experimental (grupos G1, G2 y G3), se realizaron tres análisis independientes, incluido el modelo estadístico de los efectos fijos del grupo (grupo control vs. grupo experimental infectado), tiempo (día después de la infección) y su interacción (grupo x tiempo). El efecto aleatorio de los animales en cada grupo experimental se utilizó como error para comprobar el efecto del grupo. Los efectos del tiempo y de la combinación de tiempo y grupo se probaron contra el error residual. Las comparaciones entre los tres grupos experimentales también se realizaron utilizando el mismo modelo, pero incluyendo tres niveles dentro del factor grupo (grupos G1, G2 y G3). En todos los análisis, se evaluaron diferentes estructuras de covarianza (simetría compuesta, no estructurada y autorregresiva) según los criterios de información bayesianos de Schwarz.

Las diferencias en la detección por PCR del ADN del parásito se evaluaron utilizando la prueba χ^2 o la prueba F de Fisher mediante el programa informático "GraphPad Prism 5.0". Las diferencias en la carga parasitaria y en la valoración histológica se analizaron utilizando el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del test de Dunn

Capítulo III. Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.

para las comparaciones entre grupos, y el test de Mann-Whitney para las comparaciones entre pares. Estos análisis también se realizaron con el programa “GraphPad Prism 5.0”. La significación estadística para todos los análisis se estableció en $p < 0,05$.

3. Resultados.

3.1. Observaciones clínicas.

La media de la temperatura rectal de los animales infectados fue significativamente mayor ($p < 0,001$) que la de los animales control a lo largo del experimento (**Figura III.1**). En concreto, la temperatura media de los animales infectados del G1 fue significativamente mayor que la de los controles entre los días 3 y 11 pi, mientras que en el caso de los G2 y G3 el periodo durante el cual se encontraron diferencias fue menor (entre los días 5 y 8 pi y entre los días 4 y 8 pi respectivamente). Asimismo, se observaron también diferencias en la media de la temperatura rectal de las ovejas infectadas en función del grupo al que pertenecían: la media de la temperatura rectal de los animales del G1 fue significativamente mayor que la de los G2 y G3 en los días 3, 4, 8, 9, 10 y 11 pi (**Figura III.1**). También la media de la temperatura rectal de los animales infectados de G3 fue significativamente mayor que la de los pertenecientes al G2 en el día 11 pi.

Capítulo III. Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.

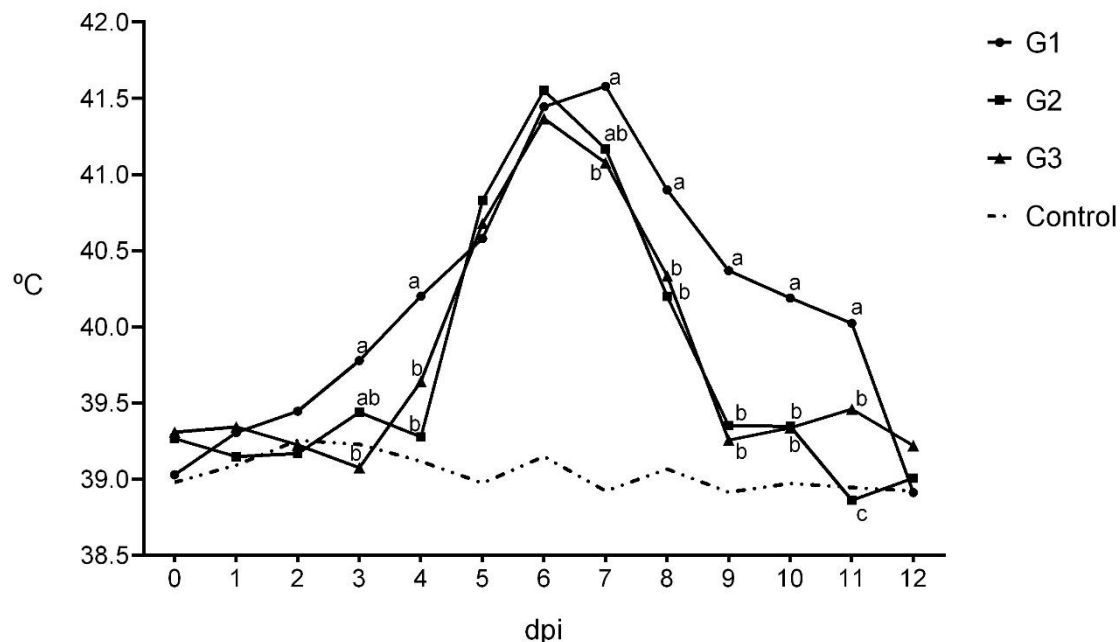


Figura III.1. Temperatura rectal media de los animales infectados y control. Los superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$). dpi: días post-infección.

En lo que respecta a los abortos (muerte fetal con o sin la expulsión del feto del útero), aparecieron en las ovejas de los tres grupos experimentales (**Tabla III.1**). Dichos abortos se clasificaron en dos categorías dependiendo del momento en el que sucedieron: a) abortos durante la fase aguda de la enfermedad (entre los días 9 y 14 pi) y b) abortos, o nacimiento de mortinatos, ocurridos entre los días 19 y 26 pi. Como consecuencia de los abortos ocurridos en las fases iniciales de la enfermedad y del nacimiento de mortinatos, se modificó el número de animales sacrificados en los días 12, 19 y 26 pi previstos inicialmente (**Tabla III.1**).

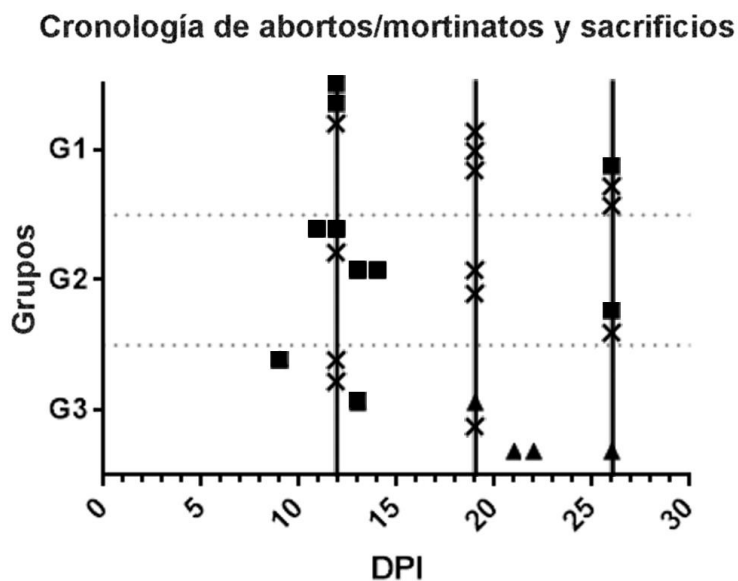
Capítulo III. Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.

Tabla III.1. Distribución experimental de los animales según el momento de gestación en que fueron infectados (G1, G2 o G3) y el día pi en el que fueron sacrificados o en el que se produjo el aborto.

	Nº de ovejas [^]				
	Abortos [‡]		Sacrificio secuencial		
	6-16 dpi	17-26 dpi	12 dpi	19 dpi	26 dpi
G1	2/0	1/0	1/1	3/1	2/1
G2	4/0	1/0	1/1	2/1	1/1
G3	2/0	4/0	2/1	1/1	0/1

‡: abortos espontáneos o mortinatos ocurridos en ese grupo. ^: ovejas infectadas/control.

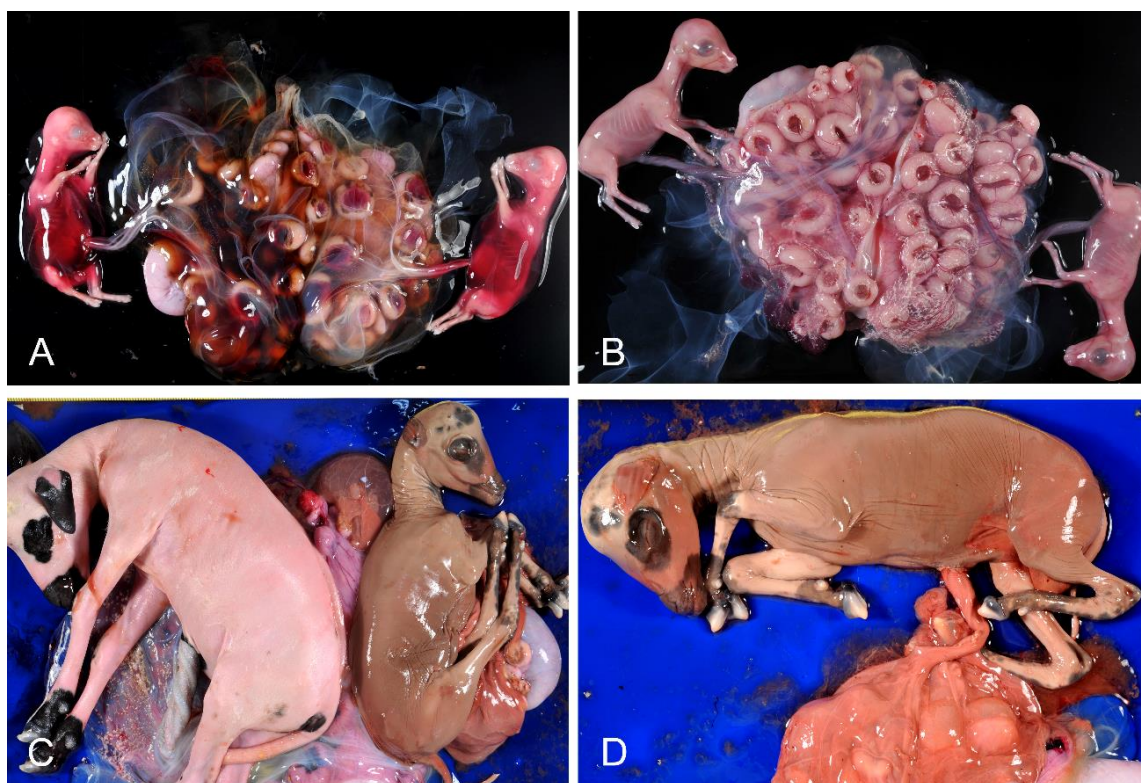
Los abortos en la fase aguda de la enfermedad sucedieron de la siguiente manera: en el G1, dos ovejas sacrificadas el día 12 pi tenían en su interior fetos muertos; en el G2, cuatro ovejas abortaron en los días 11, 12, 13 y 14 pi; en el G3, dos ovejas abortaron en los días 9 y 13 pi (**Figura III.2**).



Capítulo III. Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.

Figura III.2. Secuencia temporal en la que se analizaron los fetos de las ovejas infectadas. Los cuadrados indican abortos, los triángulos mortinatos y las cruces muestran el momento en el que los fetos fueron estudiados después de la eutanasia de la madre según el momento previsto en el sacrificio secuencial de los animales (representado por una línea continua vertical). DPI: días post-infección.

Respecto a los abortos que sucedieron después del día 19 pi, dos ovejas sacrificadas en el día 26 pi, una del G1 y otra del G2, tenían en su interior fetos muertos. En el G3, cuatro ovejas parieron mortinatos en los días 19, 21, 22 y 26 pi (**Figura III.2**). En las ovejas de los G2 y G3 (4 y 8 animales respectivamente) que tenían en su interior más de un feto, la existencia simultánea de uno más pequeño y momificado con otro sano y de mayor tamaño fue habitual (**Figura III.3**). De hecho, esto ocurrió en una oveja del G2 sacrificada en el día 26 pi, y en dos del G3 que parieron mortinatos en los días 22 y 26 pi.



Capítulo III. Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.

Figura III.3. Lesiones macroscópicas fetales. **A:** Hemorragia abdominal en fetos gemelos de una oveja infectada en el día 40 pi. Es de destacar la congestión presente en la parte fetal de algunos placentomas. **B:** Fetos gemelos de una oveja no infectada de G1. **C:** Fetos gemelos de una oveja infectada de G2. Muestran diferente grado de autólisis, lo que sugiere que su muerte ocurrió en diferentes días pi. **D:** Feto abortado de G2 con cierta maceración, así como autólisis de la placenta.

3.2. Producción de IgG específicas frente a *T. gondii*.

La producción de IgG específicas frente al parásito en fluidos fetales, suero fetal y materno recogidos inmediatamente después de la necropsia de los animales se analizó mediante IFAT. Todas las ovejas infectadas fueron seropositivas, con títulos séricos que oscilaban entre 1:400 y 1:1600 en el G1, 1:400 y 1:6400 en el G2 y en el caso del G3 entre 1:1600 y 1:12800 (**Tabla adicional III.1**).

3.3. Estudios anatomopatológicos y cuantificación de las lesiones.

3.3.1. Lesiones macroscópicas.

Se observó un desprendimiento parcial de la placenta en las ovejas que abortaron, pero cuyos fetos no fueron expulsados antes del día de sacrificio (dos en el G1, en el día 12 pi, una en el G2, también en el día 12 pi, y una en el G3, en el día 19 pi). Los fetos abortados, tanto los expulsados como los hallados *in utero* en el momento de la necropsia, tenían un grado variable de autólisis y consistencia friable de las vísceras (**Figura III.2**). Los fetos muertos del G1 tenían hemorragia abdominal y edema subcutáneo (**Figura III.3**), mientras que los de los G2 y G3 tenían un color marrón y un grado variable de momificación (**Figura III.3**).

No se observaron lesiones macroscópicas en los cotiledones o membranas intercotiledonares, de la placenta. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el grado variable de autólisis que mostraban en muchas ocasiones las placentas dificultaba su estudio. Tampoco se apreciaron lesiones macroscópicas en las vísceras maternas, placentas o fetos procedentes de ovejas que no abortaron, tanto si fueron infectadas como si no.

Capítulo III. Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.

3.3.2. Lesiones microscópicas.

3.3.2.1. *Fase aguda de la toxoplasmosis ovina.* En las ovejas infectadas de los tres grupos experimentales que abortaron durante los días 9 y 14 pi, las lesiones encontradas consistían en necrosis isquémicas (infartos) de la placenta, que se caracterizaban por presentarse como áreas congestivas netamente demarcadas del tejido sano. Se observó necrosis de los trofoblastos, que presentaban un citoplasma eosinofílico y homogéneo y la fragmentación de la cromatina del núcleo. El mesénquima fetal, dentro de estas áreas, aparecía intensamente teñido, en contraste con su apariencia clara en las áreas no afectadas. No se encontraron infiltrados inflamatorios en estas zonas. Este tipo de lesión apareció en la placenta de dos ovejas del G1 sacrificadas en el día 12 pi, una oveja del G2 que abortó en el día 13 pi y otra del G3 que sufrió un aborto en el día 9 pi. El elevado grado de autólisis de las placentas de los fetos abortados dificultó enormemente su valoración histopatológica.

En el encéfalo de cinco de estos fetos (dos del G2, en los días 11 y 14 pi, y tres del G3, en los días 9 y 13 pi) se observaron exclusivamente áreas de leucomalacia, sin infiltrados inflamatorios, en la corona radiada y en la zona periventricular.

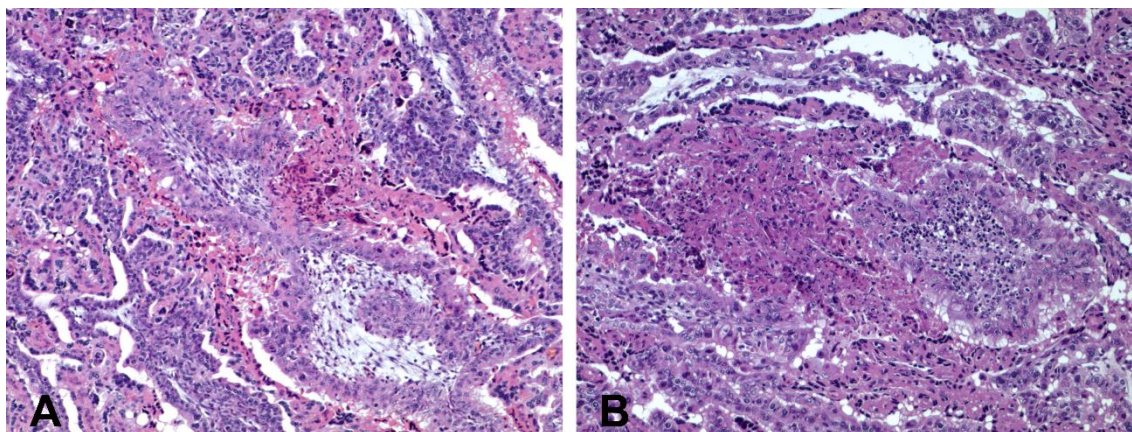
Dado que estos abortos ocurrieron durante la fase aguda de la enfermedad, y se considera que en su patogenia intervienen mecanismos diferentes a los que subyacen a los abortos ocurridos en la toxoplasmosis ovina (Castaño *et al.*, 2014), las lesiones encontradas en estas placentas y en los fetos no se consideraron al analizar los datos sobre valoración histológica de las lesiones.

En la **Tabla III.2** se recoge información de los animales que mostraron lesiones no atribuibles a la fase aguda de la infección con *T. gondii*. En dicha tabla se muestra el número de lesiones encontradas en la placenta, hígado, pulmón y encéfalo fetales, así como su tamaño medio. Los valores individuales de cada muestra de placenta o de feto pueden consultarse en la **Tabla adicional III.2**. No fue posible realizar un análisis estadístico de estas muestras de placenta o de feto debido a su escaso número.

Capítulo III. Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.

3.3.2.2. *Placenta*. Solamente se observaron lesiones en la placenta de ovejas sacrificadas el día 26 pi: de las tres del G1, solamente en una procedente de una oveja que tenía en su interior dos fetos muertos, y en las dos ovejas del G2, una de las cuales tenía en su interior un feto muerto y otro vivo mientras que la otra tenía dos fetos vivos en su interior en el momento de la necropsia. La mayoría de las placentas de los fetos abortados o de los mortinatos estaban demasiado autolíticas, lo que dificultó en gran medida su análisis histopatológico. Solamente hubo tres placentas del G3 disponibles, dos del día 12 pi y una del día 19 pi. En este grupo todos los fetos estaban vivos y ninguno de ellos presentaba lesiones histológicas.

La placenta del G1 tenía pequeños focos de necrosis principalmente localizados en el septo caruncular del placentoma. El mesénquima fetal adyacente a estos focos presentaba un infiltrado inflamatorio formado por linfocitos y macrófagos (**Figura III.4**). En el G2, una de las dos placentas con lesiones mostraba focos de necrosis mayores en el área interdigital del placentoma, abarcando tanto el septo caruncular materno como el mesénquima fetal adyacente (**Figura III.4**). Había infiltrados inflamatorios focales de macrófagos y linfocitos, si bien no fue este un hallazgo relevante. El porcentaje de tejido lesionado fue ocho veces mayor que en el caso de las placentas del G1. Las lesiones encontradas en la otra placenta del G2 eran similares a las descritas en el G1.



Capítulo III. Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.

Figura III.4. Lesiones microscópicas en la placenta. **A:** Placentitis moderada de una oveja infectada a los 40 dg (G1). Se caracteriza por un exudado seroso entre los tejidos materno y fetal, necrosis focal de las vellosidades fetales e inflamación no purulenta en el septo materno adyacente. **B:** Placentitis moderada-grave en una oveja infectada a los 90 dg (G2). La lesión está caracterizada por una gran área de necrosis que afecta tanto a la parte materna como a las vellosidades fetales, con un infiltrado inflamatorio leve.

3.3.2.3. *Encéfalo fetal.* Solo se detectaron lesiones histológicas en este órgano en el día 26 pi en los G1 y G2, mientras que en el G3 aparecieron antes, en el día 20 pi. En los tres grupos, las lesiones estaban caracterizadas por la distribución aleatoria de agregados de células mononucleares. El componente celular de estos focos era muy similar en los tres grupos experimentales, con diferencias en el G2, donde se encontraron zonas de necrosis en la parte central. También en el G2, los focos eran más numerosos y ligeramente mayores (**Figura III.5**), lo que resultó en que el porcentaje de tejido lesionado fue superior que en los G1 y G3 (**Tabla III.2**).

3.3.2.4. *Hígado fetal.* De manera muy similar a lo explicado en el anterior apartado, las lesiones en el hígado se encontraron de manera más temprana (en el día 19 pi) en el G3 que en los otros dos grupos experimentales, donde se observaron solamente en el día 26 pi (**Tabla III.2**). En el G3 ya en el día 19 pi se apreció un infiltrado moderado formado por células mononucleares. Al comparar las lesiones encontradas a partir del día 20 pi en los tres grupos, todas ellas estaban caracterizadas por la presencia de múltiples focos de necrosis por coagulación distribuidos de manera aleatoria por el parénquima hepático. Mientras que en el G1 la necrosis era una característica destacada de los focos, en el G2 también había infiltrados inflamatorios mononucleares en la periferia de los focos. En el G3, por su parte, ésta era la lesión principal (**Figura III.5**). En lo que respecta al número de focos o a su tamaño, no existían diferencias aparentes entre los diferentes grupos experimentales.

3.3.2.5. *Pulmón fetal.* Al igual que en el hígado, las lesiones del pulmón se detectaron de manera más precoz en el G3, a partir del día 19 pi, mientras que en los G1 y G2 solamente se observaron en el día 26 pi. En el pulmón del único feto del G3 con

Capítulo III. Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.

lesiones se observó un infiltrado inflamatorio moderado, de localización perivascular. Las lesiones encontradas a partir del día 20 pi en los tres grupos experimentales eran similares y se caracterizaban principalmente por la distribución aleatoria de agregados de linfocitos y macrófagos (**Figura III.5**). No se encontró necrosis asociada a estos focos en ninguno de los tres grupos.

Capítulo III. Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.

Tabla III.2. Valores medios de la extensión de las lesiones histológicas en la placenta y vísceras fetales de cada grupo experimental infectado.

Grupo	Día pi	Placenta			Cerebro fetal			Hígado fetal			Pulmón fetal		
		Nº focos /cm ²	TMF (mm ²)	%PSAL	Nº focos /cm ²	TMF (mm ²)	%PSAL	Nº focos /cm ²	TMF (mm ²)	%PSAL	Nº focos /cm ²	TMF (mm ²)	%PSAL
G1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G3	19	-	-	-	-	-	-	0,58	0,024	0,01%	1,65	0,01	0,01%
G1	26	0,52	0,02	0,01%	5,53	0,01	0,08%	2,72	0,06	0,20%	25,43	0,04	0,93%
G2	26	0,91	0,05	0,05%	12,96	0,03	0,31%	8,71	0,05	0,58%	16,10	0,06	0,90%
G3	20-26 [^]	na‡	na	na	1,20	0,02	0,02%	6,23	0,03	0,23%	3,76	0,03	0,13%

[^]: Mortinatos ocurridos en los días 21, 22 y 26 pi. ‡: La placenta de los mortinatos estaba demasiado autolítica para su estudio histopatológico. pi: post-infección.

TMF: Tamaño medio de los focos. %PSAL: Porcentaje de sección afectada por las lesiones.

Capítulo III. Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.

En los fetos procedentes de ovejas no infectadas no se encontraron, como es lógico, lesiones de ningún tipo.

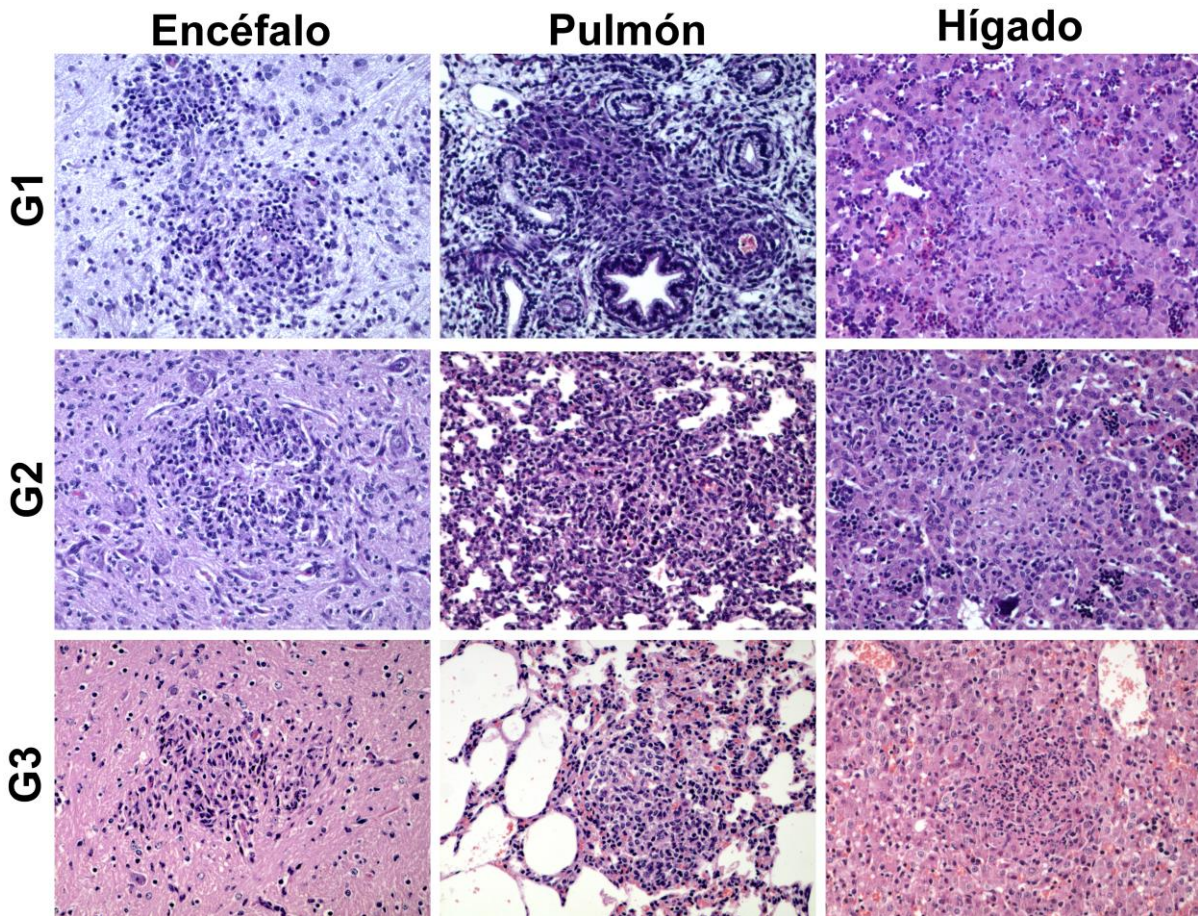


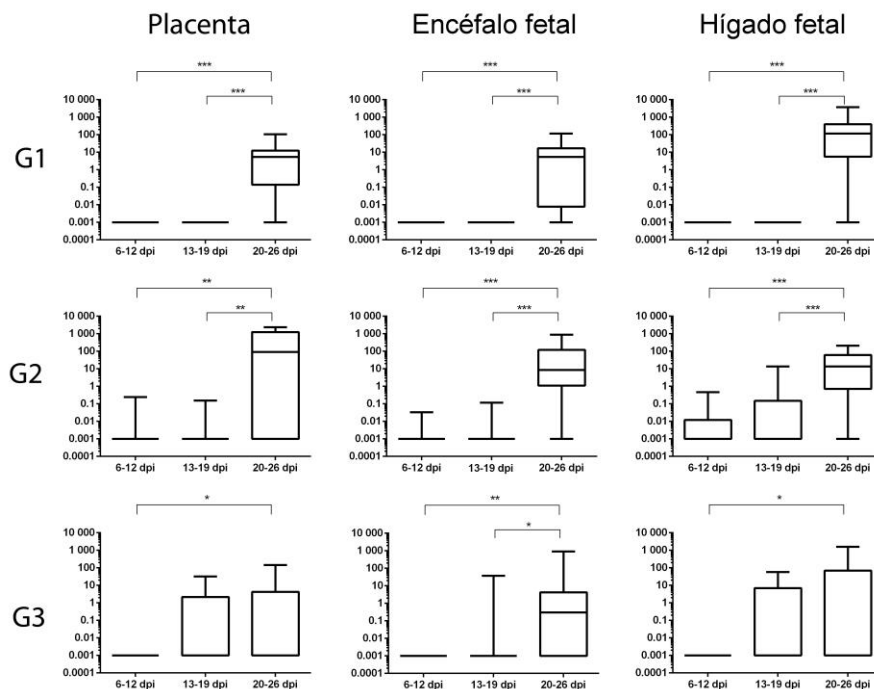
Figura III.5. Comparación de las lesiones microscópicas características encontradas en el encéfalo, pulmón e hígado fetal en los días 20-26 pi. Las imágenes muestran los cambios histológicos valorados para la cuantificación de lesiones. Se analizaron tanto los focos necróticos (más evidentes en el hígado de los G1 y G2) como los agregados de células inflamatorias (más evidentes en el pulmón del G1).

Capítulo III. Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.

3.4. Distribución del parásito y carga parasitaria en la placenta y en los tejidos fetales.

3.4.1. Placenta.

Se detectó ADN del parásito en todas las muestras estudiadas procedentes de las ovejas gestantes, independientemente de cuándo fueron infectadas, y tanto si abortaron, parieron mortinatos o fueron sacrificadas, entre los días 20 y 26 pi. Entre los días 13 y 19 pi sólo se detectó ADN de *T. gondii* en animales de los G2 y G3 y en un porcentaje de casos muy inferior con respecto al periodo comprendido entre los días 20 y 26 pi. Asimismo, entre los días 9 y 12 pi se detectó ADN parasitario solamente en una de las tres placentas estudiadas del G2 (**Tabla III.3**). La media de la carga parasitaria, medida como número de taquizoítos por mg de tejido, fue significativamente mayor entre los días 20 y 26 pi que en los días 6-12 y 13-19 pi ($p < 0,001$) en los G1 y G2 ($p < 0,005$), mientras que en el G3 esta diferencia sólo fue significativa ($p < 0,05$) cuando se comparó con el periodo de tiempo comprendido entre los días 6 y 12 pi (**Figura III.6**).



Capítulo III. Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.

Figura III.6. Diagrama “box-plot” comparando cargas parasitarias de *T. gondii* medidas en diferentes días pi, dentro del mismo grupo experimental, en la placenta y vísceras fetales de los tres grupos experimentales. La raya horizontal de cada caja representa la carga parasitaria media, mientras que la inferior y superior representan los valores mínimo y máximo respectivamente. Los asteriscos indican los niveles de significancia entre cada día pi en los diferentes tejidos analizados: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$). dpi: días post-infección.

3.4.2. Tejidos fetales.

El mayor porcentaje de casos positivos se encontró en el encéfalo, hígado y pulmón de los fetos de los grupos experimentales 1 y 2 en el periodo de tiempo comprendido entre los días 20 y 26 pi (**Tabla III.3**), mientras que en este mismo periodo el porcentaje de casos positivos del G3 fue muy bajo. De manera similar a lo observado en la placenta, se detectó ADN parasitario entre los días 13 y 19 pi en los tres órganos fetales analizados en los G2 y G3, si bien es cierto que esto ocurrió en un porcentaje de muestras menor que en el caso de las placentas, mientras que solamente en el 20% de las muestras fetales del G1 se detectó ADN parasitario, y solamente en el pulmón. Respecto al periodo comprendido entre los días 9 y 12 pi, sólo se pudo detectar ADN de *T. gondii* en el pulmón y en el hígado fetal de las muestras de los G1 y G2, siendo muy similar el porcentaje de muestras positivas al observado en esos dos mismos grupos entre los días 13 y 19 pi (**Tabla III.3**). Al comparar la carga parasitaria entre grupos, al igual que en la placenta, la carga parasitaria en los G1 y G2 fue significativamente mayor ($p < 0,001$) entre los días 20 y 26 pi que en los días pi anteriores, mientras que, aunque también se encontraron, estas diferencias fueron menos significativas ($p < 0,05$ y $p < 0,01$) en las muestras de cerebro e hígado del G3 y solamente en comparación con el periodo comprendido entre los días 6 y 12 pi (**Figura III.6**).

Por último, se comparó la carga parasitaria en placenta, cerebro e hígado de los tres grupos experimentales en el mismo periodo temporal (**Figura adicional III.1**). Así, entre los días 6 y 12 pi, de acuerdo con los resultados de la detección

Capítulo III. Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.

de ADN parasitario en estos tejidos (**Tabla III.3**), la carga parasitaria fue mayor en el G2 que en G1 ($p < 0,01$). Por su parte, entre los días 13 y 19 pi la carga parasitaria fue mayor en el G3, aunque las diferencias sólo fueron estadísticamente significativas ($p < 0,01$) cuando se comparó con la carga parasitaria de la placenta del G1. Finalmente, entre los días 20 y 26 pi, periodo de tiempo en el que la mayoría de las muestras fueron positivas (**Tabla III.3**), la carga parasitaria encontrada en el G3 fue menor ($p < 0,01$) en comparación con el G2 en la placenta, o en comparación con el G1 en el hígado (**Figura adicional III.1**). Pueden consultarse los datos individuales de la detección de ADN parasitario en la **Tabla adicional III.3**.

Capítulo III. Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.

Tabla III.3. Porcentajes de casos con lesiones histológicas y en los que se detectó ADN parasitario en la placenta y vísceras fetales, de los animales infectados a lo largo del experimento.

Grupo	DPI	Placenta		Cerebro fetal		Hígado fetal		Pulmón fetal	
		HE [^]	PCR [‡]	HE	PCR	HE	PCR	HE	PCR
G1	6-12	-	-	-	-	-	-	-	16%
	13-19	-	-	-	-	-	-	-	20%
	20-26	33%	100%	28%	86%	28%	100%	86%	100%
G2	6-12	-	33%	-	-	-	40%	-	20%
	13-19	-	50%	-	18%	-	36%	-	45%
	20-26	100%	100%	100%	100%	100%	100%	66%	100%
G3	6-12	-	-	-	-	-	-	-	-
	13-19	-	66%	-	50%	20%	50%	20%	50%
	20-26	na	100%	33%	80%	33%	60%	66%	80%

[^]: lesiones histológicas características de la toxoplasmosis ovina. [‡]: Detección de ADN parasitario mediante PCR. DPI: días post-infección.

4. Discusión.

Aunque algunos estudios ya han demostrado la influencia de la gestación sobre la patogenia de la toxoplasmosis ovina (Buxton y Finlayson, 1986; Innes *et al.*, 2009a), se desconocen los mecanismos concretos que se ven afectados. Además, existen muy pocos trabajos que analicen este aspecto de la toxoplasmosis ovina congénita (Dubey, 2010). Recientemente se ha demostrado en modelos experimentales murinos que el periodo de gestación en el que ocurre

Capítulo III. Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.

la infección de las madres gestantes influye directamente sobre las consecuencias clínicas observadas en la descendencia (Wang *et al.*, 2011a), pero debido a las diferencias existentes entre ambas especies (estructura anatómica de la placenta, respuesta inmunitaria y duración de la gestación), no siempre se pueden extrapolar los resultados (Innes, 1997). Por ello, este trabajo experimental se ha llevado a cabo con el objetivo de conocer cómo influye el momento de gestación en que ocurre la infección de las ovejas gestantes sobre la patogenia de la toxoplasmosis ovina. Para ello, ovejas primíparas procedentes del mismo rebaño fueron infectadas en los tres tercios de gestación con el mismo aislado de *T. gondii* y con la misma dosis infectiva.

Uno de los resultados más sorprendentes de este experimento fue el elevado número de abortos que ocurrieron durante la fase aguda de la enfermedad, concretamente en las dos primeras semanas pi, en los tres grupos de animales. Este tipo de abortos habían sido descritos en estudios experimentales previos, pero nunca con dosis infectivas inferiores a 200 ooquistes esporulados (Trees *et al.*, 1989; Buxton *et al.*, 1993a; 1996; Owen *et al.*, 1998; Castaño *et al.*, 2014). Puesto que el porcentaje de abortos encontrado en este estudio tras la infección con 50 ooquistes (22,2 %) es menor que el observado en un estudio experimental previo (Castaño *et al.*, 2014) donde las dosis infectivas fueron de 2000 (91,6 %) y 500 ooquistes esporulados (58,6 %), es posible que exista una correlación entre la dosis infectiva y el porcentaje de abortos durante la fase aguda de la toxoplasmosis ovina. Además, debe tenerse en cuenta que hasta la fecha se había sugerido que la dosis infectiva mínima capaz de desencadenar abortos tras la infección con *T. gondii* en esta especie era de 200 ooquistes (Dubey, 2010). Es de destacar que en este experimento una dosis tan baja (50 ooquistes esporulados) haya sido capaz de causar abortos y lesiones fetales, independientemente de cuándo se infectara a las madres gestantes. Existen dos posibles factores que podrían explicar esto: por un lado, la mayor virulencia del

Capítulo III. Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.

aislado empleado(M4) o la mayor susceptibilidad de la raza Churra, aspectos que deberían investigarse en futuros estudios.

La aparición de abortos tempranos durante la toxoplasmosis ovina ha sido descrita previamente en un número muy escaso de estudios experimentales (Trees *et al.*, 1989; Buxton *et al.*, 1993a; 1996; Owen *et al.*, 1998; Castaño *et al.*, 2014) tras infectar a ovejas gestantes a mitad y final de la gestación (a los 90 y 120 dg). En este trabajo, también ocurrieron al principio de la gestación (a los 40 días dg) y en un porcentaje muy similar en comparación con los otros dos grupos experimentales. La patogenia de los abortos durante la fase aguda se ha sugerido que difiere de los abortos clásicamente asociados a la enfermedad (Owen *et al.*, 1998; Castaño *et al.*, 2014), que suelen ocurrir cuatro semanas después de la infección de la madre gestante. Los resultados de este estudio parecen confirmar esa hipótesis, ya que la detección de ADN parasitario en las placentas o fetos de esos abortos fue muy escasa y las lesiones histológicas (trombosis y leucomalacia periventricular fetal) eran muy diferentes a las descritas clásicamente en los abortos ocurridos en ovejas tras la infección con *T. gondii*. Por otro lado, el hecho de que no se encontraran diferencias en el tipo de lesión y que el porcentaje de ovejas que sufrieron abortos en los tres grupos experimentales fuera muy similar, parece indicar que los mecanismos que explicarían la aparición de estos abortos no están influenciados por el momento de gestación en que se produce la infección de las madres gestantes.

Esta influencia sí se observó, por el contrario, en los abortos que sucedieron después del día 14 pi, ya que se encontraron diferencias en el porcentaje de abortos ocurridos a partir de esta fecha entre los tres grupos experimentales, así como variaciones en los días pi en los que ocurrieron. Además, la gravedad de las lesiones histológicas y la carga parasitaria en los tejidos analizados era distinta en función del grupo experimental.

Mientras que en los G1 y G2 solamente abortó una oveja en el día 26 pi, en el G3 cuatro animales expulsaron mortinatos en el día 19 pi. El nacimiento de

Capítulo III. Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.

mortinatos y la aparición de abortos ya había sido descrita previamente tras la infección experimental de ovejas y de cabras con *T. gondii* a final de la gestación (Dubey, 1981; Buxton *et al.*, 1982; Kirkbride *et al.*, 1992). Se ha demostrado que la infección en etapas más tempranas desemboca en una mayor mortalidad fetal que si por el contrario la infección se realiza a final de la gestación (Buxton y Finlayson, 1986). El hecho de que, tal y como se ha demostrado en estudios experimentales previos (Buxton *et al.*, 1993a; Engeland *et al.*, 1996), los abortos aparecen a partir de los 40 días después de la infección experimental con *T. gondii* de ovejas a mitad de la gestación, podría explicar que en este trabajo se detectara un menor número de abortos en los G1 y G2 con respecto al G3, ya que el último sacrificio se realizó el día 26 pi. Además, en este último grupo experimental el nacimiento de mortinatos ocurrió de manera más temprana. Ello podría deberse a que en él las lesiones fetales y de la placenta se detectaron antes (en el día 19 pi) que en los otros dos grupos experimentales, donde fueron visibles solamente en el día 26 pi, de manera similar a lo descrito en un estudio experimental previo en el que se infectó a las ovejas a mitad y final de la gestación, pues las lesiones en la placenta se detectaron en el día 28 pi (Gutierrez *et al.*, 2010). En otro trabajo, se documentó la aparición de lesiones en la placenta a los 10 días pi tras la infección experimental de ovejas con *T. gondii* a los 60 y 90 dg. Éstas eran lesiones leves o moderadas, caracterizadas por múltiples focos de necrosis, cuyo tamaño aumentaba a medida que progresaba la gestación (Gutierrez *et al.*, 2010). La aparición más precoz de estas lesiones puede deberse seguramente a que en ese trabajo la infección experimental de los animales se realizó mediante la inoculación subcutánea de quistes tisulares del parásito, una forma de infección poco habitual pues en la mayoría de las reproducciones experimentales de la toxoplasmosis ovina se administran ooquistes esporulados por vía oral (Dubey, 2010). A este respecto, en infecciones experimentales de vacunos con *N. caninum*, un apicomplejo evolutivamente muy semejante a *T. gondii*, se ha demostrado que la vía de inoculación y la forma parasitaria empleadas influyen directamente sobre la

Capítulo III. Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.

patogenia de la infección, en concreto sobre la distribución del parásito en los tejidos del hospedador (Benavides *et al.*, 2014).

En lo que respecta a las características histológicas de las lesiones, lo más destacable fue la presencia de necrosis en las muestras de placenta, hígado y encéfalo fetales estudiadas, en concordancia con lo descrito en reproducciones experimentales previas de la toxoplasmosis ovina (Buxton y Finlayson, 1986). No obstante, la patogenia de estas lesiones se desconoce. Para algunos investigadores, para que suceda la necrosis tisular tras la infección experimental con *T. gondii* es necesario que las células T secreten la citoquina pro-inflamatoria IFN- γ (Liesenfeld *et al.*, 1996), mientras que otros han demostrado en ratones modificados genéticamente que no expresaban esta citoquina (IFN- $\gamma^{-/-}$) la aparición de necrosis en sus tejidos (Silva *et al.*, 2009). Además, en cultivos celulares de trofoblastos se ha demostrado que la necrosis de estas células no está provocada ni por la multiplicación intracelular del parásito ni por un mecanismo inmunitario (Abbasi *et al.*, 2003). La correlación tan marcada entre la carga parasitaria y la necrosis, así como la escasa infiltración de células inflamatorias en estas lesiones sugiere que la presencia del parásito actúa como una señal desencadenante para su aparición, por medio de mecanismos diversos, tanto no inmunitarios como no exclusivamente inmunitarios. También el hecho de que las lesiones necróticas fueran de mayor gravedad en el G2, y en menor medida también en el G1, exactamente los grupos experimentales donde se encontraron las mayores cargas parasitarias en comparación con el G3, parece apoyar la hipótesis de que el principal factor implicado en el desarrollo de estas lesiones necróticas es la presencia y posterior multiplicación del parásito. Las menores cargas parasitarias y las lesiones de menor gravedad encontradas en muestras de los animales del G3 podría deberse a la mayor maduración de la respuesta inmunitaria fetal en las etapas más avanzadas de la gestación (Buxton y Finlayson, 1986). Por otro lado, estudios *in vitro* desarrollados en cultivos celulares de trofoblastos han sugerido que algunos

Capítulo III. Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.

factores locales secretados por los trofoblastos infectados con *T. gondii* podrían desencadenar la necrosis de los tejidos adyacentes (Abbasi *et al.*, 2003). Sería interesante, por tanto, de cara a futuros estudios, analizar la relación entre la presencia del parásito y la liberación de factores locales por parte de las células, así como si esto sucede en otras localizaciones distintas.

Otro aspecto muy interesante encontrado en este trabajo fue que, mientras que las lesiones de la placenta e hígado fetal, y también en menor medida las encontradas en el encéfalo fetal, estaban caracterizadas por la presencia de necrosis, acompañada o no de un componente inflamatorio, en las muestras analizadas de pulmón fetal solamente se observaron, principalmente en los G1 y G2, infiltrados inflamatorios perivasculares, pero no necrosis. En este sentido, aunque en un estudio anterior se describió, tras la infección experimental con *T. gondii* de ovejas a principio y mitad de la gestación, la presencia de múltiples focos de necrosis en las muestras de pulmón fetal (Buxton y Finlayson, 1986), en otras reproducciones experimentales de la toxoplasmosis ovina (Buxton *et al.*, 1982) y caprina (Dubey, 1988) sólo se han encontrado en este tejido lesiones inflamatorias con una necrosis mínima. Por tanto, sería interesante que en futuros estudios encaminados a estudiar la patogenia de la toxoplasmosis ovina se analizara la razón por la que la necrosis, una característica propia de la enfermedad, no es tan frecuente en el pulmón fetal.

Al comparar la gravedad de las lesiones entre los tres grupos experimentales en el día 26 pi, momento en el que aparecieron en todos ellos, las de mayor intensidad correspondían a las muestras analizadas del G2, es decir, provenientes de ovejas infectadas a mitad de gestación. A este respecto, un estudio experimental previo ya había demostrado que los corderos o mortinatos de ovejas infectadas en etapas más avanzadas de la gestación presentaban lesiones más graves que los de aquellos cuyas madres se infectaron en las primeras etapas de la misma (Buxton *et al.*, 1982). El hecho de que, tal y como se había demostrado previamente, la infección en el día 60 de gestación

Capítulo III. Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.

provocara unas lesiones más graves en comparación con las encontradas tras la infección en los días 40 y 90 de gestación (Buxton y Finlayson, 1986), demuestra la influencia que ejerce el momento de gestación en que ocurre la infección sobre la gravedad de las lesiones histológicas.

Asimismo, en este trabajo se demostró la estrecha relación existente entre la presencia de cambios patológicos en la placenta y en el feto y la carga parasitaria encontrada en estos tejidos. Parece que existe un intervalo de tiempo comprendido entre los 60 y 90 dg en el que la gravedad de las lesiones es máxima, lo que se relaciona con las mayores cargas parasitarias. En este sentido, se detectó ADN de *T. gondii* a los 12 días pi en muestras del G2, lo que parece confirmar la hipótesis de que el parásito es capaz de alcanzar la placenta en el día 10 pi (Buxton y Finlayson, 1986), y que la presencia del parásito es necesaria para el desarrollo de lesiones. A pesar de la limitación en el número de muestras disponibles, se pudo detectar ADN parasitario en un porcentaje elevado, superior al 50 % de las muestras en el día 26 pi en el G1, en el día 19 pi en la placenta en el G2, y en ese mismo día en la placenta, pero también en el feto, en el G3. De manera similar, al analizar la carga parasitaria, la mayor cantidad de ADN de *T. gondii* en el día 19 pi se detectó en el G3, lo que sugeriría que, o bien el parásito es capaz de llegar antes o es capaz de multiplicarse de manera más eficaz en la placenta y en el feto tras la infección de la oveja gestante en el último tercio de gestación en comparación con lo observado cuando la infección sucede en etapas más tempranas. Al comparar dentro del mismo grupo experimental la carga parasitaria a lo largo del experimento, tanto en el G1 como en el G2 se documentó un brusco incremento en la cantidad de ADN del parásito en el día 26 pi. Esta tendencia creciente ya había sido descrita en el día 20 pi tras la infección experimental con *T. gondii* de ovejas a mitad de la gestación (Gutierrez *et al.*, 2010). Aunque en el G3 también se observó ese comportamiento, el incremento en la carga parasitaria en el día 26 pi con respecto a los días 12 y 19 pi no fue tan brusco. Esto podría deberse a que,

Capítulo III. Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.

aunque es cierto que el parásito es capaz de llegar antes a la placenta si la madre se infectó en las etapas finales de la gestación, no sería capaz de replicarse de manera tan efectiva como sí lo hace si la infección de los animales sucede en etapas anteriores. Esta situación podría estar relacionada con la mayor maduración del sistema inmunitario fetal en las últimas fases de la gestación, cuya respuesta, sin embargo, no sería capaz de evitar la infección del feto.

No se puede encontrar una explicación clara para estos resultados, puesto que hay una ausencia total de estudios en ovinos que analicen las variaciones de la carga parasitaria en la placenta y en el feto en los tres tercios de gestación y especialmente que estudien la cinética de la replicación parasitaria en el último tercio. Se ha sugerido que la maduración del sistema fetal, y por tanto su capacidad para hacer frente a la infección con *T. gondii*, es el principal factor que explicaría que la infección en los últimos momentos de la gestación no desemboque en unas consecuencias excesivamente graves (Buxton y Finlayson, 1986). Por lo tanto, es posible que debido a la mayor maduración del sistema inmunitario fetal se haya podido controlar de manera más efectiva la replicación del parásito en el G3, lo que explicaría que en este grupo la carga parasitaria fuera menor en comparación con los otros dos grupos experimentales, y que también las lesiones encontradas fueran menos graves que aquellas de los G2 y G1. La posibilidad de una mayor maduración del sistema inmunitario en los fetos del G3 se ve además reforzada por el hecho de que sólo se detectaran anticuerpos específicos frente a *T. gondii* en el día 26 pi en los G2 y G3, pero no en el G1. De manera muy similar, en un estudio experimental previo sobre toxoplasmosis ovina no se encontraron títulos positivos de anticuerpos fetales anti-*T. gondii* por medio de la misma técnica serológica empleada en este estudio, IFAT, antes del día 30 pi (Buxton y Finlayson, 1986). Por otro lado, estos resultados indicarían que esta técnica podría ser poco específica para el diagnóstico de casos naturales de aborto por *T. gondii* en la especie ovina puesto que solamente permitió detectar anticuerpos

Capítulo III. Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.

frente al parásito en un caso del total de los nueve fetos abortados o mortinatos de este trabajo.

Un resultado muy interesante de este estudio fue que el parásito llegó a la placenta antes en el G3 que en los G1 y G2, lo que sugiere que en las últimas etapas de la gestación, el animal no es capaz de controlar de manera eficaz la diseminación del parásito. En modelos experimentales murinos se ha sugerido que a medida que avanza la gestación se produce una modulación de la respuesta inmunitaria materna desde una de tipo Th1 hacia una de tipo Th2 para asegurar la viabilidad fetal (Wegmann *et al.*, 1993). Puesto que las citoquinas de tipo Th1 son claves para el control de la replicación de *T. gondii* (Tan *et al.*, 2011), este paradigma Th1/Th2 podría explicar por qué el parásito alcanzó antes, o se replicó más rápido, la placenta y el feto en el G3. Sin embargo, esta transición entre distintos tipos de respuesta inmunitaria se ha considerado como una explicación demasiado simple, teniendo en cuenta la enorme complejidad de la interacción materno-fetal (Chaouat *et al.*, 2003; Zenclussen *et al.*, 2006). Además, está basada exclusivamente en estudios desarrollados en modelos experimentales murinos, lo que dificulta extrapolar estos resultados a otras especies (Entrican, 2002). En este sentido, en trabajos realizados más recientemente, no se han encontrado variaciones en la respuesta inmunitaria periférica de ovejas a medida que la gestación avanza, lo que sugiere que, en caso de ocurrir, la modulación de la respuesta inmunitaria en ovinos durante la gestación sucedería solo a nivel local (Wattegedera *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta la importancia de los factores locales durante la gestación, el estudio de las células NK está teniendo cada vez más importancia debido a su papel clave en el mantenimiento de la gestación (Chaouat *et al.*, 2003; Jabrane-Ferrat y Siewiera, 2014). En este trabajo las ovejas infectadas al principio de la misma sufrieron un periodo de hipertermia más prolongado en el tiempo que aquellas infectadas a mitad o final de la gestación. También en esas ovejas el parásito se detectó de manera más tardía. Puesto que se ha demostrado que el desarrollo

Capítulo III. Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.

de un proceso febril es consecuencia de la respuesta inmunitaria innata tras una infección y que potencia la efectividad de la posterior respuesta inmunitaria adquirida (Evans *et al.*, 2015), es posible que esas diferencias encontradas entre los G1 y G3 sean debidas no solamente a una posible modulación del sistema inmunitario materno, sino también a variaciones de la respuesta inmunitaria innata.

En conjunto, los resultados de este estudio experimental demuestran claramente que el momento de gestación en el que ocurre la infección de las ovejas gestantes influye directamente sobre la patogenia de la toxoplasmosis ovina, complementando los hallazgos de un estudio experimental previo (Buxton y Finlayson, 1986). Este efecto se ha constatado en el desarrollo clínico de la enfermedad, en la gravedad de las lesiones asociadas y en la carga parasitaria encontrada en los tejidos. La diseminación del parásito se controló de manera más eficaz en las ovejas infectadas en el primer tercio de gestación que en aquellas infectadas en el segundo tercio, por lo que la gravedad de las lesiones fue menor en aquellas. La infección en el último tercio de gestación se asoció con una diseminación más rápida del parásito en el feto y en la placenta, desembocando en aborto. Sin embargo, las lesiones fetales fueron menos graves que las encontradas cuando la infección se produjo en el primer tercio de gestación. Aunque se desconocen los mecanismos que explicarían estas diferencias, se ha sugerido que podrían deberse a la modulación de la respuesta inmunitaria a medida que avanza la gestación (Entrican, 2002; Chaouat *et al.*, 2003). Sería conveniente analizar, en próximas investigaciones, el tipo de modulación y su influencia en las respuestas inmunitarias periférica y local.

Capítulo III. Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.

Tabla adicional III.1. Títulos serológicos individuales en las ovejas infectadas y en los fetos/mortinatos en el momento de la necropsia.

Grupo	Oveja (Ref.)	Día pi de necropsia	Título sérico	Fetos (ref.)	Título sérico o de fluidos fetales
G1 (día 40)	146	12	1:400	146F1	-
				146F2	-
	147	12	1:800	147F1	-
				147F2	-
	148	12	1:800	148F1	-
				148F2	-
	150	19	1:1600	150F1	-
				150F2	-
	151	19	1:400	151F1	-
				151F2	-
	152	19	1:800	152F1	-
				154F1	-
				154F2	-
	154	26	1:800	154F3	-
				155F1	-
				155F2	-
155	26	1:600	156F1	-	
			156F2	-	
G2 (día 90)	387	11 [^]	1:400	387F1	-*
	158	12	1:800	158F1	-*
				159F1	-*
				159F2	-*
	159	12 [^]	1:3200	159F3	-*
				160F1	-
				160F2	-
	160	13 [^]	1:3200	160F3	-
				379F1	-
				162F1	-
	379	14 [^]	1:3200	162F2	-
				163F1	-
	162	19	1:1600	163F2	-
				163F3	-
				163F1	-
	163	19	1:3200	163F2	-
163F3				-	
165F1				-	
165	26	1:6400	165F1	-	

Capítulo III. Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.

				165F2	-
	166	26	1:6400	166F1	1:64
				166F2	1:128
	179	9 [^]	1:1600	179F1	na
	181	12	1:1600	181F1	1:16
	182	12	1:1600	182F1	-
	183	13 [^]	1:1600:	183F1	-*
				183F2	-*
G3	185	19 [^]	1:1600	185F1	-*
(día 120)	186	19	1:6400	186F1	-
	187	21 [^]	1:6400	187F1	-*
	188	22 [^]	1:3200	188F1	-*
				188F2	-*
	189	26 [^]	1:12800	189F1	na
				189F2	1:32

[^] fetos abortados o mortinatos. * análisis del líquido torácico de los fetos abortados. pi: post-infección.

Capítulo III. Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.

Tabla adicional III.2. Cuantificación individual de las lesiones de la placenta y de las vísceras fetales (hígado, pulmón y encéfalo).

Grupo	Feto (ref.)	Necropsia (día pi)	Placentoma			Hígado fetal			Encéfalo fetal			Pulmón fetal		
			Nº focos /cm ²	TMF (mm ²)	%PSAL	Nº focos /cm ²	TMF (mm ²)	%PSAL	Nº focos /cm ²	TMF (mm ²)	%PSAL	Nº focos /cm ²	TMF (mm ²)	%PSAL
	154F1	26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,16	0,018	0,08
	154F2	26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,19	0,058	0,07
G1 (día 40)	155F1	26	0,52	0,018	0,01	1,98	0,023	0,05	6,60	0,016	0,11	61,42	0,028	1,73
	155F2	26	-	-	-	-	-	-	4,47	0,01	0,05	23,10	0,017	0,38
	156F1	26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	41,06	0,062	2,54
	156F2	26	-	-	-	3,47	0,1	0,35	-	-	-	21,68	0,037	0,8
G2 (día 90)	165F1	26	0,88	0,021	0,02	14,39	0,076	1,09	3,66	0,039	0,14	13,88	0,053	0,74
	166F1	26	0,08	0,95	0,085	3,06	0,025	0,08	7,46	0,033	0,24	1,83	0,026	0,05
	166F2	26	-	-	-	2,99	0,018	0,06	37,07	0,019	0,69	-	-	-
G3 (día 120)	186F1	19	-	-	-	0,58	0,024	0,01	-	-	-	1,65	0,008	0,01
	187F1	21 ^a	ND	ND	ND	4,19	0,031	0,13	-	-	-	-	-	-
	188F2	22 ^a	ND	ND	ND	10,38	0,045	0,47	-	-	-	1,83	0,026	0,05
	189F2	26 ^a	ND	ND	ND	4,14	0,025	0,1	1,20	0,017	0,02	5,69	0,037	0,21

^a Mortinatos. Los otros casos fueron seleccionados según el diseño experimental inicial. pi: post-infección. ND: no disponible. TMF: Tamaño medio de los focos. %PSAL: Porcentaje de sección afectada por las lesiones.

Capítulo III. Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.

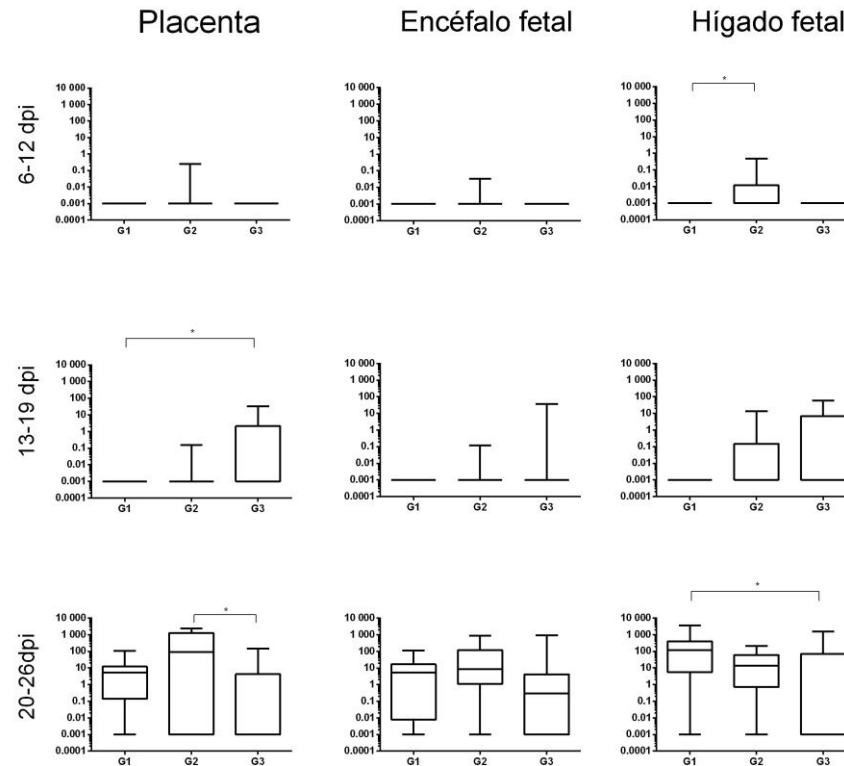


Figura adicional III.1. Diagrama “box-plot” que representa las cargas parasitarias de *T. gondii* medidas en el mismo periodo pi y comparadas entre los tres grupos experimentales en la placenta y vísceras fetales (encéfalo e hígado). La raya horizontal de cada caja representa la carga parasitaria media, mientras que la inferior y superior representan los valores mínimo y máximo respectivamente. Los asteriscos indican los niveles de significancia entre cada día pi en los diferentes tejidos analizados: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$). dpi: días post-infección.

Capítulo III. Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.

Tabla adicional III.3. Frecuencia individual de detección de ADN parasitario en los fetos.

Grupo	Feto (ref.)	Necropsia (día pi)	Placenta	Tejidos fetales					
				Encéfalo	Hígado	Corazón	Pulmón	MST	
G1 (día 40 pi)	146F1	12	-	-	-	-	+	+	
	146F2	12		-	-	-	-	-	
	147F1	12	-	-	-	-	-	-	
	147F2			-	-	-	-	-	
	148F1	12	-	- [^]	-	-	-	-	
	148F2			-	-	-	-	-	
	150F1	19	-	- [^]	-	-	- [^]	-	
	150F2			- [^]	- [^]	-	+ [^]	-	
	151F1	19	-	-	-	-	-	-	
	151F2			-	-	-	-	-	
	152F1	19	-	-	-	-	-	-	
	154F1				+++	+++	+++	+++	+++
	154F2	26	+++	- [^]	++	+++	+++	+++	+++
	154F3				+++	+++	+++	+++	+++
	155F1	26	+++		+++	+++	+++	+++	+++
	155F2				+++	+++	+++	+++	+++
	156F1	26			++	+++	+++	+++	+++
	156F2			+++		+++	++	+++	+++
	G2 (día 90 pi)	387F1	11	-	- [^]	- [^]	- [^]	- [^]	- [^]
158F1		12	+	++	+	+	-	-	
159F1				- [^]	++	-	-	-	
159F2		12	-	- [^]	-	-	-	-	
159F3				- [^]	-	-	-	-	
160F1		13			-	-	-	-	-
160F2				+		-	-	-	-

Capítulo III. Toxoplasmosis ovina experimental: influencia del estado de gestación sobre el curso clínico, el desarrollo lesional y la distribución del parásito.

	160F3			+	-	-	+++	-
	379F1	14		_b	_b	_b	_b	_b
	162F1			+++	+	++	+++	-
	162F2	19	++	-	-	-	-	-
	163F1			-	++	++	-	-
	163F2	19	-	-	++	-	-	-
	163F3			-	++	-	+++	+++
	165F1			++	+++	+++	+++	+++
	165F2	26	++	+++^	++^	-	-	-
	166F1			+++	+++	+++	+++	+++
	166F2	26	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	179F1	9	-	-	-	-	-	-
	181F1	12	-	-	-	-	-	-
	182F1	12	-	-	-	-	-	-
	183F1			-	-	-	-	-
	183F2	13	-	-	-	-	-	-
	184F1	19	-	-	-	-	-	-
G3	185F1	19	+++	+	-	+++	+++	+++
(día 120 pi)	186F1	19	++	+	+++	+++	+++	+++
	187F1	21	+^	++	+++	+++	+++	+++
	188F1			++^	-^	+++^	+++^	+++^
	188F2	22	++^	+++	++	+++	+++	+++
	189F1			-^	-^	-^	-^	-^
	189F2	26	+++^	+++	++	+++	+++	+++

^: muestra autolítica. pi: post-infección. MST: músculo semitendinoso. Los símbolos +++, ++ y + así como - representan la detección de ADN parasitario en porcentajes del 67 %, 66-34 %, <3 3% y 0 % respectivamente.

Capítulo IV.

Valoración de la respuesta inmunitaria periférica y local en ovejas infectadas experimentalmente con *T. gondii* en los tres tercios de gestación.

Trabajo publicado en el año 2019 en la revista *Veterinary Research*.

Castaño P, Fernández M, Regidor-Cerrillo J, Fuertes M, Horcajo P, Ferre I, Ferreras MC, Ortega-Mora LM, Pérez V, Benavides J. (2019). Peripheral and placental immune responses in sheep after experimental infection with *Toxoplasma gondii* at the three terms of gestation. *Vet. Res.* 50, 66.

Capítulo IV. Valoración de la respuesta inmunitaria periférica y local en ovejas infectadas experimentalmente con *T. gondii* en los tres tercios de gestación.

1. Introducción.

La toxoplasmosis ovina es una enfermedad infecciosa, causada por el protozoo *T. gondii*, que provoca importantes pérdidas económicas en la ganadería ovina en todo el mundo ya que ocasiona problemas de infertilidad, principalmente abortos y el nacimiento de corderos débiles (Dubey, 2009b). A pesar de su gran relevancia, se desconocen los mecanismos que explicarían los abortos, pues no está claro si ocurren como consecuencia de la multiplicación del parásito en el feto o en la placenta, o si por el contrario se deben a un desequilibrio hormonal o de la respuesta inmunitaria en estas localizaciones (Castaño *et al.*, 2016).

El momento de gestación en que sucede la infección de las ovejas gestantes determina las consecuencias de la toxoplasmosis ovina (Castaño *et al.*, 2016). Aunque en ratones se ha demostrado que durante la gestación la respuesta inmunitaria desarrollada en la placenta sufre una modulación y que las respuestas inmunitarias periférica y local difieren durante el proceso gestante (Chaouat, 2003), no se ha comprobado que esto también suceda en la especie ovina (Entrican *et al.*, 2015). De hecho, el paradigma de que la respuesta inmunitaria materna en la placenta evoluciona desde una de tipo Th1, caracterizada por la producción de las citoquinas pro-inflamatorias IFN- γ y TNF- α , hacia una de tipo Th2, representada principalmente por IL4 e IL10, está basado en infecciones experimentales de ratones con *T. gondii* a mitad de la gestación (Krishnan *et al.*, 2013). Sin embargo, estos resultados no se pueden extrapolar a la especie ovina debido a las diferencias existentes entre ambas especies en cuanto a la estructura de la placenta, la respuesta inmunitaria o la duración de la gestación (Innes, 1997). De hecho, los escasos estudios experimentales que se han desarrollado hasta la fecha para investigar este aspecto de la enfermedad en ovejas no han encontrado diferencias entre las respuestas inmunitarias periféricas de animales gestantes y no gestantes (McClure *et al.*, 2005; Wattedgedera *et al.*, 2008).

Capítulo IV. Valoración de la respuesta inmunitaria periférica y local en ovejas infectadas experimentalmente con *T. gondii* en los tres tercios de gestación.

Los trabajos que estudian la respuesta inmunitaria desarrollada en ovejas gestantes tras la infección experimental con *T. gondii* son escasos (Buxton y Finlayson, 1986; Castaño *et al.*, 2014; Sánchez-Sánchez *et al.*, 2019). Aun así, parece claro que la temprana producción de IFN- γ es un mecanismo de control de la infección asociado a una respuesta inmunitaria de tipo Th1 (Oura *et al.*, 1993; Gazzinelli *et al.*, 1996a). Además de los mecanismos celulares, la infección con *T. gondii* en ovejas estimula la respuesta inmunitaria humoral (Stanley *et al.*, 2004), aunque no es hasta la segunda semana pi cuando se empiezan a detectar anticuerpos específicos frente al parásito en la sangre periférica materna (Innes y Wastling, 1995), que además parecen desempeñar un papel inmunitario menor que los mecanismos celulares a la hora de controlar la infección (Innes *et al.*, 2007). Por otro lado, se ha demostrado que en los rumiantes la placenta es un sitio inmunológicamente muy activo que es capaz de prevenir la infección del feto y permitir de esta manera el transcurso normal de la gestación (Fair, 2015). Sin embargo, a pesar de la relevancia de la toxoplasmosis ovina, hay muy pocos estudios que analicen la respuesta inmunitaria local en este órgano durante la infección. Nuestro grupo de investigación publicó recientemente un trabajo en el que se demostró que el momento de gestación en que se infectan las ovejas influye de manera directa sobre el curso clínico de la enfermedad, el desarrollo de lesiones y la multiplicación del parásito (Castaño *et al.*, 2016). Teniendo en cuenta la ausencia de evidencias de que la respuesta inmunitaria periférica materna sea modulada (Wattegedera *et al.*, 2008), la hipótesis de este estudio es que dicha modulación ocurre en la placenta y que sería clave en la patogenia de la enfermedad. De esta manera, el objetivo del trabajo es comparar las respuestas inmunitarias periférica y local, a nivel de la placenta, desarrolladas en ovejas gestantes infectadas de manera experimental con 50 ooquistes esporulados de *T. gondii* (aislado M4) administrados por vía oral en los tres tercios de gestación.

Capítulo IV. Valoración de la respuesta inmunitaria periférica y local en ovejas infectadas experimentalmente con *T. gondii* en los tres tercios de gestación.

2. Material y métodos.

2.1. Animales y diseño experimental.

En el estudio experimental previo desarrollado por nuestro grupo de investigación se describió en detalle el diseño del estudio (Castaño *et al.*, 2016). De manera resumida, se seleccionaron 36 ovejas primíparas de raza Churra y del mismo rebaño con una edad comprendida entre 24 y 30 meses, y que eran seronegativas a *T. gondii*, *N. caninum*, virus de la enfermedad de la frontera, *C. burnetii* y *C. abortus*. Posteriormente, se sincronizó el celo de las ovejas y fueron cubiertas mediante monta natural con machos de raza Churra durante dos días, tras lo cual los machos fueron apartados del rebaño. A los 40 días posteriores a la fertilización, se comprobó el estado de gestación y la viabilidad fetal mediante ecografía. Las ovejas gestantes fueron distribuidas al azar en tres grupos experimentales, cada uno formado por 9 ovejas infectadas y 3 no infectadas, a modo de control negativo de la infección.

En función del momento de gestación en que se infectaron, los animales se clasificaron en diferentes grupos: a los 40 (G1), 90 (G2) y 120 (G3) días de gestación (**Tabla IV.1**). La infección experimental de las ovejas se llevó a cabo por vía oral con 50 ooquistes esporulados del aislado M4 de *T. gondii* (Moredun Research Institute, Edimburgo, Escocia, Reino Unido), caracterizado como de tipo II (Dr. Frank Katzer, comunicación personal), diluidos en 50 ml de PBS, mientras que a los 3 animales no infectados de cada grupo se les administraron 50 ml de PBS y se mantuvieron como controles negativos de la infección. Estaba previsto el sacrificio secuencial en cada grupo experimental de 3 ovejas infectadas y 1 control los días 12, 19 y 26 pi. Sin embargo, la aparición de abortos espontáneos en las fases tempranas (entre los 9 y 14 días pi) y más avanzadas (entre los 17 y 26 días pi) de gestación obligó a modificar el número de ovejas infectadas que se sacrificaron los días 12, 19 y 26 pi en G2 y G3 (**Tabla IV.1**). Las ovejas que sufrieron abortos espontáneos fueron sacrificadas en el

Capítulo IV. Valoración de la respuesta inmunitaria periférica y local en ovejas infectadas experimentalmente con *T. gondii* en los tres tercios de gestación.

momento de detectarse este, ya fuera por la expulsión del feto/mortinato o bien por la detección por ecografía de la muerte fetal.

Tabla IV.1. Distribución experimental de los animales según el momento de gestación en que fueron infectados (G1, G2 o G3) y el día pi en el que fueron sacrificados o en el que se produjo el aborto.

	Nº de ovejas				
	Abortos‡		Sacrificio secuencial		
	6-16 dpi	17-26 dpi	12 dpi	19 dpi	26 dpi
G1	2/0 [^]	1/0	1/1	3/1	2/1
G2	4/0	1/0	1/1	2/1	1/1
G3	2/0	4/0	2/1	1/1	0/1

‡: abortos espontáneos o mortinatos ocurridos en ese grupo. ^: ovejas infectadas/control.

Todos los protocolos relacionados con el manejo de los animales fueron realizados de acuerdo a la normativa vigente tanto a nivel nacional como europeo (Ley 32/2007, R.D. 1201/2005 y Directiva 2010/63/UE). Asimismo, fueron aprobados por el Comité de Bienestar Animal del Instituto de Ganadería de Montaña (IGM, ULE-CSIC), de León.

2.2. Seguimiento clínico y recogida de muestras.

Tras la inoculación del parásito, la viabilidad fetal se comprobaba tres días a la semana mediante ecografía.

Las muestras de sangre se recogieron en los días -1, 1, 5, 8, 12, 15, 19, 22 y 26 pi mediante punción yugular y en los días en los que se sacrificó a los animales justo antes de administrarles el agente eutanásico. En el caso de los fetos, la sangre se extrajo de las venas del cordón umbilical o del corazón en el momento de la necropsia. Las muestras sanguíneas se recogieron en tubos Vacutainer (Becton– Dickinson and Company, Plymouth, Reino Unido) sin anticoagulante y se les dejó coagular a

Capítulo IV. Valoración de la respuesta inmunitaria periférica y local en ovejas infectadas experimentalmente con *T. gondii* en los tres tercios de gestación.

temperatura ambiente. Tras la centrifugación de estas muestras se obtuvo el suero que se almacenó a -80°C hasta su análisis posterior.

En los días 12, 19 y 26 pi, o después de que se produjeran abortos de manera espontánea (ver apartado anterior), los animales fueron sedados con xilacina (Rompun™, Bayer, Mannheim, Alemania) y posteriormente eutanasiados tras administrarles una sobredosis de embutramida y de yoduro de mebezonio (T61, Intervet, Salamanca, España). Inmediatamente después de la eutanasia, se recogieron las muestras fetales y de placenta. Respecto a estas últimas, se cortaron de manera transversal diez placentomas seleccionados al azar y se sumergieron en “RNAlater” (Sigma–Aldrich, Saint Louis, Missouri, E.E.U.U.) para el análisis de la expresión de ARN_m de diversas citoquinas.

2.3. Detección de anticuerpos específicos frente a *T. gondii* en muestras de suero.

Las muestras de suero recogidas de las ovejas y de los fetos se analizaron mediante una técnica de ELISA indirecto (Innes y Wastling, 1995) para detectar anticuerpos específicos frente al parásito. Los 96 pocillos de cada placa fueron recubiertos con antígeno soluble procedente de taquizoítos del aislado ME49. A continuación, se incubaron durante una noche entera a 4 °C con 100 µL por pocillo de la solución de antígeno a una concentración de 10 µg/mL diluida en tampón carbonato (63 mM, pH 9,6). Las uniones inespecíficas se bloquearon mediante la adición de 100 µl de albúmina sérica bovina diluida al 0,05 % en tampón fosfato salino (0,1 M, pH 7.,6) con 0,05 % de Tween 80 (PBST). Tras 2 h de incubación a temperatura ambiente, las placas se lavaron cuatro veces con PBST. Las muestras de suero se diluyeron a 1:100 en PBST y se añadieron 100 µL de esta dilución a cada pocillo, dejándolos incubar durante 1 h a temperatura ambiente. Se analizaron todas las muestras por duplicado. Tras lavar de nuevo las placas 4 veces con PBST, se añadieron 100 µL de peroxidasa de rábano picante (HRP por sus siglas en inglés) conjugada con proteína G (Biorad, Hercules, E.E.U.U.) diluida a 1:1500 en PBST dejando incubar la mezcla durante 1 h a temperatura ambiente. Tras un nuevo lavado, se añadieron a cada pocillo 100 µL de

Capítulo IV. Valoración de la respuesta inmunitaria periférica y local en ovejas infectadas experimentalmente con *T. gondii* en los tres tercios de gestación.

sustrato ABTS (Sigma-Aldrich, Madrid, España), dejándolo incubar durante 30 min. En concreto, 5,48 mg de este sustrato se habían diluido en 50 ml de tampón citrato 0,05 M, pH 4,0 con 0,0016 % de peróxido de hidrógeno. Por último, se añadieron a cada pocillo 40 µL de una solución de ácido fluorhídrico 0,1 M a temperatura ambiente para finalizar la reacción y la densidad óptica (DO) se midió a 405 nm. Así, los resultados se expresaron como un índice de densidad (IO) óptica:

$$IO = \frac{DO \text{ muestra} - DO \text{ control negativo}}{DO \text{ control positivo} - DO \text{ control negativo}} .$$

2.4. Cuantificación de los niveles de IFN-γ, TNF-α, IL4 e IL10 en suero materno.

Los niveles de las citoquinas IFN-γ e IL4 se cuantificaron mediante los kits comerciales “Bovine IFN-γ e IL4 ELISA” (Mabtech AB, Suecia) respectivamente, siguiendo en todo momento las indicaciones del fabricante. Por otro lado, los niveles de TNF-α e IL10 se cuantificaron mediante un ELISA de inhibición competitiva (Cusabio®) específico para cada citoquina, siguiendo también las indicaciones del fabricante. En todos los casos, se leyó la DO de las placas a 450 nm y los resultados se interpretaron de manera posterior mediante el programa informático “Curve Expert Professional” (Hyams Development, Alabama, E.E.U.U.). Para poder comparar la evolución de los niveles de estas citoquinas en las muestras de suero en cada tercio de gestación, los datos procedentes de los días 1, 5, 8, 12, 15, 19, 22 y 26 pi se normalizaron con los valores de cada grupo del día -1 pi, de modo que se expresaron como un cociente.

2.5. Extracción de ARN y qPCR.

Se extrajo ARN de cinco placentomas mediante el kit comercial “Maxwell® 16 LEV simply RNA Purification Kit”, desarrollado por Maxwell® 16 System (Promega, Wisconsin, E.E.U.U.), siguiendo en todo momento las instrucciones del fabricante. La integridad de las muestras de ARN se comprobó en un gel de agarosa al 1% y se determinaron las concentraciones de ARN mediante un espectrofotómetro “Nanophotometer” (Implen GmbH, Munich, Alemania). El ADN_c se obtuvo mediante transcripción inversa utilizando el kit comercial “Master mix SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit” (Invitrogen, Paisley, Reino Unido), de acuerdo al procedimiento

Capítulo IV. Valoración de la respuesta inmunitaria periférica y local en ovejas infectadas experimentalmente con *T. gondii* en los tres tercios de gestación.

descrito en un estudio previo (Innes *et al.*, 2007). Los cebadores utilizados y la metodología empleada en la PCR fueron similares a lo descrito por Arranz-Solís *et al.* (2016), y pueden consultarse en la **Tabla adicional IV.1**. La expresión de ARN_m se calculó normalizando los valores C_t del gen diana con el valor C_t del gen “housekeeping”, o constitutivo. Los valores C_t normalizados de los animales infectados se restaron de los valores C_t promedio de los animales control. Las diferencias resultantes ($\Delta\Delta C_t$) se transformaron y expresaron como un incremento lineal con respecto a los animales control y se llevó a cabo su análisis estadístico, siguiendo el procedimiento descrito en estudios previos (Schmittgen y Livak, 2008; Arranz-Solís *et al.*, 2016).

2.6. Análisis estadístico.

Debido a que el número de muestras del que se disponía estaba limitado por la modificación que tuvo que realizarse en el plan de sacrificios secuenciales previsto inicialmente debido a la aparición espontánea de abortos en las fases más tempranas y más avanzadas de la infección, se consideró que no era significativo el efecto del día pi en el que los animales fueron sacrificados, de modo que solamente se compararon entre sí los datos de cada grupo experimental (G1, G2, G3) según el momento de gestación en el que se infectó a las ovejas.

Los niveles de producción de anticuerpos de cada grupo experimental se analizaron mediante la prueba estadística ANOVA. En el caso de que se encontraran diferencias significativas, se utilizó la prueba de Tukey para analizar las comparaciones múltiples en cada tiempo en el que se recogieron muestras. Las variaciones en los niveles de expresión de las citoquinas en muestras de suero se analizaron mediante la prueba estadística t de Student, utilizando el método Holm-Sidak para corregir las comparaciones múltiples.

Finalmente, para analizar las diferencias en la expresión de los niveles de ARN_m en la placenta entre cada grupo experimental se utilizó la prueba estadística Mann-Whitney.

Capítulo IV. Valoración de la respuesta inmunitaria periférica y local en ovejas infectadas experimentalmente con *T. gondii* en los tres tercios de gestación.

En todos los análisis, se estableció un nivel de significancia de $p < 0,05$. Para analizar todos los datos se empleó el programa informático “GraphPad Prism 6.01” (San Diego, California, E.E.U.U.).

3. Resultados.

En el capítulo anterior ya se mostró un estudio detallado de los resultados relativos al curso clínico de la enfermedad, desarrollo de lesiones y distribución del parásito, los cuales se corresponden con los publicados en Castaño *et al.* (2016). En la **Tabla adicional IV.2** se puede consultar una breve comparación de los valores medios de la carga parasitaria y de las lesiones histológicas de los animales infectados de los G1, G2 y G3 en el día 26 pi.

3.1. Producción de anticuerpos anti-*T. gondii* en el suero materno.

Los anticuerpos específicos frente a *T. gondii* comenzaron a detectarse en el suero materno a partir del día 5 pi, de forma que sus niveles se incrementaron hasta el final del experimento. No obstante, se encontraron diferencias en la cinética de producción de anticuerpos entre los diferentes grupos experimentales. Así, el valor medio de IO de las ovejas gestantes del G2 fue significativamente mayor que el del G1 en los días 1, 5, 8 y 12 pi y que el del G3 en los días 8, 12, 19 y 22 pi. Respecto a los animales no infectados, su producción de anticuerpos frente al parásito se mantuvo constante a lo largo de todo el experimento (**Figura IV.1**).

3.2. Presencia de citoquinas en el suero materno.

De entre todas las citoquinas analizadas (IFN- γ , TNF- α , IL4 e IL10), IFN- γ fue la que se detectó en mayor cantidad, y de manera más temprana, en todos los grupos experimentales (**Figura IV.1**). En todos ellos, los niveles circulantes de esta citoquina fueron significativamente mayores que los del grupo de animales no infectados en el

Capítulo IV. Valoración de la respuesta inmunitaria periférica y local en ovejas infectadas experimentalmente con *T. gondii* en los tres tercios de gestación.

día 8 pi. Además, en el día 5 pi sus niveles en las ovejas infectadas de los G2 y G3 fueron significativamente mayores que en el grupo control. No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos infectados. Respecto a TNF- α , destacó su notable incremento en el día 12 pi en las ovejas gestantes infectadas del G2. Los niveles fueron significativamente mayores que los encontrados en el suero de los animales control y de los infectados del G1 en los días 12 y 15 pi. En lo que a los niveles de IL10 respecta, no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos infectados en el día 12 pi, momento en el que en todos ellos se observaron valores significativamente mayores que en el grupo de animales control. Además, los niveles fueron significativamente mayores en las ovejas infectadas del G1 con respecto a los animales control y del G2 en los días 19 y 22 pi respectivamente. Finalmente, los niveles de IL4 no fueron significativamente diferentes entre ninguno de los grupos infectados, ni tampoco al comparar cualquiera de ellos con el de animales control (**Figura IV.1**).

Capítulo IV. Valoración de la respuesta inmunitaria periférica y local en ovejas infectadas experimentalmente con *T. gondii* en los tres tercios de gestación.

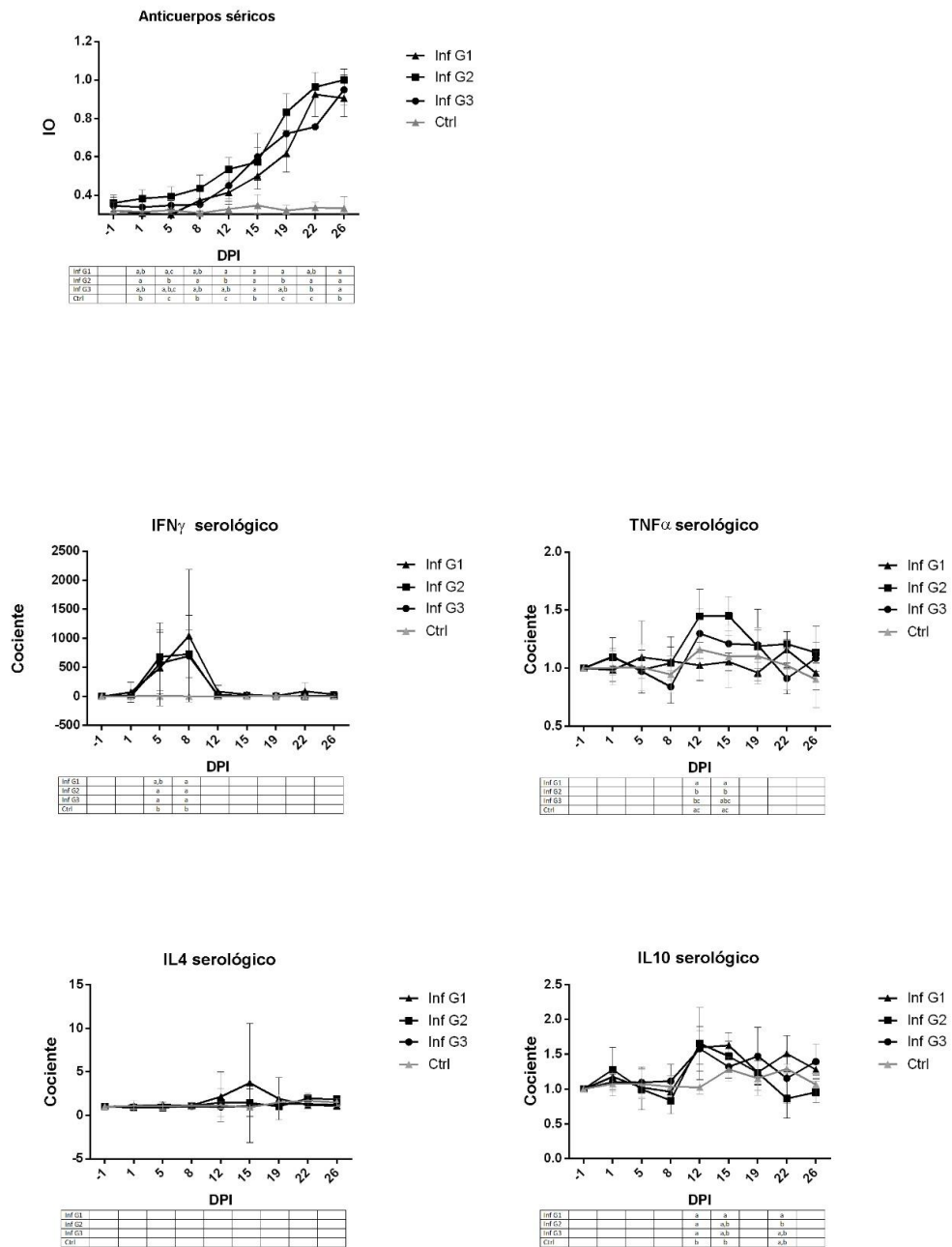


Figura IV.1. Producción de anticuerpos y citoquinas en muestras de suero de los animales infectados y controles de los G1, G2 y G3. Las gráficas representan los valores de IO de los anticuerpos y el cociente las citoquinas en los tres tercios de gestación en que se produjo la infección con *T. gondii*. Las letras que aparecen en la misma columna de las tablas representan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos experimentales al compararlos en el mismo día pi.

Capítulo IV. Valoración de la respuesta inmunitaria periférica y local en ovejas infectadas experimentalmente con *T. gondii* en los tres tercios de gestación.

3.3. Niveles de transcripción de ARN de las citoquinas en la placenta.

La respuesta inmunitaria desarrollada a nivel local en la placenta se caracterizó mediante el estudio de la transcripción de ARN en los placentomas de las mismas citoquinas analizadas en las muestras de suero materno (**Figura IV.2**). Se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de todas las citoquinas estudiadas, salvo IL12, de los animales infectados de los tres grupos con respecto a los controles en al menos un tercio de gestación. Cabe destacar que los niveles de expresión de IL10 no fueron significativamente diferentes de los de los animales controles en el G1, mientras que esto mismo ocurrió al analizar los niveles de expresión de IL4 en los animales infectados del G3 y los controles.

De manera similar a lo observado al estudiar la respuesta inmunitaria periférica, los mayores niveles de expresión encontrados en los placentomas entre animales infectados y controles correspondieron a la citoquina IFN- γ . No obstante, no se detectaron diferencias significativas en su expresión entre los diferentes grupos infectados, como tampoco las hubo en el caso de TNF- α .

Sí se encontraron diferencias significativas en los niveles de transcripción de las citoquinas de tipo Th2 y T_{reg} entre los diferentes grupos experimentales. En concreto, los niveles de expresión de IL4 fueron significativamente mayores en los G1 y G2, mientras que los de IL10 lo fueron en el G3.

Capítulo IV. Valoración de la respuesta inmunitaria periférica y local en ovejas infectadas experimentalmente con *T. gondii* en los tres tercios de gestación.

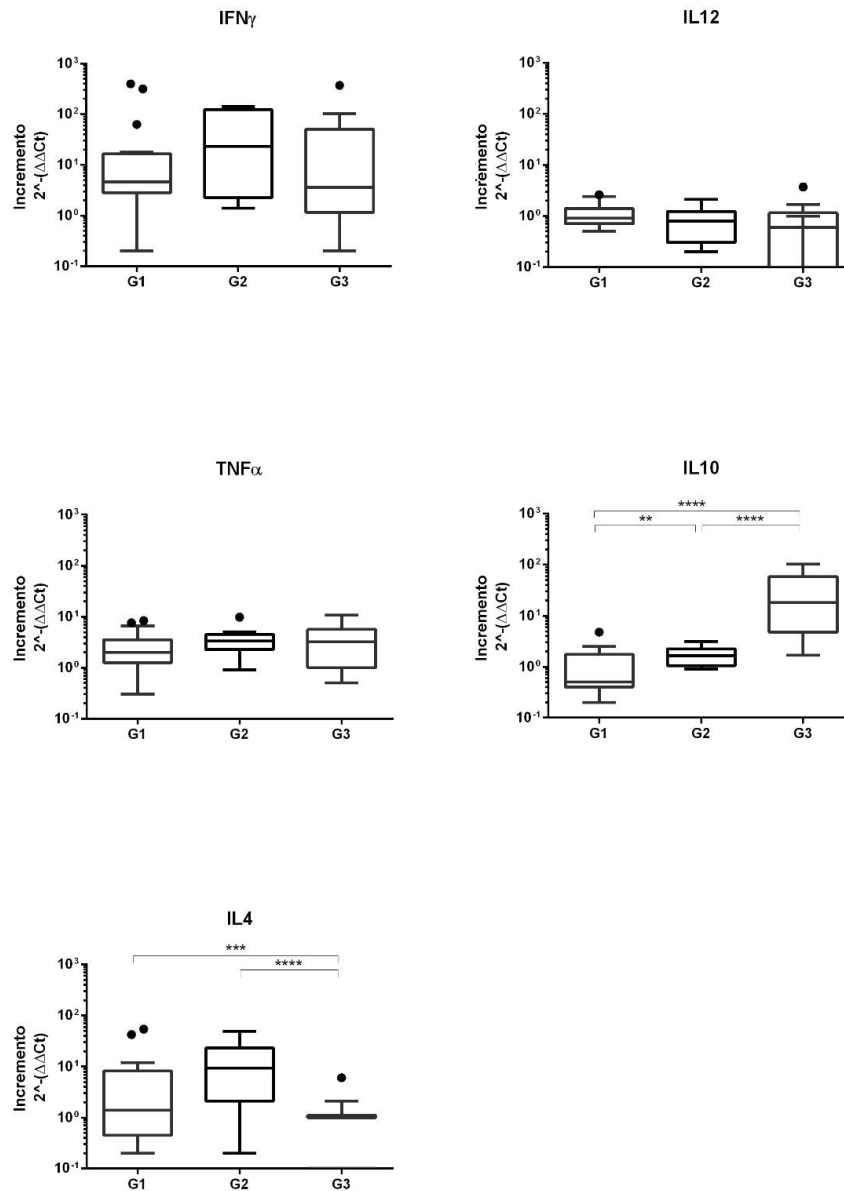


Figura IV.2. Transcripción del ARN de las citoquinas de los animales infectados y controles de los tres grupos experimentales en muestras de placenta. Las gráficas representan los niveles de expresión de las citoquinas IFN- γ y TNF- α , de tipo Th1, así como de IL4, de tipo Th2, y de IL10, de tipo T_{reg}, para analizar la influencia del tercio de gestación en que se produjo la infección con *T. gondii* sobre la respuesta inmunitaria a nivel local.

Capítulo IV. Valoración de la respuesta inmunitaria periférica y local en ovejas infectadas experimentalmente con *T. gondii* en los tres tercios de gestación.

4. Discusión.

La existencia de una clara influencia del momento de gestación en que se produce la infección experimental con *T. gondii* sobre la patogenia de la toxoplasmosis ovina ya se ha expuesto en el capítulo anterior, y los resultados relativos a dicho estudio fueron publicados en un artículo científico (Castaño *et al.*, 2016). En concreto, las lesiones asociadas a la infección y la llegada del parásito a la placenta, se detectaron de forma más temprana (a los 19 días pi) en los animales del G3, en comparación con el resto de animales infectados, en los que la detección no fue posible hasta el día 26 pi. Sin embargo, la mayor carga parasitaria se detectó en el día 26 pi en las ovejas infectadas a mitad de la gestación (Castaño *et al.*, 2016). Con el objetivo de profundizar en la patogenia de la toxoplasmosis ovina, en este estudio se analizan las respuestas inmunitarias periférica y local, en la placenta, en esos mismos animales.

Con respecto a la respuesta inmunitaria periférica, evaluada mediante la producción de anticuerpos específicos frente a *T. gondii*, se detectaron mayores niveles de anticuerpos circulantes en los animales infectados de todos los grupos con respecto a los controles en el día 12 pi. A pesar de que en los días 12 y 19 pi la producción de anticuerpos fue significativamente mayor ($p < 0,0001$) en el G2 que en el G1, a partir de ese momento no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales. De manera similar a los resultados de este trabajo, el aumento en la producción de anticuerpos específicos frente al parásito en la sangre periférica de ovejas infectadas con *T. gondii* a partir de la segunda semana pi ya había sido descrito previamente (Maley *et al.*, 1997; Castaño *et al.*, 2014; Sánchez-Sánchez *et al.*, 2019). El hecho de que la cinética de producción de anticuerpos sea similar entre los diferentes grupos de animales infectados sugiere que el momento de gestación en que ocurra la infección con *T. gondii* no influye sobre la respuesta inmunitaria periférica desarrollada en los animales.

Capítulo IV. Valoración de la respuesta inmunitaria periférica y local en ovejas infectadas experimentalmente con *T. gondii* en los tres tercios de gestación.

En lo que respecta a la producción de citoquinas en las muestras de suero materno, fue muy similar en todos los grupos experimentales, lo que fue especialmente destacable en el caso de la citoquina IFN- γ , cuyos niveles séricos fueron significativamente mayores ($p < 0,0001$) en todos los grupos de animales infectados con respecto al grupo de animales control en los días 5 y 8 pi. Estos resultados demuestran que esta citoquina ejerce un papel esencial en el control de la infección con *T. gondii* en ovinos, tal y como había sido demostrado previamente en ovejas no gestantes (Innes y Wastling, 1995; Verhelst *et al.*, 2014). Tras este incremento, los niveles circulantes de IFN- γ descendieron, coincidiendo con un incremento gradual en la producción de anticuerpos específicos frente al parásito, así como de las citoquinas TNF- α e IL10. A este respecto, en un estudio en el que se infectó de manera experimental un cultivo celular de trofoblastos humanos con *T. gondii* se describió también un incremento en la producción de ambas (Barbosa *et al.*, 2015). A la hora de comparar los niveles séricos de TNF- α e IL10 entre los animales de los tres grupos experimentales, se encontraron diferencias significativas solamente en momentos puntuales. Así, por ejemplo, los niveles circulantes de la citoquina TNF- α fueron mayores en el G2 que en G1 en los días 12 y 15 pi. Teniendo en cuenta que, como ya se ha explicado previamente (Castaño *et al.*, 2016), las lesiones más graves y las mayores cargas parasitarias, tanto en la placenta como en los tejidos fetales, se encontraron en los animales infectados a mitad de la gestación (G2) es posible pensar que la producción de la citoquina TNF- α y de los anticuerpos específicos frente al parásito ocurriría en la placenta pero también, por ejemplo, en los nódulos linfáticos tras la infección con el parásito, y que esto esté relacionado de algún modo con la gravedad de las lesiones fetales y de la placenta. Con respecto a IL4, no se encontraron diferencias significativas ni entre los animales infectados de los diferentes grupos experimentales ni al comparar los animales infectados con los controles, lo que está en consonancia con los resultados derivados de reproducciones experimentales de la toxoplasmosis en modelos murinos (Dogruman-AI *et al.*, 2011). A la vista de estos resultados, es posible sugerir que la citoquina IL4 no desempeña un papel

Capítulo IV. Valoración de la respuesta inmunitaria periférica y local en ovejas infectadas experimentalmente con *T. gondii* en los tres tercios de gestación.

relevante en la respuesta inmunitaria periférica desarrollada en ovinos tras la infección experimental con *T. gondii*.

También se analizó la influencia de la infección a nivel de la placenta, estudiando el perfil de transcripción de las citoquinas en este tejido. A excepción de IL12, se produjo un incremento en la transcripción de ARNm de todas las citoquinas estudiadas (IFN- γ , TNF- α , IL4 e IL10) en la placenta de todos los animales infectados con respecto a aquellos que no lo estaban. Por tanto, estos resultados demuestran que, de manera similar a lo ocurrido a nivel periférico, la respuesta inmunitaria desarrollada en la placenta tras la infección con *T. gondii* está caracterizada por la producción de citoquinas tanto de tipo Th1 como de tipo Th2, y de tipo T_{reg}. Estos resultados concuerdan con lo encontrado tras la infección experimental con el apicomplejo *N. caninum*, muy similar en términos evolutivos a *T. gondii*, donde se ha visto que no existe una polarización clara hacia uno u otro tipo de respuesta inmunitaria en la placenta de ovejas (Arranz-Solís *et al.*, 2016) y vacas (Rosbottom *et al.*, 2008) y apoyan que en ambas infecciones no existiría una polarización Th1/Th2 clara durante la gestación. Con respecto a las citoquinas de tipo Th1 (IFN- γ y TNF- α), que mostraron un incremento tras la infección, no se encontraron diferencias significativas en sus niveles de transcripción en la placenta de los diferentes grupos infectados. Los mayores niveles de producción de todas las citoquinas analizadas correspondieron a IFN- γ , lo que sugiere que esta citoquina no solamente es esencial en la respuesta inmunitaria periférica desarrollada por el hospedador tras la infección con *T. gondii*, sino que también es trascendental en la respuesta inmunitaria local, desarrollada en la placenta para controlar su multiplicación. Otros estudios ya han puesto de manifiesto la importancia de esta citoquina en la patogenia de la toxoplasmosis ovina (Innes *et al.*, 1995b; Verhelst *et al.*, 2015). En este trabajo, además, se demuestra que el papel que juega es independiente del momento de gestación en el que se infecten las ovejas.

Por otra parte, la expresión de las citoquinas de tipo Th2 (IL4) y T_{reg} (IL10) fue totalmente diferente. Los niveles de transcripción de IL10 fueron mayores en las

Capítulo IV. Valoración de la respuesta inmunitaria periférica y local en ovejas infectadas experimentalmente con *T. gondii* en los tres tercios de gestación.

ovejas infectadas en el último tercio de gestación (G3), mientras que en el caso de IL4 fueron mayores en los animales infectados en las primeras etapas de la enfermedad (G1). Estos resultados difieren de la idea clásica de que a medida que avanza la gestación la respuesta inmunitaria es modulada hacia una de tipo Th2, caracterizada por la producción de IL4 (Krishnan *et al.*, 2013). Puesto que los niveles de transcripción de ARNm de IL4 en la placenta fueron mayores en G1 y G2, los resultados de este trabajo demuestran que a medida que avanza la gestación en ovejas infectadas experimentalmente con *T. gondii* la respuesta inmunitaria en este órgano no evoluciona hacia una de tipo Th2. En estudios previos en los que se reprodujo experimentalmente la neosporosis en ovejas (Arranz-Solís *et al.*, 2016), vacas (Rosbottom *et al.*, 2008) y ratones (López-Pérez *et al.*, 2011) sí que se encontró un aumento en los niveles de expresión de esta citoquina en la placenta, confirmando que desempeña un importante papel en la patogénesis de la enfermedad. En lo que respecta a ovinos, los niveles de ARNm de IL4 en la placenta tras la infección con *N. caninum* fueron similares en el primer y tercer tercio de gestación (Arranz-Solís *et al.*, 2016).

En conjunto, tras analizar los niveles de expresión de las citoquinas IFN- γ , TNF- α , e IL4, tanto a nivel periférico como a nivel local, parece claro que, bajo las condiciones de este estudio, no existe una modulación de la respuesta inmunitaria en ovejas gestantes. Un estudio experimental previo, en el que se sensibilizó a ovejas con un antígeno no infeccioso, ovoalbúmina, no encontró diferencias a lo largo de la gestación en la producción de citoquinas tras la re-estimulación de PBMCs (Wattegedera *et al.*, 2008). Estos resultados son muy similares a los encontrados en este trabajo, aunque es cierto que, dada las diferencias en el diseño de ambos experimentos, y, sobre todo, en la naturaleza de los estímulos antigénicos (estimulación *in vitro* con el antígeno ovoalbúmina frente a la infección *in vivo* con *T. gondii* viable), es difícil poder comparar los hallazgos de ambos estudios.

En lo que respecta a la IL10, sus niveles de transcripción en la placenta aumentaron considerablemente en el segundo y tercer tercio de gestación. Se ha sugerido que

Capítulo IV. Valoración de la respuesta inmunitaria periférica y local en ovejas infectadas experimentalmente con *T. gondii* en los tres tercios de gestación.

esta es una citoquina que desempeña un papel clave en el mantenimiento de la gestación por su relación con las células T_{reg} (Cubro *et al.*, 2018). Aunque su papel en la infección con *T. gondii* durante la gestación no ha sido investigado en profundidad, se ha sugerido, tras investigaciones desarrolladas en modelos experimentales murinos, que la propia infección con este parásito podría favorecer la producción de IL10 como una estrategia de evasión contra la respuesta inmunitaria del hospedador para que así la infección se cronifique (Jeong *et al.*, 2016). Teniendo esto en cuenta, es posible que el aumento en la expresión de esta citoquina en los animales infectados a final de la gestación haya favorecido que el parásito colonice la placenta de manera más temprana, tal y como se ha descrito en el primer estudio (Castaño *et al.*, 2016). Por lo tanto, teniendo en cuenta los resultados de la expresión de IL4 e IL10 en la placenta, es posible que en este órgano se haya producido una modulación de la respuesta inmunitaria durante la gestación tras la infección con *T. gondii*, aunque no estaría claramente orientada hacia una de tipo Th2. Sería muy interesante, por tanto, dada la ausencia de estudios que aborden este aspecto concreto de la enfermedad, investigarlo y, en concreto, el papel que desempeña en el control de la enfermedad.

Sin embargo, al analizar el comportamiento de estas dos citoquinas, IL4 y IL10, durante la gestación, se observa que no existe correlación entre las variaciones observadas a nivel periférico y en los niveles de transcripción en la placenta. Esto sugiere que la respuesta inmunitaria desarrollada por las ovejas tras la infección varía en función de la localización. En ratones gestantes, se ha demostrado que tras ser infectados experimentalmente con *T. gondii*, su respuesta inmunitaria es modulada en la placenta, pero no a nivel periférico (Liu *et al.*, 2014), lo que se ha relacionado con una mayor expresión de las moléculas CTLA-4 y PD-L1 en las células T de este órgano en comparación con las células T del bazo (Liu *et al.*, 2014).

En conjunto, los resultados de este trabajo sugieren que en las ovejas se produce una modulación basal y limitada de la respuesta inmunitaria en la placenta durante la gestación, de manera similar a lo descrito en otras especies, pero que dicha modulación no se refleja a nivel periférico. Uno de los factores que pueden estar

Capítulo IV. Valoración de la respuesta inmunitaria periférica y local en ovejas infectadas experimentalmente con *T. gondii* en los tres tercios de gestación.

interviniendo son las hormonas. Su papel en la toxoplasmosis ha sido ampliamente estudiado en cultivos celulares de ratones y de humanos, habiéndose sugerido que sí que contribuyen a modular la respuesta inmunitaria (Galván-Ramírez *et al.*, 2014). Sin embargo, los escasos estudios que han analizado su influencia tras la infección con *T. gondii* en ovejas, todos ellos realizados tras la infección a mitad de la gestación, no han podido demostrar que la progesterona, cuyos niveles disminuyen tras producirse la infección seguramente como consecuencia del daño tisular causado por el parásito, tenga un claro papel en la modulación de la respuesta inmunitaria materna (Aiumlamai *et al.*, 1990; Fredriksson *et al.*, 1990).

En conclusión, esta parte de la Tesis Doctoral caracteriza las respuestas inmunitarias periférica y local, a nivel de la placenta, desarrolladas tras la infección de ovejas con *T. gondii* en los tres tercios de gestación, complementando el primer estudio (Castaño *et al.*, 2016). Los resultados obtenidos demuestran que dicha infección influye en las respuestas inmunitarias periférica y a nivel de placenta, que éstas están caracterizadas por la producción de citoquinas tanto de tipo Th1 (IFN- γ y TNF- α) como de tipo Th2 (IL4) y T_{reg} (IL10). Asimismo, estos dos tipos de respuestas inmunitarias no son semejantes, especialmente en lo que respecta a las citoquinas IL4 e IL10, lo que probablemente sea debido a mecanismos complejos en los que diferentes factores, como la gestación, el parásito y el hospedador, interactúen entre ellos y cuyo papel concreto merece investigaciones futuras.

Capítulo IV. Valoración de la respuesta inmunitaria periférica y local en ovejas infectadas experimentalmente con *T. gondii* en los tres tercios de gestación.

Tabla adicional IV.1. Secuencias de cebadores utilizados para analizar los niveles de expresión de las citoquinas mediante qPCR.

Diana ^a	Cebador	Secuencias del cebador (5'-3')	Tamaño (pb)	R ² ^b	Pendientes ^c	CV (%) ^d
IFN-γ (X52640.1)	QIFN-UP*	GATTCAAATTCGGTGGATG	110	0,996	(-3,40) – (-3,20)	2,26 ₍₋₆₎ – 1,68 ₍₋₂₎
	QIFN-RP	TTCTCTTCCGCTTTCTGAGG				
TNF-α (NM_001024860.1)	QTNF-UP*	CCAGAGGGAAGAGCAGTCC	126	0,996	(-3,24) – (-3,19)	6,69 ₍₋₂₎ – 2,28 ₍₋₇₎
	QTNFov-RP*	GGAGCGCTGATGTTGGCTAC				
IL4 (XM_004008636.1)	QIL4ov-UP*	CTGCCCAAAGAACGCAACT	154	0,996	(-3,62) – (-3,48)	7,24 ₍₋₁₎ – 0,95 ₍₋₆₎
	QIL4-RP*	TCATTACAGAACAGGTCTTGCTT				
IL10 (NM_001009327.1)	QIL10-UP*	TGCTGGATGACTTTAAGGGTTACC	60	0,997	(-3,23) – (-3,22)	7,22 ₍₋₁₎ – 2,33 ₍₋₇₎
	QIL10-RP	AAAAGTGGATCATTTCGACAAG				
β-actina (NM_001009784.1)	BACTIN-UP*	ACACCGCAACCAGTTCGCCAT	216	0,992	(-3,63) – (-3,46)	2,23 ₍₋₁₎ – 0,20 ₍₋₆₎
	QBACT216-RP	GTCAGGATGCCTCTCTTGCT				

^a Número de acceso en el NCBI para las secuencias de ADN_c utilizadas para el diseño de los cebadores. El anillamiento de los cebadores se comprobó con las secuencias de ADN genómico de *Ovis aries* del cromosoma 3 de IFN-γ, del cromosoma 20 de TNF-α, del cromosoma 5 de IL4, del cromosoma 12 de IL10 y de los cromosomas 14 y 24 de la β-actina en la base de datos de NCBI (Liu *et al.*, 2014). ^b Coeficiente de regresión mínimo (R²) de las curvas estándar de cada gen diana de la PCR en todos los ciclos de amplificación, basado en diluciones de 10 (10⁻¹–10⁻⁷) de 10 ng/μL del stock de plásmidos. Los valores C_t se incrementaron de manera lineal hasta la dilución 10⁻⁷ de todos los plásmidos. ^c Pendientes de las curvas estándar. Se indican los valores mínimos y máximos de las pendientes de cada gen diana de la PCR en cada uno de los ciclos de amplificación. ^d Coeficiente de variación (CV) entre cada ensayo. Los valores de CV indican el valor máximo y mínimo de todos los puntos de la curva estándar para cada gen diana de la PCR. Los números que aparecen como subíndices indican los puntos de la curva para los valores de CV. Los asteriscos (*) indican el anillamiento de los cebadores en las secuencias de los intrones. No se detectaron productos de amplificación al analizar las muestras de ARN ovino libres de ADN (datos no mostrados). Todas las secuencias de cebadores fueron previamente descritas por Arranz-Solís *et al.* (2016).

Capítulo IV. Valoración de la respuesta inmunitaria periférica y local en ovejas infectadas experimentalmente con *T. gondii* en los tres tercios de gestación.

Tabla adicional IV.2. Comparación de los valores medios de la carga parasitaria y de las lesiones histológicas de los animales infectados de G1, G2 y G3 en el día 26 pi.

	Tejido	Grupo experimental		
		G1	G2	G3
Carga parasitaria ^c	Placenta	5,49 (12,07) ^a	1,97 (1250,00)	ND
	Cerebro	5,38 (16,94)	8,51 (118,20)	0,30 (4,21)
	Hígado	117,50 (395,40)	13,49 (60,90)	0 (69,96)
Lesiones histológicas	Placenta	0,01 ^b	0,03	ND
	Cerebro	0,08	0,31	0,02
	Hígado	0,2	0,58	0,23

Capítulo V.

Estudio de las poblaciones celulares presentes en el infiltrado inflamatorio de la placenta en las distintas presentaciones clínicas de la toxoplasmosis ovina.

Trabajo bajo revisión en la revista *Veterinary Pathology* (enviado el 26-07-2019).

Castaño P, Fuertes M, Fernández M, Ferreras MC, Ferre I, Ortega-Mora LM, Pérez V, Benavides J. (2019). Macrophages and T lymphocytes predominantly infiltrate the maternal caruncle or foetal villi depending on the clinical presentation of ovine toxoplasmosis.

Capítulo V. Estudio de las poblaciones celulares presentes en el infiltrado inflamatorio de la placenta en las distintas presentaciones clínicas de la toxoplasmosis ovina.

1. Introducción.

Como ya se ha explicado en el apartado de *Revisión bibliográfica*, los abortos asociados a la toxoplasmosis ovina suelen ocurrir un mes después de la infección de las hembras gestantes (Buxton y Finlayson, 1986). En algunos estudios experimentales desarrollados recientemente se ha descrito una forma de presentación de la enfermedad poco conocida, caracterizada por la aparición de abortos en las dos semanas posteriores a la infección de los animales y cuya patogenia parece diferir a la de los abortos asociados clásicamente a la enfermedad (Benavides *et al.*, 2017).

A pesar de la importancia de la toxoplasmosis ovina, la información disponible actualmente sobre la interacción patógeno-hospedador es escasa, especialmente la relacionada con la respuesta inmunitaria desarrollada en la placenta y su influencia sobre la enfermedad. En los dos estudios anteriores de esta Tesis Doctoral se demostró que el momento de gestación en el que se infecta a las ovejas claramente influye sobre la gravedad de las lesiones en la placenta y la distribución del parásito en este órgano (Castaño *et al.*, 2016) y que además las respuestas inmunitarias periférica y local difieren (Castaño *et al.*, 2019). En lo que a la respuesta inmunitaria se refiere, su componente celular es decisivo para controlar la infección con el parásito (Innes *et al.*, 2009a), especialmente en la interacción materno-fetal, donde se ha encontrado que *T. gondii* altera el equilibrio inmunitario de la placenta de ratones y humanos mediante la activación de diferentes subpoblaciones celulares (Pfaff y Candolfi, 2008). Para poder profundizar en la comprensión de la patogenia que presenta la toxoplasmosis ovina a nivel de la placenta, y como continuación del trabajo experimental previo en el que se infectó a ovejas primíparas con ooquistes esporulados de *T. gondii* administrados por vía oral en los tres tercios gestantes, el objetivo de este trabajo fue caracterizar la distribución del parásito y el infiltrado de células inflamatorias en los placentomas de estos animales.

Capítulo V. Estudio de las poblaciones celulares presentes en el infiltrado inflamatorio de la placenta en las distintas presentaciones clínicas de la toxoplasmosis ovina.

2. Material y métodos.

La descripción completa y detallada del diseño experimental de este trabajo puede consultarse en los dos primeros capítulos de esta Tesis Doctoral, cuyos resultados se corresponden con los publicados en Castaño *et al.* (2016). De manera resumida, 36 ovejas primíparas de raza Churra se dividieron en tres grupos en función del momento de gestación en que se infectó a los animales: a los 40 (G1), 90 (G2) y 120 (G3) dg (**Tabla adicional V.1**). Dentro de cada grupo 9 ovejas fueron infectadas con 50 ooquistes esporulados del aislado M4 de *T. gondii* (Moredun Research Institute, Edimburgo, Escocia, Reino Unido), mientras que 3 recibieron 50 ml de PBS como control negativo de la inoculación. De acuerdo al diseño experimental previsto inicialmente, los días 12, 19 y 26 pi se sacrificarían en cada grupo tres ovejas infectadas y una control. Sin embargo, como consecuencia del episodio de abortos tempranos observado en todos los grupos experimentales y de la expulsión de mortinatos en el G3, se alteró el número de animales que fueron sacrificados en los días previstos en el diseño inicial, por lo que éste tuvo que ser modificado (**Tabla adicional V.1**). Además, el grado de autólisis de 9 placentas procedentes de ovejas que abortaron de manera temprana (n=5) o que expulsaron mortinatos (n=4) era muy elevado, lo que impidió su correcto procesamiento histológico y posterior caracterización inmunohistoquímica. En consecuencia, las muestras de placenta disponibles en este estudio fueron muy limitadas: 9 procedentes de animales no infectados (3 de cada grupo), 3 de ovejas que abortaron en la fase inicial de la infección (2 del G1 y una del G2), y 15 sacrificadas de acuerdo a lo previsto inicialmente (7 del G1, 5 del G2 y 3 del G3). En la **Tabla adicional V.1** pueden consultarse con detalle las muestras analizadas. Puesto que la limitación de muestras obligó a modificar el calendario de sacrificios secuenciales, se asumió que el efecto del momento de gestación en que se produjo la infección de los animales o en el que se les sacrificó, no era estadísticamente significativo, y éstos se agruparon en tres

Capítulo V. Estudio de las poblaciones celulares presentes en el infiltrado inflamatorio de la placenta en las distintas presentaciones clínicas de la toxoplasmosis ovina.

categorías: no infectados (n=9), aquellos que abortaron en la fase temprana de la infección (n=3) y los que fueron sacrificados (n=15).

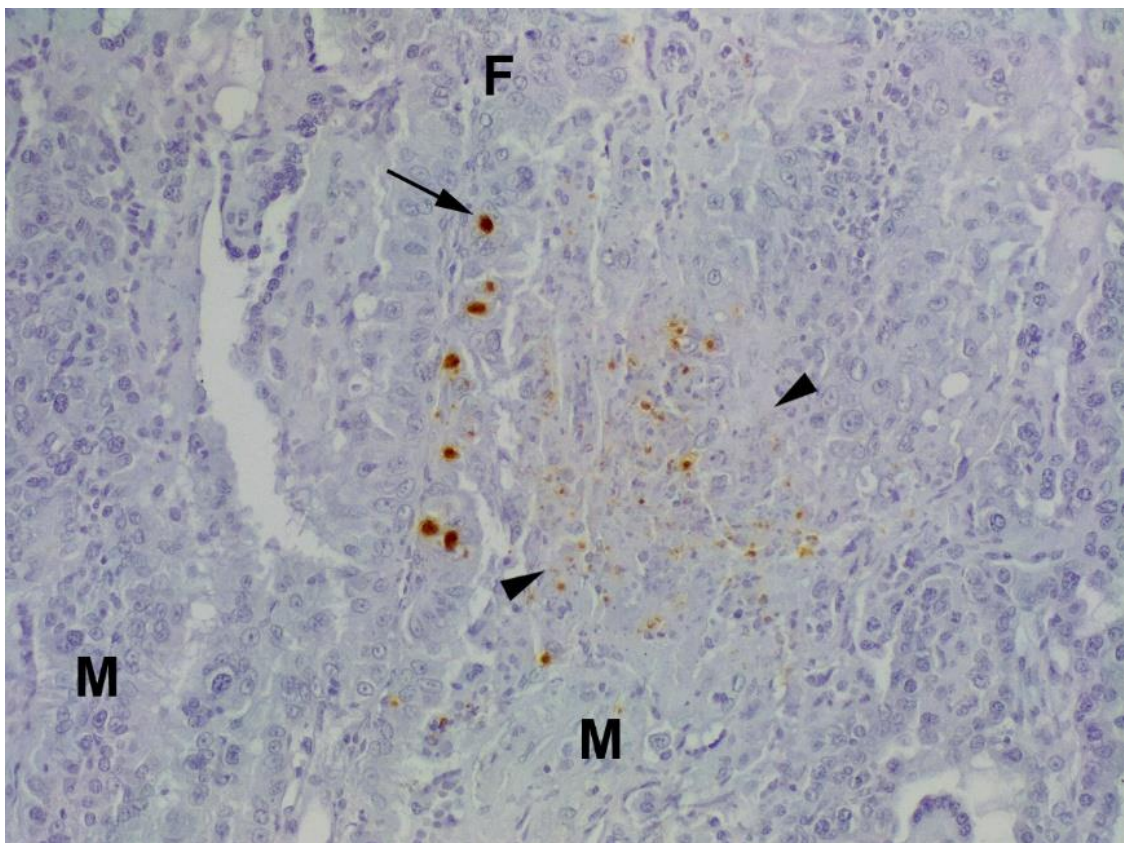
Para llevar a cabo este trabajo, se seleccionaron al azar 3 placentomas de cada animal que se incluyeron en parafina una vez fueron fijados en formol, tal y como se explica en el primer capítulo (Castaño *et al.*, 2016). De cada uno de ellos se obtuvieron cortes de 3 µm de grosor en los que se analizó la distribución del parásito por métodos inmunohistoquímicos mediante el empleo de un anticuerpo policlonal (Castaño *et al.*, 2016). Para poder evaluar la respuesta inmunitaria local, se utilizó un panel de anticuerpos primarios frente a diferentes antígenos que expresan linfocitos o macrófagos: CD3, CD20, CD163, CD335, calprotectina e Iba1 (**Tabla adicional V.2**). Para el recuento de células positivas se seleccionaron en el microscopio óptico veinte campos al azar en las áreas interdigitales de cada placentoma. Las diferencias en cuanto al número de células positivas para cada anticuerpo fueron analizadas mediante la comparación por pares entre grupos empleando la prueba estadística Mann-Whitney (GraphPad Prism 5.0 software, San Diego, California, E.E.U.U.).

3. Resultados.

Solamente se detectó antígeno parasitario mediante métodos inmunohistoquímicos en 5 ovejas del grupo de animales que fueron sacrificados (n=15). En concreto, estas 5 ovejas fueron eutanasiadas en la cuarta semana pi y fueron las únicas que además mostraban lesiones histológicas evidentes, consistentes en placentitis multifocal con un infiltrado inflamatorio mononuclear (Castaño *et al.*, 2016). No obstante, la inmunotinción no se observó de la misma manera en todas las áreas del placentoma (**Figura V.1**): mientras que en la carúncula materna el antígeno parasitario siempre estaba asociado con áreas de infiltrado inflamatorio de linfocitos y macrófagos y/o

Capítulo V. Estudio de las poblaciones celulares presentes en el infiltrado inflamatorio de la placenta en las distintas presentaciones clínicas de la toxoplasmosis ovina.

necrosis, en los cotiledones fetales se encontró principalmente en los trofoblastos de las vellosidades coriónicas, pero no relacionado con lesiones histológicas. En algunas ocasiones también se observó positividad en el tejido conectivo de las vellosidades fetales junto al infiltrado de células inflamatorias, pero, al contrario que en la parte materna, nunca se encontraba asociada a necrosis. Respecto a la integridad del antígeno parasitario también se observaron diferencias entre la parte materna y fetal: mientras que en aquella se encontraron restos de parásito o antígeno particulado, en ésta se observaron estructuras parasitarias muy bien conservadas cuya forma recordaba a la estructura de las vacuolas parasitóforas. (**Figura V.1**). Así, de ahora en adelante las ovejas sacrificadas en las que se detectó antígeno parasitario por métodos inmunohistoquímicos se denominarán “ovejas sacrificadas positivas por IHQ” y el resto “ovejas sacrificadas negativas por IHQ”.



Capítulo V. Estudio de las poblaciones celulares presentes en el infiltrado inflamatorio de la placenta en las distintas presentaciones clínicas de la toxoplasmosis ovina.

Figura V.1. Detección de antígeno parasitario por métodos inmunohistoquímicos en un placentoma de un animal del grupo “ovejas sacrificadas positivas por IHQ”. La positividad se observa (color amarillo/marrón) como pequeñas vacuolas parasitóforas o antígeno particulado en el interior del foco de necrosis (puntas de flechas) localizadas en el septo caruncular materno (M). Es de destacar la diferencia en cuanto a la estructura del parásito en las vellosidades coriónicas fetales (F), donde se observan grandes vacuolas parasitóforas (F) en los trofoblastos.

En lo que respecta a los infiltrados de células inflamatorias, apenas se observaron células CD335⁺ (células NK) o CD20⁺ (células B) en los placentomas de los tres grupos experimentales. Las escasas células inmunoteñidas, que únicamente se podían visualizar al microscopio óptico empleando objetivos a grandes aumentos, estaban distribuidas al azar por el placentoma y no estaban asociadas con lesiones histológicas ni con la presencia del parásito. Sin embargo, al analizar la subpoblación de células CD3⁺ (células T), sí que se encontró una relación con la presencia del parásito y la presentación clínica. En los animales no infectados, estas células eran escasas y se encontraban distribuidas en la matriz de las criptas carunculares (**Figura V.2**). En las ovejas que abortaron durante la fase temprana de la enfermedad tanto el número como la distribución de las células CD3⁺ fue muy similar a la de los animales control (**Figura V.3**). Sin embargo, se observaron grandes diferencias con el grupo “ovejas sacrificadas positivas por IHQ”, sacrificado en la cuarta semana pi y en cuyas muestras se encontró antígeno parasitario, (**Tabla V.1**). Este aumento en el recuento de células T se debió principalmente a su incremento en algunas vellosidades fetales, en las que las células estaban distribuidas de manera difusa en el tejido conectivo (**Figura V.4**). En la carúncula materna, solamente se observó un incremento moderado de las células CD3⁺ asociado a los focos de necrosis, siempre y cuando éstos estuvieran presentes.

Al analizar la población de macrófagos, se observaron diferencias muy claras no solamente entre los grupos de animales sino también en el fenotipo de esta subpoblación celular. Las células CD163⁺ e Iba1⁺ fueron las más numerosas y estaban distribuidas de manera similar. Tanto en los animales no infectados como en el grupo

Capítulo V. Estudio de las poblaciones celulares presentes en el infiltrado inflamatorio de la placenta en las distintas presentaciones clínicas de la toxoplasmosis ovina.

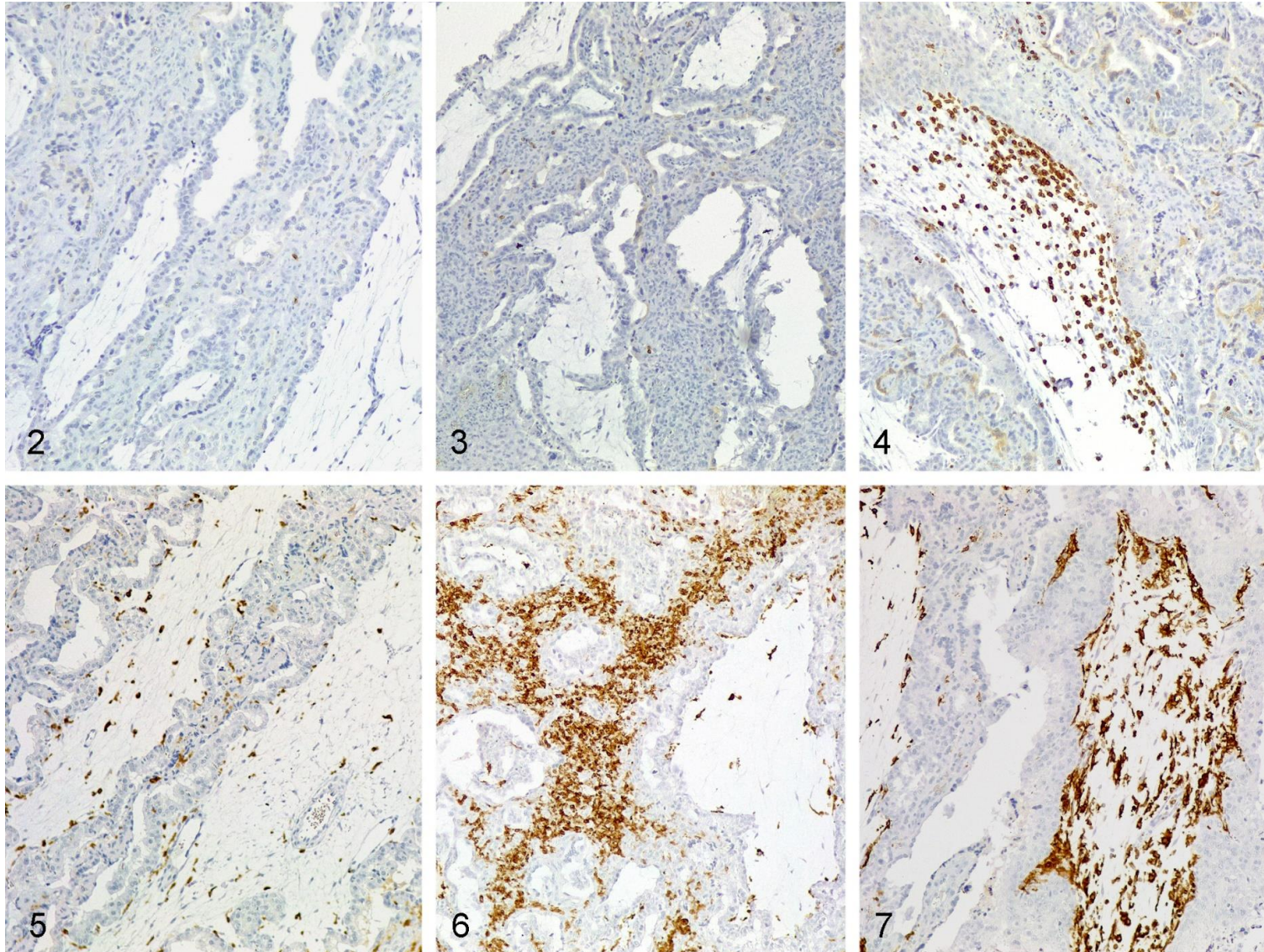
“ovejas sacrificadas negativas por IHQ”, estas células eran numerosas y estaban distribuidas de manera aislada en las criptas carunculares maternas y en las vellosidades fetales (**Figura V.5**). El número de células CD163⁺ e Iba1⁺ fue muy superior en las ovejas que abortaron en la fase aguda de la enfermedad y en el grupo “ovejas sacrificadas positivas por IHQ” (**Tabla V.1**). No obstante, entre estos dos últimos grupos de animales la distribución de las células CD163⁺ e Iba1⁺ fue muy diferente, pues mientras que en los animales que abortaron en la fase aguda de la enfermedad la positividad se encontró en el septo caruncular materno (**Figura V.6**), en el grupo “ovejas sacrificadas positivas por IHQ” las células CD163⁺ e Iba1⁺ se encontraban infiltrando algunas vellosidades fetales (**Figura V.7**), de manera similar a lo que ocurría en el caso de las células CD3⁺.

Tabla V.1. Media (\pm SEM) por campo de células positivas por IHQ en la zona interdigital de los placentomas analizados de los diferentes animales.

Antígeno	Grupo			
	Control	Aborto temprano	Sacrificadas -	Sacrificadas +
CD3 ⁺	3,11 (\pm 0,16) ^a	3,51 (\pm 0,3) ^a	2,76 (\pm 0,16) ^a	12,24 (\pm 0,45) ^b
CD21 ⁺	0,34 (\pm 0,06)	0,32 (\pm 0,06)	0,27 (\pm 0,04)	0,34 (\pm 0,08)
CD335 ⁺	0,19 (\pm 0,03)	0,23 (\pm 0,07)	0,24 (\pm 0,05)	0,27 (\pm 0,07)
Iba1 ⁺	7,15 (\pm 0,28) ^a	16,59 (\pm 0,91) ^b	7,44 (\pm 0,28) ^a	18,29 (\pm 0,57) ^b
CD163 ⁺	4,82 (\pm 0,32) ^a	13,46 (\pm 2,17) ^b	4,59 (\pm 0,36) ^a	12,82 (\pm 0,88) ^b
Calprotectina ⁺	0,26 (\pm 0,02)	0,29 (\pm 0,06)	0,27 (\pm 0,03)	0,32 (\pm 0,03)

^{a, b} Los superíndices indican diferencias significativas en el recuento total de células positivas para cada marcador (prueba estadística Mann-Whitney) ($p \leq 0.05$).

Capítulo V. Estudio de las poblaciones celulares presentes en el infiltrado inflamatorio de la placenta en las distintas presentaciones clínicas de la toxoplasmosis ovina.



Capítulo V. Estudio de las poblaciones celulares presentes en el infiltrado inflamatorio de la placenta en las distintas presentaciones clínicas de la toxoplasmosis ovina.

Figuras V.2-V.7. Tinción inmunohistoquímica de células T (Figuras V.2-V.4) y macrófagos (Figuras V.4-V.7) en la placenta. **Figura V.2.** Grupo de animales no infectados. Las células CD3⁺ son escasas y se encuentran en el septo caruncular del placentoma. Es de destacar su ausencia en el mesénquima fetal. **Figura V.3.** Grupo de ovejas que abortaron en la fase temprana de la enfermedad. La inmunotinción asociada a las células CD3 es muy similar, tanto en su distribución como en su número, a la observada en los animales no infectados (Figura V.2). **Figura V.4.** Grupo de “ovejas sacrificadas positivas por IHQ”. Se observa un evidente incremento en el número de células CD3⁺ en una vellosidad fetal cotiledonaria. **Figura V.5.** Grupo de animales no infectados. Los macrófagos positivos por IHQ se encuentran distribuidos de manera aislada tanto en la carúncula materna como en los compartimentos cotiledonarios del placentoma. **Figura V.6.** Grupo de ovejas que abortaron en la fase temprana de la toxoplasmosis. Puede apreciarse un evidente aumento en el número de células CD163⁺ en el tallo caruncular del placentoma. **Figura V.7.** Grupo de “ovejas sacrificadas positivas por IHQ”. El incremento en el número de células CD163⁺ está claramente delimitado a las vellosidades fetales cotiledonarias.

Capítulo V. Estudio de las poblaciones celulares presentes en el infiltrado inflamatorio de la placenta en las distintas presentaciones clínicas de la toxoplasmosis ovina.

4. Discusión.

El principal hallazgo de este estudio es la diferencia observada entre las partes materna y fetal de la placenta, como un reflejo de la interacción patógeno-hospedador en la toxoplasmosis ovina, y cómo esto se relaciona con la presentación clínica de la enfermedad. Las lesiones en la carúncula estaban caracterizadas por necrosis, de manera similar a lo descrito previamente (Buxton y Finlayson, 1986), y en asociación con ésta se detectaron restos de antígeno parasitario, lo que sugiere que en esta localización tuvo lugar una reacción agresiva que dañó el tejido, provocando su necrosis, y que destruyó también al parásito. En lo que respecta al compartimento fetal de la placenta, el antígeno parasitario se detectó principalmente asociado los trofoblastos y con una estructura semejante a la de las vacuolas parasitóforas, en ausencia de necrosis, lo que sugiere que *T. gondii* es capaz de proliferar de manera más eficaz en la parte fetal que en la parte materna de la placenta. Aunque no existen estudios que analicen la susceptibilidad de los trofoblastos ovinos a la infección por *T. gondii*, un trabajo publicado recientemente ha demostrado que los trofoblastos bovinos son más susceptibles a la infección con *N. caninum*, un apicomplejo evolutivamente muy próximo a *T. gondii*, que las células carunculares bovinas sugiriendo que esta mayor susceptibilidad sería consecuencia de la actividad fagocítica de los trofoblastos (Jiménez-Pelayo *et al.*, 2019). Además, en otro estudio relacionado con la neosporosis bovina se ha demostrado que la carúncula materna, al contrario que el compartimento fetal de la placenta, es un sitio inmunológicamente muy activo frente a la infección parasitaria (Rosbottom *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta estos hallazgos previos, es posible sugerir que la presencia de necrosis y restos parasitarios de *T. gondii* encontrados exclusivamente en la carúncula materna se deban a un mecanismo similar al propuesto por esos investigadores en la neosporosis bovina.

Capítulo V. Estudio de las poblaciones celulares presentes en el infiltrado inflamatorio de la placenta en las distintas presentaciones clínicas de la toxoplasmosis ovina.

Con respecto a la población de linfocitos analizada, solamente las células T parecen desempeñar un papel clave en la respuesta inmunitaria desarrollada en la placenta frente a la infección por *T. gondii* una vez que el parásito ha alcanzado este tejido. Es de destacar la escasez de células NK en cualquier animal, estuviera o no infectado. A pesar de su importancia para el progreso de la gestación en ratones y humanos, la ausencia de esta población celular en el útero de ovejas gestantes ha sido recientemente descrita (Wattegedera *et al.*, 2019). En su lugar, se ha propuesto que los linfocitos $\gamma\delta$ representarían una subpoblación celular muy relevante durante el transcurso de la gestación en rumiantes (Meesuen *et al.*, 1993), por lo que en futuras investigaciones debería analizarse su papel en la toxoplasmosis ovina. Además, el hecho de que no se encontraran diferencias en el número de células CD335⁺ entre los animales de los diferentes grupos experimentales, sugiere que el momento de gestación en que se produce la infección con *T. gondii* no influye sobre el papel que desempeñaría esta subpoblación linfocitaria. No obstante, hay que tener en cuenta que el número de animales analizados en este estudio fue muy bajo, debido a la limitación en el número de muestras que pudieron valorarse apropiadamente, por lo que este aspecto de la patogenia de la enfermedad debería investigarse más en detalle en el futuro antes de descartar por completo esta influencia.

Solamente se observó un incremento significativo de las células inflamatorias estudiadas en las placentas de las ovejas que abortaron en la fase temprana de la infección con *T. gondii* y en el grupo “ovejas sacrificadas positivas por IHQ”. Sin embargo, las subpoblaciones celulares concretas, así como su número y distribución, fue diferente en función de la presentación clínica de la enfermedad, lo que parece sugerir que la patogenia de la toxoplasmosis ovina en estos dos grupos de animales fue distinta, en consonancia con los diferentes tipos de lesión encontrados en ambos grupos (Castaño *et al.*, 2014). Aunque se desconoce la patogénesis de los abortos tempranos de la toxoplasmosis (Benavides *et al.*,

Capítulo V. Estudio de las poblaciones celulares presentes en el infiltrado inflamatorio de la placenta en las distintas presentaciones clínicas de la toxoplasmosis ovina.

2017), en el presente estudio se demuestra que ni las células B, T o NK desempeñan un papel importante. En cambio, sí parecen ser relevantes los macrófagos, en especial en la carúncula materna. En concreto, en esta localización se pudo observar un incremento en la expresión de macrófagos que expresaban tanto Iba1, un marcador general de macrófagos (Ohsawa *et al.*, 2004), como CD163, un marcador de macrófagos asociado a procesos inflamatorios. El incremento de estas poblaciones celulares se ha asociado a complicaciones de la gestación, como la preeclampsia (Jena *et al.*, 2019), que a su vez está estrechamente relacionada con la aparición de leucomalacia fetal (Vogell *et al.*, 2014), que es precisamente el principal tipo de lesión encontrada en abortos tempranos de la toxoplasmosis ovina (Castaño *et al.*, 2014; Benavides *et al.*, 2017). Este hallazgo sugiere, por tanto, un papel muy destacado de los macrófagos de la carúncula materna en esta presentación clínica de la enfermedad, siendo aconsejable su estudio detallado en futuras investigaciones.

La distribución de las células inflamatorias en el grupo de animales en el que se detectó mediante IHQ antígeno parasitario en la placenta, denominado ““ovejas sacrificadas positivas por IHQ”, fue completamente diferente. En concreto, se observó un infiltrado de macrófagos y células T en las vellosidades coriónicas, la parte fetal de la placenta. Se ha sugerido que las células T son una subpoblación celular muy relevante en la patogénesis de la toxoplasmosis ovina, posiblemente como productores de IFN- γ , tal y como se ha demostrado en ovejas adultas (Innes *et al.*, 1995b), pero el papel que desempeñan en la respuesta inmunitaria desarrollada por el feto frente a la infección por *T. gondii* se desconoce. Por su parte, los macrófagos presentes en la placenta ovina, denominados células Hofbauer, parecen ser muy importantes en la respuesta inmunitaria desarrollada en este tejido durante la toxoplasmosis ovina. Éstos macrófagos representan una población celular cuyos orígenes son muy diversos, ya que pueden diferenciarse de las células madre mesenquimales presentes en las vellosidades de la

Capítulo V. Estudio de las poblaciones celulares presentes en el infiltrado inflamatorio de la placenta en las distintas presentaciones clínicas de la toxoplasmosis ovina.

placenta o tener un origen hematopoyético (Reyes *et al.*, 2017). Igualmente, se ha demostrado que los fetos en la especie ovina son capaces de desarrollar respuestas inmunitarias tanto de tipo innato como adquirido, por ejemplo, frente a la infección por bunyavirus (Rodrigues Hoffmann *et al.*, 2013), y, de manera similar, en el presente estudio, los resultados indicarían que el sistema inmunitario fetal es capaz de reaccionar frente a la infección con *T. gondii* mediante la infiltración en la parte fetal de la placenta de macrófagos y células T. De cualquier manera, la ausencia de macrófagos que expresen calprotectina, un complejo proteico del citosol presente en los monocitos que se expresa en los macrófagos que han migrado recientemente a los tejidos desde la sangre periférica (Chilosi *et al.*, 1990), demuestra que, en ambas presentaciones clínicas de la toxoplasmosis ovina, la población residente de macrófagos es muy relevante y, por tanto, analizar la respuesta inmunitaria local en la placenta durante la toxoplasmosis ovina reviste gran importancia. Sería muy interesante que en futuros trabajos se caracterizaran más en detalle las subpoblaciones de macrófagos y células T implicadas en esta respuesta, pues de esta manera podrá comprenderse mejor la patogénesis de los abortos asociados a la toxoplasmosis ovina.

Capítulo V. Estudio de las poblaciones celulares presentes en el infiltrado inflamatorio de la placenta en las distintas presentaciones clínicas de la toxoplasmosis ovina.

Tabla adicional V.1. Distribución de los animales del estudio según el tercio de gestación en el que fueron infectados, la semana pi cuando se les sacrificó o la presentación clínica observada después de la inoculación de *T. gondii*.

Grupo	Tercio de gestación			Semana pi			Presentación clínica		
	1º	2º	3º	2	3	4	Aborto temprano	Ninguno	Mortinatos
Control	3/3*	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	-	9/9	-
Aborto temprano	2/2	1/4	0/2	3/8	-	-	3/8	-	-
Sacrificadas	7/7	5/5	3/7	5/5	5/5	5/9	-	15/15	0/4

* animales disponibles/animales totales del experimento.

Capítulo V. Estudio de las poblaciones celulares presentes en el infiltrado inflamatorio de la placenta en las distintas presentaciones clínicas de la toxoplasmosis ovina.

Tabla adicional V.2. Anticuerpos y técnica inmunohistoquímica empleados en este trabajo.

Anticuerpo	Clon	Tipo	Marcador de	Desenmascaramiento	Dilución	Casa comercial
CD3	–	Conejo, Policlonal	Células T	HIER*; tampón citrato, pH6	1:100	Dako, Alemania
CD20	–	Conejo, Policlonal	Células B	–	1:200	Thermo, Reino Unido
CD335	EC1.1	Ratón, Monoclonal	Células NK	HIER*; tampón citrato, pH9	1:100	Serotec, Reino Unido
Calprotectina	MAC387	Ratón, Monoclonal	Macrófagos y células epiteliales activadas	PIER: Proteasa XIV	1:100	Dako, Dinamarca
Iba1	–	Conejo, Policlonal	Macrófagos/microglia	HIER*; tampón citrato, pH6	1:1000	Wako, Japan
CD163	EDHu-1	Ratón, Monoclonal	Macrófagos	HIER*; tampón citrato, pH6	1:200	BioRad, E..E.U.U.

* HIER: Desenmascaramiento de antígeno inducido por calor. ^PIER: Desenmascaramiento de antígeno inducido por proteínas.

Capítulo VI.

Discusión general.

Discusión general.

La toxoplasmosis es una de las principales enfermedades infecciosas que afectan al ganado ovino en todo el mundo, asociada a importantes problemas reproductivos, principalmente abortos, que conllevan serias pérdidas económicas. Aunque se conoce que las consecuencias clínicas de la infección están determinadas por el momento de gestación en que ocurre, se desconocen los mecanismos que explicarían esas diferencias.

Por ello, esta Tesis Doctoral pretende profundizar en el conocimiento de la patogenia de la toxoplasmosis en la especie ovina. En concreto, se articula en torno al análisis de cómo influye el periodo de gestación en que ocurre la infección de las ovejas sobre la respuesta inmunitaria desarrollada tanto en la madre como en el feto evaluando si existe o no relación entre estos mecanismos inmunitarios y la aparición de abortos o las lesiones encontradas. Dada la importancia que la respuesta inmunitaria ejerce sobre el control y progresión de la toxoplasmosis ovina (Innes y Vermeulen, 2006; Innes *et al.*, 2009b), el conocimiento de dichos factores es un aspecto fundamental para comprender los mecanismos patogénicos subyacentes a la enfermedad.

El **objetivo general** de esta Tesis Doctoral es estudiar la influencia del periodo de gestación en la respuesta inmunitaria desarrollada por el feto y la placenta durante la infección por *T gondii* en la especie ovina, así como la relación existente entre esta respuesta inmunitaria y la aparición de abortos o transmisión congénita. Para su abordaje, se planteó el estudio de tres objetivos concretos, cuya consecución dio lugar a tres artículos científicos, dos de ellos ya publicados en una revista internacional situada en el primer cuartil y el tercero de ellos actualmente en revisión. El **primer objetivo** planteado fue estudiar cómo el momento de gestación en que se produce la infección con el parásito determina sus consecuencias clínicas, el desarrollo de las lesiones y la distribución del parásito en los tejidos, tanto de la placenta como del feto, de los animales infectados. El **segundo objetivo** fue analizar la respuesta inmunitaria, tanto a nivel periférico como local, en la placenta, de estos animales. Finalmente, el **tercer objetivo** fue caracterizar las poblaciones celulares específicas que forman parte de los infiltrados inflamatorios observados en la placenta y la relación que existía

Capítulo VI. Discusión general.

entre estos y el parásito. A continuación, se exponen y discuten los principales resultados derivados de estos estudios, contrastándolos con los obtenidos en otros previos sobre esta enfermedad.

La reproducción experimental de la toxoplasmosis ovina en la que se basa esta Tesis Doctoral, se llevó a cabo en un conjunto de 36 ovejas gestantes, primíparas, de raza Churra y de la misma edad. Estos animales fueron distribuidos al azar en 3 grupos experimentales, cada uno formado por 9 ovejas infectadas y 3 controles. La infección se llevó a cabo inoculando por vía oral una misma dosis infectiva de 50 ooquistes del aislado M4 de *T. gondii*, en los tres tercios de gestación: a los 40, 90 y 120 días de gestación en los grupos experimentales 1, 2 y 3 respectivamente. Con el fin de poder estudiar la evolución de la respuesta inmunitaria del hospedador frente al parásito, estaba previsto en cada grupo experimental el sacrificio secuencial de tres ovejas infectadas y un control en los días 12, 19 y 26 pi.

El **primer estudio**, que se planteó para responder al primer objetivo, demostró que, tal y como se había puesto de manifiesto en trabajos previos (Gutierrez *et al.*, 2010; Castaño *et al.*, 2014; Katzer *et al.*, 2014), se puede reproducir experimentalmente la toxoplasmosis en ovejas gestantes utilizando el aislado M4 de *T. gondii*. En concreto se trata de un aislado de tipo II, el más frecuente en las infecciones del ganado ovino (Chessa *et al.*, 2014), obtenido a partir de un caso natural de aborto en ovejas en un rebaño de Escocia (Dr. David Buxton, comunicación personal). La reproducción experimental se produjo mediante la administración por vía oral de 50 ooquistes esporulados, una dosis muy baja teniendo en cuenta que hasta la fecha se había planteado que la dosis mínima necesaria para desencadenar abortos por toxoplasma en esta especie era de 200 ooquistes esporulados (McColgan *et al.*, 1988). Respecto a forma parasitaria infectante, se optó por infectar a los animales con ooquistes esporulados dado que la ingestión de éstos representa la forma más común de infección de las ovejas en condiciones naturales (Verhelst *et al.*, 2014). Según se ha indicado en la que quizás sea la revisión más extensa sobre toxoplasmosis ovina, los ooquistes esporulados son la forma parasitaria infectante que desencadena las consecuencias más graves en estudios experimentales (Dubey, 2010). En este estudio, la dosis empleada fue muy baja, teniendo en cuenta los trabajos previos, y sin embargo se observaron casos de abortos tempranos y transmisión vertical al feto

Capítulo VI. Discusión general.

de forma similar a otros que habían empleado dosis mayores (Dubey, 2010). El hecho de que el aislado empleado en este trabajo haya sufrido sucesivos pases de laboratorio podría ser la causa de que se viese incrementada su virulencia, ya que se podría estar seleccionando parásitos que creciesen rápido en cultivo celular, y con ello que una dosis tan baja sea capaz de inducir un porcentaje relativamente alto de abortos en ovejas, tal y como se ha propuesto recientemente (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2019).

La consecuencia clínica más importante de la infección fue la aparición de abortos en todos los grupos experimentales, esto es, infectados en los tres tercios de gestación, entre los días 6 y 26 pi. Clásicamente los abortos asociados a la toxoplasmosis ovina se han descrito aproximadamente en la cuarta semana pi (Dubey, 2010). Sin embargo, en este estudio ocurrieron abortos en una fase mucho más temprana, entre la primera y segunda semana pi. A estos se les conoce como abortos tempranos en la fase aguda de la enfermedad, y fueron descritos por primera vez a finales de los años 80 en algunas infecciones experimentales (Trees *et al.*, 1989; Owen *et al.*, 1998). Desde entonces han sido muy pocos los trabajos que han documentado la aparición de este tipo de abortos, y siempre en trabajos experimentales (Mévélec *et al.*, 2010; Castaño *et al.*, 2014; Sánchez-Sánchez *et al.*, 2019). En un estudio desarrollado recientemente por nuestro grupo de investigación (Castaño *et al.*, 2014) también se documentaron abortos en la fase aguda de la enfermedad empleando el aislado M4, el mismo que se ha empleado para esta Tesis Doctoral, utilizando dosis infectivas de 2000 y 500 ooquistes esporulados administrados por vía oral. En estos dos casos, el porcentaje de abortos fue del 91,6 % y 58,6 % respectivamente (Castaño *et al.*, 2014). Sin embargo, en este primer estudio de la Tesis, en el que la dosis empleada fue de 50 ooquistes esporulados, el porcentaje fue del 29,6 %. A la vista de estos resultados, y comparándolos con los de resultados previos en los que se empleó el mismo aislado de *T. gondii*, parece que la dosis infectiva ejerce una importante influencia sobre la aparición de los abortos tempranos, ya que cuanto mayor sea esta mayor es el porcentaje de ovejas que abortan dentro de las dos primeras semanas pi. Estos resultados fueron similares a aquellos observados en la infección de ovejas gestantes a mitad de gestación con el aislado PRU de *T. gondii*, también de tipo II, ya que la administración por vía oral de 400 ooquistes esporulados del parásito ocasionó un

Capítulo VI. Discusión general.

porcentaje de abortos tempranos en la fase aguda de la enfermedad del 71,4 %, mientras que cuando la dosis infectiva fue de tan sólo 100 ooquistes esporulados el porcentaje se redujo al 16,7 % (Mévélec *et al.*, 2010). Por otro lado, al producirse abortos tempranos en las ovejas gestantes de todos los grupos experimentales de este estudio, es posible concluir que no existe influencia del momento de gestación en que se produce la infección de los animales sobre la aparición de abortos tempranos en la fase aguda de la enfermedad. En este sentido, los resultados de este trabajo suponen la primera evidencia de abortos ocurridos en la fase aguda de la toxoplasmosis ovina tras la infección de ovejas gestantes en el primer tercio de gestación, pues hasta ahora sólo se habían descrito tras reproducciones experimentales de la enfermedad en animales infectados en el segundo y tercer tercio de gestación (Trees *et al.*, 1989; Owen *et al.*, 1998; Mévélec *et al.*, 2010; Castaño *et al.*, 2014; Sánchez-Sánchez *et al.*, 2019).

Por otro lado, el porcentaje de ovejas infectadas en las que se produjo el aborto clásico asociado a esta enfermedad, a las 4 semanas pi o posteriormente, fue escaso, ya que únicamente se observó en el 22,2 %. Sin embargo, cabe destacar que el objeto del experimento era poder estudiar los cambios que ocurren tras la llegada del parásito mediante un sacrificio programado y seriado de los animales infectados, y por ello se fijó como último día del sacrificio el 26 pi. Teniendo en cuenta que se ha propuesto que para que ocurran abortos tras la infección con *T. gondii* en animales infectados a mitad de la gestación deben transcurrir al menos 40 días (Buxton *et al.*, 1993a; Engeland *et al.*, 1996), es esperable que, en caso de haber dejado continuar la gestación, hubiese habido más abortos. De hecho, el grupo que presentó un mayor porcentaje de muerte y expulsión fetal fue aquel infectado en el último tercio, concretamente en el día 120 dg. En este grupo, la producción de aborto, con expulsión del feto, pudo verse acelerada ya que la finalización de la gestación, a los 150 días aproximadamente, estaba muy cercana, por lo que los cuatro abortos observados en este grupo podrían considerarse como mortinatos (Taylor y Njaa, 2012). En conjunto, estos resultados ponen de manifiesto que, a diferencia de lo propuesto en el caso de los abortos tempranos ocurridos durante las dos primeras semanas pi, el momento de gestación en que se produce la infección sí influye en la aparición de los abortos descritos clásicamente en esta enfermedad.

Capítulo VI. Discusión general.

Como se ha indicado, el diseño experimental del estudio, que determinaba el sacrificio seriado de las ovejas infectadas entre la segunda y cuarta semana pi, no permitió la aparición de un elevado porcentaje de abortos y, de igual forma, no se produjeron tampoco lesiones macroscópicas, probablemente debido a la falta de tiempo para su desarrollo. Sin embargo, las lesiones microscópicas encontradas en las placentas y fetos procedentes de ovejas infectadas eran compatibles con las citadas previamente en la toxoplasmosis. Respecto a los abortos tempranos, se observaron trombosis e infartos en un número variable de placentomas en todas las placentas procedentes de ovejas en los que se dio esta presentación clínica (8 de 27 animales infectados), y áreas de leucomalacia en algunos de los fetos procedentes de ellas (5 de 53 fetos en total). Estos hallazgos son similares a los descritos por nuestro grupo de investigación en un trabajo anterior (Castaño *et al.*, 2014), en el que se propuso que las lesiones vasculares de la placenta serían las desencadenantes del daño hipóxico fetal con el consiguiente deterioro de los órganos nerviosos del feto, afectando especialmente a la sustancia blanca periventricular, y su expulsión en forma de aborto en las primeras fases de la enfermedad. Por otro lado, la presencia de una placentitis necrótica multifocal, junto a encefalitis y hepatitis también de carácter necrótico y multifocal, fueron los principales hallazgos histológicos de las ovejas sacrificadas en la tercera y cuarta semana pi, de manera similar a lo sugerido en estudios previos (Buxton y Finlayson, 1986; Buxton, 1998). La inoculación en los tres tercios de gestación causó la aparición de lesiones placentarias y fetales en el día 26 pi, de acuerdo a lo ya observado en un estudio previo en el que se infectaron animales a mitad de gestación (Gutierrez *et al.*, 2010). Sin embargo, cabe destacar que, en el grupo infectado durante el último tercio de la gestación, además de en el día 26 pi, también se observaron lesiones en un animal sacrificado en el día 19 pi, al igual que en una reproducción experimental de la enfermedad tras la infección de ovejas gestantes a mitad de gestación (Buxton y Finlayson, 1986). Por otro lado, la influencia de la gestación sobre el curso clínico de la enfermedad pudo apreciarse también en las características histológicas de las lesiones, ya que aquellos animales infectados durante el segundo tercio presentaron lesiones, tanto en la placenta como en vísceras fetales, más extensas que aquellos infectados al principio o al final de la gestación. Estos resultados ponen de manifiesto que el momento de la gestación en el que se

Capítulo VI. Discusión general.

infectan las ovejas influye sobre el curso clínico y las lesiones desarrolladas en la toxoplasmosis ovina.

La aplicación de técnicas de biología molecular ha permitido detectar, y cuantificar, la presencia del parásito en la placenta y vísceras fetales. En primer lugar, y de acuerdo a observaciones previas (Owen *et al.*, 1998; Castaño *et al.*, 2014), se ha podido comprobar cómo los abortos tempranos en la toxoplasmosis ovina no están asociados a la presencia del parásito en la placenta o feto, ya que no se detectó ADN parasitario en ninguno de ellos. Sin embargo, la alta sensibilidad de estas técnicas sí que permitió identificar que *T. gondii* puede llegar a la placenta en tan sólo 12 días tras la infección, lo que confirmaría estudios previos que sugerían que el parásito alcanza este tejido alrededor del día 10 pi (Buxton y Finlayson, 1986). De igual modo, se pueden apreciar diferencias en función del tercio de gestación en el que se infectaron las ovejas. El parásito se detectó antes, en los días 12, 13 o 19 pi en la placenta y vísceras fetales de las ovejas infectadas en el segundo y último tercio de la gestación, mientras que, en aquellas infectadas en el primer tercio, únicamente se encontró en el día 26 pi. En conjunto, estos resultados sugieren que la respuesta inmunitaria de la madre es capaz de retrasar la invasión de la placenta durante el primer tercio. En este sentido se ha demostrado en un estudio *in vitro* desarrollado sobre muestras de placentas humanas infectadas de manera experimental con *T. gondii* que los niveles de expresión del factor inhibidor de la migración de los macrófagos son mucho más elevados que en el último tercio de la gestación (de Oliveira Gomes *et al.*, 2011), por lo que la colonización de este órgano en el primer tercio de gestación es más complicada que en etapas posteriores.

Al analizar la carga parasitaria en las muestras estudiadas, se observó que aumentaba en todos los grupos experimentales en la cuarta semana pi con respecto a la tercera, siendo este incremento muy brusco en las muestras estudiadas de los grupos 1 (infectados en primer tercio) y 2 (infectados en segundo tercio). Dicho aumento fue también descrito en un estudio previo en el que se reprodujo experimentalmente la toxoplasmosis en ovejas infectadas a mitad de la gestación (Gutierrez *et al.*, 2010). Sin embargo, este aumento no fue tan acusado en el grupo 3 en el que, de hecho, se detectaron los niveles de ADN parasitario más bajos de todo el experimento a pesar de que la llegada del parásito a la placenta en el día 19 pi se detectó en un mayor

Capítulo VI. Discusión general.

número de muestras de este grupo en comparación con el resto. Esto podría explicarse por la maduración del sistema inmunitario fetal que, si bien no sería lo suficientemente maduro como para evitar la infección fetal, sí conseguiría controlar en cierta medida la replicación del parásito una vez se ha producido la infección del feto (Buxton y Finlayson, 1986), evitando que se multiplique tan fácilmente como en los tercios anteriores y, por tanto, causando lesiones más leves. El hecho de que sólo se detectaran anticuerpos específicos frente al parásito en fluidos fetales de los grupos 2 y 3 apoyaría esta hipótesis.

Los resultados de este estudio muestran aspectos claves en la patogenia de la toxoplasmosis ovina. Por un lado, en la presentación clínica caracterizada por los abortos tempranos, se confirma que la presencia del parásito no es necesaria para su desencadenamiento y que las lesiones asociadas, como son trombosis e infartos en los placentomas y leucomalacia fetal, no estarían causadas directamente por la presencia del parásito, como ya se había sugerido en un estudio previo (Castaño *et al.*, 2014). Por otro lado, respecto a la presentación clínica clásicamente asociada a esta enfermedad, en la que los abortos ocurren tras al menos transcurridas tres o cuatro semanas desde la infección, se observa que el parásito llega a la placenta antes de la aparición de las lesiones, existiendo por tanto una relación causal directa entre la llegada de *T. gondii* a la placenta, o al feto, y la producción de lesiones. La reproducción experimental de la toxoplasmosis en ratas ha mostrado que el parásito primero invade los trofoblastos fetales, que ejercen una separación entre la sangre materna y el feto, donde ocasiona importantes daños por necrosis (Abbasi *et al.*, 2003), posteriormente la parte fetal de la placenta y finalmente el feto ocasionándole lesiones (Ferro *et al.*, 2002). Estos resultados apoyarían la hipótesis de esa relación causal. Sobre este fenómeno también parece influir el momento de gestación en el que se infecta la oveja, ya que, aunque la llegada del parásito a la placenta tras la infección se produce antes en el segundo tercio, el día 12 y 13 pi, que en el último tercio de gestación, es en este último donde aparecen primero las lesiones, en el día 19 pi, mientras que en el segundo tercio no lo hacen hasta el día 26 pi. Si bien es necesario tener en cuenta que tanto el número de animales disponible, como las muestras elegidas para su estudio histológico pueden haber influido en estos resultados, también es cierto que este estudio ha mostrado diferencias entre ambos

Capítulo VI. Discusión general.

tercios y que, según éstas, se podría sugerir que durante el segundo tercio existe un retraso en la aparición de lesiones en la placenta, tanto de necrosis del tejido como de infiltración de células inflamatorias. Una vez más, se muestra que el momento de gestación en el que se infectan los animales influye no sólo sobre el curso clínico, sino también sobre la llegada del parásito a la placenta y al feto y el desarrollo de lesiones. Esta influencia se ha demostrado también en una infección experimental con toxoplasma en ratones gestantes infectados en los tres tercios de gestación (a los 5, 10 y 15 días de gestación) con quistes tisulares del parásito administrados por vía oral (Wang *et al.*, 2011a), donde se describe cómo la cantidad de quistes tisulares presentes en el cerebro de los fetos de las madres infectadas era mucho mayor cuando la infección ocurría en las primeras etapas de la gestación y, de manera lógica, la tasa de supervivencia fetal era menor en comparación con la infección a final de la gestación (Wang *et al.*, 2011a). Sin embargo, no analizaron la influencia del momento de gestación en que se producía la infección sobre la llegada del parásito a la placenta o sobre la gravedad de las lesiones encontradas (Wang *et al.*, 2011a). En cuanto a las lesiones, la infección de ovejas gestantes mostró que el tercio en el que se infectan sí puede influir sobre su extensión, pero no sobre sus características histológicas. La similitud entre los cambios histológicos asociados a las lesiones, independientemente de si la madre se infectó a mitad o final de gestación, fue también observada en trabajos anteriores (Buxton y Finlayson, 1986).

Tomados en conjunto los resultados de este primer estudio, tanto el curso clínico como la distribución del parásito y la presencia y tipo de lesiones, indicarían que, si bien la gestación influye sobre la llegada del parásito a la placenta y en el desarrollo de lesiones frente a ésta, una vez que se inician, no habría diferencias y estarían caracterizadas siempre por una inflamación de carácter necrótico multifocal acompañada de infiltrados de linfocitos y macrófagos. Parece pues claro que existen factores tanto maternos como fetales que, en función del momento de la gestación en el que se produzca la infección, pueden influir sobre la patogenia de esta enfermedad, sobre todo en su fase inicial, cuando el parásito invade la placenta y los tejidos fetales.

Teniendo en cuenta que los resultados del primer estudio apuntan hacia una influencia clara de la gestación sobre la patogenia de la enfermedad, pero que sin embargo no existen pruebas claras de que, al contrario que en otras especies, en la oveja se

Capítulo VI. Discusión general.

produzca una modulación de la respuesta inmunitaria (Wattegedera *et al.*, 2008; Entrican *et al.*, 2015), el **segundo estudio** de esta Tesis Doctoral está encaminado a responder al segundo objetivo mediante el análisis de las respuestas inmunitarias periférica y local, a nivel de la placenta, que se desarrollan tras la infección. Si bien la importancia de la respuesta inmunitaria periférica frente a la toxoplasmosis es ya conocida (Dubey, 2009b), sin duda la respuesta local, en la placenta, debe jugar un papel fundamental en la patogenia de esta enfermedad, ya que este órgano es vital para evitar el rechazo inmunológico del feto durante la gestación, lo que se ha demostrado tanto en humanos (PrabhuDas *et al.*, 2015; Erkers *et al.*, 2017) como en ratones (Krishnan *et al.*, 2013) y rumiantes (Benedictus *et al.*, 2015; Fair, 2015), asegurando por tanto la viabilidad fetal. En el caso de la toxoplasmosis, estudios llevados a cabo en modelos experimentales murinos han puesto de manifiesto que sí se produce una modulación de la respuesta inmunitaria a nivel local que la hace diferente de la periférica (Liu *et al.*, 2014). Con el fin de investigar si este hecho sucede también en ovejas, el presente estudio analizó los niveles de citoquinas, tanto de tipo Th1 como de tipo Th2, producidas a nivel periférico y en la placenta, así como los de anticuerpos maternos circulantes específicos frente al parásito.

La presencia de anticuerpos séricos específicos frente a *T. gondii*, principales mediadores de la respuesta inmunitaria periférica humoral, se detectó en la primera semana pi, y esta pareció ser más intensa en el grupo infectado en el segundo tercio de gestación, si bien las diferencias significativas con el resto de grupos infectados se vieron únicamente en días sueltos. La dinámica de la detección de anticuerpos, encontrándose diferencias claras y constantes entre los grupos infectados y el grupo control a partir del día 12 pi, es similar a la descrita en otros estudios experimentales previos sobre la toxoplasmosis ovina (Innes y Wastling, 1995; Maley *et al.*, 1997) y demostrarían que la respuesta inmunitaria humoral forma parte de la reacción del hospedador frente a la infección una vez ha finalizado su fase aguda. Es en este momento, durante la fase más aguda de la enfermedad, cuando se observa una elevación clara y transitoria de la presencia de la citoquina IFN- γ circulante en suero en aquellas ovejas infectadas con respecto a los controles, lo que confirma que, tal y como se ha sugerido previamente (Buxton e Innes, 1995; Buxton, 1998), en la fase inicial de la enfermedad la respuesta inmunitaria frente a la infección por *T. gondii* en

Capítulo VI. Discusión general.

el ganado ovino es principalmente de tipo celular. Esta respuesta no sería una característica únicamente desarrollada durante la gestación, ya que la importancia de IFN- γ ha sido también puesta de manifiesto en estudios *in vitro* (Oura *et al.*, 1993) e *in vivo* desarrollados a partir de ovejas no gestantes (Innes *et al.*, 1995b; Verhelst *et al.*, 2015). En concreto, esta citoquina es producida por una enorme variedad de poblaciones celulares implicadas en las primeras fases de la respuesta inmunitaria frente a *T. gondii*, como las células dendríticas y NK, neutrófilos y células T (Sturge y Yarovinsky, 2014). Su principal acción es activar a las células fagocíticas, en especial a los macrófagos, y reclutarlos hasta el sitio de infección para que ejerzan esta acción de destrucción o bien del parásito o bien de las células que ha infectado, controlando de esta manera la parasitemia (Dupont *et al.*, 2012; Silva-Barrios y Stäger, 2017). En el caso de la toxoplasmosis, y de acuerdo a los resultados del tercer estudio de esta Tesis Doctoral, la población de células NK en la placenta no sería relevante en la producción de IFN- γ ya que no se observaron variaciones entre los grupos infectados y el control.

Tras este aumento en la detección de IFN- γ circulante, se detectaron unos niveles significativamente mayores de TNF- α e IL10 en los grupos de ovejas infectadas con respecto al grupo de ovejas control, pero sin que existieran diferencias evidentes entre los grupos infectados. A este respecto, se ha descrito que trofoblastos humanos infectados de manera experimental con *T. gondii* pueden producir TNF- α , el cual desempeñaría un papel similar al llevado a cabo por el IFN- γ (Barbosa *et al.*, 2015). En concreto, esta citoquina incrementa la producción de la enzima iNOS en los macrófagos (Sher *et al.*, 2017), lo que contribuye a la producción de NO (Sasai *et al.*, 2018), el cual se ha demostrado que ataca directamente al ADN del parásito, produciendo su destrucción (Cabral *et al.*, 2018). Por otro lado, hay que tener en cuenta que la fuente de las citoquinas séricas probablemente no sea exclusivamente la placenta, si no que los nódulos linfáticos periféricos también pueden jugar un papel relevante en la respuesta del hospedador frente al parásito, tal y como se ha demostrado en ratones (Hunter *et al.*, 1994) o humanos (Prigione *et al.*, 2006; Sher *et al.*, 2017). Así, se ha demostrado en ratones que tras la infección por *T. gondii* se producen grandes cantidades de citoquinas pro-inflamatorias como IFN- γ y TNF- α en las primeras fases de la infección en los nódulos linfáticos, tras lo cual se detectan

Capítulo VI. Discusión general.

niveles elevados de IL10 que podrían contribuir a la colonización del parásito de los tejidos del hospedador y el consiguiente desarrollo de encefalitis asociada a la toxoplasmosis (Hunter *et al.*, 1994), ya que esta citoquina tiene un efecto inhibitorio de la inflamación (Denkers y Gazzinelli, 1998). De forma similar, y coincidiendo con el momento en el que las diferencias en los niveles de IFN- γ circulante dejaron de ser significativos entre las ovejas infectadas y las controles, se produjo también la elevación en el día 12 pi de la citoquina IL10 en las ovejas del presente estudio, lo cual podría estar relacionado con que esta es una citoquina de tipo T_{reg} que inhibe la producción de IFN- γ (Denkers, 1999). A este respecto, tras la infección experimental de ratones gestantes con taquizoítos de *T. gondii* administrados por vía intraperitoneal y la posterior administración utilizando esa misma vía de IL10 recombinante, en algunos de ellos se observó que los niveles de expresión de IFN- γ en el sobrenadante disminuían, mientras que los de IL4 e IL10, lógicamente, aumentaban y contribuían al desarrollo exitoso de la gestación (Zhang *et al.*, 2012). Respecto a la IL4, no se detectaron diferencias significativas en los niveles séricos de esta citoquina en ninguno de los grupos infectados con respecto a las ovejas control. Se trata de una citoquina de tipo anti-inflamatorio que, al igual que la IL10, inhibe la actividad de IFN- γ en las primeras fases de la infección con *T. gondii*, lo que contribuye a una menor supervivencia fetal (Roberts *et al.*, 1996), mientras que en las fases más avanzadas de la gestación su producción sería beneficiosa para el parásito pues le permitiría colonizar los tejidos del hospedador (Smith, 1997; Marin *et al.*, 2017). Nuestros resultados indicarían que esta citoquina no ejerce un papel relevante en la respuesta inmunitaria desarrollada a nivel periférico frente a *T. gondii* en el ganado ovino, de manera similar a lo descrito en la toxoplasmosis murina (Dogruman-Al *et al.*, 2011) y en mujeres embarazadas infectadas con el parásito (Fatoohi *et al.*, 2002). Dadas las diferencias anatómicas y fisiológicas entre estas tres especies, así como las variaciones en la susceptibilidad a la infección por este agente (Innes, 1997), los resultados derivados de estos estudios demostrarían en conjunto que la IL4 no desempeña un papel relevante en la respuesta inmunitaria periférica materna tras la infección con *T. gondii*. Además, tampoco parece tener importancia en la respuesta inmunitaria periférica desarrollada en ovejas gestantes infectadas de manera experimental con *N. caninum*, independientemente del momento de gestación en el que esto ocurra (Arranz-Solís *et al.*, 2016), pero sí en vacas infectadas al principio y

Capítulo VI. Discusión general.

final de la gestación con este mismo parásito (Rosbottom *et al.*, 2007; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014).

En conjunto, los resultados del segundo trabajo de esta Tesis Doctoral sugieren que, tras la infección con *T. gondii*, la respuesta inmunitaria periférica de las ovejas gestantes estaría caracterizada por una producción de citoquinas tanto de tipo Th1 como de tipo Th2, pero que no existiría una polarización clara hacia uno u otro tipo de respuesta a medida que avanza la gestación, de manera similar a lo observado en mujeres embarazadas tras la infección experimental de PBMCs con taquizoítos de *T. gondii*, puesto que tras la infección produjeron grandes cantidades de TNF- α (de tipo Th1), IL5 (de tipo Th2) y también IL10 (de tipo T_{reg}) en comparación con lo observado en mujeres no embarazadas (Silva *et al.*, 2014).

En cuanto a la respuesta inmunitaria local, a nivel de la placenta, se ha valorado mediante el análisis de la transcripción de citoquinas tanto de tipo Th1 o pro-inflamatorias (IL12, IFN- γ y TNF- α) como de tipo Th2 o anti-inflamatorias (IL4) y de tipo T_{reg} (IL10). En el momento del sacrificio, y de forma similar a lo encontrado al estudiar la respuesta inmunitaria periférica, se vio que existía un incremento en la transcripción de citoquinas tanto Th1 como Th2 y T_{reg}. El mayor aumento de transcripción se observó para IFN- γ e IL10. En el primer caso, se vio una diferencia clara entre los animales infectados y los controles, pero no se observaron diferencias al comparar los grupos infectados entre ellos. Este hallazgo confirma el papel fundamental que juega esta citoquina Th1, no sólo a nivel periférico, sino también a nivel local. En este sentido, se ha demostrado en estudios *in vitro* en humanos que la citoquina IFN- γ , secretada por las células NK de la decidua de la placenta favorece la apoptosis de los trofoblastos infectados con el parásito mediante mecanismos celulares complejos mediados por caspasas (Gazzinelli *et al.*, 1996b; Zhang *et al.*, 2015), y que esto interferiría con la invasión de los trofoblastos de la decidua materna, típico de roedores y humanos, desencadenando irremediablemente en fallo reproductivo (Zhang *et al.*, 2015). En el caso de rumiantes, esta invasión no tiene lugar por tratarse de una placenta de tipo sinepiteliocorial, por lo que la importancia del IFN- γ como agente deletéreo de la gestación debe ser diferente y su conocimiento requeriría futuros estudios. Por otro lado, cabe destacar el incremento claro que se observa en la transcripción de IL10 en el grupo infectado durante el último tercio de

Capítulo VI. Discusión general.

gestación. En el primer estudio de esta Tesis Doctoral se detectó ADN parasitario en el día 19 pi en un mayor número de muestras en el grupo 3 en comparación con el resto. Dado que se ha demostrado *in vitro* que esta citoquina aumenta la susceptibilidad de los trofoblastos a la infección con *T. gondii* (Barbosa *et al.*, 2008), y que en ratones parece ser relevante en la posterior formación de quistes tisulares (Jeong *et al.*, 2016), este hecho podría explicar que en estos animales los elevados niveles de IL10 hayan favorecido la rápida colonización de la placenta y feto por parte del parásito. Cabe destacar, sin embargo, que no se observó ninguna elevación de su producción tras la infección en el primer o segundo tercio, lo que contrasta con los resultados al analizar la respuesta inmunitaria periférica, donde en estos grupos se encontraron niveles séricos de IL10 similares a aquellos observados en el grupo 3. Esta diferencia entre las respuestas inmunitarias periférica y local se observa también al analizar los resultados de la IL4, pues existe un incremento local de producción sobre todo tras la infección en el segundo tercio de gestación y, aunque de forma menos evidente, en el primer tercio. Este hallazgo contrasta con la ausencia de detección de esta citoquina a nivel periférico, lo que sugiere que la respuesta detectada en sangre no es exactamente igual a aquella que se observa en la placenta. Estudios en la neosporosis ovina, una enfermedad muy similar tanto por la estrecha relación de los agentes causantes (Reid *et al.*, 2012; Sánchez-Sánchez *et al.*, 2018) como por la similitud del curso clínico en modelos experimentales de ovino gestante (Buxton *et al.*, 1997), han demostrado que esta citoquina podría desempeñar un papel relevante a nivel local (Arranz-Solís *et al.*, 2016). Teniendo esto en cuenta, los resultados de este trabajo demuestran que la respuesta inmunitaria local a nivel de la placenta puede diferir de la desarrollada a nivel periférico, tal y como se ha propuesto en ratones (Chaouat, 2003). Esto podría deberse a que las poblaciones celulares en ambas localizaciones no están presentes en igual número: por ejemplo, se ha demostrado en humanos y ratones que mientras en la sangre periférica las células T predominantes son las de tipo CD4, en la placenta las CD8 son las células T hegemónicas (Erkers *et al.*, 2017).

En conjunto, los resultados de este segundo trabajo demuestran la importancia de la placenta como localización inmunológica estratégica para poder desarrollar una respuesta inmunitaria específica frente a la infección con *T. gondii*. Para

Capítulo VI. Discusión general.

complementar este trabajo y profundizar en el estudio de la respuesta inmunitaria local durante la toxoplasmosis ovina se desarrolló el **tercer y último trabajo** de esta Tesis Doctoral, con el que se trataba de responder al tercer objetivo. Para ello, se caracterizó, mediante marcaje inmunohistoquímico, el infiltrado inflamatorio presente en los placentomas de ovejas infectadas por *T. gondii* que habían desarrollado distintas formas clínicas de la enfermedad, y se valoró su relación con la presencia del parásito en los tejidos, detectado también empleando métodos inmunohistoquímicos.

Como ya se ha indicado en el primer estudio, concretamente en las manifestaciones clínicas tras la inoculación de los ooquistes parasitarios, hubo un elevado número de abortos tempranos, en la fase aguda de la enfermedad (ocho ovejas en total), que ocurrieron de forma inesperada. Debido al avanzado estado de autólisis de las muestras procedentes de estos casos, únicamente se pudieron estudiar mediante métodos inmunohistoquímicos 3 de ellos. Lo mismo ocurrió en el grupo infectado durante el último tercio de la gestación, en el que se produjeron 4 abortos, mortinatos, antes del sacrificio programado de las madres. La autólisis es uno de los grandes problemas que surgen al estudiar muestras procedentes de abortos (Taylor y Njaa, 2012) y dificulta enormemente la evaluación histopatológica de la placenta y muestras fetales (Pereira-Bueno *et al.*, 2004; Williams *et al.*, 2005; de Moraes *et al.*, 2011; Castaño *et al.*, 2014). Por ello, en este estudio se han analizado las muestras procedentes de 27 animales: 9 controles y 18 infectados, que se decidió agrupar únicamente en controles e infectados, y dentro de estos, diferenciar entre: aquellos que sufrieron aborto temprano (n=3) y aquellos que fueron sacrificados (n=15), debido al insuficiente número de muestras.

La detección de antígeno parasitario de *T. gondii* en tejidos ovinos mediante marcaje inmunohistoquímico ha sido descrito como un método eficaz para el diagnóstico de la toxoplasmosis en esta especie (Uggla *et al.*, 1987). Se ha empleado tanto en estudios experimentales (Castaño *et al.*, 2014; Chiebao *et al.*, 2019) como en casos de infección natural (Weissmann, 2003). Esta técnica permite estudiar la distribución del parásito en el tejido y, de este modo, conocer su relación con las lesiones (Gontijo da Silva *et al.*, 2015). Se analizaron 3 placentomas por cada animal y sólo se detectó antígeno parasitario en 5 animales de los 27 estudiados todos ellos sacrificados en la cuarta semana pi, momento en el que, como ya se ha indicado en el primer estudio

Capítulo VI. Discusión general.

de esta Tesis Doctoral, se detectaron lesiones histológicas tanto en las muestras de placenta como fetales. Al estudiar la distribución y morfología de parásito, se encontraron diferencias entre la parte materna, la carúncula, y la fetal, los cotiledones, de los placentomas analizados. En concreto, en la carúncula materna el antígeno parasitario siempre se encontró asociado con áreas de infiltración de linfocitos y macrófagos y/o áreas de necrosis. Estudios previos en neosporosis bovina citan esta zona de la placenta como un lugar inmunológicamente muy activo frente a la replicación parasitaria (Maley *et al.*, 2006; Marin *et al.*, 2017; Jiménez-Pelayo *et al.*, 2019). La presencia de una intensa respuesta inflamatoria en esta localización podría explicar otra de las diferencias percibidas, que el antígeno parasitario observado en la carúncula se encontraba en forma de restos de parásito, una apariencia denominada como antígeno particulado (Macaldowie *et al.*, 2004; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014; Arranz-Solís *et al.*, 2016), en lugar de estructuras parasitarias bien formadas y delimitadas. Este hallazgo sugeriría que la respuesta inmunitaria en la carúncula es eficaz, hasta cierto punto, en destruir al parásito. Sin embargo, en la parte fetal de la placenta, en el cotiledón, el parásito presentaba una morfología mucho más conservada, compatible con vacuolas parasitóforas, y principalmente dentro de los trofoblastos, aunque en el mesénquima cotiledonario también se identificaron estructuras parasitarias íntegras. Existen evidencias sólidas sobre la actividad fagocítica de los trofoblastos en humanos (Choy y Manyonda, 1998; Bevilacqua *et al.*, 2010), ratones (Drake y Rodger, 1987; Amarante-Paffaro *et al.*, 2004; Albieri *et al.*, 2005) y rumiantes (Wooding y Burton, 2008; Pereira *et al.*, 2013; Peter *et al.*, 2017), y estudios *in vitro* han demostrado la gran susceptibilidad de los trofoblastos humanos a la infección por *T. gondii* (Barbosa *et al.*, 2008; Milian *et al.*, 2019). Además, este tipo de presentación parasitaria nunca se encontraba asociada a áreas de necrosis, que no se observaron en la parte fetal de la placenta. Estos hallazgos en conjunto sugieren que el parásito, una vez ha podido invadir la placenta fetal, sería capaz de replicarse de manera muy efectiva en ella, especialmente en los trofoblastos, sin verse afectado por la respuesta inmunitaria desarrollada en la parte materna. A pesar de que sí se han observado células inflamatorias infiltrando el mesénquima cotiledonario, la ausencia de necrosis o destrucción del parásito sugeriría que esta respuesta, en la placenta fetal, no sería eficaz para su eliminación.

Capítulo VI. Discusión general.

Por otro lado, y teniendo en cuenta los resultados del anterior estudio, que mostraron diferencias entre la respuesta inmunitaria periférica y local, también se analizaron mediante técnicas inmunohistoquímicas, la presencia, y distribución de las células NK, linfocitos T y B y macrófagos en los infiltrados inflamatorios encontrados en las lesiones. Uno de los primeros, y sorprendentes, hallazgos fue la casi total ausencia de células NK y linfocitos B, tanto en las placentas de los animales infectados como de los controles. Las células NK son una población celular que ejerce un efecto inmunomodulador en la placenta de ratones y humanos (Dosiou y Giudice, 2005). Su número en el útero decrece a medida que avanza la gestación humana, especialmente a partir del tercer trimestre (Faas y de Vos, 2017), por lo que se ha sugerido que tienen un papel fundamental en la implantación del embrión y su desarrollo inicial, ya que producen, además de citoquinas inmunomoduladoras como la IL10, factores angiogénicos (Barrientos *et al.*, 2013) como el factor de crecimiento de la placenta (Lash *et al.*, 2006), así como proteasas que favorecen la invasión de la decidua de la placenta por los trofoblastos (Naruse *et al.*, 2009). Sin embargo, los hallazgos del presente estudio sugerirían que esta población celular no jugaría un papel importante en las ovejas. A este respecto, un estudio reciente tampoco encontró células NK en el útero de ovejas, en ausencia de infección alguna, durante el último tercio de la gestación, lo que dio pie a discutir las diferencias, no ya solo histológicas, sino también fisiológicas, entre las placentas de ratones y ovejas, poniendo en duda por tanto la extrapolación directa de resultados de una especie a otra (Wattegedera *et al.*, 2019). Respecto al papel que juegan los linfocitos B en la respuesta placentaria, un reciente estudio desarrollado en ratones ha demostrado que ejercen un papel clave en el desarrollo de la gestación protegiendo al feto de posibles infecciones de patógenos, ya que a medida que avanza la gestación se detectan elevados niveles de linfocitos B maduros que migran desde los nódulos linfáticos hasta el útero (Muzzio *et al.*, 2014). Sin embargo, esta población no parece relevante en la respuesta local, placentaria, en las ovejas frente a patógenos intracelulares. Estudios previos llevados a cabo en modelos de ovino gestante inoculados con *C. abortus* (Buxton *et al.*, 2002) o *N. caninum* (Arranz-Solís *et al.*, 2016) demostraron una escasa presencia de linfocitos B, aunque estos dos estudios utilizaron un anticuerpo específico frente a la población de linfocitos B distinto al utilizado en nuestro trabajo (anti-CD21 y anti-CD79_{acy} respectivamente), lo que les ha llevado a sugerir que tendría una escasa importancia

Capítulo VI. Discusión general.

en la respuesta inmunitaria local frente a estos agentes. Del mismo modo, esta población celular parece que carece también de importancia en términos inmunológicos en la respuesta inmunitaria local en la placenta tras la infección experimental con *N. caninum* de vacas en los tres tercios de gestación (Cantón *et al.*, 2014). No obstante, en la especie murina se ha demostrado que la población de células B es esencial en la respuesta inmunitaria desarrollada frente a la infección experimental con *C. abortus* pues en ratones modificados genéticamente que no expresaban este tipo de células se observó, tras la infección con este patógeno, una carga parasitaria en el hígado 1000 veces mayor que en los ratones normales y unas lesiones histológicas consistentes en áreas de necrosis mucho más graves (Buendía *et al.*, 2009). Los resultados del presente trabajo sugerirían sin embargo que, al igual que en las otras dos enfermedades anteriormente expuestas, en el caso de la toxoplasmosis ovina, el papel de los linfocitos B en la placenta no sería relevante.

A diferencia de las células NK y los linfocitos B, los resultados de este tercer trabajo demuestran la importancia de los linfocitos T y de los macrófagos en la respuesta inmunitaria desarrollada en la placenta, ya que el infiltrado inflamatorio observado en las lesiones encontradas está, en su mayoría, formado por estas poblaciones celulares. De hecho, en este estudio se ha apreciado una relación clara entre la presentación clínica de la toxoplasmosis ovina, ya sea en forma de abortos tempranos o bien la clásicamente conocida en esta enfermedad, asociada a la invasión de la placenta por parte del parásito. Concretamente, el incremento de linfocitos T se observó exclusivamente en los placentomas de aquellos animales en los que se identificó la presencia del parásito, los sacrificados en la cuarta semana pi. Aquellos animales infectados, pero en los que no se encontró al parásito no presentaban diferencias con los animales control. Es posible sugerir que estas células, cuyo papel es el de producir elevadas concentraciones de citoquinas, entre ellas IFN- γ , tras ser estimulados con diversos antígenos (Entrican *et al.*, 1992), como por ejemplo *T. gondii* (Innes *et al.*, 1995b), sean la fuente principal de los altos niveles de IFN- γ encontrados durante el segundo estudio tanto a nivel periférico como, sobre todo, al estudiar la placenta. Por otro lado, la positividad se encontró fundamentalmente en las vellosidades fetales, sugiriendo la importancia de esta población celular en la respuesta inmunitaria desarrollada por el feto. De manera muy interesante, se ha

Capítulo VI. Discusión general.

demostrado en humanos que la parte materna y fetal de la decidua no exhiben las mismas características inmunológicas tras procesos infecciosos: por ejemplo, en la parte fetal se concentran la mayoría de las CD (Li *et al.*, 2018). Dado que la acción de la respuesta inmunitaria adaptativa se produce fundamentalmente por el nexo que se produce entre las CD, esenciales en la respuesta inmunitaria innata, y las células T estas diferencias entre los compartimentos materno y fetal de la placenta pueden desempeñar un papel clave en la respuesta inmunitaria en ambas localizaciones. En este mismo sentido, se ha demostrado tras una reproducción experimental de la malaria en ratones que las respuestas inmunitarias de los compartimentos materno y fetal de la placenta difieren, de modo que es la parte fetal la responsable de, por medio de interacciones de TLR4, captar a los eritrocitos infectados con *Plasmodium* e iniciar la respuesta inmunitaria innata (Rodrigues-Duarte *et al.*, 2018). Además, demostraron que en ratones gestantes modificados genéticamente para que no expresaran este receptor (TLR4^{-/-}) los efectos de la infección en el feto fueron menos graves que en los ratones gestantes normales que sí lo expresaban, mientras que la expresión de TLR4 en la parte fetal de la placenta disminuyó la incidencia de pérdida fetal inducida por *Plasmodium* en el útero (Rodrigues-Duarte *et al.*, 2018).

Por otro lado, cabe destacar la importancia que parecen tener los macrófagos en la respuesta inmunitaria local durante la toxoplasmosis ovina. En este estudio se utilizaron diferentes marcadores de macrófagos: Iba-1, un marcador general (Minami *et al.*, 2018) y CD163, cuya positividad en tejidos se relaciona con procesos inflamatorios (Etzerodt y Moestrup, 2013). Se observó un claro aumento del número de células que expresaban estos marcadores, sobre todo el segundo, en dos situaciones: tanto en aquellas ovejas que sufrieron abortos tempranos poco después de la infección como en aquellas ovejas sacrificadas en la cuarta semana pi y en las que se observaron lesiones histológicas y la presencia del parásito. La expresión de CD163 se considera que está asociada a una activación de los macrófagos por la denominada como vía alternativa, o M2, cuya función principal sería la de participar en la reparación de los tejidos, angiogénesis, y eliminación de restos necróticos (Martinez *et al.*, 2008). La población de macrófagos M2 es la mayoritaria entre las células inmunitarias presentes en la placenta humana (Cupurdija *et al.*, 2004), y su presencia está asociada al mantenimiento de la gestación (Tsao *et al.*, 2018). Sin

Capítulo VI. Discusión general.

embargo, el incremento del número de macrófagos CD163⁺ observado en el presente estudio asociado tanto a aborto temprano como a las lesiones inducidas por la presencia del parásito es contrario a este papel en el mantenimiento de la gestación. Esta contradicción podría explicarse por la heterogeneidad de las células CD163⁺ que, por ejemplo, pueden diferenciarse en la expresión de otros marcadores, como el HLA-DR en humanos, pudiendo encontrarse poblaciones CD163⁺HLA-DR⁻, de carácter M2, y CD163⁺HLA-DR⁺, de carácter mixto M1/M2 o incluso de diferentes subpoblaciones de M2 (Shimada *et al.*, 2018). Además, la clasificación de la función que están desempeñando los macrófagos como M1 o M2 es quizás una simplificación excesiva. La acción real que ejercen los macrófagos, y su fenotipo, por tanto, dependería de múltiples factores y señales en función del microambiente que les rodee, la localización o el proceso al que estén asociados (Møller, 2011). Es por ello que sería necesario profundizar en la caracterización fenotípica de las subpoblaciones de macrófagos asociadas a la toxoplasmosis ovina y así poder comprender mejor la patogenia de esta enfermedad.

Resultó llamativo que no sólo se observó un aumento en las poblaciones de macrófagos, sino que la distribución de estas células era marcadamente diferente en función de la presentación clínica. En las ovejas infectadas que sufrieron abortos en la fase temprana poco después de la infección, en las que se observaron infartos en los placentomas, el aumento de macrófagos estaba claramente restringido al septo caruncular materno. En este sentido, en ratones se ha demostrado recientemente que la población de macrófagos residente en la placenta aumenta considerablemente cuando suceden abortos espontáneos, provocando la apoptosis de los trofoblastos fetales, lo que sugiere un papel clave en su patogenia (Guenther *et al.*, 2012). También se ha sugerido su participación en otras complicaciones durante la gestación en humanos (Kim *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta estos hallazgos previos, es probable que los macrófagos residentes en la placenta ovina estén implicados en la patogenia de los abortos tempranos ocurridos poco después de la infección, y de algún modo relacionados con lesiones vasculares de la placenta y leucomalacia fetal posterior, consideradas las consecuencias histopatológicas características de este tipo de abortos (Castaño *et al.*, 2014).

Capítulo VI. Discusión general.

Por su parte, en la placenta de las ovejas sacrificadas en la cuarta semana pi en las que se había detectado la presencia del parásito se observó un importante infiltrado de macrófagos en las vellosidades coriónicas, parte fetal de la placenta, de manera similar a lo descrito en el caso de los linfocitos T. La tinción negativa frente a la calprotectina en estas células sugiere que estos macrófagos corresponderían a una subpoblación de macrófagos residente en la placenta (Soulas *et al.*, 2011). Este tipo de macrófagos fetales localizados en las vellosidades de la placenta, también llamados células Hofbauer (Takahashi *et al.*, 1991), pueden tener diferentes orígenes: en las primeras etapas de la gestación pueden provenir de células madre mesenquimales mientras que a final de la gestación se ha descrito su origen en células madre hematopoyéticas fetales (Yao *et al.*, 2019). Además, tienen una alta capacidad proliferativa y mitogénica (Castellucci *et al.*, 1987), lo que unido a la ausencia de calprotectina, sugeriría que la división por mitosis *in situ* contribuiría al incremento en su número observado en el presente estudio. Recientemente se ha demostrado que, aunque las células Hofbauer se clasifican como macrófagos M2 (Young *et al.*, 2015), en casos de inflamación crónica de la placenta los macrófagos fetales pueden producir citoquinas pro-inflamatorias que pueden dañar este tejido (Reyes y Golos, 2018). Teniendo en cuenta que la positividad de estas células se detectó en el día 26 pi, momento en el que se detectaron las lesiones placentarias en este experimento, parece claro que las células Hofbauer desempeñan un papel clave en la patogenia de la toxoplasmosis ovina.

Tomados en conjunto, los resultados de esta Tesis Doctoral ayudan a profundizar en el conocimiento de los mecanismos patogénicos subyacentes durante el transcurso de la toxoplasmosis ovina. En concreto, demuestran que el momento de gestación en que se produzca la infección de los animales influye directamente sobre la llegada del parásito a la placenta y sobre la aparición y gravedad de las lesiones asociadas a su replicación en este tejido, así como en el feto. Estas consecuencias de la infección por toxoplasma estarían además influenciadas por la respuesta inmunitaria desarrollada por el hospedador no sólo a nivel sistémico sino también a nivel local. Particularmente, la respuesta inmunitaria desarrollada en placenta desempeña un papel clave en el control de la infección y difiere de la desarrollada a nivel periférico por la madre gestante. En este órgano, además, los compartimentos materno y fetal exhiben

Capítulo VI. Discusión general.

propiedades inmunitarias diferentes, lo que se relaciona de manera directa con la distribución del parásito en estas localizaciones y las lesiones asociadas a su replicación.

Capítulo VII.

Conclusiones.

Conclusiones.

Tras el análisis y discusión de los resultados obtenidos en los tres estudios que componen esta Tesis Doctoral, centrada en el estudio de la patogenia de la toxoplasmosis ovina, es posible concluir que:

- 1- La infección de ovejas gestantes con 50 ooquistes del aislado M4 de *T. gondii* administrados por vía oral consigue reproducir de manera experimental la toxoplasmosis ovina y causar abortos tempranos en un porcentaje significativo de las ovejas infectadas y la invasión de la placenta en el resto.
- 2- La patogenia de los abortos inducidos en la especie ovina tras la infección con el parásito *T. gondii* es diferente en función de si ocurren durante la segunda semana pi o transcurridas cuatro semanas, pues en el primer caso los abortos no son consecuencia directa de la multiplicación del parásito en la placenta, mientras que en el segundo caso se ha demostrado que la presencia de lesiones sí está asociada a ésta.
- 3- El momento de gestación en el que se infectan las ovejas influye sobre la invasión de la placenta por el parásito y el desarrollo de lesiones. Si la infección ocurre a final de la gestación, tanto el parásito como las lesiones asociadas pueden detectarse a partir del día 19 pi, mientras que si sucede en otra fase gestante la detección es posible a partir del día 26 pi.
- 4- El desarrollo de una placentitis necrótica multifocal, junto a la infiltración de células inflamatorias, se produce en relación a la colonización de la placenta por parte del parásito.
- 5- En los abortos tardíos de la toxoplasmosis, la gravedad de las lesiones y la carga parasitaria de la placenta y los tejidos fetales están directamente relacionados, y están influidas por el momento de gestación siendo en ambos casos mayor si la infección de las ovejas sucede a mitad de la gestación. Sin embargo, en los abortos tempranos ocurridos durante la segunda semana pi no existen diferencias, respecto a estos parámetros, entre los diferentes tercios de gestación.

Capítulo VII. Conclusiones.

- 6- La respuesta inmunitaria tanto a nivel periférico como en la placenta tras la infección con *T. gondii* en ovinos está caracterizada por la producción de citoquinas de tipo Th1 o pro-inflamatorias (IFN- γ y TNF- α), de tipo Th2 o anti-inflamatorias (IL4) y de tipo T_{reg} (IL10).
- 7- Los dos tipos de respuestas inmunitarias difieren a lo largo de la infección, pues mientras que a nivel periférico el momento de gestación en que se produzca la infección no influye en los niveles séricos de las citoquinas estudiadas, a nivel local, en la placenta, sí se observa esta influencia al analizar los niveles de transcripción de IL4 e IL10.
- 8- A medida que avanza la gestación, la infección con *T. gondii* en el ganado ovino se asocia a una modulación de la respuesta inmunitaria local a nivel de la placenta, principalmente caracterizada por una mayor expresión de la citoquina IL10.
- 9- Existe una diferencia clara entre la parte materna de la placenta (carúncula), y la fetal (cotiledón), en cuanto a la viabilidad del parásito. Mientras que en la parte materna se detectan restos de antígeno parasitario asociados a áreas de necrosis, en la parte fetal el parásito aparece en formas compatibles con vacuolas parasitóforas y que sugieren su viabilidad.
- 10- Tanto las poblaciones de células inflamatorias presentes en las lesiones, como su distribución, difieren en función de la presentación clínica de la enfermedad. Mientras que en los abortos tempranos predomina la infiltración de macrófagos en la carúncula, tras la colonización de la placenta por el parásito predominan los linfocitos T y macrófagos en las vellosidades fetales.
- 11- El aumento de macrófagos en la placenta se produce principalmente a partir de poblaciones residentes en este órgano, ya que no se observa expresión de calprotectina, marcador asociado a la llegada reciente de monocitos desde el torrente sanguíneo.

Capítulo VIII.
Resumen/Summary.

Resumen.

La toxoplasmosis ovina es una enfermedad infecto-contagiosa causada por el protozoo parasitario *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), con una elevada incidencia en la ganadería ovina en todo el mundo, donde provoca importantes pérdidas económicas al estar asociada a fallo reproductivo, generalmente aborto. Aunque se sabe que el momento de gestación en que ocurra la primoinfección de las ovejas gestantes determina las consecuencias clínicas de la enfermedad, no se conocen con exactitud los mecanismos patogénicos que explicarían esas diferencias. Uno de ellos podría ser la respuesta inmunitaria desarrollada tanto por la madre gestante como por el feto, a nivel periférico y de la placenta, pues éste es un factor clave en el control de la infección y multiplicación del parásito. De esta manera, el **objetivo general** de esta Tesis Doctoral es analizar cómo influye el momento de gestación en que ocurre la infección con *T. gondii* sobre la respuesta inmunitaria materna y fetal, a nivel sistémico y local, y la posible relación con la aparición de abortos o transmisión vertical. Para su abordaje se han desarrollado tres estudios en los que además se pretende dar respuesta a objetivos de carácter más específico.

Para ello, 36 ovejas gestantes, primíparas, de raza Churra y de la misma edad se distribuyeron al azar en 3 grupos experimentales, cada uno de ellos formado por 9 ovejas infectadas y 3 no infectadas. La reproducción experimental de la enfermedad se produjo empleando una misma dosis infectiva en todos los grupos, 50 ooquistes esporulados del aislado M4 de *T. gondii* (tipo II) administrados por vía oral. De esta manera, la infección se llevó a cabo a los 40 (G1), 90 (G2) y 120 (G3) días de gestación. Tras la inoculación, se planificó el sacrificio secuencial de 3 animales infectados y 1 control en los días 12, 19 y 26 post-infección (pi).

El primero de los tres estudios de esta Tesis Doctoral se desarrolló con el **objetivo concreto** de esclarecer qué influencia ejerce el momento de gestación en que se infecte a las ovejas gestantes sobre la clínica de la toxoplasmosis ovina, las lesiones fetales y placentarias y también sobre la colonización y multiplicación del parásito en estos tejidos. Para ello, tras la infección se realizó el seguimiento clínico de los animales, siendo posteriormente sacrificados, o bien en el momento en el que se

Capítulo VIII. Resumen/Summary.

produjeron abortos espontáneos o bien cuando estaba previsto su sacrificio secuencial. Tras la necropsia, se recogieron muestras fetales (suero o líquido torácico) para la detección de anticuerpos específicos frente a *T. gondii*. Además, se recogieron diferentes muestras tanto en el feto (encéfalo, hígado, corazón y pulmón) como en la placenta (5 placentomas seleccionados al azar) para su fijación en formol y posterior análisis histológico o bien su almacenamiento a -80°C para después detectar y cuantificar, mediante qPCR, ADN de *T. gondii* analizando estadísticamente las diferencias entre grupos.

La consecuencia clínica más destacable fue la aparición de abortos entre los días 6 y 26 pi que se clasificaron en dos categorías: abortos tempranos (entre los 6 y 16 días pi) o abortos tardíos (entre los días 17 y 26 pi). Los tempranos ocurrieron en los animales infectados de los tres grupos, por lo que en su aparición no influye el momento de gestación en que se produzca la infección de la madre gestante. Además, puesto que la detección de ADN parasitario en los fetos o placentas de los tres grupos fue muy esporádica y puntual en ese intervalo temporal y sucedió en un número muy escaso de muestras, se confirmó que estos abortos tempranos no estarían causados por la multiplicación del parásito en la placenta. Igualmente, la presencia del parásito tampoco es necesaria para la aparición de las lesiones características de este tipo de abortos, consistentes en trombosis e infartos en la placenta y áreas de leucomalacia fetal, observadas solamente en algunos de los encéfalos fetales estudiados. En resumen, el momento de gestación en que se infecta a las ovejas gestantes no ejerce ninguna influencia sobre la aparición de los abortos tempranos, ni sobre el tipo de lesiones fetales o placentarias asociadas o su gravedad, ni sobre la presencia del parásito en ellos.

Sin embargo, al considerar los abortos tardíos, el tercio de gestación en el que se infectan las ovejas sí influye sobre la invasión de la placenta por el parásito, la aparición de lesiones y la consecución de estos abortos. La muerte fetal, con o sin aborto, entre los días 17 y 26 pi fue más frecuente en el grupo de animales infectados a final de la gestación (66,6%) que en los otros dos grupos (16,7% en ambos casos). El momento de gestación en que se produjo la infección de las ovejas gestantes también influyó sobre la colonización del parásito de la placenta y posterior multiplicación en este tejido y en el feto, así como en la aparición y gravedad de las

Capítulo VIII. Resumen/Summary.

lesiones asociadas. Tanto la llegada del parásito a la placenta tras la infección como la aparición de lesiones se detectaron antes, en el día 19 pi, en el G3 en comparación con los otros dos grupos experimentales, donde sólo se detectaron en el día 26 pi. Además, el aumento de carga parasitaria entre la tercera y cuarta semana pi fue muy brusco en los G1 y G2, mientras que en el G3 ese aumento fue muy leve. Dado que a lo largo de todo el experimento solamente se detectaron anticuerpos específicos frente al parásito en fluidos fetales del G2 y, principalmente, en el G3, es posible que la mayor maduración del sistema inmunitario fetal sea la causa de la aparición de estos anticuerpos y, a su vez, del menor incremento en la carga parasitaria observado en el G3, de forma que hubiera sido capaz de limitar en cierto modo la replicación del parásito y dificultar su diseminación hacia otros tejidos. Esta hipótesis también podría explicar que las lesiones de menor gravedad, tanto en la placenta como en el feto, correspondan a las muestras analizadas del G3. Por el contrario, las lesiones más graves y extensas se encontraron en las muestras procedentes de las ovejas infectadas a mitad de la gestación, detectándose en estos mismos animales las mayores cargas parasitarias de todo el experimento.

Sin embargo, las características histológicas de las lesiones son muy similares, independientemente del tercio en el que se produzca la infección. Siempre se correspondieron con inflamaciones necróticas multifocales con infiltrados de macrófagos y linfocitos. Por otro lado, dado que siempre se detectó ADN de *T. gondii* en todas las muestras donde se encontró lesiones, parece claro que, en los abortos o transmisión fetal ocurridos más allá de la segunda semana pi, para el desarrollo de las lesiones es condición necesaria la colonización previa del parásito de estos tejidos. En conjunto, los resultados del primer estudio demuestran que el momento de gestación en que ocurra la infección de la oveja gestante determina claramente las consecuencias clínicas de la enfermedad, además de influir en la llegada del parásito a la placenta y feto y posterior desarrollo de lesiones.

En el segundo trabajo de esta Tesis Doctoral el **objetivo concreto** que se planteó fue analizar la respuesta inmunitaria, tanto periférica como a nivel de la placenta, de los mismos animales que los del anterior trabajo. Para ello, se cuantificaron los niveles circulantes de anticuerpos específicos frente a *T. gondii* en muestras de suero maternas y fetales, así como los de citoquinas de tipo Th1 (IFN- γ y TNF- α), Th2 (IL4)

Capítulo VIII. Resumen/Summary.

y T_{reg} (IL10) en suero materno. También se analizaron los niveles de transcripción de ARN_m de estas cuatro citoquinas, así como de IL12, a nivel de la placenta, mediante qPCR. Durante la fase inicial de la enfermedad, en concreto en los días 5 y 8 pi, se detectaron niveles séricos significativamente mayores de IFN- γ en todos los grupos experimentales con respecto al grupo control, aunque no existieron diferencias significativas entre los grupos infectados. Estos hallazgos confirman que en las fases iniciales de la enfermedad predomina una respuesta inmunitaria de tipo celular. Tras este aumento en la producción de IFN- γ , sus niveles circulantes decrecieron rápidamente coincidiendo con un incremento en la producción de anticuerpos específicos frente a *T. gondii*, así como de TNF- α e IL10. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos infectados más que en días concretos y de forma puntual. Sin embargo, los tres grupos infectados presentaron clara, y significativamente, una mayor cantidad de estas citoquinas que el grupo control. Por otro lado, no se detectaron niveles circulantes apreciables de IL4. Estos resultados en conjunto demuestran que el momento de gestación en que se produce la infección de las ovejas gestantes con *T. gondii* no influye sobre la respuesta inmunitaria periférica desarrollada por los animales, la cual se caracteriza por la producción de citoquinas tanto de tipo Th1 como de tipo T_{reg}, sin que exista una polarización clara hacia uno u otro tipo de respuesta a medida que avanza la gestación.

Al igual que a nivel periférico, la respuesta inmunitaria local estaba caracterizada por la producción de citoquinas de tipo Th1, Th2 y T_{reg}. Es de destacar que, de manera similar a lo observado a nivel periférico, los mayores niveles de expresión de ARN_m en la placenta correspondieron a IFN- γ . Sin embargo, aunque, salvo en el caso de IL12, se encontraron diferencias significativas entre los animales infectados y los controles, las diferencias entre grupos infectados sólo fueron significativas en el caso de IL4 e IL10. En concreto, los niveles de IL4 fueron mayores en los G1 y G2, mientras que los de IL10 fueron mucho más elevados en el G3. Estos resultados demuestran, por un lado que la respuesta inmunitaria periférica y local difieren a lo largo de la infección y que el momento de gestación en que se produce la infección no influye sobre los niveles séricos de las citoquinas estudiadas, pero sí sobre los niveles de expresión de IL4 e IL10 en la placenta, y por otro lado que a medida que avanza la gestación la respuesta inmunitaria desarrollada en la placenta frente a la infección por

Capítulo VIII. Resumen/Summary.

T. gondii sufre una modulación caracterizada principalmente por una mayor expresión de IL10.

El tercer **objetivo concreto** de esta Tesis Doctoral fue analizar si el momento de gestación en que se produjo la infección de los animales con *T. gondii* influye sobre las poblaciones celulares concretas que constituyen los infiltrados inflamatorios observados en la placenta y la distribución del parásito en este órgano. Para ello, se utilizaron métodos inmunohistoquímicos mediante el empleo de anticuerpos específicos frente a diferentes antígenos: del parásito y de diferentes poblaciones celulares (células NK, B, T y macrófagos).

No obstante, debido a la aparición de abortos tempranos en la fase aguda de la toxoplasmosis y de la expulsión de mortinatos en G3, las muestras de placenta de estos animales estaban muy autolíticas, lo que impedía su correcta valoración histológica. Debido a esta limitación en el número de muestras, no se tuvo en cuenta el momento de gestación en que se infectó a los animales y las comparaciones se realizaron entre tres grupos de ovejas: aquellas no infectadas, las que abortaron y las que fueron sacrificadas. Solamente se detectó antígeno parasitario mediante análisis inmunohistoquímico en las placentas de los animales sacrificados en la cuarta semana pi, pues en este momento, como se explicó anteriormente, es cuando se detectó no sólo ADN de *T. gondii* sino también lesiones en la placenta y vísceras fetales de todos los animales infectados. No obstante, la distribución de antígeno parasitario fue diferente en la parte materna y fetal: mientras que en aquella se encontraban restos de parásito, denominado antígeno particulado, asociados con áreas de infiltración de linfocitos y macrófagos y/o áreas de necrosis, en la parte fetal la morfología del parásito estaba más conservada, con una estructura semejante a las vacuolas parasitóforas, frecuentemente observado en el interior de trofoblastos y nunca se encontraba asociado a áreas de necrosis. Estos resultados plantean la posibilidad de que los trofoblastos fetales sean más susceptibles a la infección con *T. gondii* y que la respuesta inmunitaria fetal no sea tan efectiva a la hora de controlar la replicación del parásito, lo que favorecería su multiplicación, al contrario de lo que ocurriría en la parte materna de la placenta.

Respecto a la distribución de los distintos subtipos celulares, un resultado muy destacado fue que el número de células NK⁺ y B⁺ fue muy reducido, no solamente en

Capítulo VIII. Resumen/Summary.

los animales infectados sino también en los controles. Esto parece demostrar que estas células no son importantes en la respuesta inmunitaria desarrollada en la placenta durante la toxoplasmosis ovina. Por el contrario, es de especial relevancia el hecho de que la positividad asociada a las células T y macrófagos, así como su distribución, estuviera condicionada por la presentación clínica de la enfermedad. En concreto, en las ovejas que sufrieron abortos tempranos se detectó una predominancia de macrófagos en el infiltrado inflamatorio siempre restringido a la carúncula materna. Por el contrario, en la placenta de las ovejas sacrificadas en la cuarta semana pi (en las que se había detectado la presencia del parásito por PCR e inmunohistoquímica), los infiltrados inflamatorios asociados con la multiplicación del parásito consistían tanto en linfocitos T como en macrófagos, restringidos siempre a las vellosidades fetales de la placenta. Además, en este último caso se demostró que, dada la ausencia de positividad asociada a la calprotectina, los macrófagos implicados en la respuesta inmunitaria local serían aquellos residentes de manera constitutiva en este tejido.

En resumen, los resultados de esta Tesis Doctoral demuestran que la llegada de *T. gondii* a la placenta ovina y posterior multiplicación en este tejido y en el feto, así como la gravedad de las lesiones asociadas, están influidas por el momento de gestación en que ocurra la infección. Se demuestra también la importancia de la respuesta inmunitaria local, a nivel de la placenta, que presenta diferencias con respecto a la materna periférica, y cuyo infiltrado inflamatorio difiere en función de la presentación clínica de la enfermedad.

Summary.

Ovine toxoplasmosis is an infectious disease caused by the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), which results in heavy economic losses in the sheep industry worldwide as it is related to reproductive failure, principally abortions. There is evidence that the term of gestation when pregnant sheep are infected for the first time clearly influences the clinical outcome of this disease, but the mechanisms underlying

Capítulo VIII. Resumen/Summary.

these differences are unclear. One of these mechanisms would be related to both maternal and foetal peripheral and placental immune responses, as they are key factors to prevent the infection and parasite replication. Consequently, the **general aim** of this PhD Thesis is to analyse the influence of the term of gestation when pregnant sheep are infected with *T. gondii* on the systemic and local maternal and foetal immune responses and its possible relationship with the appearance of abortions or vertical transmission. For this, three studies were conducted, focused in three specific objectives.

For this purpose, 36 pure Churra breed primiparous sheep of the same age were randomly distributed into 3 experimental groups, each of which formed by 9 infected animals and 3 sheep as negative control of inoculation. All the infected animals were orally dosed with 50 sporulated oocysts of the M4 isolate of *T. gondii* (type II) at 40 (G1), 90 (G2) and 120 (G3) days of gestation. Once inoculated, the original schedule was planned for the serial culling of three challenged and one unchallenged animal at days 12, 19 and 26 pi.

The **specific aim** of the first study was to evaluate how clinical disease, lesions, in both foetal and maternal tissues. and parasite distribution and burden in them are influenced by the gestational age in which infection occurs. With this objective, ewes were observed daily after inoculations until they were sedated and immediately euthanized either when spontaneous abortion occurred or on the scheduled days for the serial cullings. After necropsy, foetal samples (sera or thoracic fluid) were collected to detect specific antibodies against *T. gondii* foetal (brain, liver, heart and lungs) and placental (five placentomes randomly selected) samples that were fixed in 10% formalin for histological examinations or stored at -80°C until subsequent DNA extraction for parasite detection and quantification by qPCR. In all cases, differences between groups were statistically analysed.

The most striking clinical finding was the occurrence of abortions between days 6 and 26 pi. Specifically, they were classified into two categories according to the time of occurrence: abortions during the acute phase of the disease (between days 6 and 16 pi) and late abortions, occurred between days 17 and 26 pi. As acute abortions happened in the three groups, their occurrence was not influenced by the gestational age when pregnant sheep were infected. *T. gondii* DNA was only found in sporadic

Capítulo VIII. Resumen/Summary.

days and in few foetal and placental samples at this period of time, so it was confirmed that the multiplication of the parasite in the placenta is not necessary to trigger acute abortions or the appearance of lesions, i.e. thrombosis and infarcts found in all the placentomes recovered and leucomalacia in some foetal brains. In summary, the term of gestation when pregnant sheep are infected with *T. gondii* does not influence the occurrence of early abortions during the acute phase of ovine toxoplasmosis, neither the type or severity of foetal and placental lesions related to this clinical presentation, neither the parasite burden in these tissues.

However, when considering late abortions, the gestation period when infection takes place has a direct effect on placental colonization by the parasite, the appearance of lesions and the rate of abortions. Foetal death, with or without foetal expulsion, between days 17 and 26 pi was more frequent in the group of animals infected at the end of pregnancy (66.6%) than in the other two groups (16.7% in both cases). The gestational age in which infection occurred also influenced the colonization of the placenta by *T. gondii* and its later multiplication in this tissue and in the foetus, as well as the appearance and severity of the associated lesions. Specifically, both the arrival of the parasite to the placenta after infection and the appearance of lesions were detected before, on day 19 pi, in G3 compared to the other two experimental groups, in which they were only detected on day 26 pi. In addition, there was a marked increase in parasite burden between the third and fourth week pi in G1 and G2, whereas in G3 that increase was very slight. Given that throughout the entire experiment specific antibodies against the parasite were only detected in foetal fluids of G2 and, mainly, in G3, it is possible that the maturation of the foetal immune response that takes place towards the end of gestation was the responsible for the production of the antibodies and, at the same time, the slighter increase of the parasite burden observed in G3, as this immune response might have been able to limit the replication of *T. gondii*. This hypothesis also seems to explain that the milder lesions, both in placental and foetal tissues, correspond to samples recovered from G3. By contrast, the more severe and extensive lesions were found in ewes infected at mid-gestation, when it was also found the highest parasite burden of the entire experiment.

However, regardless the moment of gestation when infection occurs, the lesions found showed the same histological changes, characterized by the presence of multifocal

Capítulo VIII. Resumen/Summary.

necrotic foci in the placenta and several organs of the foetus with mild infiltration of both macrophages and lymphocytes. As *T. gondii* DNA was always detected in all samples where lesions were found, it seems clear that, in abortions or congenital transmission from the second week pi, it is necessary that the parasite colonizes the placenta for these lesions to appear. Together, the results of the first study demonstrate that the time of gestation when sheep are infected clearly determines the clinical outcome of ovine toxoplasmosis. Besides, it also influences the arrival of the parasite to the placenta and foetus and subsequent development of lesions.

The **specific aim** of the second study was to analyse the peripheral and placental immune responses of the same animals as those of the previous work. For this purpose, specific anti-*T. gondii* antibodies were investigated in maternal and foetal serum samples, as well as the levels of several cytokines: IFN- γ and TNF- α (Th1 type), IL4 (Th2 type), and IL10 (T_{reg} type). In addition, the immune response at the placenta was characterized by analysing the RNA transcription of these four cytokines, as well as IL12, at the placentomes by qPCR. It is noticeable that the strongest response measured in maternal sera was that of IFN- γ . Specifically, the three infected groups showed a significant increase of serological IFN- γ at days 5 and 8 pi when compared to control animals, although there were no statistically significant differences between the infected groups. These findings confirm that at early stages of the infection predominates a cellular-type immune response. After this increase, the IFN- γ peripheral levels rapidly decreased, coinciding with a sudden increase in the production of both specific antibodies against *T. gondii* and TNF- α and IL10 cytokines. Apart from specific days, there were no statistical differences between infected groups. However, peripheral levels of these two cytokines were significantly higher in all the infected groups in comparison with the control group. By contrast, IL4 was not detected at peripheral level. Taken together, these results show that the moment of gestation when infection with *T. gondii* occurs does not influence the peripheral immune response developed by sheep, which is characterized by the production of cytokines of both Th1 type and T_{reg} type, and that there is no clear polarization towards one or another type as gestation progresses.

As at the peripheral level, the local immune response was characterized by the production of Th1, Th2 and T_{reg} type cytokines. It is noteworthy that, similarly to the

Capítulo VIII. Resumen/Summary.

peripheral level, the highest levels of mRNA expression in the placenta were those of IFN- γ cytokine. Moreover, except for IL12, the only significant differences found between groups were those of IL4 and IL10. Specifically, IL4 levels were higher in G1 and G2 than in G3, while IL10 levels were much higher in G3 than in the other groups. These results show that peripheral and local immune response differ throughout the disease, as the time of gestation in which infection with *T. gondii* takes place does not influence the peripheral immune response but it does at local level. In addition, this work demonstrates that as pregnancy progresses the placental immune response against *T. gondii* infection is modulated towards a greater expression of IL10.

The **specific aim** of the third and last study of this PhD Thesis was to evaluate if the term of gestation in which the infection occurs influences the distribution of *T. gondii* at the placenta of the same animals that the two previous studies, as well as the specific cell populations involved in the inflammatory infiltrates observed at this tissue. For this purpose, specific antibodies against different antigens (the parasite and different cell populations like NK, B, and T cells as well as macrophages) were used for immunohistochemical labelling.

However, due to the occurrence of early abortions in the acute phase of the disease and the expulsion of stillbirths in G3, the placental samples of these animals showed an advanced degree of autolysis, which hampered its evaluation. This clear limitation in the number of samples provoked that the time of pregnancy in which the animals were infected was not taken into account and the comparisons were only made between three groups of sheep: those not infected, those that aborted and those that were culled on scheduled days. The parasite was only found at the placenta of those sheep culled on the fourth week pi. As explained above, at this time not only *T. gondii* DNA but also placental and foetal lesions were observed. However, the distribution of *T. gondii* antigen was quite different between the foetal and maternal compartments of the placenta, as at the maternal caruncle it was found as particulate antigen or parasite debris always related to areas of infiltration of lymphocytes and macrophages and/or necrosis, whereas on the foetal cotyledon the parasite integrity was better preserved, as positive structures resembling parasitoforous vacuoles, but it was never associated with necrosis. In view of these results it seems that foetal trophoblasts are more susceptible to infection with *T. gondii* than the maternal caruncle, and that the foetal

Capítulo VIII. Resumen/Summary.

immune response is not as effective when controlling parasite replication, which would favour its multiplication.

With regard to the distribution of specific cell populations, a remarkable result was the almost lack of NK⁺ and B⁺ cells, not only in infected but also in uninfected sheep. This seems to show that these cells are not important in the placental immune response after challenge with *T. gondii* of sheep at any time of pregnancy. By contrast, the outcome of the infection clearly influenced the distribution of both T cells and macrophages at this tissue. Specifically, there was an increase of macrophages expressing Iba1 and CD163 at the maternal caruncle of the placentomes recovered from those sheep that suffered early abortions at the acute phase of the disease. On the other hand, the distribution of the inflammatory cells at the placenta was different in those sheep culled at the fourth week pi, in which the parasite was detected by both PCR and immunohistochemistry. In these samples, it was found a remarkable increase of both T lymphocytes and macrophages within the chorionic villi, the foetal compartment of the placenta. Moreover, the lack of macrophages expressing calprotectin demonstrates that macrophages involved in the placental immune response during ovine toxoplasmosis are a resident population of this tissue.

Taken together, the results of this PhD Thesis clearly demonstrate that the arrival of *T. gondii* to the ovine placenta and subsequent multiplication in this tissue and in the foetus, as well as the severity of the associated lesions, are influenced by the gestational age when infection occurs. They also show the relevance of the local immune response at the placenta, that differs from the peripheral maternal immune response, and whose inflammatory infiltrate is different depending on the clinical presentation of the disease.

Capítulo IX.
Referencias
bibliográficas.

Referencias bibliográficas.

- Abbasi M, Kowalewska-Grochowska K, Bahar MA, Kilani RT, Winkler-Lowen B, Guilbert LJ. (2003).** Infection of placental trophoblasts by *Toxoplasma gondii*. *J. Infect. Dis.* 188(4), 608-616.
- Abi Abdallah DS, Lin C, Ball CJ, King MR, Duhamel GE, Denkers EY. (2012).** *Toxoplasma gondii* triggers release of human and mouse neutrophil extracellular traps. *Infect. Immun.* 80(2), 768-777.
- Adl SM, Simpson AG, Lane CE, Lukeš J, Bass D, Bowser SS, Brown MW, Burki F, Dunthorn M, Hampl V, Heiss A, Hoppenrath M, Lara E, Le Gall L, Lynn DH, McManus H, Mitchell EA, Mozley-Stanridge SE, Parfrey LW, Pawlowski J, Rueckert S, Shadwick L, Schoch CL, Smirnov A, Spiegel FW. (2012).** The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 59(5), 429-493.
- Aguirre AA, Longcore T, Barbieri M, Dabritz H, Hill D, Klein PN, Lepczyk C, Lilly EL, McLeod R, Milcarsky J, Murphy CE, Su C, VanWormer E, Yolken R, Sizemore GC. (2019).** The one health approach to toxoplasmosis: epidemiology, control, and prevention strategies. *Ecohealth* 16(2), 378-390.
- Aisemberg J, Vercelli CA, Bariani MV, Billi SC, Wolfson ML, Franchi AM. (2013).** Progesterone is essential for protecting against LPS-induced pregnancy loss. LIF as a potential mediator of the anti-inflammatory effect of progesterone. *PLoS One* 8(2), e56161.
- Aiumlamai S, Fredriksson G, Uggla A, Kindahl H, Edqvist LE. (1990).** The effect of *Toxoplasma gondii* infection in flunixin meglumine treated pregnant ewes as monitored by plasma levels of 15-ketodihydroprostaglandin F2 alpha, progesterone, oestrone sulphate and ultrasound scanning. *Zentralbl Veterinarmed A.* 37(1), 23-34.
- Al-Kappany YM, Rajendran C, Abu-Elwafa SA, Hilali M, Su C, Dubey JP. (2010).** Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates in Egyptian feral cats reveals new genotypes. *J. Parasitol.* 96(6), 1112-1114.
- Al-Kappany YM, Abbas IE, Devleeschauwer B, Dorny P, Jennes M, Cox E. (2018).** Seroprevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in Egyptian sheep and goats. *BMC Vet. Res.* 14(1), 120.
- Albieri A, Hoshida MS, Gagiotti SM, Leanza EC, Abrahamsohn I, Croy A, Ashkar AA, Bevilacqua E. (2005).** Interferon-gamma alters the phagocytic activity of the mouse trophoblast. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3, 34.
- Aldebert D, Durand F, Mercier C, Brenier-Pinchart MP, Cesbron-Delauw MF, Pelloux H. (2007).** *Toxoplasma gondii* triggers secretion of interleukin-12 but low level of interleukin-10 from the THP-1 human monocytic cell line. *Cytokine* 37(3), 206-211.
- Allan SE, Broady R, Gregori S, Himmel ME, Locke N, Roncarolo MG, Bacchetta R, Levings MK.**

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

- (2008). CD4⁺ T-regulatory cells: toward therapy for human diseases. *Immunol. Rev.* 223, 391-421.
- Almería S, Calvete C, Pagés A, Gauss C, Dubey JP. (2004).** Factors affecting the seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from Spain. *Vet. Parasitol.* 123(3-4), 265-270.
- Almería S, Araujo RN, Darwich L, Dubey JP, Gasbarre LC. (2011).** Cytokine gene expression at the materno-foetal interface after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. *Parasite Immunol.* 33(9), 517-523.
- Almería S, Cabezón O, Paniagua J, Cano-Terriza D, Jiménez-Ruiz S, Arenas-Montes A, Dubey JP, Garcia-Bocanegra I. (2018).** *Toxoplasma gondii* in sympatric domestic and wild ungulates in the Mediterranean ecosystem. *Parasitol. Res.* 117(3), 665-671.
- Álvarez-García G, Collantes-Fernández E, Costas E, Rebordosa X, Ortega-Mora LM. (2003).** Influence of age and purpose for testing on the cut-off selection of serological methods in bovine neosporosis. *Vet. Res.* 34(3), 341-352.
- Amarante-Paffaro A, Queiroz GS, Corrêa ST, Spira B, Bevilacqua E. (2004).** Phagocytosis as a potential mechanism for microbial defense of mouse placental trophoblast cells. *Reproduction* 128(2), 207-218.
- Araujo FG, Slifer T. (2003).** Different strains of *Toxoplasma gondii* induce different cytokine responses in CBA/Ca mice. *Infect. Immun.* 71(7), 4171-4174.
- Arck P, Hansen PJ, Jericevic BM, Piccinni MP, Szekeres-Bartho J. (2007).** Progesterone during pregnancy: endocrine-immune cross talk in mammalian species and the role of stress. *Am. J. Reprod. Immunol.* 58(3), 268-279.
- Arisue N, Hashimoto T. (2015).** Phylogeny and evolution of apicomplasts and apicomplexan parasites. *Parasitol. Int.* 64(3), 254-259.
- Armand B, Solhjoo K, Kordshooli MS, Davami MH, Pourahmad M, Orfaee V. (2017).** *Toxoplasma gondii* type I, predominant genotype isolated from sheep in South of Iran. *Vet. World* 10(4), 386-392.
- Arranz-Solís D, Benavides J, Regidor-Cerrillo J, Fuertes M, Ferre I, Ferreras MC, Collantes-Fernández E, Hemphill A, Pérez V, Ortega-Mora LM. (2015).** Influence of the gestational stage on the clinical course, lesional development and parasite distribution in experimental ovine neosporosis. *Vet. Res.* 46, 19.
- Arranz-Solís D, Benavides J, Regidor-Cerrillo J, Horcajo P, Castaño P, Ferreras MC, Jiménez-Pelayo L, Collantes-Fernández E, Ferre I, Hemphill A, Pérez V, Ortega-Mora LM. (2016).** Systemic and local immune responses in sheep after *Neospora caninum* experimental infection at early, mid and late gestation. *Vet. Res.* 47, 2.
- Astorga RJ, Reguillo L, Hernández M, Cardoso-Toset F, Tarradas C, Maldonado A, Gómez-**

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

Laguna J. (2014). Serosurvey on schmallenberg virus and selected ovine reproductive pathogens in culled ewes from Southern Spain. *Transbound. Emerg. Dis.* 61(1), 4-11.

Bachan M, Deb AR, Maharana BR, Sudhakar NR, Sudan V, Saravanan BC, Tewari AK. (2018). High seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in goats in Jharkhand state of India. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports* 12, 61-68.

Baines MG, Duclos AJ, Anteckka E, Haddad EK. (1997). Decidual infiltration and activation of macrophages leads to early embryo loss. *Am. J. Reprod. Immunol.* 37(6), 471-477.

Bajnok J, Boyce K, Rogan MT, Craig PS, Lun ZR, Hide G. (2015). Prevalence of *Toxoplasma gondii* in localized populations of *Apodemus sylvaticus* is linked to population genotype not to population location. *Parasitology* 142(5), 680-690.

Barbosa BF, Silva DA, Costa IN, Mineo JR, Ferro EA. (2008). BeWo trophoblast cell susceptibility to *Toxoplasma gondii* is increased by interferon- γ , interleukin-10 and transforming growth factor- β 1. *Clin. Exp. Immunol.* 151(3), 536-545.

Barbosa BF, Lopes-Maria JB, Gomes AO, Angeloni MB, Castro AS, Franco PS, Fermino ML, Roque-Barreira MC, Ietta F, Martins-Filho OA, Silva DA, Mineo JR, Ferro EA. (2015). IL10, TGF Beta1, and IFN gamma modulate intracellular signaling pathways and cytokine production to control *Toxoplasma gondii* infection in BeWo trophoblast cells. *Biol. Reprod.* 92(3), 82.

Barragan A, Sibley LD. (2003). Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends Microbiol.* 11(9), 426-430.

Barrientos G, Tirado-González I, Freitag N, Kobelt P, Moschansky P, Klapp BF, Thijssen VL, Blois SM. (2013). CXCR4⁺ dendritic cells promote angiogenesis during embryo implantation in mice. *Angiogenesis* 16(2), 417-427.

Barros M, Cabezón O, Dubey JP, Almería S, Ribas MP, Escobar LE, Ramos B, Medina-Vogel G. (2018). *Toxoplasma gondii* infection in wild mustelids and cats across an urban-rural gradient. *PLoS One* 13(6), e0199085.

Basso W, Handke M, Sydler T, Borel N, Grimm F, Sidler X, Deplazes P. (2015). Involvement of *Toxoplasma gondii* in reproductive disorders in Swiss pig farms. *Parasitol. Int.* 64(2), 157-160.

Basso W, Grimm F, Ruetten M, Djokic V, Blaga R, Sidler X, Deplazes P. (2017). Experimental *Toxoplasma gondii* infections in pigs: humoral immune response, estimation of specific IgG avidity and the challenges of reproducing vertical transmission in sows. *Vet. Parasitol.* 236, 76-85.

Beagley KW, Gockel CM. (2003). Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 38(1), 13-22.

Benavides J. (2018). Toxoplasmosis en pequeños rumiantes. [<https://www.oviespana.com/foro-nacional-de-ovino/foro-de-ovino-18-actas/foro-ovino-18-primera-sesion/toxoplasmosis-en>]

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

pequeños-rumiantes].

- Benavides J, Maley S, Pang Y, Palarea J, Eaton S, Katzer F, Innes EA, Buxton D, Chianini F. (2011).** Development of lesions and tissue distribution of parasite in lambs orally infected with sporulated oocysts of *Toxoplasma gondii*. *Vet. Parasitol.* 179(1-3), 209-215.
- Benavides J, Collantes-Fernández E, Ferre I, Pérez V, Campero C, Mota R, Innes E, Ortega-Mora LM. (2014).** Experimental ruminant models for bovine neosporosis: what is known and what is needed. *Parasitology* 141(11), 1471-1488.
- Benavides J, Fernández M, Castaño P, Ferreras MC, Ortega-Mora L, Pérez V. (2017).** Ovine toxoplasmosis: a new look at its pathogenesis. *J. Comp. Pathol.* 157(1), 34-38.
- Benedictus L, Koets AP, Rutten VP. (2015).** The role of placental MHC class I expression in immune-assisted separation of the fetal membranes in cattle. *J. Reprod. Immunol.* 112, 11-19.
- Beverley JK, Henry L. (1978).** Experimental toxoplasmosis in young piglets. *Res Vet. Sci.* 24(2), 136-146.
- Beverley JK, Archer JF, Watson WA, Fawcett AR. (1971).** Trial of a killed vaccine in the prevention of ovine abortion due to toxoplasmosis. *Br. Vet. J.* 127(11), 529-535.
- Beverley JK, Henry L, Hunter D, Brown ME. (1977).** Experimental toxoplasmosis in calves. *Res Vet. Sci.* 23(1), 33-37.
- Bevilacqua E, Hoshida MS, Amarante-Paffaro A, Albieri-Borges A, Zago-Gomes S. (2010).** Trophoblast phagocytic program: roles in different placental systems. *Int. J. Dev. Biol.* 54(2-3), 495-505.
- Bezerra MJ, Cruz JA, Kung ES, Albuquerque PP, Kim PC, Moraes EP, Pinheiro Júnior JW, Mota RA. (2014).** Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in fresh and frozen semen from rams in Brazil. *Reprod. Domest. Anim.* 49(5), 753-755.
- Bhadra R, Cobb DA, Khan IA. (2013).** CD40 signaling to the rescue: a CD8 exhaustion perspective in chronic infectious diseases. *Crit. Rev. Immunol.* 33(4), 361-378.
- Blanchard N, Gonzalez F, Schaeffer M, Joncker NT, Cheng T, Shastri AJ, Robey EA, Shastri N. (2008).** Immunodominant, protective response to the parasite *Toxoplasma gondii* requires antigen processing in the endoplasmic reticulum. *Nat. Immunol.* 9(8), 937-944.
- Blewett DA, Bryson CE, Miller JK. (1983).** Studies of antibody titres in experimentally induced ovine toxoplasmosis. *Res. Vet. Sci.* 34(2), 163-166.
- Bliss SK, Zhang Y, Denkers EY. (1999).** Murine neutrophil stimulation by *Toxoplasma gondii* antigen drives high level production of IFN- γ -independent IL-12. *J. Immunol.* 163(4), 2081-2088.
- Brown MB, von Chamier M, Allam AB, Reyes L. (2014).** M1/M2 macrophage polarity in normal and complicated pregnancy. *Front. Immunol.* 5, 606.

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

- Buaille C, Guerrero NA, Cebrian I, Blanié S, Lopez J, Bassot E, Vasseur V, Santi-Rocca J, Blanchard N. (2017).** MHC I presentation of *Toxoplasma gondii* immunodominant antigen does not require Sec22b and is regulated by antigen orientation at the vacuole membrane. *Eur. J. Immunol.* 47(7), 1160-1170.
- Buendía AJ, Ortega N, Caro MR, Del Río L, Gallego MC, Sánchez J, Navarro JA, Cuello F, Salinas J. (2009).** B cells are essential for moderating the inflammatory response and controlling bacterial multiplication in a mouse model of vaccination against *Chlamydomphila abortus* infection. *Infect. Immun.* 77(11), 4868-4876.
- Burrells A, Benavides J, Cantón G, Garcia JL, Bartley PM, Nath M, Thomson J, Chianini F, Innes EA, Katzer F. (2015).** Vaccination of pigs with the S48 strain of *Toxoplasma gondii* - Safer meat for human consumption. *Vet. Res.* 46, 47.
- Burrells A, Taroda A, Opsteegh M, Schares G, Benavides J, Dam-Deisz C, Bartley PM, Chianini F, Villena I, van der Giessen J, Innes EA, Katzer F. (2018).** Detection and dissemination of *Toxoplasma gondii* in experimentally infected calves, a single test does not tell the whole story. *Parasit. Vectors* 11(1), 45.
- Buxton D. (1990).** Ovine toxoplasmosis: a review. *J. R. Soc. Med.* 83(8), 509-511.
- Buxton D. (1998).** Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis spp.*) in sheep and goats: recent advances. *Vet. Res.* 29(3-4), 289-310.
- Buxton D, Finlayson J. (1986).** Experimental infection of pregnant sheep with *Toxoplasma gondii*: pathological and immunological observations on the placenta and foetus. *J. Comp. Pathol.* 96(3), 319-333.
- Buxton D, Innes EA. (1995).** A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. *Parasitology* 110(Suppl:S11-S16).
- Buxton D, Gilmour JS, Angus KW, Blewett DA, Miller JK. (1982).** Perinatal changes in lambs infected with *Toxoplasma gondii*. *Res. Vet. Sci.* 32(2),170-176.
- Buxton D, Donald KM, Finlayson J. (1987).** Monensin and the control of experimental ovine toxoplasmosis: a systemic effect. *Vet. Rec.* 120(26), 618-619.
- Buxton D, Blewett DA, Trees AJ, McColgan C, Finlayson J. (1988).** Further studies in the use of monensin in the control of experimental ovine toxoplasmosis. *J. Comp. Pathol.* 98(2), 225-236.
- Buxton D, Uggla A, Lövgren K, Thomson K, Lundén A, Morein B, Blewett DA. (1989).** Trial of a novel experimental *Toxoplasma* iscom vaccine in pregnant sheep. *Br. Vet. J.* 145(5), 451-457.
- Buxton D, Thomson K, Maley S, Wright S, Bos HJ. (1991).** Vaccination of sheep with a live incomplete strain (S48) of *Toxoplasma gondii* and their immunity to challenge when pregnant. *Vet. Rec.* 129(5), 89-93.
- Buxton D, Thomson KM, Maley S. (1993a).** Treatment of ovine toxoplasmosis with a combination of

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

sulphamezathine and pyrimethamine. *Vet. J.* 132(16), 409-411.

Buxton D, Thomson KM, Maley S, Wright S, Bos HJ. (1993b). Experimental challenge of sheep 18 months after vaccination with a live (S48) *Toxoplasma gondii* vaccine. *Vet. Rec.* 133(13), 310-312.

Buxton D, Thomson KM, Maley S, Wastling JM, Innes EA, Panton WR, Nicoll S. (1994). Primary and secondary responses of the ovine lymph node to *Toxoplasma gondii*: cell output in efferent lymph and parasite detection. *J. Comp. Pathol.* 111(3), 231-241.

Buxton D, Brebner J, Wright S, Maley SW, Thomson KM, Millard K. (1996). Decoquate and the control of experimental ovine toxoplasmosis. *Vet. Rec.* 138(18), 434-436.

Buxton D, Maley SW, Thomson KM, Trees AJ, Innes EA. (1997). Experimental infection of non-pregnant and pregnant sheep with *Neospora caninum*. *J. Comp. Pathol.* 117(1), 1-16.

Buxton D, Anderson IE, Longbottom D, Livingstone M, Wattegedera S, Entrican G. (2002). Ovine chlamydial abortion: characterization of the inflammatory immune response in placental tissues. *J. Comp. Pathol.* 127(2-3), 133-141.

Buxton D, Maley SW, Wright SE, Rodger S, Bartley P, Innes EA. (2007). *Toxoplasma gondii* and ovine toxoplasmosis: new aspects of an old story. *Vet. Parasitol.* 149(1-2), 25-28.

Cabral GRA, Wang ZT, Sibley LD, DaMatta RA. (2018). Inhibition of nitric oxide production in activated macrophages caused by *Toxoplasma gondii* infection occurs by distinct mechanisms in different mouse macrophage cell lines. *Front. Microbiol.* 9, 9136.

Calabrese KS, Tedesco RC, Zaverucha do Valle T, Barbosa HS. (2008). Serum and aqueous humour cytokine response and histopathological alterations during ocular *Toxoplasma gondii* infection in C57BL/6 mice. *Micron* 39(8), 1335-1341.

Calero-Bernal R, Gennari SM. (2019). Clinical toxoplasmosis in dogs and cats: an update. *Front. Vet. Sci.* 6, 54.

Cantón GJ, Katzer F, Maley SW, Bartley PM, Benavides-Silván J, Palarea-Albaladejo J, Pang Y, Smith SH, Rocchi MS, Buxton D, Innes EA, Chianini F. (2014). Inflammatory infiltration into placentas of *Neospora caninum* challenged cattle correlates with clinical outcome of pregnancy. *Vet. Res.* 45, 11.

Carlier Y, Truyens C, Deloron P, Peyron F. (2012). Congenital parasitic infections: a review. *Acta Trop.* 121(2), 55-70.

Carson A. (2018). Abortion in sheep: an update. *Vet. Rec.* 183(17), 528-529.

Cassaing S, Bessièrès MH, Berry A, Berrebi A, Fabre R, Magnaval JF. (2006). Comparison between two amplification sets for molecular diagnosis of toxoplasmosis by real-time-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 44(3), 720-724.

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

- Castaño P, Fuertes M, Ferre I, Fernández M, Ferreras MC, Moreno-Gonzalo J, González-Lanza C, Katzer F, Regidor-Cerrillo J, Ortega-Mora LM, Pérez V, Benavides J. (2014).** Placental thrombosis in acute phase abortions during experimental *Toxoplasma gondii* infection in sheep. *Vet. Res.* 45, 9.
- Castaño P, Fuertes M, Regidor-Cerrillo J, Ferre I, Fernández M, Ferreras MC, Moreno-Gonzalo J, González-Lanza C, Pereira-Bueno J, Katzer F, Ortega-Mora LM, Pérez V, Benavides J. (2016).** Experimental ovine toxoplasmosis: influence of the gestational stage on the clinical course, lesion development and parasite distribution. *Vet. Res.* 47, 43.
- Castaño P, Fernández M, Regidor-Cerrillo J, Fuertes M, Horcajo P, Ferre I, Ferreras MC, Ortega-Mora LM, Pérez V, Benavides J. (2019).** Peripheral and placental immune responses in sheep after experimental infection with *Toxoplasma gondii* at the three terms of gestation. *Vet. Res.* 50, 66.
- Castellucci M, Celona A, Bartels H, Steininger B, Benedetto V, Kaufmann P. (1987).** Mitosis of the Hofbauer cell: possible implications for a fetal macrophage. *Placenta* 8(1), 65-76.
- Cesbron-Delauw MF, Gendrin C, Travier L, Ruffiot P, Mercier C. (2008).** Apicomplexa in mammalian cells: trafficking to the parasitophorous vacuole. *Traffic* 9(5), 657-664.
- Chang JS, Russell GC, Jann O, Glass EJ, Werling D, Haig DM. (2009).** Molecular cloning and characterization of Toll-like receptors 1-10 in sheep. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 127(1-2), 94-105.
- Chaouat G. (2003).** Innately moving away from the Th1/Th2 paradigm in pregnancy. *Clin. Exp. Immunol.* 131(3), 393-395.
- Chaouat G, Ledee-Bataille N, Dubanchet S, Zourbas S, Sandra O, Martal J. (2003).** Reproductive immunology 2003: reassessing the Th1/Th2 paradigm? *Immunol. Lett.* 92(3), 207-214.
- Chen JL, Ge YY, Zhang J, Qiu XY, Qiu JF, Wu JP, Wang Y. (2013).** The dysfunction of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells contributes to the abortion of mice caused by *Toxoplasma gondii* excreted-secreted antigens in early pregnancy. *PLoS One* 8(7), e69012.
- Chessa G, Chisu V, Porcu R, Masala G. (2014).** Molecular characterization of *Toxoplasma gondii* Type II in sheep abortion in Sardinia, Italy. *Parasite* 21, 6.
- Chhabra MB, Bhardwaj RM, Gautam OP, Gupta RP. (1981).** *Toxoplasma* infection and abortion in dairy goats. *Trop. Anim. Health Prod.* 13(4), 222-226.
- Chiebao DP, Pena HF, Passarelli D, Santín T, Pulz LH, Strefezzi RF, Sevá AP, Martins CM, Lopes EG, Grisi Filho JHH, Gennari SM, Soares RM. (2019).** Congenital transmission of *Toxoplasma gondii* after experimental reinfection with brazilian typical strains in chronically infected sheep. *Front. Vet. Sci.* 6, 93.
- Chilosi M, Mombello A, Montagna L, Benedetti A, Lestani M, Semenzato G, Menestrina F. (1990).**

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

- Multimarker immunohistochemical staining of calgranulins, chloroacetate esterase, and S100 for simultaneous demonstration of inflammatory cells on paraffin sections. *J. Histochem. Cytochem.* 38(11), 1669-1675.
- Choy MY, Manyonda IT. (1998).** The phagocytic activity of human first trimester extravillous trophoblast. *Hum. Reprod.* 13(10), 2941-2949.
- Clark DP, Pazdernik NJ, McGehee MR. (2018).** Molecular Biology. 3rd Edition. London, United Kingdom. Elsevier. ISBN: 9780128132883.
- Conde M, Caballero JM, Rodríguez-Ponce E, Ruiz A, González J. (2001).** Analysis of IgG response to experimental infection with RH *Toxoplasma gondii* in goats. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 24(3), 197-206.
- Cong H, Mui EJ, Witola WH, Sidney J, Alexander J, Sette A, Maewal A, McLeod R. (2010).** Human immunome, bioinformatic analyses using HLA supermotifs and the parasite genome, binding assays, studies of human T cell responses, and immunization of HLA-A*1101 transgenic mice including novel adjuvants provide a foundation for HLA-A03 restricted CD8⁺T cell epitope based, adjuvanted vaccine protective against *Toxoplasma gondii*. *Immunome Res.* 6, 12.
- Cong H, Mui EJ, Witola WH, Sidney J, Alexander J, Sette A, Maewal A, McLeod R. (2011).** Towards an immunosense vaccine to prevent toxoplasmosis: protective *Toxoplasma gondii* epitopes restricted by HLA-A*0201. *Vaccine* 29(4), 754-762.
- Connelley T, Storset AK, Pemberton A, MacHugh N, Brown J, Lund H, Morrison IW. (2011).** NKp46 defines ovine cells that have characteristics corresponding to NK cells. *Vet. Res.* 42, 37.
- Consalter A, Silva AF, Frazão-Teixeira E, Matos LF, de Oliveira FCR, Leite JS, Silva FBF, Ferreira AMR. (2017).** *Toxoplasma gondii* transmission by artificial insemination in sheep with experimentally contaminated frozen semen. *Theriogenology* 90, 169-174.
- Coombes JL, Charsar BA, Han SJ, Halkias J, Chan SW, Koshy AA, Striepen B, Robey EA. (2013).** Motile invaded neutrophils in the small intestine of *Toxoplasma gondii*-infected mice reveal a potential mechanism for parasite spread. *PNAS* 110(21), E1913-22.
- Costa AJ, Araujo FG, Costa JO, Lima JD, Nascimento E. (1977).** Experimental infection of bovines with oocysts of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 63(2), 212-218.
- Costa GH, da Costa AJ, Lopes WD, Bresciani KD, dos Santos TR, Esper CR, Santana AE. (2011).** *Toxoplasma gondii*: infection natural congenital in cattle and an experimental inoculation of gestating cows with oocysts. *Exp. Parasitol.* 127(1), 277-281.
- Couper KN, Roberts CW, Brombacher F, Alexander J, Johnson LL. (2005).** *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin M limits parasite dissemination by preventing host cell invasion. *Infect. Immun.* 73(12), 8060-8068.
- Couper KN, Lanthier PA, Perona-Wright G, Kummer LW, Chen W, Smiley ST, Mohrs M, Johnson**

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

- LL. (2009). Anti-CD25 antibody mediated depletion of effector T cell populations enhances susceptibility of mice to acute but not chronic *Toxoplasma gondii* infection. *J. Immunol.* 182(7), 3985-3994.
- Coutinho LB, Gomes AO, Araújo EC, Barenco PV, Santos JL, Caixeta DR, Silva DA, Cunha-Júnior JP, Ferro EA, Silva NM. (2012). The impaired pregnancy outcome in murine congenital toxoplasmosis is associated with a pro-inflammatory immune response, but not correlated with decidual inducible nitric oxide synthase expression. *Int. J. Parasitol.* 42(4), 341-352.
- Croy BA, Zhang J, Tayade C, Colucci F, Yadi H, Yamada AT. (2010). Analysis of uterine natural killer cells in mice. *Methods Mol. Biol.* 612, 465-503.
- Cubro H, Kashyap S, Nath MC, Ackerman AW, Garovic VD. (2018). The role of interleukin-10 in the pathophysiology of preeclampsia. *Curr. Hypertens. Rep.* 20(4), 36.
- Cupurdija K, Azzola D, Hainz U, Gratchev A, Heitger A, Takikawa O, Goerdts S, Wintersteiger R, Dohr G, Sedlmayr P. (2004). Macrophages of human first trimester decidua express markers associated to alternative activation. *Am. J. Reprod. Immunol.* 51, 117-122.
- Curtsinger JM, Schmidt CS, Mondino A, Lins DC, Kiedl RM, Jenkins MK, Mescher MF. (1999). Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J. Immunol.* 162(6), 3256-3262.
- *****
- D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G. (1993). Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon γ -production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J. Exp. Med.* 178(3), 1041-1048.
- da Cunha IA, Zulpo DL, Bogado AL, de Barros LD, Taroda A, Igarashi M, Navarro IT, Garcia JL. (2012). Humoral and cellular immune responses in pigs immunized intranasally with crude rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii* plus Quil-A. *Vet. Parasitol.* 186(3-4), 216-221.
- Dabritz HA, Miller MA, Atwill ER, Gardner IA, Leutenegger CM, Melli AC, Conrad PA. (2007). Detection of *Toxoplasma gondii*-like oocysts in cat feces and estimates of the environmental oocyst burden. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 231(11), 1676-1684.
- Dabritz HA, Miller MA, Gardner IA, Packham AE, Atwill ER, Conrad PA. (2008). Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in wild rodents from Central coastal California and a review of *T. gondii* prevalence in rodents. *J. Parasitol.* 94(3), 675-683.
- Dantzer V, Leiser R. (2006). Placentation. 279-297. En: Dellmann's textbook of veterinary histology. 6th edition. Iowa, United States of America. *Blackwell Publishing.* ISBN: 9780781741484.
- Dardé ML. (1996). Biodiversity in *Toxoplasma gondii*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 219, 27-41.
- de Meuter F, Famerée L, Cotteleer C. (1975). Toxoplasmose expérimentale du porc. Implications épidémiologiques et alimentaires (Experimental toxoplasmosis in pigs. Epidemiological and

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

- alimentary implications). *Protistologica* 11, 499-507.
- de Moraes EP, da Costa MM, Dantas AF, da Silva JC, Mota RA. (2011).** *Toxoplasma gondii* diagnosis in ovine aborted fetuses and stillborns in the State of Pernambuco, Brazil. *Vet. Parasitol.* 183(1-2), 152-155.
- de Oliveira Gomes A, de Oliveira Silva DA, Silva NM, de Freitas Barbosa B, Franco PS, Angeloni MB, Fermio ML, Roque-Barreira MC, Bechi N, Paulesu LR, Dos Santos MC, Mineo JR, Ferro EA. (2011).** Effect of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human placental explants infected with *Toxoplasma gondii* depends on gestational age. *Am. J. Pathol.* 178(6), 2792-2801.
- de Santana Rocha D, de Sousa Moura RL, Maciel BM, Guimarães LA, O'dwyer HN, Munhoz AD, Albuquerque GR. (2015).** Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in naturally infected sheep's milk. *Genet. Mol. Res.* 14(3), 8658-8662.
- Dealtry GB, O'Farrell MK, Fernandez N. (2000).** The Th2 cytokine environment of the placenta. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 123(2), 107-119.
- Debierre-Grockiego F, Campos MA, Azzouz N, Schmidt J, Bieker U, Resende MG, Mansur DS, Weingart R, Schmidt RR, Golenbock DT, Gazzinelli RT, Schwarz RT. (2007).** Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 179(2), 1129-1137.
- Decoster A, Darcy F, Caron A, Vinatier D, Houze de L'Aulnoit D, Vittu G, Niel G, Heyer F, Lecolier B, Delcroix M, Monnier JC, Duhamel M, Capron A. (1992).** Anti-P30 IgA antibodies as prenatal markers of congenital *Toxoplasma* infection. *Clin. Exp. Immunol.* 87(2), 310-315.
- Degrandi D, Hoffmann R, Beuter-Gunia C, Pfeffer K. (2009).** The proinflammatory cytokine-induced IRG1 protein associates with mitochondria. *J. Interferon Cytokine Res.* 29(1), 55-67.
- Deng S, Yu K, Wu Q, Li Y, Zhang X, Zhang B, Liu G, Liu Y, Lian Z. (2016).** Toll-like receptor 4 reduces oxidative injury via glutathione activity in sheep. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 9151290.
- Denkers EY. (1999).** T lymphocyte-dependent effector mechanisms of immunity to *Toxoplasma gondii*. *Microbes Infect.* 1(9), 699-708.
- Denkers EY. (2010).** Toll-like receptor initiated host defense against *Toxoplasma gondii*. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 737125.
- Denkers EY, Gazzinelli RT. (1998).** Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 11(4), 569-588.
- Denney JM, Nelson EL, Wadhwa PD, Waters TP, Mathew L, Chung EK, Goldenberg RL, Culhane JF. (2011).** Longitudinal modulation of immune system cytokine profile during pregnancy. *Cytokine* 53(2), 170-177.
- Díaz P, Cabanelas E, Díaz-Cao JM, Viña M, Béjar JP, Pérez-Creo A, Prieto A, López CM, Panadero R, Fernández G, Díez-Baños P, Morrondo P. (2016).** Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

- Neospora caninum* in goats from North-Western Spain. *Ann. Agric. Environ. Med.* 23(4), 587-590.
- Dlugonska H. (2008).** Toxoplasma rhoptries: unique secretory organelles and source of promising vaccine proteins for immunoprevention of toxoplasmosis. *J. Biomed. Biotechnol.* 2008, 632424.
- Doggett JS, Nilsen A, Forquer I, Wegmann KW, Jones-Brando L, Yolken RH, Bordón C, Charman SA, Katneni K, Schultz T, Burrows JN, Hinrichs DJ, Meunier B, Carruthers VB, Riscoe MK. (2012).** Endochin-like quinolones are highly efficacious against acute and latent experimental toxoplasmosis. *PNAS* 109(39), 15936-15941.
- Dogruman-AI F, Fidan I, Celebi B, Yesilyurt E, Erdal B, Babur C, Kustimur S. (2011).** Cytokine profile in murine toxoplasmosis. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 4(1), 16-19.
- Dos Santos TR, Faria GD, Guerreiro BM, Dal Pietro NH, Lopes WD, da Silva HM, Garcia JL, Luvizotto MC, Bresciani KD, da Costa AJ. (2016).** Congenital toxoplasmosis in chronically infected and subsequently challenged ewes. *PLoS One* 11(10), e0165124.
- Dosiou C, Giudice LC. (2005).** Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives. *Endocr. Rev.* 26(1), 44-62.
- Drake BL, Rodger JC. (1987).** Phagocytic properties of cultured murine trophoblast. *Placenta* 8(2), 129-139.
- Dubey JP. (1981).** *Toxoplasma*-induced abortion in dairy goats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 178(7), 671-674.
- Dubey JP. (1982).** Repeat transplacental transfer of *Toxoplasma gondii* in dairy goats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 180(10), 1220-1221.
- Dubey JP. (1983).** Distribution of cysts in tachyzoites and pregnant cows inoculated with *Toxoplasma gondii* oocysts. *Vet. Parasitol.* 13(3), 199-211.
- Dubey JP. (1986a).** A review of toxoplasmosis in cattle. *Vet. Parasitol.* 22(3-4), 177-202.
- Dubey JP. (1986b).** A review of toxoplasmosis in pigs. *Vet. Parasitol.* 19(3-4), 181-223.
- Dubey JP. (1988).** Lesions in transplacentally induced toxoplasmosis in goats. *Am. J. Vet. Res.* 49(6), 905-909.
- Dubey JP. (1989).** Lesions in goats fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Vet. Parasitol.* 32(2-3), 133-144.
- Dubey JP. (1997).** Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 44(6), 592-602.
- Dubey JP. (1998a).** Re-examination of resistance of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites to pepsin and trypsin digestion. *Parasitology* 116(Pt 1), 43-50.
- Dubey JP. (1998b).** *Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperatures. *J. Parasitol.* 84(4), 862-865.

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

- Dubey JP. (2001).** Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. *J. Parasitol.* 87(1), 215-219.
- Dubey JP. (2005).** Unexpected oocyst shedding by cats fed *Toxoplasma gondii* tachyzoites: *in vivo* stage conversion and strain variation. *Vet. Parasitol.* 133(4), 289-298.
- Dubey JP. (2009a).** Toxoplasmosis in pigs--The last 20 years. *Vet. Parasitol.* 164(2-4), 89-103.
- Dubey JP. (2009b).** Toxoplasmosis in sheep--The last 20 years. *Vet. Parasitol.* 163(1-2), 1-14.
- Dubey JP. (2010).** Toxoplasmosis of animals and humans. 2nd edition. Florida, United States of America. *CRC Press.* ISBN: 9781420092363.
- Dubey JP, Beattie CP. (1988).** Toxoplasmosis of animals and man. 1st Edition. Florida, United States of America. *CRC Press.* ISBN: 9780849346187.
- Dubey JP, Frenkel JK. (1973).** Experimental *Toxoplasma* infection in mice with strains producing oocysts. *J. Parasitol.* 59(3), 505-512.
- Dubey JP, Frenkel JK. (1998).** Toxoplasmosis of rats: a review, with considerations of their value as an animal model and their possible role in epidemiology. *Vet. Parasitol.* 77(1), 1-32.
- Dubey JP, Jones JL. (2014).** Comments on "Detection of *Toxoplasma gondii* in raw caprine, ovine, buffalo, bovine, and camel milk using cell cultivation, cat bioassay, capture ELISA, and PCR methods in Iran". *Foodborne Pathog. Dis.* 11(6), 500-501.
- Dubey JP, Sharma SP. (1980).** Parasitemia and tissue infection in sheep fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *J. Parasitol.* 66(1), 111-114.
- Dubey JP, Urban JF Jr. (1990).** Diagnosis of transplacentally induced toxoplasmosis in pigs. *Am. J. Vet. Res.* 51(8), 1295-1299.
- Dubey JP, Desmonts G, McDonald C, Walls KW. (1985).** Serologic evaluation of cattle inoculated with *Toxoplasma gondii*: comparison of Sabin Feldman dye test and other agglutination test. *Am. J. Vet. Res.* 46(5), 1085-1088.
- Dubey JP, Schlafer DH, Urban JF Jr, Lindsay DS. (1990).** Lesions in fetal pigs with transplacentally-induced toxoplasmosis. *Vet. Pathol.* 27(6), 411-418.
- Dubey JP, Urban JF Jr, Davis SW. (1991).** Protective immunity to toxoplasmosis in pigs vaccinated with a non-persistent strain of *Toxoplasma gondii*. *Am. J. Vet. Res.* 52(8), 1316-1319.
- Dubey JP, Lunney JK, Shen SK, Kwok OC, Ashford DA, Thulliez P. (1996).** Infectivity of low numbers of *Toxoplasma gondii* oocysts to pigs. *J. Parasitol.* 82(3), 438-443.
- Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. (1998).** Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.* 11(2), 267-299.
- Dubey JP, Shen SK, Kwok OC, Frenkel JK. (1999).** Infection and immunity with the RH strain of *Toxoplasma gondii* in rats and mice. *J. Parasitol.* 85(4), 657-662.

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

- Dubey JP, Navarro IT, Sreekumar C, Dahl E, Freire RL, Kawabata HH, Vianna MC, Kwok OC, Shen SK, Thulliez P, Lehmann T. (2004). *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. *J. Parasitol.* 90(4), 721-726.
- Dubey JP, Rajendran C, Ferreira LR, Martins J, Kwok OC, Hill DE, Villena I, Zhou H, Su C, Jones JL. (2011). High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from goats, from a retail meat store, destined for human consumption in the USA. *Int. J. Parasitol.* 41(8), 827-833.
- Dubey JP, Ferreira LR, Martins J, Mcleod R. (2012). Oral oocyst-induced mouse model of toxoplasmosis: effect of infection with *Toxoplasma gondii* strains of different genotypes, dose, and mouse strains (transgenic, out-bred, in-bred) on pathogenesis and mortality. *Parasitology* 139(1), 1-13.
- Dukaczewska A, Tedesco R, Liesenfeld O. (2015). Experimental models of ocular infection with *Toxoplasma gondii*. *Eur. J. Microbiol. Immunol. (Bp)* 5(4), 293-305.
- Dumètre A, Ajzenberg D, Rozette L, Mercier A, Dardé ML. (2006). *Toxoplasma gondii* infection in sheep from Haute-Vienne, France: seroprevalence and isolate genotyping by microsatellite analysis. *Vet. Parasitol.* 142(3-4), 376-379.
- Dunay IR, Fuchs A, Sibley LD. (2010). Inflammatory monocytes but not neutrophils are necessary to control infection with *Toxoplasma gondii* in mice. *Infect. Immun.* 78(4), 1564-1570.
- Duncanson P, Terry RS, Smith JE, Hide G. (2001). High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in a commercial sheep flock. *Int. J. Parasitol.* 31(14), 1699-1703.
- Dupont CD, Christian DA, Hunter CA. (2012). Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. *Semin. Immunopathol.* 34(6), 793-813.
- Dzierszinski F, Pepper M, Stumhofer JS, LaRosa DF, Wilson EH, Turka LA, Halonen SK, Hunter CA, Roos DS. (2007). Presentation of *Toxoplasma gondii* antigens via the endogenous major histocompatibility complex class I pathway in nonprofessional and professional antigen-presenting cells. *Infect. Immun.* 75(11), 5200-5209.
- *****
- Edwards JF, Dubey JP. (2013). *Toxoplasma gondii* abortion storm in sheep on a Texas farm and isolation of mouse virulent atypical genotype *T. gondii* from an aborted lamb from a chronically infected ewe. *Vet. Parasitol.* 192(1-3), 129-136.
- Egan CE, Sukhumavasi W, Butcher BA, Denkers EY. (2009). Functional aspects of Toll-like receptor/MyD88 signalling during protozoan infection: focus on *Toxoplasma gondii*. *Clin. Exp. Immunol.* 156(1), 17-24.
- Eissa MM, Barakat AM, Amer EI, Younis LK. (2015). Could miltefosine be used as a therapy for toxoplasmosis? *Exp. Parasitol.* 157, 12-22.

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

- Ek C, Whary MT, Ihrig M, Bravo LE, Correa P, Fox JG. (2012).** Serologic evidence that *Ascaris* and *Toxoplasma* infections impact inflammatory responses to *Helicobacter pylori* in Colombians. *Helicobacter* 17(2), 107-115.
- Engeland IV, Waldeland H, Kindahl H, Ropstad E, Andresen Ø. (1996).** Effect of *Toxoplasma gondii* infection on the development of pregnancy and on endocrine foetal-placental function in the goat. *Vet. Parasitol.* 67(1-2), 61-74.
- Entrican G. (2002).** Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. *J. Comp. Pathol.* 126(2-3), 79-94.
- Entrican G, Wheelhouse NM. (2006).** Immunity in the female sheep reproductive tract. *Vet. Res.* 37(3), 295-309.
- Entrican G, McInnes CJ, Rothel JS, Haig DM. (1992).** Kinetics of ovine interferon-gamma production: detection of mRNA and characterisation of biological activity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 33(1-2), 171-178.
- Entrican G, Wattegedera S, Wheelhouse N, Allan A, Rocchi M. (2010).** Immunological paradigms and the pathogenesis of ovine chlamydial abortion. *Am. J. Reprod. Immunol.* 64(4), 287-294.
- Entrican G, Wattegedera SR, Griffiths DJ. (2015).** Exploiting ovine immunology to improve the relevance of biomedical models. *Mol. Immunol.* 66(1), 68-77.
- Erkers T, Stikvoort A, Uhlin M. (2017).** Lymphocytes in placental tissues: immune regulation and translational possibilities for immunotherapy. *Stem Cells Int.* 2017, 5738371.
- Erlebacher A. (2013).** Immunology of the maternal-fetal interface. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 387-411.
- Esnal A. (2010).** Estudio de la patología abortiva en pequeños rumiantes en España (2007- 2010) I: análisis etiológico. *Tierras de Castilla y León: Ganadería* 173, 13-15.
- Esteban-Redondo I, Innes EA. (1997).** *Toxoplasma gondii* infection in sheep and cattle. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 20(2), 191-196.
- Esteban-Redondo I, Innes EA. (1998).** Detection of *Toxoplasma gondii* tissues of sheep orally challenged with different doses of oocysts. *Int. J. Parasitol.* 28(9), 1459-1466.
- Esteban-Redondo I, Maley SW, Thomson K, Nicoll S, Wright S, Buxton D, Innes EA. (1999).** Detection of *T. gondii* in tissues of sheep and cattle following oral infection. *Vet. Parasitol.* 86(3), 155-171.
- Etheridge RD, Alaganan A, Tang K, Lou HJ, Turk BE, Sibley LD. (2014).** The *Toxoplasma* pseudokinase ROP5 forms complexes with ROP18 and ROP17 kinases that synergize to control acute virulence in mice. *Cell Host Microbe* 15(5), 537-550.
- Etzerodt A, Moestrup SK. (2013).** CD163 and inflammation: biological, diagnostic, and therapeutic aspects. *Antioxid. Redox Signal.* 18(17), 2352-2363.

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

Evans SS, Repasky EA, Fisher DT. (2015). Fever and the thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat. *Nat. Rev. Immunol.* 15(6), 335-349.

EUROSTAT. (2015). Number of sheep from the November/December survey. [<https://ec.europa.eu/eurostat/databrowser/view/tag00017/default/table?lang=en>].

Faas MM, de Vos P. (2017). Uterine NK cells and macrophages in pregnancy. *Placenta* 56, 44-52.

Fair T. (2015). The contribution of the maternal immune system to the establishment of pregnancy in cattle. *Front. Immunol.* 6, 7.

Fajardo HV, D'ávila S, Bastos RR, Cyrino CD, de Lima Detoni M, Garcia JL, das Neves LB, Nicolau JL, Amendoeira MR. (2013). Seroprevalence and risk factors of toxoplasmosis in cattle from extensive and semi-intensive rearing systems at Zona da Mata, Minas Gerais state, Southern Brazil. *Parasit. Vectors* 6, 191.

Fatoohi AF, Cozon GJ, Greenland T, Ferrandiz J, Bienvenu J, Picot S, Peyron F. (2002). Cellular immune responses to recombinant antigens in pregnant women chronically infected with *Toxoplasma gondii*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9(3), 704-707.

Fehlberg HF, Maciel BM, Albuquerque GR. (2017). Identification and discrimination of *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp., *Neospora* spp., and *Cryptosporidium* spp. by high-resolution melting analysis. *PLoS One* 12(3), e0174168.

Ferguson DJ. (2009). *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104(2), 133-148.

Ferguson DJ, Graham DI, Hutchison WM. (1991). Pathological changes in the brains of mice infected with *Toxoplasma gondii*: a histological, immunocytochemical and ultrastructural study. *Int. J. Exp. Pathol.* 72(4), 463-74.

Ferguson DJ, Huskinson-Mark J, Araujo FG, Remington JS. (1994). An ultrastructural study of the effect of treatment with atovaquone in brains of mice chronically infected with the ME49 strain of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Exp. Pathol.* 75(2), 111-116.

Fernández M, Ferreras MC, García JF, Pérez V. (2012). Abortos en la especie ovina: caracterización lesional y diagnóstico en Castilla y León. *XXXVII Congreso Nacional y el XIII Congreso Internacional de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC)*. Ciudad Real. 322-326.

Fernández-Aguilar X, Ajzenberg D, Cabezón O, Martínez-López A, Darwich L, Dubey JP, Almería S. (2013a). Fatal toxoplasmosis associated with an atypical *Toxoplasma gondii* strain in a Bennett's wallaby (*Macropus rufogriseus*) in Spain. *Vet. Parasitol.* 196(3-4), 523-527.

Fernández-Aguilar X, Alzaga V, Villanúa D, Cabezón O, García-Bocanegra I, Dubey JP, Almería S. (2013b). Epidemiology and prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in the Iberian hare

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

(*Lepus granatensis*). *Vet. Parasitol.* 196(1-2), 194-198.

Ferro EA, Silva DA, Bevilacqua E, Mineo JR. (2002). Effect of *Toxoplasma gondii* infection kinetics on trophoblast cell population in *Calomys callosus*, a model of congenital toxoplasmosis. *Infect. Immun.* 70(12), 7089-7094.

Fichera ME, Roos DS. (1997). A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature* 390(6658), 407-409.

Filiseti D, Candolfi E. (2004). Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Ann. Ist. Super. Sanita* 40(1), 71-80.

Flegre J, Prandota J, Sovičková M, Israili ZH. (2014). Toxoplasmosis - a global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. *PLoS One* 9(3), e92023.

Foroutan M, Fakhri Y, Riahi SM, Ebrahimpour S, Namroodi S, Taghipour A, Spotin A, Gamble HR, Rostami A. (2019). The global seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs: a systematic review and meta-analysis. *Vet. Parasitol.* 269, 42-52.

Fredriksson G, Buxton D, Uggla A, Kindahl H, Edqvist LE. (1990). The effect of *Toxoplasma gondii* infection in unvaccinated and iscom-vaccinated pregnant ewes as monitored by plasma levels of 15-ketodihydroprostaglandin F₂ alpha, progesterone, and oestrone sulphate. *Zentralbl Veterinarmed A.* 37(2), 113-122.

Frenkel JK. (1970). Pursuing *Toxoplasma*. *J. Infect. Dis.* 122(6), 553-559.

Frenkel JK, Dubey JP. (1973). Effects of freezing on the viability of *Toxoplasma* oocysts. *J. Parasitol.* 59(3), 587-588.

Frenkel JK, Smith DD. (1982). Inhibitory effects of monensin on shedding of *Toxoplasma* oocysts by cats. *J. Parasitol.* 68(5), 851-855.

Frenkel JK, Dubey JP, Hoff RL. (1976). Loss of stage after continuous passage of *Toxoplasma gondii* and *Besnoitia jellisoni*. *J. Protozool.* 23(3), 421-424.

Fuentes I, Rubio JM, Ramírez C, Alvar J. (2001). Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain : direct analysis from clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 39(4), 1566-70.

Fuentes-Castro BE, Reyes-García JG, Valenzuela-Vargas MT, Martínez-Gómez F. (2017). Histopathology of murine toxoplasmosis under treatment with dialyzable leukocyte extract. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 112(11), 741-747.

Galván-Ramírez ML, Gutiérrez-Maldonado AF, Verduzco-Grijalva F, Dueñas Jiménez JM. (2014). The role of hormones on *Toxoplasma gondii* infection: a systematic review. *Front Microbiol* 5, 503.

Gamarra JA, Cabezón O, Pabón M, Arnal MC, Luco DF, Dubey JP, Gortázar C, Almeria S. (2008).

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

- Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in roe deer from Spain. *Vet. Parasitol.* 153(1-2), 152-156.
- García JL, Navarro IT, Vidotto O, Gennari SM, Machado RZ, da Luz Pereira AB, Sinhorini IL. (2006).** *Toxoplasma gondii*: comparison of a rhoptry-ELISA with IFAT and MAT for antibody detection in sera of experimentally infected pigs. *Exp. Parasitol.* 113(2), 100-105.
- García JL, Gennari SM, Navarro IT, Machado RZ, Headley SA, Vidotto O, da Silva Guimarães Junior J, Bugni FM, Igarashi M. (2008).** Evaluation of IFA, MAT, ELISAs and immunoblotting for the detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in paired serum and aqueous humour samples from experimentally infected pigs. *Res. Vet. Sci.* 84(2), 237-242.
- García JL, Burrells A, Bartley PM, Bartley K, Innes EA, Katzer F. (2017).** The use of ELISA, nPCR and qPCR for diagnosis of ocular toxoplasmosis in experimentally infected pigs. *Res. Vet. Sci.* 115, 490-495.
- García-Bocanegra I, Dubey JP, Martínez F, Vargas A, Cabezón O, Zorrilla I, Arenas A, Almería S. (2010a).** Factors affecting seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Vet. Parasitol.* 167(1), 36-42.
- García-Bocanegra I, Dubey JP, Simon-Grifé M, Cabezón O, Casal J, Allepuz A, Napp S, Almería S. (2010b).** Seroprevalence and risk factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in pig farms from Catalonia, North-Eastern Spain. *Res. Vet. Sci.* 89(1), 85-87.
- García-Bocanegra I, Simon-Grifé M, Dubey JP, Casal J, Martín GE, Cabezón O, Perea A, Almería S. (2010c).** Seroprevalence and risk factors associated with *Toxoplasma gondii* in domestic pigs from Spain. *Parasitol. Int.* 59(3), 421-426.
- García-Bocanegra I, Cabezón O, Arenas-Montes A, Carbonero A, Dubey JP, Perea A, Almería S. (2012a).** Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in equids from Southern Spain. *Parasitol. Int.* 61(3), 421-424.
- García-Bocanegra I, Cabezón O, Pabón M, Gómez-Guillamón F, Arenas A, Alcaide E, Salas-Vega R, Dubey JP, Almería S. (2012b).** Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in Spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*). *Vet. J.* 191(2), 257-260.
- García-Bocanegra I, Cabezón O, Hernández E, Martínez-Cruz MS, Martínez-Moreno A, Martínez-Moreno J. (2013).** *Toxoplasma gondii* in ruminant species (cattle, sheep, and goats) from Southern Spain. *J. Parasitol.* 99(3), 438-440.
- Gauss CB, Dubey JP, Vidal D, Ruiz F, Vicente J, Marco I, Lavin S, Gortazar C, Almería S. (2005).** Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild pigs (*Sus scrofa*) from Spain. *Vet. Parasitol.* 131(1-2), 151-156.
- Gauss CB, Dubey JP, Vidal D, Cabezón O, Ruiz-Fons F, Vicente J, Marco I, Lavin S, Gortazar C, Almería S. (2006).** Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in red deer (*Cervus elaphus*) and

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

- other wild ruminants from Spain. *Vet. Parasitol.* 136(3-4), 193-200.
- Gaynor LM, Colucci F. (2017).** Uterine natural killer cells: functional distinctions and influence on pregnancy in humans and mice. *Front. Immunol.* 8, 467.
- Gazzinelli RT, Hakim FT, Hieny S, Shearer GM, Sher A. (1991).** Synergistic role of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J. Immunol.* 146(1), 286-292.
- Gazzinelli RT, Amichay D, Sharton-Kersten T, Grunwald E, Farber JM, Sher A. (1996a).** Role of macrophage-derived cytokines in the induction and regulation of cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 219, 127-139.
- Gazzinelli R, Wysocka M, Hieny S, Scharon-Kersten T, Cheever A, Kühn R, Müller W, Trinchieri G, Sher A. (1996b).** In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4⁺ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN- γ and TNF- α . *J. Immunol.* 157(2), 798-805.
- Ge YY, Zhang L, Zhang G, Wu JP, Tan MJ, Hu E, Liang YJ, Wang Y. (2008).** In pregnant mice, the infection of *Toxoplasma gondii* causes the decrease of CD4⁺ CD25⁺ -regulatory T cells. *Parasite Immunol.* 30(9), 471-481.
- Gibney EH, Kipar A, Rosbottom A, Guy CS, Smith RF, Hetzel U, Trees AJ, Williams DJ. (2008).** The extent of parasite-associated necrosis in the placenta and foetal tissues of cattle following *Neospora caninum* infection in early and late gestation correlates with foetal death. *Int. J. Parasitol.* 38(5), 579-588.
- Gigley JP. (2016).** The diverse role of NK cells in immunity to *Toxoplasma gondii* infection. *PLoS Pathog.* 12(2), e1005396.
- Gigley JP, Bhadra R, Khan IA. (2011).** CD8 T cells and *Toxoplasma gondii*: a new paradigm. *J. Parasitol. Res.* 2011, 243796.
- Goldszmid RS, Sher A. (2010).** Processing and presentation of antigens derived from intracellular protozoan parasites. *Curr. Opin. Immunol.* 22(1), 118-123.
- Golubovskaya V, Wu L. (2016).** Different subsets of T cells, memory, effector functions, and CAR-T immunotherapy. *Cancers* 8(3), E36.
- Gomes TC, de Andrade Júnior HF, Lescano SA, Amato-Neto V. (2012).** *In vitro* action of antiparasitic drugs, especially artesunate, against *Toxoplasma gondii*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 45(4), 485-490.
- Gontijo da Silva M, Clare Vinaud M, de Castro AM. (2015).** Prevalence of toxoplasmosis in pregnant women and vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in patients from basic units of health from Gurupi, Tocantins, Brazil, from 2012 to 2014. *PLoS One* 10(11), e0141700.
- Gorgievski-Hrisoho M, Germann D, Matter L. (1996).** Diagnostic implications of kinetics of

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

- immunoglobulin M and A antibody responses to *Toxoplasma gondii*. *J. Clin. Microbiol.* 34(6), 1506–1511.
- Gottstein B, Hentrich B, Wyss R, Thür B, Busato A, Stärk KD, Müller N. (1998).** Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. *Int. J. Parasitol.* 28(4), 679-691.
- Gov L, Schneider CA, Lima TS, Pandori W, Lodoen MB. (2017).** NLRP3 and potassium efflux drive rapid IL-1 β release from primary human monocytes during *Toxoplasma gondii* infection. *J. Immunol.* 199(8), 2855-2864.
- Gubbels MJ, Striepen B, Shastri N, Turkoz M, Robey EA. (2005).** Class I major histocompatibility complex presentation of antigens that escape from the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 73(2), 703-711.
- Guenther S, Vrekoussis T, Heublein S, Bayer B, Anz D, Knabl J, Navrozoglou I, Dian D, Friese K, Makrigiannakis A, Jeschke U. (2012).** Decidual macrophages are significantly increased in spontaneous miscarriages and over-express FasL: a potential role for macrophages in trophoblast apoptosis. *Int. J. Mol. Sci.* 13(7), 9069-9080.
- Guiguemde WA, Shelat AA, Bouck D, Duffy S, Crowther GJ, Davis PH, Smithson DC, Connelly M, Clark J, Zhu F, Jiménez-Díaz MB, Martínez MS, Wilson EB, Tripathi AK, Gut J, Sharlow ER, Bathurst I, El Mazouni F, Fowble JW, Forquer I, McGinley PL, Castro S, Angulo-Barturen I, Ferrer S, Rosenthal PJ, Derisi JL, Sullivan DJ, Lazo JS, Roos DS, Riscoe MK, Phillips MA, Rathod PK, Van Voorhis WC, Avery VM, Guy RK. (2010).** Chemical genetics of *Plasmodium falciparum*. *Nature* 465(7296), 311-315.
- Gupta S, Ansari HR, Gautam A, Raghava GP. (2013).** Identification of B-cell epitopes in an antigen for inducing specific class of antibodies. *Biol. Direct* 8, 27.
- Gutiérrez J. (2015).** Nuevas estrategias para el control de los abortos por clamidias: SEROCHECK. *XVII Foro Nacional Ovino*. Aranda de Duero (Burgos). 77-78.
- Gutierrez J, O'Donovan J, Williams E, Proctor A, Brady C, Marques PX, Worrall S, Nally JE, McElroy M, Bassett H, Sammin D, Buxton D, Maley S, Markey BK. (2010).** Detection and quantification of *Toxoplasma gondii* in ovine maternal and foetal tissues from experimentally infected pregnant ewes using real-time PCR. *Vet. Parasitol.* 172(1-2), 8-15.
- Gutierrez J, O'Donovan J, Proctor A, Brady C, Marques PX, Worrall S, Nally JE, McElroy M, Bassett H, Fagan J, Maley S, Buxton D, Sammin D, Markey BK. (2012).** Application of quantitative real-time polymerase chain reaction for the diagnosis of toxoplasmosis and enzootic abortion of ewes. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 24(5), 846-854.
- Gutierrez K, Dicks N, Glanzner WG, Agellon LB, Bordignon V. (2015).** Efficacy of the porcine species in biomedical research. *Front. Genet.* 6(293).

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

- Habibi G, Imani A, Gholami M, Hablolvarid M, Behroozikhah A, Lotfi M, Kamalzade M, Najjar E, Esmaeil-Nia K, Bozorgi S. (2012).** Detection and identification of *Toxoplasma gondii* type one infection in sheep aborted fetuses in Qazvin province of Iran. *Iran. J. Parasitol.* 7(3), 64-72.
- Halonen SK, Weiss LM. (2013).** Toxoplasmosis. *Handb. Clin. Neurol.* 114, 125-145.
- Hamilton CM, Kelly PJ, Boey K, Corey TM, Huynh H, Metzler D, Villena I, Su C, Innes EA, Katzer F. (2017).** Predominance of atypical genotypes of *Toxoplasma gondii* in free-roaming chickens in St. Kitts, West Indies. *Parasit. Vectors* 10(1), 104.
- Hamilton CM, Black L, Oliveira S, Burrells A, Bartley PM, Melo RPB, Chianini F, Palarea-Albaladejo J, Innes EA, Kelly PJ, Katzer F. (2019).** Comparative virulence of Caribbean, Brazilian and European isolates of *Toxoplasma gondii*. *Parasit. Vectors* 12(1), 104.
- Hansen PJ. (1998).** Regulation of uterine immune function by progesterone-lessons from the sheep. *J. Reprod. Immunol.* 40(1), 63-79.
- Hansen PJ. (2011).** The immunology of early pregnancy in farm animals. *Reprod. Domest. Anim.* 46(Suppl 3), 18-30.
- Hartley WJ, Marshall SC. (1957).** Toxoplasmosis as a cause of ovine perinatal mortality. *N. Z. Vet. J.* 5(4), 119-124.
- Hassan IA, Wang S, Xu L, Yan R, Song X, XiangRui L. (2014).** Immunological response and protection of mice immunized with plasmid encoding *Toxoplasma gondii* glycolytic enzyme malate dehydrogenase. *Parasite Immunol.* 36(12), 674-683.
- Hauser WE Jr, Tsai V. (1986).** Acute *Toxoplasma* infection of mice induces spleen NK cells that are cytotoxic for *T. gondii* in vitro. *J. Immunol.* 136(1), 313-319.
- Hayashi S, Chan CC, Gazzinelli R, Roberge FG. (1996).** Contribution of nitric oxide to the host parasite equilibrium in toxoplasmosis. *J. Immunol.* 156(4), 1476-1481.
- He N, Aosai F, Luo WT, Ueda M, Yang TH, Yamashita K, Sekiya S, Yano A. (1997).** Parasite load in pregnant mice infected by *Toxoplasma gondii* assayed by quantitative competitive-PCR. *Parasitol. Int.* 46(2), 143-147.
- Hecker YP, Moore DP, Manazza JA, Unzaga JM, Späth EJ, Pardini LL, Venturini MC, Roberi JL, Campero CM. (2013).** First report of seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dairy sheep from Humid Pampa, Argentina. *Trop. Anim. Health Prod.* 45(7), 1645-1647.
- Hecker YP, Masson FM, Armendano JI, Cora J, Olivares CF, Gual I, Pardini L, Moore DP, Moré G, Cantón GJ. (2018).** Evaluation of frequency of antibodies against *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp. and transmission routes in sheep from Humid Pampa, Argentina. *Acta Parasitol.* 63(2), 416-421.

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

- Hehl AB, Basso WU, Lippuner C, Ramakrishnan C, Okoniewski M, Walker RA, Grigg ME, Smith NC, Deplazes P. (2015). Asexual expansion of *Toxoplasma gondii* merozoites is distinct from tachyzoites and entails expression of non-overlapping gene families to attach, invade, and replicate within feline enterocytes. *BMC Genomics* 16, 66.
- Henry CJ, Ornelles DA, Mitchell LM, Brzoza-Lewis KL, Hiltbold EM. (2008). IL-12 produced by dendritic cells augments CD8⁺ T cell activation through the production of the chemokines CCL1 and CCL17. *J. Immunol.* 181(12), 8576-8584.
- Herrero L, Gracia MJ, Pérez-Arquillué C, Lázaro R, Herrera M, Herrera A, Bayarri S. (2016). *Toxoplasma gondii*: pig seroprevalence, associated risk factors and viability in fresh pork meat. *Vet. Parasitol.* 224, 52-59.
- Herrmann DC, Pantchev N, Vrhovec MG, Barutzki D, Wilking H, Fröhlich A, Lüder CG, Conraths FJ, Schares G. (2010). Atypical *Toxoplasma gondii* genotypes identified in oocysts shed by cats in Germany. *Int. J. Parasitol.* 40(3), 285-292.
- Hide G. (2016). Role of vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in prevalence of infection. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 14(3), 335-344.
- Hide G, Morley EK, Hughes JM, Gerwash O, Elmahaishi MS, Elmahaishi KH, Thomasson D, Wright EA, Williams RH, Murphy RG, Smith JE. (2009). Evidence for high levels of vertical transmission in *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 136(14), 1877-1885.
- Hill D, Dubey JP. (2002). *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis, and prevention. *Clin. Microbiol. Infect.* 8(10), 634-640.
- Hiszyczyńska-Sawicka E, Li H, Xu JB, Holec-Gąsior L, Kur J, Sedcole R, Bickerstaffe R, Stankiewicz M. (2011). Modulation of immune response to *Toxoplasma gondii* in sheep by immunization with a DNA vaccine encoding ROP1 antigen as a fusion protein with ovine CD154. *Vet. Parasitol.* 183(1-2), 72-78.
- Homan WL, Vercammen M, De Braekeleer J, Verschueren H. (2000). Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int. J. Parasitol.* 30(1), 69-75.
- Hönig A, Rieger L, Kapp M, Sütterlin M, Dietl J, Kämmerer U. (2004). Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression in invasive extravillous trophoblast supports role of the enzyme for materno-fetal tolerance. *J. Reprod. Immunol.* 61(2), 79-86.
- Howe DK, Sibley LD. (1995). *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.* 172(6), 1561-1566.
- Howe DK, Summers BC, Sibley LD. (1996). Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 64(12), 5193-5198.
- Hunter CA, Sibley LD. (2012). Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors.

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

Nat. Rev. Microbiol. 10(11), 766-778.

Hunter CA, Litton MJ, Remington JS, Abrams JS. (1994). Immunocytochemical detection of cytokines in the lymph nodes and brains of mice resistant or susceptible to toxoplasmic encephalitis. *J. Infect. Dis.* 170(4), 939-945.

Hunter CA, Bermudez L, Beernink H, Waegell W, Remington JS. (1995). Transforming growth factor-beta inhibits interleukin-12-induced production of interferon-gamma by natural killer cells: a role for transforming growth factor-beta in the regulation of T cell-independent resistance to *Toxoplasma gondii*. *Eur. J. Immunol.* 25(4), 994-1000.

Hurley WL, Theil PK. (2011). Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. *Nutrients* 3(4), 442-474.

Hurtado A, Aduriz G, Moreno B, Barandika J, García-Pérez AL. (2001). Single tube nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted ewes. *Vet. Parasitol.* 102(1-2), 17-27.

Innes EA. (1997). Toxoplasmosis: comparative species susceptibility and host immune response. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 20(2), 131-138.

Innes EA, Vermeulen AN. (2006). Vaccination as a control strategy against the coccidial parasites *Eimeria*, *Toxoplasma* and *Neospora*. *Parasitology* 133, S145-S68.

Innes EA, Wastling JM. (1995). Analysis of *in vivo* immune responses during *Toxoplasma gondii* infection using the technique of lymphatic cannulation. *Parasitol. Today* 11(7), 268-271.

Innes EA, Panton WR, Sanderson A, Thomson KM, Wastling JM, Maley S, Buxton D. (1995a). Induction of CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses in efferent lymph responding to *Toxoplasma gondii* infection: analysis of phenotype and function. *Parasite Immunol.* 17(3), 151-160.

Innes EA, Panton WR, Thomson KM, Maley S, Buxton D. (1995b). Kinetics of interferon gamma production *in vivo* during infection with the S48 vaccine strain of *Toxoplasma gondii*. *J. Comp. Pathol.* 113(1), 89-94.

Innes EA, Bartley PM, Maley SW, Wright SE, Buxton D. (2007). Comparative host-parasite relationships in ovine toxoplasmosis and bovine neosporosis and strategies for vaccination. *Vaccine* 25(30), 5495-5503.

Innes EA, Bartley PM, Buxton D, Katzer F. (2009a). Ovine toxoplasmosis. *Parasitology* 136(14), 1887-94.

Innes EA, Bartley PM, Maley S, Katzer F, Buxton D. (2009b). Veterinary vaccines against *Toxoplasma gondii*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104(2), 246-251.

Innes EA, Bartley PM, Rocchi M, Benavidas-Silvan J, Burrells A, Hotchkiss E, Chianini F, Canton

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

- G, Katzer F. (2011).** Developing vaccines to control protozoan parasites in ruminants: dead or alive? *Vet. Parasitol.* 180(1-2), 155-163.
- Innes EA, Hamilton C, Garcia JL, Chryssafidis A, Smith D. (2019).** A one health approach to vaccines against *Toxoplasma gondii*. *Food Waterborne Parasitol.* 15, e00053.
- Izquierdo-Rodríguez E, Fernández-Álvarez Á, Martín-Carrilo N, Feliu C, Marchand B, Quilichini Y, Foronda P. (2019).** Rodents as reservoirs of the zoonotic pathogens *Coxiella burnetii* and *Toxoplasma gondii* in Corsica (France). *Vector-Borne Zoonotic Dis.*
- *****
- Jabrane-Ferrat N, Siewiera J. (2014).** The up side of decidual natural killer cells: new developments in immunology of pregnancy. *Immunology* 141(4), 490-497.
- Jankovic D, Kullberg MC, Feng CG, Goldszmid RS, Collazo CM, Wilson M, Wynn TA, Kamanaka M, Flavell RA, Sher A. (2007).** Conventional T-bet⁺Foxp3⁻ Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J. Exp. Med.* 204(2), 273-283.
- Jena MK, Nayak N, Chen K, Nayak NR. (2019).** Role of macrophages in pregnancy and related complications. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 67(5), 295-309.
- Jenkins MK, Khoruts A, Ingulli E, Mueller DL, Mcorley SJ, Reinhardt RL, Itano A, Pape KA. (2001).** *In vivo* activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 23-45.
- Jensen KD, Camejo A, Melo MB, Cordeiro C, Julien L, Grotenbreg GM, Frickel EM, Ploegh HL, Young L, Saeij JP. (2015).** *Toxoplasma gondii* superinfection and virulence during secondary infection correlate with the exact ROP5/ROP18 allelic combination. *MBio* 6(2), e02280.
- Jeong YI, Hong SH, Cho SH, Park MY, Lee SE. (2016).** Induction of IL-10-producing regulatory B cells following *Toxoplasma gondii* infection is important to the cyst formation. *Biochem. Biophys. Reports* 7, 91-97.
- Jiménez-Pelayo L, García-Sánchez M, Regidor-Cerrillo J, Horcajo P, Collantes-Fernández E, Gómez-Bautista M, Hambruch N, Pfarrer C, Ortega-Mora LM. (2019).** Immune response profile of caruncular and trophoblast cell lines infected by high- (Nc-Spain7) and low-virulence (Nc-Spain1H) isolates of *Neospora caninum*. *Parasit. Vectors* 12(1), 218.
- Johnson AM. (1984).** Strain-dependent, route of challenge-dependent murine susceptibility to toxoplasmosis. *Z Parasitenkd.* 70(3), 303-309.
- Johnson LL. (1994).** Resistance to *Toxoplasma gondii* in mice infected as neonates or exposed in utero. *Infect. Immun.* 62(8), 3075-3079.
- Johnson LL, Sayles PC. (2002).** Deficient humoral responses underlie susceptibility to *Toxoplasma gondii* in CD4-deficient mice. *Infect. Immun.* 70(1), 185-191.
- Jokelainen P, Tagel M, Mötus K, Viltrop A, Lassen B. (2017).** *Toxoplasma gondii* seroprevalence in

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

- dairy and beef cattle: large-scale epidemiological study in Estonia. *Vet. Parasitol.* 236, 137-143.
- Jones JL, Dargelas V, Roberts J, Press C, Remington JS, Montoya JG. (2009).** Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in the United States. *Clin. Infect. Dis.* 49(6), 878-884.
- Jungersen G, Jensen L, Riber U, Heegaard PM, Petersen E, Poulsen JS, Bille-Hansen V, Lind P. (1999).** Pathogenicity of selected *Toxoplasma gondii* isolates in young pigs. *Int. J. Parasitol.* 29(8), 1307-1319.
- Jungersen G, Bille-Hansen V, Jensen L, Lind P. (2001).** Transplacental transmission of *Toxoplasma gondii* in minipigs infected with strains of different virulence. *J. Parasitol.* 87(1), 108-113.
- Jungersen G, Jensen L, Rask MR, Lind P. (2002).** Non-lethal infection parameters in mice separate sheep Type II *Toxoplasma gondii* isolates by virulence. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 25(3), 187-195.
- Juránková J, Opsteegh M, Neumayerová H, Kovařík K, Frencová A, Baláž V, Volf J, Koudela B. (2013).** Quantification of *Toxoplasma gondii* in tissue samples of experimentally infected goats by magnetic capture and real-time PCR. *Vet. Parasitol.* 193(1-3), 95-99.
- *****
- Kang H, Remington JS, Suzuki Y. (2000).** Decreased resistance of B cell-deficient mice to infection with *Toxoplasma gondii* despite unimpaired expression of IFN- γ , TNF- α , and inducible nitric oxide synthase. *J. Immunol.* 164(5), 2629-2634.
- Katzer F, Brülisauer F, Collantes-Fernández E, Bartley PM, Burrells A, Gunn G, Maley SW, Cousens C, Innes EA. (2011).** Increased *Toxoplasma gondii* positivity relative to age in 125 Scottish sheep flocks; evidence of frequent acquired infection. *Vet. Res.* 42, 121.
- Katzer F, Canton G, Burrells A, Palarea-Albaladejo J, Horton B, Bartley PM, Pang Y, Chianini F, Innes EA, Benavides J. (2014).** Immunization of lambs with the S48 strain of *Toxoplasma gondii* reduces tissue cyst burden following oral challenge with a complete strain of the parasite. *Vet. Parasitol.* 205(1-2), 46-56.
- Keeling PJ. (2007).** Genomics. Deep questions in the tree of life. *Science* 317(5846), 1875-1876.
- Khan IA, Matsuura T, Kasper LH. (1995).** IL-10 mediates immunosuppression following primary infection with *Toxoplasma gondii* in mice. *Parasite Immunol.* 17(4), 185-195.
- Khan A, Dubey JP, Su C, Ajioka JW, Rosenthal BM, Sibley LD. (2011).** Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. *Int. J. Parasitol.* 41(6), 645-655.
- Khan IA, Hwang S, Moretto M. (2019).** *Toxoplasma gondii*: CD8 T cells cry for CD4 help. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9, 136.
- Khosroshahi KH, Ghaffarifar F, Sharifi Z, D'Souza S, Dalimi A, Hassan ZM, Khoshzaban F. (2012).**

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

Comparing the effect of IL-12 genetic adjuvant and alum non-genetic adjuvant on the efficiency of the cocktail DNA vaccine containing plasmids encoding SAG-1 and ROP-2 of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Res.* 111(1), 403-411.

Kim JS, Romero R, Cushenberry E, Kim YM, Erez O, Nien JK, Yoon BH, Espinoza J, Kim CJ. (2007). Distribution of CD14⁺ and CD68⁺ macrophages in the placental bed and basal plate of women with preeclampsia and preterm labor. *Placenta* 28(5-6), 571-576.

Kirkbride CA, Dubey JP, Libal MC. (1992). Effect of feeding lasalocid to pregnant ewes experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. *Vet. Parasitol.* 44(3-4), 299-303.

Klun I, Uzelac A, Villena I, Mercier A, Bobić B, Nikolić A, Rajnpreht I, Opsteegh M, Aubert D, Blaga R, van der Giessen J, Djurković-Djaković O. (2017). The first isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from horses in Serbia. *Parasit. Vectors* 10(1), 167.

Koestner A, Cole CR. (1961). Neuropathology of ovine and bovine toxoplasmosis. *Am. J. Vet. Res.* 22, 53-66.

Krishnan L, Nguyen T, McComb S. (2013). From mice to women: the conundrum of immunity to infection during pregnancy. *J. Reprod. Immunol.* 97(1), 62-73.

Kropf C, Debache K, Rampa C, Barna F, Schorer M, Stephens CE, Ismail MA, Boykin DW, Hemphill A. (2012). The adaptive potential of a survival artist: characterization of the *in vitro* interactions of *Toxoplasma gondii* tachyzoites with di-cationic compounds in human fibroblast cell cultures. *Parasitology* 139(2), 208-220.

Kudo Y. (2013). The role of placental indoleamine 2,3-dioxygenase in human pregnancy. *Obstet. Gynecol. Sci.* 56(4), 209-216.

Kul O, Yildiz K, Ocal N, Freyre A, Deniz A, Karahan S, Atmaca HT, Gokpinar S, Dincel GC, Uzunalioglu T, Terzi OS. (2013). *In-vivo* efficacy of toltrazuril on experimentally induced *Toxoplasma gondii* tissue cysts in lambs: a novel strategy for prevention of human exposure to meat-borne toxoplasmosis. *Res. Vet. Sci.* 94(2), 269-276.

Kupz A, Pai S, Giacomini PR, Whan JA, Walker RA, Mehdi-Hammoudi P, Smith NC, Miller CM. (2019). Treatment of mice with IL2-complex enhances inflammasome-driven IFN- γ production and prevents lethal toxoplasmosis. *bioRxiv* 593574.

Lang C, Groß U, Lüder CG. (2007). Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Res.* 100(2), 191-203.

Lash GE, Schiessl B, Kirkley M, Innes BA, Cooper A, Searle RF, Robson SC, Bulmer JN. (2006). Expression of angiogenic growth factors by uterine natural killer cells during early pregnancy. *J. Leukoc. Biol.* 80(3), 572-580.

Laškarin G, Tokmadžić VS, Štrbo N, Bogović T, Szekeres-Bartho J, Randić L, Podack ER,

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

- Rukavina D. (2002).** Progesterone induced blocking factor (PIBF) mediates progesterone induced suppression of decidual lymphocyte cytotoxicity. *Am. J. Reprod. Immunol.* 48(4), 201-209.
- Lee SH, Kim AR, Lee DH, Rubino I, Choi HJ, Quan FS. (2017).** Protection induced by virus-like particles containing *Toxoplasma gondii* microneme protein 8 against highly virulent RH strain of *Toxoplasma gondii* infection. *PLoS One* 12(4), e0175644.
- Li M, Piao L, Chen CP, Wu X, Yeh CC, Masch R, Chang CC, Huang SJ. (2016).** Modulation of decidual macrophage polarization by macrophage colony-stimulating factor derived from first-trimester decidual cells: implication in preeclampsia. *Am. J. Pathol.* 186(5), 1258-1266.
- Li Y, Lopez GE, Vazquez J, Sun Y, Chavarria M, Lindner PN, Fredrickson S, Karst N, Stanic AK. (2018).** Decidual-placental immune landscape during syngeneic murine pregnancy. *Front. Immunol.* 9, 2087.
- Liesenfeld O, Kosek J, Remington JS, Suzuki Y. (1996).** Association of CD4⁺ T cell-dependent, interferon- γ -mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Exp. Med.* 184(2), 597-607.
- Liesenfeld O, Kosek JC, Suzuki Y. (1997).** Gamma interferon induces Fas-dependent apoptosis of Peyer's patch T cells in mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 65(11), 4682-4689.
- Liesenfeld O, Kang H, Park D, Nguyen TA, Parkhe CV, Watanabe H, Abo T, Sher A, Remington JS, Suzuki Y. (1999).** TNF- α , nitric oxide and IFN- γ are all critical for development of necrosis in the small intestine and early mortality in genetically susceptible mice infected perorally with *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* 21(7), 365-376.
- Liesenfeld O, Parvanova I, Zerrahn J, Han SJ, Heinrich F, Muñoz M, Kaiser F, Aebischer T, Buch T, Waisman A, Reichmann G, Utermöhlen O, von Stebut E, von Loewenich FD, Bogdan C, Specht S, Saefel M, Hoerauf A, Mota MM, Könen-Waisman S, Kaufmann SH, Howard JC. (2011).** The IFN- γ -inducible GTPase, Irga6, protects mice against *Toxoplasma gondii* but not against *Plasmodium berghei* and some other intracellular pathogens. *PLoS One* 6(6), e20568.
- Lima TS, Lodoen MB. (2019).** Mechanisms of human innate immune evasion by *Toxoplasma gondii*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9, 103.
- Lima TS, Gov L, Lodoen MB. (2018).** Evasion of human neutrophil-mediated host defense during *Toxoplasma gondii* infection. *MBio* 9(1), e02027-e02037.
- Lin H, Mosmann TR, Guilbert L, Tuntipopipat S, Wegmann TG. (1993).** Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. *J. Immunol.* 151(9), 4562-4573.
- Lindsay DS, Toivio-Kinnucan MA, Blagburn BL. (1998).** Decoquinatate induces tissue cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii*. *Vet. Parasitol.* 77(2-3), 75-81.
- Lingelbach K, Joiner KA. (1998).** The parasitophorous vacuole membrane surrounding *Plasmodium*

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

and *Toxoplasma*: an unusual compartment in infected cells. *J. Cell Sci.* 111(Pt 11), 1467-1475.

- Lissauer D, Eldershaw SA, Inman CF, Coomarasamy A, Moss PA, Kilby MD. (2015).** Progesterone promotes maternal-fetal tolerance by reducing human maternal T-cell polyfunctionality and inducing a specific cytokine profile. *Eur. J. Immunol.* 45(10), 2858-2872.
- Liu CH, Fan YT, Dias A, Esper L, Corn RA, Bafica A, Machado FS, Aliberti J. (2006).** Cutting edge: dendritic cells are essential for *in vivo* IL-12 production and development of resistance against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J. Immunol.* 177(1), 31-35.
- Liu Y, Zhao M, Xu X, Liu X, Zhang H, Jiang Y, Zhang L, Hu X. (2014).** Adoptive transfer of Treg cells counters adverse effects of *Toxoplasma gondii* infection on pregnancy. *J. Infect. Dis.* 210(9), 1435-1443.
- Liu Q, Wang ZD, Huang SY, Zhu XQ. (2015).** Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. *Parasit. Vectors* 8, 292.
- Liu Y, Cao A, Li Y, Li X, Cong H, He S, Zhou H. (2017).** Immunization with a DNA vaccine encoding *Toxoplasma gondii* Superoxide dismutase (TgSOD) induces partial immune protection against acute toxoplasmosis in BALB/c mice. *BMC Infect. Dis.* 17(1), 403.
- Lopes WD, Costa AJ, Souza FA, Rodrigues JD, Costa GH, Soares VE, Silva GS. (2009a).** Semen variables of sheep (*Ovis aries*) experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. *Anim. Reprod. Sci.* 111(2-4), 312-319.
- Lopes WD, da Costa AJ, Santana LF, dos Santos RS, Rossanese WM, Lopes WC, Costa GH, Sakamoto CA, dos Santos TR. (2009b).** Aspects of *Toxoplasma* infection on the reproductive system of experimentally infected rams (*Ovis aries*). *J. Parasitol. Res.* 2009, 602803.
- Lopes WD, Santos TR, Luvizotto MC, Sakamoto CA, Oliveira GP, Costa AJ. (2011).** Histopathology of the reproductive system of male sheep experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Res.* 109(2), 405-409.
- Lopes WD, Rodriguez JD, Souza FA, dos Santos TR, dos Santos RS, Rosanese WM, Lopes WR, Sakamoto CA, da Costa AJ. (2013).** Sexual transmission of *Toxoplasma gondii* in sheep. *Vet. Parasitol.* 195(1-2), 47-56.
- Lopez J, Bittame A, Massera C, Vasseur V, Effantin G, Valat A, Buillon C, Allart S, Fox BA, Rommereim LM, Bzik DJ, Schoehn G, Weissenhorn W, Dubremetz JF, Gagnon J, Mercier C, Cesbron-Delauw MF, Blanchard N. (2015).** Intravacuolar membranes regulate CD8 T Cell recognition of membrane-bound *Toxoplasma gondii* protective antigen. *Cell Rep.* 13(10), 2273-2286.
- López-Pérez IC, Collantes-Fernández E, Rojo-Montejo S, Navarro-Lozano V, Risco-Castillo V, Pérez-Pérez V, Pereira-Bueno J, Ortega-Mora LM. (2011).** Pathological and immunological findings in placentas from pregnant BALB/c mice infected with *Neospora caninum* at early and late

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

stages of gestation. *Acta Parasitol.* 56(3), 245-254.

Lu F, Huang S, Hu MS, Kasper LH. (2005). Experimental ocular toxoplasmosis in genetically susceptible and resistant mice. *Infect. Immun.* 73(8), 5160-5165.

Macaldowie C, Maley SW, Wright S, Bartley P, Esteban-Redondo I, Buxton D, Innes EA. (2004). Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. *J. Comp. Pathol.* 131(2-3), 142-156.

Macpherson AJ, Geuking MB, McCoy KD. (2012). Homeland security: IgA immunity at the frontiers of the body. *Trends Immunol.* 33(4), 160-166.

Mainar-Jaime RC, Barberán M. (2007). Evaluation of the diagnostic accuracy of the modified agglutination test (MAT) and an indirect ELISA for the detection of serum antibodies against *Toxoplasma gondii* in sheep through Bayesian approaches. *Vet. Parasitol.* 148(2), 122-129.

Maley SW, Thomson KM, Bos HJ, Buxton D. (1997). Serological diagnosis of toxoplasmosis in sheep following vaccination and challenge. *Vet. Rec.* 140(21), 558-559.

Maley SW, Buxton D, Macaldowie CN, Anderson IE, Wright SE, Bartley PM, Esteban-Redondo I, Hamilton CM, Storset AK, Innes EA. (2006). Characterization of the immune response in the placenta of cattle experimentally infected with *Neospora caninum* in early gestation. *J. Comp. Pathol.* 135(2-3), 130-141.

MAPAMA. (2018). El sector ovino y caprino de carne en cifras. [https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/publicaciones/indicadoreseconomicosovinoycaprinocarne2018_tcm30-428265.pdf].

Marca MC, Ramos JJ, Loste A, Sáez T, Sanz MC. (1996). Comparison of indirect immunofluorescent antibody test and modified direct agglutination test methods for detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in adult sheep in Spain. *Vet. Parasitol.* 67(1-2), 99-103.

Marin MS, Hecker YP, Quintana S, Pérez SE, Leunda MR, Cantón GJ, Cobo ER, Moore DP, Odeón AC. (2017). Toll-like receptors 3, 7 and 8 are upregulated in the placental caruncle and fetal spleen of *Neospora caninum* experimentally infected cattle. *Vet. Parasitol.* 236, 58-61.

Marques PX, O' Donovan J, Williams EJ, Gutierrez J, Worrall S, McElroy M, Proctor A, Brady C, Sammin D, Bassett H, Buxton D, Maley S, Markey BK, Nally JE. (2012). Detection of *Toxoplasma gondii* antigens reactive with antibodies from serum, amniotic, and allantoic fluids from experimentally infected pregnant ewes. *Vet. Parasitol.* 185(2-4), 91-100.

Marshall PA, Hughes JM, Williams RH, Smith JE, Murphy RG, Hide G. (2004). Detection of high levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in natural urban populations of *Mus domesticus*. *Parasitology* 128(Pt 1), 39-42.

Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. (2008). Macrophage activation and polarization. *Front.*

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

Biosci. 13, 453-461.

- Martrou P, Pestre M, Loubet R, Nicolas A, Malinvaud G. (1965).** La toxoplasmose congénitale (note concernant un cas mortel). *Limousin Med.* 53, 7.
- Mason S, Quinnell RJ, Smith JE. (2010).** Detection of *Toxoplasma gondii* in lambs via PCR screening and serological follow-up. *Vet. Parasitol.* 169(3-4), 258-263.
- Matsuo K, Kamai R, Uetsu H, Goto H, Takashima Y, Nagamune K. (2014).** Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cattle, horses, pigs and chickens in Japan. *Parasitol. Int.* 63(4), 638-639.
- McClure L, O'Connor AE, Hayward S, Jenkin G, Walker DW, Phillips DJ. (2005).** Effects of age and pregnancy on the circulatory activin response of sheep to acute inflammatory challenge by lipopolysaccharide. *J. Endocrinol.* 185(1), 139-149.
- McColgan C, Buxton D, Miller HR. (1987).** Studies on ovine efferent lymph following infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Comp. Pathol.* 97(6), 695-703.
- McColgan C, Buxton D, Blewett DA. (1998).** Titration of *Toxoplasma gondii* oocysts in non-pregnant sheep and the effects of subsequent challenge during pregnancy. *Vet. Rec.* 123(18), 467-470.
- McKee AS, Dzierszynski F, Boes M, Roos DS, Pearce EJ. (2004).** Functional inactivation of immature dendritic cells by the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 173(4), 2632-2640.
- Mearns R. (2007).** Abortion in sheep. 1. Investigation and principal causes. *In Pract.* 29, 40-46.
- Medawar P. (1953).** Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 7, 320-338.
- Meerburg BG, Kijlstra A. (2009).** Changing climate-changing pathogens: *Toxoplasma gondii* in North-Western Europe. *Parasitol. Res.* 105(1), 17-24.
- Meeusen E, Fox A, Brandon M, Lee CS. (1993).** Activation of uterine intraepithelial gamma delta T cell receptor-positive lymphocytes during pregnancy. *Eur. J. Immunol.* 23(5), 1112-1117.
- Meeusen EN, Bischof RJ, Lee CS. (2001).** Comparative T-cell responses during pregnancy in large animals and humans. *Am. J. Reprod. Immunol.* 46(2), 169-179.
- Meisel R, Brockers S, Heseler K, Degistirici O, Bülle H, Woite C, Stuhlsatz S, Schwippert W, Jäger M, Sorg R, Henschler R, Seissler J, Dilloo D, Däubener W. (2011).** Human but not murine multipotent mesenchymal stromal cells exhibit broad-spectrum antimicrobial effector function mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Leukemia* 25(4), 648-654.
- Menotti J, Garin YJ, Thulliez P, Sérugue MC, Stanislawiak J, Ribaud P, de Castro N, Houzé S, Derouin F. (2010).** Evaluation of a new 5'-nuclease real-time PCR assay targeting the *Toxoplasma gondii* AF146527 genomic repeat. *Clin. Microbiol. Infect.* 16(4), 363-368.
- Menzies FM, Henriquez FL, Roberts CW. (2008).** Immunological control of congenital toxoplasmosis

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

- in the murine model. *Immunol. Lett.* 115(2), 83-89.
- Mévélec MN, Ducournau C, Bassuny Ismael A, Olivier M, Sèche É, Lebrun M, Bout D, Dimier-Poisson I. (2010).** Mic1-3 knockout *Toxoplasma gondii* is a good candidate for a vaccine against *T. gondii*-induced abortion in sheep. *Vet. Res.* 41(4), 49.
- Meyer DJ, Allan JE, Beaman MH. (2013).** Effect of route of infection on outcome of *Toxoplasma gondii* infection in hu-PBL SCID mice. *Eur. J. Microbiol. Immunol. (Bp)* 3(1), 28-35.
- Milian ICB, Silva RJ, Manzan-Martins C, Barbosa BF, Guirelli PM, Ribeiro M, de Oliveira Gomes A, Ietta F, Mineo JR, Silva Franco P, Ferro EAV. (2019).** Increased *Toxoplasma gondii* intracellular proliferation in human extravillous trophoblast cells (HTR8/SVneo Line) is sequentially triggered by MIF, ERK1/2, and COX-2. *Front. Microbiol.* 10, 852.
- Millán J, Cabezón O, Pabón M, Dubey JP, Almería S. (2009).** Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in feral cats (*Felis silvestris catus*) in Majorca, Balearic Islands, Spain. *Vet. Parasitol.* 165(3-4), 323-326.
- Miller JK, Blewett DA, Buxton D. (1982).** Clinical and serological response of pregnant gimmers to experimentally induced toxoplasmosis. *Vet. Rec.* 111(6), 124-126.
- Minami K, Hiwatashi K, Ueno S, Sakoda M, Iino S, Okumura H, Hashiguchi M, Kawasaki Y, Kurahara H, Mataka Y, Maemura K, Shinchi H, Natsugoe S. (2018).** Prognostic significance of CD68, CD163 and Folate receptor- β positive macrophages in hepatocellular carcinoma. *Exp. Ther. Med.* 15(5), 4465-4476.
- Miranda FJ, Souza DB, Frazão-Teixeira E, Oliveira FC, Melo JC, Mariano CM, Albernaz AP, Carvalho EC, Oliveira FC, Souza WD, DaMatta RA. (2015).** Experimental infection with the *Toxoplasma gondii* ME-49 strain in the Brazilian BR-1 mini pig is a suitable animal model for human toxoplasmosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110(1), 95-100.
- Moffett JR, Namboodiri MA. (2003).** Tryptophan and the immune response. *Immunol. Cell Biol.* 81(4), 247-265.
- Molina-López R, Cabezón O, Pabón M, Darwich L, Obón E, Lopez-Gatius F, Dubey JP, Almería S. (2012).** High seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in the common raven (*Corvus corax*) in the Northeast of Spain. *Res. Vet. Sci.* 93(1), 300-302.
- Møller HJ. (2011).** Soluble CD163. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 72(1), 1-13.
- Montoya JG, Liesenfeld O. (2004).** Toxoplasmosis. *Lancet* 363(9425), 1965-76.
- Montoya A, Miró G, Mateo M, Ramírez C, Fuentes I. (2008).** Molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from cats in Spain. *J. Parasitol.* 94(5), 1044-1046.
- Moore DP, Regidor-Cerrillo J, Morrell E, Poso MA, Cano DB, Leunda MR, Linschinky L, Odeón AC, Odriozola E, Ortega-Mora LM, Campero CM. (2008).** The role of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in spontaneous bovine abortion in Argentina. *Vet. Parasitol.* 156(3-4), 163-167.

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

- Mordue DG, Sibley LD. (2003).** A novel population of Gr-1⁺-activated macrophages induced during acute toxoplasmosis. *J. Leukoc. Biol.* 74(6), 1015-1025.
- Mordue DG, Monroy F, La Regina M, Dinarello CA, Sibley LD. (2001).** Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. *J. Immunol.* 167(8), 4574-4584.
- Morelli SS, Mandal M, Goldsmith LT, Kashani BN, Ponzio NM. (2015).** The maternal immune system during pregnancy and its influence on fetal development. *Res. Rep. Biol.* 6, 171-189.
- Moreno B, Collantes-Fernández E, Villa A, Navarro A, Regidor-Cerrillo J, Ortega-Mora LM. (2012).** Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions. *Vet. Parasitol.* 187(1-2), 312-318.
- Morley EK, Williams RH, Hughes JM, Thomasson D, Terry RS, Duncanson P, Smith JE, Hide G. (2008).** Evidence that primary infection of Charollais sheep with *Toxoplasma gondii* may not prevent foetal infection and abortion in subsequent lambings. *Parasitology* 135(2), 169-173.
- Moskwa B, Kornacka A, Cybulska A, Cabaj W, Reiterova K, Bogdaszewski M, Steiner-Bogdaszewska Ż, Bień J. (2018).** Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infection in sheep, goats, and fallow deer farmed on the same area. *J. Anim. Sci.* 96(6), 2468-2473.
- Moura AB, Costa AJ, Jordão Filho S, Paim BB, Pinto FR, Di Mauro DC. (2007).** *Toxoplasma gondii* in semen of experimentally infected swine. *Pesqui. Vet. Bras.* 27(10), 430-434.
- Müller J, Limban C, Stadelmann B, Missir AV, Chirita IC, Chifiriuc MC, Nitulescu GM, Hemphill A. (2009).** Thioureides of 2-(phenoxyethyl)benzoic acid 4-R substituted: a novel class of anti-parasitic compounds. *Parasitol. Int.* 58(2), 128-135.
- Müller J, Aguado-Martínez A, Ortega-Mora LM, Moreno-Gonzalo J, Ferre I, Hulverson MA, Choi R, McCloskey MC, Barrett LK, Maly DJ, Ojo KK, Van Voorhis W, Hemphill A. (2017).** Development of a murine vertical transmission model for *Toxoplasma gondii* oocyst infection and studies on the efficacy of bumped kinase inhibitor (BKI)-1294 and the naphthoquinone buparvaquone against congenital toxoplasmosis. *J. Antimicrob. Chemother.* 72(8), 2334-2341.
- Munday BL. (1978).** Bovine toxoplasmosis: experimental infections. *Int. J. Parasitol.* 8(4), 285-288.
- Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL. (1998).** Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 281(5380), 1191-1193.
- Muzzio DO, Soldati R, Ehrhardt J, Utpatel K, Evert M, Zenclussen AC, Zygmunt M, Jensen F. (2014).** B cell development undergoes profound modifications and adaptations during pregnancy in mice. *Biol. Reprod.* 91(5), 115.
- *****
- Nagamatsu T, Schust DJ. (2010).** The contribution of macrophages to normal and pathological pregnancies. *Am. J. Reprod. Immunol.* 63(6), 460-471.

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

- Naruse K, Lash GE, Innes BA, Otun HA, Searle RF, Robson SC, Bulmer JN. (2009).** Localization of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9 and tissue inhibitors for MMPs (TIMPs) in uterine natural killer cells in early human pregnancy. *Hum. Reprod.* 24(3), 553-561.
- Nascimento FS, Suzuki LA, Rossi CL. (2008).** Assessment of the value of detecting specific IgA antibodies for the diagnosis of a recently acquired primary *Toxoplasma* infection. *Prenat. Diagn.* 28(8), 749–752.
- Nefefe T, Liebenberg J, van Kleef M, Steyn HC, Pretorius A. (2017).** Innate immune transcriptomic evaluation of PBMC isolated from sheep after infection with *E. ruminantium* Welgevonden strain. *Mol. Immunol.* 91, 238-248.
- Neyer LE, Grünig G, Fort M, Remington JS, Rennick D, Hunter CA. (1997).** Role of interleukin-10 in regulation of T-cell-dependent and T-cell-independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 65(5), 1675-1682.
- Nicoll S, Wright S, Maley SW, Burns S, Buxton D. (1997).** A mouse model of recrudescence of *Toxoplasma gondii* infection. *J. Med. Microbiol.* 46(3), 263-266.
- Nicolles C, Manceaux L. (1908).** Sur une infection a corps de *Leishman* (ou organisms voisins) du gondii. *C. R. Séances Acad. Sci.* 147, 763-766.
- Nishi SM, Kasai N, Gennari SM. (2001).** Antibody levels in goats fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *J. Parasitol.* 87(2), 445-447.
- *****
- O'Brien CA, Batista SJ, Still KM, Harris TH. (2019).** IL-10 and ICOS differentially regulate T cell responses in the brain during chronic *Toxoplasma gondii* infection. *J. Immunol.* 202(6), 1755-1766.
- O'Connell E, Wilkins MF, Te Punga WA. (1988).** Toxoplasmosis in sheep. II. The ability of a live vaccine to prevent lamb losses after an intravenous challenge with *Toxoplasma gondii*. *N. Z. Vet. J.* 36(1), 1-4.
- O'Donovan J, Proctor A, Gutierrez J, Worrell S, Nally J, Marques P, Brady C, McElroy M, Sammin D, Buxton D, Maley S, Bassett H, Markey B. (2012).** Distribution of lesions in fetal brains following experimental infection of pregnant sheep with *Toxoplasma gondii*. *Vet. Pathol.* 49(3), 462-469.
- O'Garra A, Vieira P. (2007).** T_H1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat. Rev. Immunol.* 7(6), 425-428.
- Oborne R. (2018).** EU sheep population marginally up. [<http://beefandlamb.ahdb.org.uk/market-intelligence-news/eu-sheep-population-marginally/>].
- Ocejo M, Oporto B, Hurtado A. (2019).** Occurrence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in cattle and sheep in Northern Spain and changes in antimicrobial resistance in two studies 10-years apart. *Pathogens* 8(3), E98.

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

- Ohsawa K, Imai Y, Sasaki Y, Kohsaka S. (2004). Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *J. Neurochem.* 88(4), 844-856.
- Oledzka G, Bo L, Hiszczynska-Sawicka E, Gelder FB, Kur J, McFarlane RG. (2017). *Toxoplasma gondii*: immunological response of sheep to injections of recombinant SAG1, SAG2, GRA1 proteins coupled to the non-toxic microparticle muramyl dipeptide. *Small Rumin. Res.* 150, 111-117.
- Oliveira CB, Meurer YS, Andrade JM, Costa ME, Andrade MM, Silva LA, Lanza DC, Vítor RW, Andrade-Neto VF. (2016). Pathogenicity and phenotypic sulfadiazine resistance of *Toxoplasma gondii* isolates obtained from livestock in North-Eastern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 111(6), 391-398.
- Oporto B, Barandika JF, Hurtado A, Aduriz G, Moreno B, Garcia-Perez AL. (2006). Incidence of ovine abortion by *Coxiella burnetii* in Northern Spain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1078, 498-501.
- Opsteegh M, Teunis P, Züchner L, Koets A, Langelaar M, van der Giessen J. (2011). Low predictive value of seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cattle for detection of parasite DNA. *Int. J. Parasitol.* 41(3-4), 343-354.
- Oshiumi H, Matsuo A, Matsumoto M, Seya T. (2008). Pan-vertebrate Toll-like receptors during evolution. *Curr. Genomics* 9(7), 488-493.
- Oura CA, Innes EA, Wastling JM, Entrican G, Panton WR. (1993). The inhibitory effect of ovine recombinant interferon-gamma on intracellular replication of *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* 15(9), 535-538.
- Ouyang W, O'Garra A. (2019). IL-10 family cytokines IL-10 and IL-22: from basic science to clinical translation. *Immunity* 50(4), 871-891.
- Owen MR, Trees AJ. (1998). Vertical transmission of *Toxoplasma gondii* from chronically infected house (*Mus musculus*) and field (*Apodemus sylvaticus*) mice determined by polymerase chain reaction. *Parasitology* 116(Pt 4), 299-304.
- Owen MR, Clarkson MJ, Trees AJ. (1998). Acute phase *Toxoplasma* abortions in sheep. *Vet. Rec.* 142(18), 480-482.
- *****
- Panadero R, Paineira A, López C, Vázquez L, Paz A, Díaz P, Dacal V, Cienfuegos S, Fernández G, Lago N, Díez-Baños P, Morrondo P. (2010). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wild and domestic ruminants sharing pastures in Galicia (North-West Spain). *Res. Vet. Sci.* 88(1), 111-115.
- Pappas G, Roussos N, Falagas ME. (2009). Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int. J. Parasitol.* 39(12), 1385-1394.

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

- Payne RA, Joynson DH, Wilsmore AJ. (1988). Enzyme-linked immunosorbent assays for the measurement of specific antibodies in experimentally induced ovine toxoplasmosis. *Epidemiol. Infect.* 100(2), 205-212.
- Pearce EL, Shen H. (2007). Generation of CD8 T cell memory is regulated by IL-12. *J. Immunol.* 179(4), 2074-2081.
- Pena HF, Gennari SM, Dubey JP, Su C. (2008). Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *Int. J. Parasitol.* 38(5), 561-569.
- Peña-Díaz P, Lukeš J. (2018). Fe-S cluster assembly in the supergroup *Excavata*. *J. Biol. Inorg. Chem.* 23(4), 521-541.
- Pereira FT, Oliveira LJ, Barreto Rda S, Mess A, Perecin F, Bressan FF, Mesquita LG, Miglino MA, Pimentel JR, Fantinato Neto P, Meirelles FV. (2013). Fetal-maternal interactions in the synepitheliochorial placenta using the eGFP cloned cattle model. *PLoS One* 8(5), e64399.
- Pereira-Bueno J, Quintanilla-Gozaolo A, Pérez-Pérez V, Álvarez-García G, Collantes-Fernández E, Ortega-Mora LM. (2004). Evaluation of ovine abortion associated with *Toxoplasma gondii* in Spain by different diagnostic techniques. *Vet. Parasitol.* 121(1-2), 33-43.
- Pereira-Bueno J, Collantes-Fernández E, Álvarez-García G. (2005). Toxoplasmosis en el ganado ovino y caprino: epidemiología, diagnóstico y control. 46-83. En: Guía del aborto ovino. 1st Edition. Salamanca, España. *Laboratorios Intervet*.
- Peter AT, Beg MA, Ahmad E, Bergfelt DR. (2017). Trophoblast of domestic and companion animals: basic and applied clinical perspectives. *Anim. Reprod.* 14(Suppl 1), 1209-1224.
- Pérez V. (2018). Abortions and reproductive failure in sheep and goats. *34th World Veterinary Association Congress*. Barcelona. 56.
- Peyron F, Lobry JR, Musset K, Ferrandiz J, Gomez-Marin JE, Petersen E, Meroni V, Rausher B, Mercier C, Picot S, Cesbron-Delauw MF. (2006). Serotyping of *Toxoplasma gondii* in chronically infected pregnant women: predominance of type II in Europe and types I and III in Colombia (South America). *Microbes Infect.* 8(9-10), 2333-2340.
- Pfaff AW, Candolfi E. (2008). New insights in toxoplasmosis immunology during pregnancy. Perspective for vaccine prevention. *Parassitologia* 50(1-2), 55-58.
- Pfefferkorn ER. (1984). Interferon γ blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *PNAS* 81(3), 908-912.
- Picchio MS, Sánchez VR, Arcon N, Soto AS, Perrone Sibilía M, Aldirico MLA, Urrutia M, Moretta R, Fenoy IM, Goldman A, Martín V. (2018). Vaccine potential of antigen cocktails composed of recombinant *Toxoplasma gondii* TgPI-1, ROP2 and GRA4 proteins against chronic toxoplasmosis in C3H mice. *Exp. Parasitol.* 185, 62-70.
- Piccinni MP, Scaletti C, Maggi E, Romagnani S. (2000). Role of hormone-controlled Th1- and Th2-

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

type cytokines in successful pregnancy. *J. Neuroimmunol.* 109(1), 30-33.

Pinckney RD, Lindsay DS, Blagburn BL, Boosinger TR, McLaughlin SA, Dubey JP. (1994). Evaluation of the safety and efficacy of vaccination of nursing pigs with living tachyzoites of two strains of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 80(3), 438-448.

Pomares C, Ajzenberg D, Bornard L, Bernardin G, Hasseine L, Darde ML, Marty P. (2011). Toxoplasmosis and horse meat, France. *Emerg. Infect. Dis.* 17(7), 1327-1328.

Pomares C, Devillard S, Holmes TH, Olariu TR, Press CJ, Ramirez R, Talucod J, Estran R, Su C, Dubey JP, Ajzenberg D, Montoya JG. (2018). Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* DNA samples isolated from humans living in North America: an unexpected high prevalence of atypical genotypes. *J. Infect. Dis.* 218(11), 1783-1791.

Porte Y, Buhot MC, Mons NE. (2008). Spatial memory in the Morris water maze and activation of cyclic AMP response element-binding (CREB) protein within the mouse hippocampus. *Learn. Mem.* 15(12), 885-894.

PrabhuDas M, Bonney E, Caron K, Dey S, Erlebacher A, Fazleabas A, Fisher S, Golos T, Matzuk M, McCune JM, Mor G, Schulz L, Soares M, Spencer T, Strominger J, Way SS, Yoshinaga K. (2015). Immune mechanisms at the maternal-fetal interface: perspectives and challenges. *Nat. Immunol.* 16(4), 328-334.

Prigione I, Chiesa S, Taverna P, Ceccarelli R, Frulio R, Morandi F, Bocca P, Cesbron-Delauw MF, Pistoia V. (2006). T cell mediated immune responses to *Toxoplasma gondii* in pregnant women with primary toxoplasmosis. *Microbes Infect.* 8(2), 552-560.

Quinn HE, Ellis JT, Smith NC. (2002). *Neospora caninum*: a cause of immune-mediated failure of pregnancy? *Trends Parasitol.* 18(9), 391-394.

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

Regidor-Cerrillo J, Arranz-Solís D, Benavides J, Gómez-Bautista M, Castro-Hermida JA, Mezo M, Pérez V, Ortega-Mora LM, González-Warleta M. (2014). *Neospora caninum* infection during early pregnancy in cattle: how the isolate influences infection dynamics, clinical outcome and peripheral and local immune responses. *Vet. Res.* 45, 10.

Rêgo WMF, Costa JGL, Baraviera RCA, Pinto LV, Bessa GL, Lopes REN, Vitor RWA. (2017). Association of ROP18 and ROP5 was efficient as a marker of virulence in atypical isolates of *Toxoplasma gondii* obtained from pigs and goats in Piauí, Brazil. *Vet. Parasitol.* 247, 19-25.

Reichel MP, Alejandra Ayanegui-Alcérreca M, Gondim LF, Ellis JT. (2013). What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - the billion dollar question. *Int. J. Parasitol.* 43(2),

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

133-142.

- Reichmann G, Walker W, Villegas EN, Craig L, Cai G, Alexander J, Hunter CA. (2000).** The CD40/CD40 ligand interaction is required for resistance to toxoplasmic encephalitis. *Infect. Immun.* 68(3), 1312-1318.
- Reid AJ, Vermont SJ, Cotton JA, Harris D, Hill-Cawthorne GA, Könen-Waisman S, Latham SM, Mourier T, Norton R, Quail MA, Sanders M, Shanmugam D, Sohal A, Wasmuth JD, Brunk B, Grigg ME, Howard JC, Parkinson J, Roos DS, Trees AJ, Berriman M, Pain A, Wastling JM. (2012).** Comparative genomics of the apicomplexan parasites *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*: Coccidia differing in host range and transmission strategy. *PLoS Pathog.* 8(3), e1002567.
- Reinhard G, Noll A, Schlebusch H, Mallmann P, Ruecker AV. (1998).** Shifts in the TH1/TH2 balance during human pregnancy correlate with apoptotic changes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245(3), 933-938.
- Reischl U, Bretagne S, Krüger D, Ernault P, Costa JM. (2003).** Comparison of two DNA targets for the diagnosis of toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *BMC Infect. Dis.* 3, 7.
- Remington JS, Jacobs L, Melton ML. (1961).** Congenital transmission of toxoplasmosis from mother animals with acute and chronic infections. *J. Infect. Dis.* 108, 163-173.
- Reyes L, Golos TG. (2018).** Hofbauer cells: their role in healthy and complicated pregnancy. *Front. Immunol.* 9, 2628.
- Reyes L, Wolfe B, Golos T. (2017).** Hofbauer cells: placental macrophages of fetal origin. *Results Probl. Cell. Differ.* 62, 45-60.
- Rezende-Oliveira K, Silva NM, Mineo JR, Rodrigues Junior V. (2012).** Cytokines and chemokines production by mononuclear cells from parturient women after stimulation with live *Toxoplasma gondii*. *Placenta* 33(9), 682-687.
- Ribas MP, Almería S, Fernández-Aguilar X, de Pedro G, Lizarraga P, Alarcia-Alejos O, Molina-López R, Obón E, Gholipour H, Temiño C, Dubey JP, Cabezón O. (2018).** Tracking *Toxoplasma gondii* in freshwater ecosystems: interaction with the invasive American mink (*Neovison vison*) in Spain. *Parasitol. Res.* 117(7), 2275-2281.
- Roberts CW, Alexander J. (1992).** Studies on a murine model of congenital toxoplasmosis: vertical disease transmission only occurs in BALB/c mice infected for the first time during pregnancy. *Parasitology* 104(Pt 1), 19-23.
- Roberts CW, Ferguson DJ, Jebbari H, Satoskar A, Bluethmann H, Alexander J. (1996).** Different roles for interleukin-4 during the course of *Toxoplasma gondii* infection. *Infect. Immun.* 64(3), 897-904.

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

- Rocchi MS, Wattedegera S, Meridiani I, Entrican G. (2009).** Protective adaptive immunity to *Chlamydophila abortus* infection and control of ovine enzootic abortion (OEA). *Vet. Microbiol.* 135(1-2), 112-121.
- Rocha AC, Calabrese Kda S, Tedesco RC, Campos WR, Neto MH, Vasconcelos AC, Oréface F. (2014).** Morphometric changes in C57BL/6 mice retina infected by *Toxoplasma gondii* ME 49 strain. *Exp. Parasitol.* 136, 1-4.
- Rodger SM, Maley SW, Wright SE, Mackellar A, Wesley F, Sales J, Buxton D. (2006).** Role of endogenous transplacental transmission in toxoplasmosis in sheep. *Vet. Rec.* 159(23), 768-772.
- Rodrigues-Duarte L, Pandya Y, Neres R, Penha-Gonçalves C. (2018).** Fetal and maternal innate immunity receptors have opposing effects on the severity of experimental malaria in pregnancy: beneficial roles for fetus-derived Toll-like receptor 4 and type I interferon receptor 1. *Infect. Immun.* 86(5), e00708-e00717.
- Rodrigues Hoffmann A, Dorniak P, Filant J, Dunlap KA, Bazer FW, de la Concha-Bermejillo A, Welsh CJ, Varner P, Edwards JF. (2013).** Ovine fetal immune response to Cache Valley virus infection. *J. Virol.* 87(10), 5586-5592.
- Rodríguez-Ponce E, Molina JM, Hernández S. (1995).** Seroprevalence of goat toxoplasmosis on Grand Canary Island (Spain). *Prev. Vet. Med.* 24(4), 229-234.
- Romand S, Pudney M, Derouin F. (1993).** *In vitro* and *in vivo* activities of the hydroxynaphthoquinone atovaquone alone or combined with pyrimethamine, sulfadiazine, clarithromycin, or minocycline against *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37(11), 2371-2378.
- Rosbottom A, Guy CS, Gibney EH, Smith RF, Valarcher JF, Taylor G, Williams DJ. (2007).** Peripheral immune responses in pregnant cattle following *Neospora caninum* infection. *Parasite Immunol.* 29(4), 219-228.
- Rosbottom A, Gibney EH, Guy CS, Kipar A, Smith RF, Kaiser P, Trees AJ, Williams DJ. (2008).** Upregulation of cytokines is detected in the placentas of cattle infected with *Neospora caninum* and is more marked early in gestation when fetal death is observed. *Infect. Immun.* 76(6), 2352-2361.
- Rouatbi M, Amdouni Y, Amairia S, Rjeibi MR, Sammoudi S, Rekik M, Gharbi M. (2016).** Molecular detection and phylogenetic analyses of *Toxoplasma gondii* from naturally infected sheep in Northern and Central Tunisia. *Vet. Med. Sci.* 3(1), 22-31.
- *****
- Saad NM, Hussein AAA, Ewida RM. (2018).** Occurrence of *Toxoplasma gondii* in raw goat, sheep, and camel milk in Upper Egypt. *Vet. World* 11(9), 1262-1265.
- Sabin A. (1941).** Toxoplasmic encephalitis in children. *J. Am. Med. Assoc.* 116(9), 801-807.
- Saeij JP, Boyle JP, Collier S, Taylor S, Sibley LD, Brooke-Powell ET, Ajioka JW, Boothroyd JC.**

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

- (2006). Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. *Science* 314(5806), 1780-1783.
- Saito S, Nakashima A, Shim T, Ito M. (2010).** Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 63(6), 601-610.
- Salkowski CA, Detore G, McNally R, van Rooijen N, Vogel SN. (1997).** Regulation of inducible nitric oxide synthase messenger RNA expression and nitric oxide production by lipopolysaccharide *in vivo*: the roles of macrophages, endogenous IFN- γ , and TNF receptor-1-mediated signaling. *J. Immunol.* 158(2), 905-912.
- Sammin D, Markey B, Bassett H, Buxton D. (2009).** The ovine placenta and placentitis- A review. *Vet. Microbiol.* 135(1-2), 90-97.
- San Miguel JM, Gutiérrez-Expósito D, Aguado-Martínez A, González-Zotes E, Pereira-Bueno J, Gómez-Bautista M, Rubio P, Ortega-Mora LM, Collantes-Fernández E, Álvarez-García G. (2016).** Effect of different ecosystems and management practices on *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in wild ruminants in Spain. *J. Wildl. Dis.* 52(2), 293-300.
- Sánchez-Sánchez R, Vázquez P, Ferre I, Ortega-Mora LM. (2018).** Treatment of toxoplasmosis and neosporosis in farm ruminants: state of knowledge and future trends. *Curr. Top. Med. Chem.* 18(15), 1304-1323.
- Sánchez-Sánchez R, Ferre I, Regidor-Cerrillo J, Gutiérrez-Expósito D, Ferrer LM, Arteche-Villasol N, Moreno-Gonzalo J, Müller J, Aguado-Martínez A, Pérez V, Hemphill A, Ortega-Mora LM, Benavides J. (2019).** Virulence in mice of a *Toxoplasma gondii* type II isolate does not correlate with the outcome of experimental infection in pregnant sheep. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 436.
- Santana LF, da Costa AJ, Pieroni J, Lopes WD, Santos RS, de Oliveira GP, de Mendonça RP, Sakamoto CA. (2010).** Detection of *Toxoplasma gondii* in the reproductive system of male goats. *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária* 19(3), 179-182.
- Saraf P, Shwab EK, Dubey JP, Su C. (2017).** On the determination of *Toxoplasma gondii* virulence in mice. *Exp. Parasitol.* 174, 25-30.
- Sasai M, Pradipta A, Yamamoto M. (2018).** Host immune responses to *Toxoplasma gondii*. *Int. Immunol.* 30(3), 113-119.
- Scanga CA, Aliberti J, Jankovic D, Tilloy F, Bennouna S, Denkers EY, Medzhitov R, Sher A. (2002).** Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *J. Immunol.* 168(12), 5997-6001.
- Scarpelli L, Lopes WZ, Migani M, Bresciani KDS, da Costa AJ. (2009).** *Toxoplasma gondii* in experimentally infected *Bos taurus* and *Bos indicus* semen and tissues. *Pesqui. Veterinária Bras.* 29(1), 59-64.
- Schmittgen TD, Livak KJ. (2008).** Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nat.*

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

Protoc. 3(6), 1101-1108.

- Schlüter D, Kwok LY, Lütjen S, Soltek S, Hoffmann S, Körner H, Deckert M. (2003).** Both lymphotoxin- α and TNF are crucial for control of *Toxoplasma gondii* in the central nervous system. *J. Immunol.* 170(12), 6172-6182.
- Schreiber R, Feldman H. (1980).** Identification of the activator system for antibody to *Toxoplasma* as the classical complement pathway. *J. Infect. Dis.* 141(3), 366-369.
- Sedlmayr P, Blaschitz A, Stocker R. (2014).** The role of placental tryptophan catabolism. *Front. Immunol.* 5, 230.
- Senegas A, Villard O, Neuville A, Marcellin L, Pfaff AW, Steinmetz T, Mousli M, Klein JP, Candolfi E. (2009).** *Toxoplasma gondii*-induced foetal resorption in mice involves interferon- γ -induced apoptosis and spiral artery dilation at the maternofetal interface. *Int. J. Parasitol.* 39(4), 481-487.
- Shaapan RM. (2016).** The common zoonotic protozoal diseases causing abortion. *J. Parasit. Dis.* 40(4), 1116-1129.
- Shaapan RM, El-Nawawi FA, Tawfik MAA. (2008).** Sensitivity and specificity of various serological tests for the detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sheep. *Vet. Parasitol.* 153(3-4), 359-362.
- Shah NM, Imami N, Johnson MR. (2018).** Progesterone modulation of pregnancy-related immune responses. *Front. Immunol.* 9, 1293.
- Shayda H, Mahmood JT, Ebrahim T, Jamileh G, Golnaz Ensieh KS, Parivash D, Leila BY, Mohammad Mehdi A, Amir Hassan Z. (2009).** Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is expressed at feto-placental unit throughout mouse gestation: an immunohistochemical study. *J. Reprod. Infertil.* 10(3), 177-83.
- Sharif M, Amouei A, Sarvi S, Mizani A, Aarabi M, Hosseini SA, Daryani A. (2017).** Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from ruminants: a systematic review. *Int. J. Food Microbiol.* 258, 38-49.
- Sher A, Gazzinelli RT, Oswald IP, Clerici M, Kullberg M, Pearce EJ, Berzofsky JA, Mosmann TR, James SL, Morse HC. (1992).** Role of T-Cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. *Immunol. Rev.* 127, 183-204.
- Sher A, Tosh K, Jankovic D. (2017).** Innate recognition of *Toxoplasma gondii* in humans involves a mechanism distinct from that utilized by rodents. *Cell. Mol. Immunol.* 14(1), 36-42.
- Shimada S, Ebina Y, Iijima N, Deguchi M, Yamada H. (2018).** Decidual CD68⁺HLA-DR⁺CD163⁻ M1 macrophages increase in miscarriages with normal fetal chromosome. *Am. J. Reprod. Immunol.* 79(2), e12791.
- Shiono Y, Mun HS, He N, Nakazaki Y, Fang H, Furuya M, Aosai F, Yano A. (2007).** Maternal-fetal transmission of *Toxoplasma gondii* in interferon- γ deficient pregnant mice. *Parasitol. Int.* 56(2),

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

141-148.

- Shuralev EA, Shamaev ND, Mukminov MN, Nagamune K, Taniguchi Y, Saito T, Kitoh K, Arleevskaya MI, Fedotova AY, Abdulmanova DR, Aleksandrova NM, Efimova MA, Yarullin AI, Valeeva AR, Khaertynov KS, Takashima Y. (2018).** *Toxoplasma gondii* seroprevalence in goats, cats and humans in Russia. *Parasitol. Int.* 67(2), 112-114.
- Shwab EK, Saraf P, Zhu XQ, Zhou DH, McFerrin BM, Ajzenberg D, Schares G, Hammond-Aryee K, van Helden P, Higgins SA, Gerhold RW, Rosenthal BM, Zhao X, Dubey JP, Su C. (2018).** Human impact on the diversity and virulence of the ubiquitous zoonotic parasite *Toxoplasma gondii*. *PNAS* 115(29), E6956-E6963.
- Sibley LD, Ajioka JW. (2008).** Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. *Annu. Rev. Microbiol.* 62, 329-351.
- Sibley LD, Messina M, Niesman IR. (1994).** Stable DNA transformation in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii* by complementation of tryptophan auxotrophy. *PNAS* 91(12), 5508-5512.
- Sibley LD, Mordue DG, Su C, Robben PM, Howe DK. (2002).** Genetic approaches to studying virulence and pathogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 357(1417), 81-88.
- Silva NM, Vieira JC, Carneiro CM, Tafuri WL. (2009).** *Toxoplasma gondii*: the role of IFN-gamma, TNFRp55 and iNOS in inflammatory changes during infection. *Exp. Parasitol.* 123(1), 65-72.
- Silva JL, Rezende-Oliveira K, da Silva MV, Gómez-Hernández C, Peghini BC, Silva NM, Mineo JR, Rodrigues Júnior V. (2014).** IL-17-expressing CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in human toxoplasmosis. *Mediators Inflamm.* 2014, 573825.
- Silva HM, Pereira MM, Oliveira TA, Almeida HMS, Bresciani KDS, Santana LF, Soares VE, Lopes WZ, Castanheira TLL, Costa AJ. (2015).** Goats reinfected with *Toxoplasma gondii*: loss of viable prolificacy and gross revenue. *Arq. Bras. Med. Veterinária e Zootec.* 67(5), 1279-1286.
- Silva-Barrios S, Stäger S. (2017).** Protozoan parasites and type I IFNs. *Front. Immunol.* 8, 14.
- Silverstein AM, Uhr JW, Kraner KL, Lukes RJ. (1963).** Fetal response to antigenic stimulus. II. Antibody production by the fetal lamb. *J. Exp. Med.* 117, 799-812.
- Skariah S, McIntyre MK, Mordue DG. (2010).** *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. *Parasitol. Res.* 107(2), 253-260.
- Skinner LJ, Timperley AC, Wightman D, Chatterton JM, Ho-Yen DO. (1990).** Simultaneous diagnosis of toxoplasmosis in goats and goatowner's family. *Scand. J. Infect. Dis.* 22(3), 359-361.
- Smith JL. (1997).** Long-term consequences of foodborne toxoplasmosis: effects on the unborn, the immunocompromised, the elderly, and the immunocompetent. *J. Food Prot.* 60(12), 1595-1611.

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

- Sobrino R, Cabezón O, Millán J, Pabón M, Arnal MC, Luco DF, Gortázar C, Dubey JP, Almeria S. (2007).** Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild carnivores from Spain. *Vet. Parasitol.* 148(3-4), 187-192.
- Solomon EP, Berg LR, Martin DW. (2014).** Biología. 9th edition. Mexico DF, Mexico. *Cengage Learning*. ISBN: 9786074819335.
- Soulas C, Conerly C, Kim WK, Burdo TH, Alvarez X, Lackner AA, Williams KC. (2011).** Recently infiltrating MAC387⁺ monocytes/ macrophages: a third macrophage population involved in SIV and HIV encephalitic lesion formation. *Am. J. Pathol.* 178(5), 2121-2135.
- Speer CA, Dubey JP. (1998).** Ultrastructure of early stages of infections in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Parasitology* 116(Pt 1), 35-42.
- Stalheim OH, Hubbert WT, Boothe AD, Zimmermann WJ, Hughes DE, Barnett D, Riley JL, Foley J. (1980).** Experimental toxoplasmosis in calves and pregnant cows. *Am. J. Vet. Res.* 41(1), 10-13.
- Stanley AC, Buxton D, Innes EA, Huntley JF. (2004).** Intranasal immunisation with *Toxoplasma gondii* tachyzoite antigen encapsulated into PLG microspheres induces humoral and cell-mediated immunity in sheep. *Vaccine* 22(29-30), 3929-3941.
- Steinman RM, Pack M, Inaba K. (1997).** Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. *Immunol. Rev.* 156, 25-37.
- Stelzer S, Basso W, Benavides-Silván J, Ortega-Mora LM, Maksimov P, Gethmann J, Conraths FJ, Schares G. (2019).** *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis in farm animals: risk factors and economic impact. *Food Waterborne Parasitol.* 15, e00037.
- Sturge CR, Yarovinsky F. (2014).** Complex immune cell interplay in the gamma interferon response during *Toxoplasma gondii* infection. *Infect. Immun.* 82(8), 3090-3097.
- Su C, Shwab EK, Zhou P, Zhu XQ, Dubey JP. (2010).** Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 137(1), 1-11.
- Su C, Khan A, Zhou P, Majumdar D, Ajzenberg D, Dardé ML, Zhu XQ, Ajioka JW, Rosenthal BM, Dubey JP, Sibley LD. (2012).** Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *PNAS* 109(15), 5844-5849.
- Subauste CS, Wessendarp M. (2006).** CD40 restrains *in vivo* growth of *Toxoplasma gondii* independently of gamma interferon. *Infect. Immun.* 74(3), 1573-1579.
- Subedi S, Sharma B, Singh S, Bindari YR. (2018).** Sero-prevalence of *Toxoplasma gondii* in sheep in different geographical regions of Nepal. *Vet. Anim. Sci.* 5, 7-9.
- Sukhumavasi W, Egan CE, Warren AL, Taylor GA, Fox BA, Bzik DJ, Denkers EY. (2008).** TLR adaptor MyD88 is essential for pathogen control during oral *Toxoplasma gondii* infection but not adaptive immunity induced by a vaccine strain of the parasite. *J. Immunol.* 181(5), 3464-3473.

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

- Suzuki Y, Orellana M, Schreiber R, Remington J. (1988).** Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* 240(4851), 516-518.
- Suzuki Y, Kang H, Parmley S, Lim S, Park D. (2000).** Induction of tumor necrosis factor- α and inducible nitric oxide synthase fails to prevent toxoplasmic encephalitis in the absence of interferon- γ in genetically resistant BALB/c mice. *Microbes Infect.* 2(5), 455-462.
- Swapna LS, Parkinson J. (2017).** Genomics of apicomplexan parasites. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 52(3), 254-273.
- *****
- Tagel M, Lassen B, Viltrop A, Jokelainen P. (2019).** Large-scale epidemiological study on *Toxoplasma gondii* seroprevalence and risk factors in sheep in Estonia: age, farm location, and breed associated with seropositivity. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 19(6),421-429.
- Tait ED, Hunter CA. (2009).** Advances in understanding immunity to *Toxoplasma gondii*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104(2), 201-210.
- Takahashi K, Naito M, Katabuchi H, Higashi K. (1991).** Development, differentiation, and maturation of macrophages in the chorionic villi of mouse placenta with special reference to the origin of Hofbauer cells. *J. Leukoc. Biol.* 50(1), 57-68.
- Tan F, Hu X, Luo FJ, Pan CW, Chen XG. (2011).** Induction of protective Th1 immune responses in mice by vaccination with recombinant *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase-II. *Vaccine* 29(15), 2742-2748.
- Taylor MA, Bartram DJ. (2012).** The history of decoquinatone in the control of coccidial infections in ruminants. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 35(5), 417-427.
- Taylor RF, Njaa BL. (2012).** General approach to fetal and neonatal loss. 1-12. En: Kirkbride's diagnosis of abortion and neonatal loss in animals. 4th edition. West Sussex, United Kingdom. *Wiley-Blackwell*. ISBN: 9780470958520.
- Taylor S, Barragan A, Su C, Fux B, Fentress SJ, Tang K, Beatty WL, Hajj HE, Jerome M, Behnke MS, White M, Wootton JC, Sibley LD. (2006).** A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Science* 314(5806),1776-80.
- Tegegne D, Kelifa A, Abdurahaman M, Yohannes M. (2016).** Seroepidemiology and associated risk factors of *Toxoplasma gondii* in sheep and goats in South-Western Ethiopia. *BMC Vet. Res.* 12(1), 280.
- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. (2000).** *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.* 30(12-13), 1217-1258.
- Thomasson D, Wright EA, Hughes JM, Dodd NS, Cox AP, Boyce K, Gerwash O, Abushahma M, Lun ZR, Murphy RG, Rogan MT, Hide G. (2011).** Prevalence and co-infection of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in *Apodemus sylvaticus* in an area relatively free of cats.

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

Parasitology 138(9), 1117-1123.

Thouvenin M, Candolfi E, Villard O, Klein JP, Kien T. (1997). Immune response in a murine model of congenital toxoplasmosis: increased susceptibility of pregnant mice and transplacental passage of *Toxoplasma gondii* are type 2-dependent. *Parassitologia* 39(4), 279-283.

Tombácz K, Burgess G, Holder A, Werners A, Werling D. (2018). *Toxoplasma gondii* profilin does not stimulate an innate immune response through bovine or human TLR5. *Innate Immun.* 24(7), 422-429.

Torres M, Guiton R, Lacroix-Lamandé S, Ryffel B, Leman S, Dimier-Poisson I. (2013). MyD88 is crucial for the development of a protective CNS immune response to *Toxoplasma gondii* infection. *J. Neuroinflammation* 10, 19.

Trees AJ, Crozier SJ, Buxton D, Blewett DA. (1989). Serodiagnosis of ovine toxoplasmosis: an assessment of the latex agglutination test and the value of IgM specific titres after experimental oocyst-induced infections. *Res. Vet. Sci.* 46(1), 67-72.

Tsao FY, Wu MY, Chang YL, Wu CT, Ho HN. (2018). M1 macrophages decrease in the deciduae from normal pregnancies but not from spontaneous abortions or unexplained recurrent spontaneous abortions. *J. Formos. Med. Assoc.* 117(3), 204-211.

Ufermann CM, Domröse A, Babel T, Tersteegen A, Cengiz SC, Eller SK, Spekker-Bosker K, Sorg UR, Förster I, Däubener W. (2019). Indoleamine 2,3-dioxygenase activity during acute toxoplasmosis and the suppressed T cell proliferation in mice. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9, 184.

Uggla A, Sjöland L, Dubey JP. (1987). Immunohistochemical diagnosis of toxoplasmosis in fetuses and fetal membranes of sheep. *Am. J. Vet. Res.* 48(3), 348-351.

Valdezate S, Astorga R, Herrera-León S, Perea A, Usera MA, Huerta B, Echeita A. (2007). Epidemiological tracing of *Salmonella enterica* serotype Abortusovis from Spanish ovine flocks by PFGE fingerprinting. *Epidemiol. Infect.* 135(4), 695-702.

van der Puije WN, Bosompem KM, Canacoo EA, Wastling JM, Akanmori BD. (2000). The prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in Ghanaian sheep and goats. *Acta Trop.* 76(1), 21-26.

Van Grol J, Muniz-Feliciano L, Portillo JA, Bonilha VL, Subaustea CS. (2013). CD40 induces anti-*Toxoplasma gondii* activity in nonhematopoietic cells dependent on autophagy proteins. *Infect. Immun.* 81(6), 2002-2011.

Veenstra van Nieuwenhoven AL, Heineman MJ, Faas MM. (2003). The immunology of a successful pregnancy. *Hum. Reprod. Update* 9(4), 347-357.

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

- Vercammen M, Scorza T, El Bouhdidi A, Van Beeck K, Carlier Y, Dubremetz JF, Verschueren H. (1999).** Opsonization of *Toxoplasma gondii* tachyzoites with nonspecific immunoglobulins promotes their phagocytosis by macrophages and inhibits their proliferation in nonphagocytic cells in tissue culture. *Parasite Immunol.* 21(11), 555-563.
- Verhelst D, De Craeye S, Entrican G, Dorny P, Cox E. (2014).** Parasite distribution and associated immune response during the acute phase of *Toxoplasma gondii* infection in sheep. *BMC Vet. Res.* 10, 293.
- Verhelst D, De Craeye S, Jennes M, Dorny P, Goddeeris B, Cox E. (2015).** Interferon-gamma expression and infectivity of *Toxoplasma* infected tissues in experimentally infected sheep in comparison with pigs. *Vet. Parasitol.* 207(1-2), 7-16.
- Villard O, Candolfi E, Despringre JL, Derouin F, Marcellin L, Viville S, Kien T. (1995).** Protective effect of low doses of an anti-IL-4 monoclonal antibody in a murine model of acute toxoplasmosis. *Parasite Immunol.* 17(5), 233-236.
- Villegas EN, Lieberman LA, Mason N, Blass SL, Zediak VP, Peach R, Horan T, Yoshinaga S, Hunter CA. (2002).** A role for inducible costimulator protein in the CD28-independent mechanism of resistance to *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 169(2), 937-943.
- Vitor RW, Ferreira AM, Fux B. (1999).** Antibody response in goats experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. *Vet. Parasitol.* 81(3), 259-263.
- Vodička P, Smetana K Jr, Dvořánková B, Emerick T, Xu YZ, Ourednik J, Ourednik V, Motlík J. (2005).** The miniature pig as an animal model in biomedical research. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1049, 161-171.
- Vogell A, Boelig RC, Skora J, Baxter JK. (2014).** Bilateral bell palsy as a presenting sign of preeclampsia. *Obstet. Gynecol.* 124(2 Pt 2 Suppl 1), 459-461.
- *****
- Walzer KA, Boyle JP. (2012).** A single chromosome unexpectedly links highly divergent isolates of *Toxoplasma gondii*. *MBio* 3(1), e00284-e00311.
- Wanderley FS, Porto WJ, Câmara DR, da Cruz NL, Feitosa BC, Freire RL, de Moraes EP, Mota RA. (2013).** Experimental vaginal infection of goats with semen contaminated with the “CPG” strain of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 99(4), 610-613.
- Wanderley FS, Porto WJ, Câmara DR, de Oliveira VVG, Garcia JL, de Albuquerque PP, da Fonseca Oliveira AA, Mota RA. (2015).** Venereal transmission of *Toxoplasma gondii* in goats after a buck was experimentally infected. *Small Rumin. Res.* 123(2-3), 301-305.
- Wang T, Liu M, Gao XJ, Zhao ZJ, Chen XG, Lun ZR. (2011a).** *Toxoplasma gondii*: the effects of infection at different stages of pregnancy on the offspring of mice. *Exp. Parasitol.* 127(1), 107-112.
- Wang Y, Wang M, Wang G, Pang A, Fu B, Yin H, Zhang D. (2011b).** Increased survival time in mice

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

- vaccinated with a branched lysine multiple antigenic peptide containing B- and T-cell epitopes from *T. gondii* antigens. *Vaccine* 29(47), 8619-8623.
- Wastling JM, Nicoll S, Buxton D. (1993).** Comparison of two gene amplification methods for the detection of *Toxoplasma gondii* in experimentally infected sheep. *J. Med. Microbiol.* 38(5), 360-365.
- Wattegedera S, Rocchi M, Sales J, Howard CJ, Hope JC, Entrican G. (2008).** Antigen-specific peripheral immune responses are unaltered during normal pregnancy in sheep. *J. Reprod. Immunol.* 77(2), 171-178.
- Wattegedera SR, Doull LE, Goncheva MI, Wheelhouse NM, Watson DM, Pearce J, Benavides J, Palarea-Albaladejo J, McInnes CJ, Ballingall K, Entrican G. (2019).** Immunological homeostasis at the ovine placenta may reflect the degree of maternal fetal interaction. *Front. Immunol.* 9, 3025.
- Webster JP. (1994).** Prevalence and transmission of *Toxoplasma gondii* in wild brown rats, *Rattus norvegicus*. *Parasitology* 108(Pt 4), 407-411.
- Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. (1993).** Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol. Today* 14(7), 353-356.
- Weiss LM, Dubey JP. (2009).** Toxoplasmosis: a history of clinical observations. *Int. J. Parasitol.* 39(8), 895-901.
- Weissmann J. (2003).** Presumptive *Toxoplasma gondii* abortion in a sheep. *Can. Vet. J.* 44(4), 322-324.
- Wilkins MF, O'Connell E, Te Punga WA. (1987).** Toxoplasmosis in sheep I. Effect of a killed vaccine on lambing losses caused by experimental challenge with *Toxoplasma gondii*. *N. Z. Vet. J.* 35(3), 31-34.
- Williams EJ, O'Donovan J. (2009).** Ovine abortion: an overview. *Ir. Vet. J.* 62(5), 342-346.
- Williams RH, Morley EK, Hughes JM, Duncanson P, Terry RS, Smith JE, Hide G. (2005).** High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in longitudinal and cross-sectional studies on sheep farms provides evidence of vertical transmission in ovine hosts. *Parasitology* 130(Pt 3), 301-307.
- Wilson EH, Wille-Reece U, Dzierszynski F, Hunter CA. (2005).** A critical role for IL-10 in limiting inflammation during toxoplasmic encephalitis. *J. Neuroimmunol.* 165(1-2), 63-74.
- Wilson DC, Matthews S, Yap GS. (2008).** IL-12 signaling drives CD8⁺ T cell IFN- γ production and differentiation of KLRG1⁺ effector subpopulations during *Toxoplasma gondii* infection. *J. Immunol.* 180(9), 5935-5945.
- Winer N, Resche-Rigon M, Morin C, Ville Y, Rozenberg P. (2009).** Is induced abortion with

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

misoprostol a risk factor for late abortion or preterm delivery in subsequent pregnancies? *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 145(1), 53-56.

Wingstrand A, Lind P, Haugegaard J, Henriksen SA, Bille-Hansen V, Sørensen V. (1997). Clinical observations, pathology, bioassay in mice and serological response at slaughter in pigs experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. *Vet. Parasitol.* 72(2), 129-140.

Witola WH, Mui E, Hargrave A, Liu S, Hypolite M, Montpetit A, Cavailles P, Bisanz C, Cesbron-Delauw MF, Fournié GJ, McLeod R. (2011). NALP1 influences susceptibility to human congenital toxoplasmosis, proinflammatory cytokine response, and fate of *Toxoplasma gondii*-infected monocytic cells. *Infect. Immun.* 79(2), 756-766.

Witting PA. (1979). Learning capacity and memory of normal and *Toxoplasma*-infected laboratory rats and mice. *Zeitschrift fur Parasitenkd.* 61(1), 29-51.

Wolf A, Cowen D, Paige B. (1939). Human toxoplasmosis: occurrence in infants as an encephalomyelitis verification by transmission to animals. *Science* 89(2306), 226-227.

Wooding FB, Burton G. (2008). Comparative placentation: structures, functions and evolution. 1st Edition. Berlin, Germany. *Springer*. ISBN: 9783540787969.

Work K, Eriksen L, Fennestad KL, Moller T, Siim JC. (1970). Experimental toxoplasmosis in pregnant sows. I. Clinical, parasitological and serological observations. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. B. Microbiol. Immunol.* 78(2), 129-139.

Yao Y, Xu XH, Jin L. (2019). Macrophage polarization in physiological and pathological pregnancy. *Front. Immunol.* 10, 792.

Yarovinsky F, Sher A. (2006). Toll-like receptor recognition of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 36(3), 255-259.

Yarovinsky F, Zhang D, Andersen JF, Bannenberg GL, Serhan CN, Hayden MS, Hieny S, Sutterwala FS, Flavell RA, Ghosh S, Sher A. (2005). TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 308(5728), 1626-1629.

Young OM, Tang Z, Niven-Fairchild T, Tadesse S, Krikun G, Norwitz ER, Mor G, Abrahams VM, Guller S. (2015). Toll-like receptor-mediated responses by placental Hofbauer Cells (HBCs): a potential pro-inflammatory role for fetal M2 macrophages. *Am. J. Reprod. Immunol.* 73(1), 22-35.

Zenclussen AC, Gerlof K, Zenclussen ML, Ritschel S, Bertoja AZ, Fest S, Hontsu S, Ueha S, Matsushima K, Leber J, Volk HD. (2006). Regulatory T cells induce a privileged tolerant microenvironment at the fetal-maternal interface. *Eur. J. Immunol.* 36(1), 82-94.

Zhang R, Zhang H, Liu X, Fu Q, Xu X, Hu X. (2012). The immunoprotective role of interleukin-10 in

Capítulo IX. Referencias bibliográficas.

abnormal pregnancy outcome induced by *Toxoplasma gondii* infection. *Gynecol. Obstet. Invest.* 73(3), 223-229

Zhang L, Zhao M, Jiao F, Xu X, Liu X, Jiang Y, Zhang H, Ou X, Hu X. (2015). Interferon gamma is involved in apoptosis of trophoblast cells at the maternal-fetal interface following *Toxoplasma gondii* infection. *Int. J. Infect. Dis.* 30, 10-16.

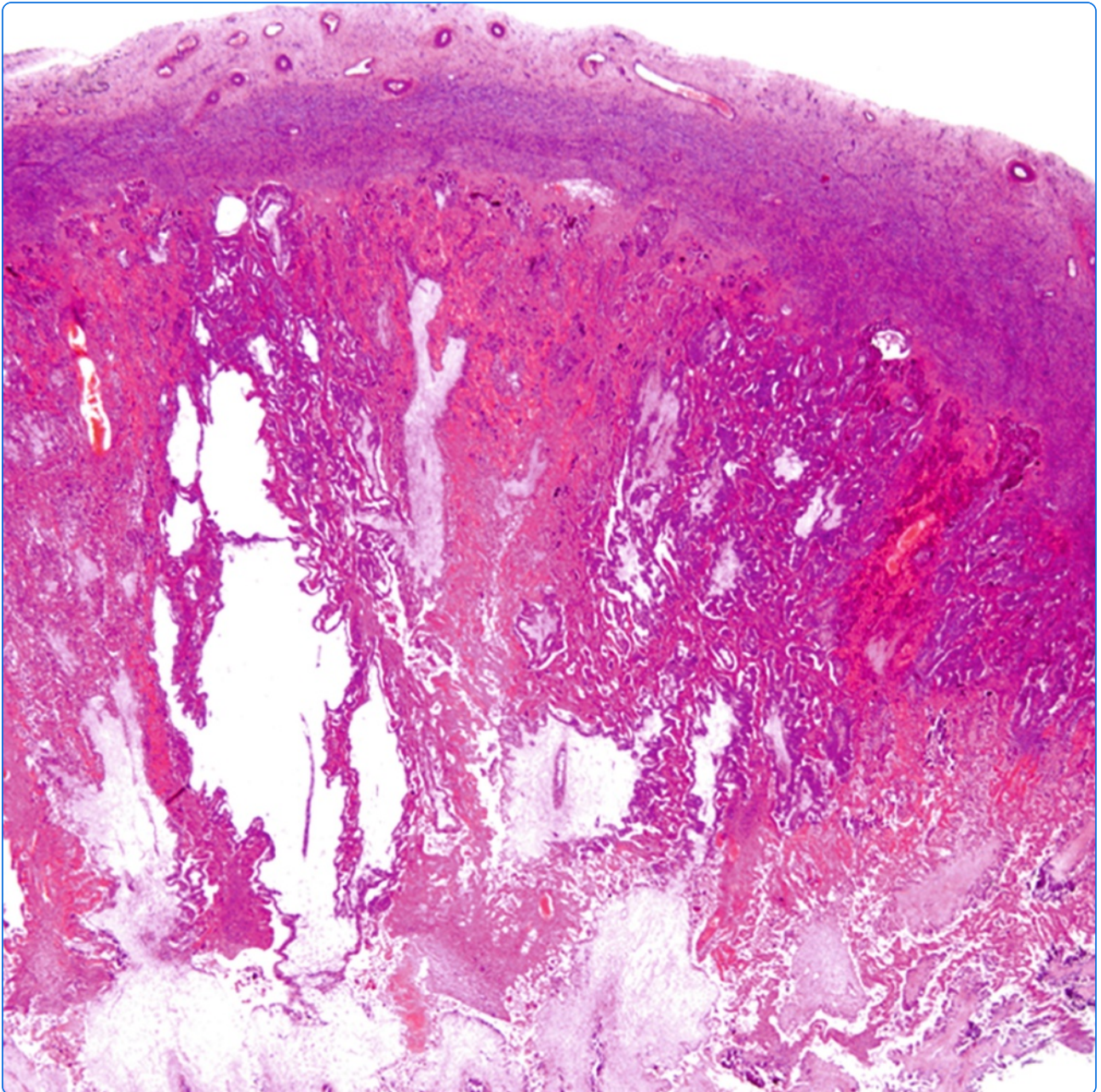
Zhang N, Wang S, Wang D, Li C, Zhang Z, Yao Z, Li T, Xie Q, Liu S, Zhang H. (2016). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection and risk factors in domestic sheep in Henan province, Central China. *Parasite* 23, 53.

Zhou Z, Liu Y, Li M, Gu JD. (2018). Two or three domains: a new view of tree of life in the genomics era. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102(7), 3049-3058.

Zorgi NE, Galisteo AJ Jr, Sato MN, do Nascimento N, de Andrade HF Jr. (2016). Immunity in the spleen and blood of mice immunized with irradiated *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Med. Microbiol. Immunol.* 205(4), 297-314.

Capítulo X.

Anexos: Publicaciones.



Placental thrombosis in acute phase abortions during experimental *Toxoplasma gondii* infection in sheep

Castaño *et al.*

RESEARCH

Open Access

Placental thrombosis in acute phase abortions during experimental *Toxoplasma gondii* infection in sheep

Pablo Castaño¹, Miguel Fuertes¹, Ignacio Ferre², Miguel Fernández¹, Maria del Carmen Ferreras¹, Javier Moreno-Gonzalo², Camino González-Lanza¹, Frank Katzer³, Javier Regidor-Cerrillo², Luis Miguel Ortega-Mora², Valentín Pérez¹ and Julio Benavides^{1*}

Abstract

After oral administration of ewes during mid gestation with 2000 freshly prepared sporulated oocysts of *T. gondii* isolate M4, abortions occurred between days 7 and 11 in 91.6% of pregnant and infected ewes. Afterwards, a further infection was carried out at late gestation in another group of sheep with 500 sporulated oocysts. Abortions happened again between days 9 and 11 post infection (pi) in 58.3% of the infected ewes. Classically, abortions in natural and experimental ovine toxoplasmosis usually occur one month after infection. Few experimental studies have reported the so-called acute phase abortions as early as 7 to 14 days after oral inoculation of oocysts, and pyrexia was proposed to be responsible for abortion, although the underline mechanism was not elucidated. In the present study, all placentas analysed from ewes suffering acute phase abortions showed infarcts and thrombosis in the caruncular villi of the placentomes and ischemic lesions (periventricular leukomalacia) in the brain of some foetuses. The parasite was identified by PCR in samples from some placentomes of only one sheep, and no antigen was detected by immunohistochemical labelling. These findings suggest that the vascular lesions found in the placenta, and the consequent hypoxic damage to the foetus, could be associated to the occurrence of acute phase abortions. Although the pathogenesis of these lesions remains to be determined, the infectious dose or virulence of the isolate may play a role in their development.

Introduction

Ovine toxoplasmosis is a zoonotic disease of sheep caused by the infection of the protozoan *Toxoplasma gondii* that results in heavy economic losses for the sheep industry as it is a major cause for reproductive failure. High seroprevalence of infection has been worldwide reported, and it is recognised as one of the main ovine infectious abortifacient in those countries with a significant sheep industry [1]. Congenital transmission to the foetus occurs mainly when sheep are infected for the first time during pregnancy and the outcome of the infection depends on the gestational age at the time of transplacental transmission. Infections during the early and mid pregnancy are usually associated with the occurrence of abortion, while infection

in late pregnancy would produce a congenitally infected but viable lamb [2].

Despite the great importance of this disease, for both animals and public health, the cause of abortion in toxoplasmosis not yet fully understood [3]. Early foetal death is thought to be caused by the direct damage of the parasite replication in the foetus, while foetal death later in gestation may result from anoxia caused by extensive necrosis in the placentomes [4]. Lesions in the placenta could appear as soon as 10 days after infection, and are characterized by multiple small foci of necrosis in the caruncular septa. Lesions in the foetus could be found from day 15 post infection (pi), although are more frequent from day 20, affecting the brain, heart, lung and liver. They are characterized by multiple foci of necrosis with an eosinophilic central area that can be surrounded by glial cells in the brain or mononuclear inflammatory cells elsewhere when infection occurs at mid or late

* Correspondence: j.benavides@eae.csic.es

¹Departamento de Sanidad Animal, Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), Grulleros, 24346 León, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

gestation [5]. Parasite can be identified in relation to microscopic lesions by immunohistochemical labelling of histological slides or PCR amplification of *T. gondii* [6].

Once the infection occurs, there is generally a delay of 4 weeks until the occurrence of the abortion [3]. However, in a number of experimental studies, oral inoculation of sheep with sporulated oocysts of *T. gondii* resulted in an earlier abortion between days 7 and 14 pi. For such presentation of ovine toxoplasmosis, the term “acute phase abortion” was coined [7,8]. In these cases, the parasite was not found in placental or foetal samples and the ewes did not show serological antibodies against the parasite at the time of abortion, although these were detected few days after [8]. No histological examination of the placenta or foetus was carried out in these cases so the absence of detectable parasite in them led the authors to propose that the pyrexia developed after the infection was the cause of abortion, although the exact mechanisms involved were not elucidated [7,8]. Furthermore, the authors raised the hypothesis that the occurrence of acute phase abortions related to toxoplasmosis may be seriously under diagnosed in the field due to the lack of antibody response and parasite detection [7]. It was estimated that 1 out of every 7 abortion associated with toxoplasmosis could be acute phase abortions [8].

In the current study we report the occurrence of acute phase abortions during an experimental infection of sheep with sporulated oocysts of *T. gondii* at mid and late gestation. In addition, in these foetuses and their dams, clinical, histopathological, PCR and immunological studies were carried out in order to investigate the pathogenesis of this clinical presentation of ovine toxoplasmosis.

Materials and methods

Inoculum preparation

Sporulated oocysts were obtained through oral infection of cats according to the methods proposed elsewhere [9]. Briefly, ten 8 week-old female Balb/c mice (Charles River Laboratories, France) were inoculated intra peritoneally with 10^4 tachyzoites of the M4 isolate of *T. gondii* (Moredun Research Institute, Edinburgh, Scotland, UK) suspended in 200 μ L PBS. All infected mice were treated with sulphadimidine sodium (0.3 mg/mL in drinking water) for 14 days, beginning 10 days post-infection (dpi), to minimize morbidity and prevent death. At 4 months post-inoculation mice were humanely euthanized by CO₂ asphyxiation and brains were removed from each mouse. Two twelve-week-old specific-pathogen-free kittens (Isoquimen S.L., Barcelona, Spain) were fed a pool of 3 brains each from the infected mice.

Faeces were collected from kittens daily and examined by zinc sulfate double centrifugation to detect shedding of *T. gondii* oocysts as well as to monitor a possible co-infection with other parasites. Unsporulated oocysts were

harvested from faeces using a saturated sodium chloride solution to concentrate them by flotation [10]. Oocysts were counted on a hemocytometer. Oocysts were sporulated by resuspending on H₂SO₄ 2% for 4 days at room temperature. Sporulated oocysts were kept at 4 °C until used. All procedures were conducted in a biohazard hood.

Animals and experimental design

Seventy pure Churra breed sheep aged approximately 12 months (born at the same flock within the same lambing season from synchronized ewes), seronegative for *T. gondii*, *Neospora caninum*, Border disease virus, *Coxiella burnetii* and *Chlamydophila abortus* were oestrus synchronized and mated with pure breed Churra tups for 2 days, after which the rams were removed from the ewes. Pregnancy and foetal viability were confirmed by ultrasound scanning on day 40 after mating and forty-eight pregnant sheep were selected for the experiment. The animals were randomly allocated into two groups: A and B. Each group was composed of twenty-four animals: sixteen sheep to be infected and eight uninfected-control animals. Animals were observed by a veterinarian twice daily throughout the experiment.

Each group was independently allocated for two different experimental infections. For the first infection, sixteen animals from group A were each inoculated with 2×10^3 sporulated oocysts diluted in 50 mL of PBS, orally administered in a single dose, on day 90 of gestation. Oocysts were used one month after sporulation. For the second infection, carried out thirty days later, sixteen sheep from group B each inoculated at day 120 of pregnancy with a single oral dose of 5×10^2 sporulated oocysts from the same batch as used before. In each group, eight sheep received 50 mL of PBS without oocysts as negative control of infection. Rectal temperatures were recorded from group B animals two days before inoculation and then daily until 14 dpi.

Initial design of the experiment involved the serial culling of four infected and two uninfected-control animals at 5, 12, 21 and 26 dpi by intravenous barbiturate overdose.

All animal procedures complied with the Guidelines of the European Union Council (2010/63/EU) for the use of laboratory animals and were in accordance with local national guidelines (RD 1201/2005) which regulates the welfare of animals used for experimentation. They were also approved by the Complutense University of Madrid and CSIC bioethics committee.

Histological processing and immunohistochemical labelling of tissues

Post-mortem examinations of all the culled ewes and foetuses recovered were carried out immediately after euthanasia (or abortion in a number of cases. See Results

section) and tissue samples were taken and placed into 10% formaldehyde in buffered saline. From each placenta, ten randomly selected placentomes were chosen and sliced coronally. Maternal samples included brain and iliofemoral (uterine) and mesenteric caudal lymph nodes. Foetal tissue samples included brain, spinal cord, apex of the heart, lung, liver, kidney, thymus and semi-tendinosus muscle. After fixation for less than five days, maternal and foetal brains were cut coronally, embedded in paraffin wax and processed, with the rest of the samples, by standard procedures for haematoxylin and eosin staining. Selected sections from the placentomes were stained with Martius, Scarlet and Blue (MSB) for the detection of fibrin.

After microscopic examination, selected tissue sections from the placental and foetal brain samples of all animals were immunolabelled for *T. gondii* antigens using a polyclonal specific serum according to previously described methods [11].

Tissue DNA extraction and detection of *T. gondii* DNA by PCR

Tissue pieces from the placentomes that were taken for histological examination were also collected for parasite DNA detection by PCR. Samples of the liver from fetuses were also collected during necropsy and maintained at -20°C for PCR analysis. Each PCR analysis was carried out in 5 pieces of different placentomes from each ewe and three different DNA extractions from each foetal tissue sample.

Genomic DNA was extracted from 20–50 mg of tissue using the commercial kit Maxwell[®] 16 Mouse Tail DNA Purification Kit, developed for automated Maxwell[®] 16 System (Promega, Wisconsin, USA) following the manufacturer's recommendations. The concentration of DNA for all samples was determined by UV spectrophotometry and adjusted to 50–100 ng/ μL . *T. gondii* DNA detection was carried out by a ITS1 PCR adapted to a single tube following procedures previously described [12]. Each PCR reaction was performed in a final volume of 25 μL using 5 μL of genomic DNA as template under PCR conditions as described [12]. Negative controls, including reactions without a template and DNA samples from non-infected fetuses were included in each round of DNA extraction and PCR. In each batch of amplifications, positive PCR controls with a quantity of *T. gondii* genomic DNA equivalent to 10 and 1 tachyzoites were also included. Positive controls were prepared by serial dilutions in a sheep genomic *T. gondii* PCR-negative DNA solution of 20 ng/ μL . PCR products were visualized under UV light in 1.5% agarose/ethidium bromide gel. A reaction was determined as positive when a band of 227 bp was detected.

Analysis of the peripheral humoral immune response

Sheep blood samples were collected from both groups at days -7 , 0, 5, 11, 16, 21 and 25 pi by jugular venipuncture into 10 mL vacutainer tubes (Terumo Europe) without coagulant and allowed to clot. Serum was removed by centrifugation and samples were stored at -20°C until they were used in an in-house indirect ELISA to measure anti *T. gondii* antibodies. Soluble antigens prepared from tachyzoites of ME49 isolate were used to coat 96 well microtiter plates. For this, 100 μL /well of antigen at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ diluted in carbonate buffer (63 mM, pH 9.6) was incubated overnight at 4°C . Subsequently, non specific binding was blocked by adding 100 μL of bovine serum albumin diluted 0.05% in phosphate buffer saline (0.1 M, pH 7.6) containing 0.05% Tween 80 (PBST). After 2 h incubation at room temperature the plates were washed four times with PBST. Sera samples were diluted 1:100 in PBST and 100 μL of this dilution was added to each well and incubated for 60 min at room temperature. All samples were analysed in duplicate. After four washes in PBST, 100 μL of horseradish peroxidase conjugate protein G (Biorad, Hercules, USA) diluted 1:1500 in PBST was added as secondary Ab and incubated for 1 h at room temperature. Plates were washed as above before the addition of 100 μL per well of substrate ABTS (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) diluted 5.48 mg in 50 mL of citrate buffer 0.05 M, pH 4.0 with 0.0016% hydrogen peroxide. The reaction was stopped after 30 min at room temperature by the addition of 40 μL per well of a solution of hydrofluoric acid 0.1 M, and the OD read at 405 nm. In each plate, samples from the same positive and negative control sera were tested. The results were given as percent of positivity of the OD ration value ($\text{PP} = [\text{OD sample} - \text{OD negative control}] / (\text{OD positive control} - \text{OD negative control}) \times 100$).

Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) stimulation assay and Interferon-gamma (IFN- γ) production analysis

Blood samples were collected from both groups at days -7 , 0, 5, 11, 16, 21 and 25 pi by jugular venipuncture into 10 mL vacutainer tubes (Terumo Europe) with lithium heparin as anticoagulant. PBMCs were isolated by Ficoll gradient centrifugation following procedures previously described [13]. Once isolated, PBMCs were resuspended in RPMI 1640 medium (Gibco, Paisley, UK) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Lonza, Belgium) and 100X antibiotic/antimycotic solution (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) to a concentration of 1×10^6 cells/mL. The assays were performed in 24-well flat-bottom plates (Nunc, Roskilde, Denmark), with 5×10^5 cells/well cultured with soluble antigen of *T. gondii* at a final concentration 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, concanavalin A (ConA, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) at a final concentration of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, or in medium alone. All cultures were performed in duplicate for each stimulus. Plates were

cultured in a 5% CO₂/37 °C/100% humidity atmosphere for 96 h. Thus, cell-free culture supernatants were stored at -70 °C for cytokine analyses.

Supernatant was assayed in duplicate for IFN-γ detection using a commercial bovine enzyme immunoassay kit (Bovigam; Prionics AG, Switzerland). Mean optical density (OD) for each experimental animal was calculated as the mean OD obtained from each supernatant from the *T. gondii* antigen stimulated cells divided by the mean OD of the same cells incubated with medium alone (negative control). Afterwards, mean OD was calculated for each experimental group. Supernatant from ConA stimulated cells were processed in a similar way as positive control for stimulation but not included in the analysis.

Statistical analysis

Data of rectal temperature, IFN-γ and serological antibodies production were subjected to one-way analysis of variance using the general linear model procedure of SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC). The model included the fixed effect of the experimental treatment, where the animal was considered as the experimental unit. Logarithmic transformation of IFN-γ and serological antibody data was used to submit them to normal distribution. Analysis was performed for each sampling day and differences between means were determined with the Tukey test. Significance was declared at $P < 0.05$ unless otherwise indicated.

Results

Clinical observations

The most striking finding in the two groups was the occurrence of early abortions between days 7 and 11 pi.

In the first trial of experimental infections, according to the experimental design, six sheep (four infected and two controls) were culled from each group on day 5 pi, as scheduled (Table 1). These animals showed no evident clinical signs of disease, and all the foetuses from them were viable.

Then, between days 7 and 11 pi, eleven sheep from group A (91.6% of the remaining infected sheep) aborted; one on day 7 and eleven between days 10 and 11. Then, the only remaining infected and not aborting sheep, plus

two control animals, were culled on day 12 pi. The four control animals left delivered at full term and their lambs were culled 12 h after birth.

After the occurrence of this high percentage of abortions in group A, the dose of infection for group B was dropped from 2×10^3 to 5×10^2 in a subsequent experimental infection. Similarly as in Group A, (four infected and two controls) were culled from each group on day 5 pi, as scheduled (Table 1). The infected sheep culled showed an elevation of rectal temperature at days 4 and 5 pi (Figure 1). Apart from this, no other evident clinical signs of disease were observed and all the foetuses from these animals were viable at the time of euthanasia. Then, in this group, seven sheep aborted (58.3% of the remaining infected sheep on the group) between days 9 and 11 pi; three on day 9, other three on day 10 and one on day 11. Afterwards, and according to the experimental design, two infected sheep, without any sign of disease, other than the transitory elevation of rectal temperature, were culled on day 12, along with two control animals. On day 21 pi, five sheep (three infected and two control), were culled, none of them having shown signs of disease other than transitory fever of the infected sheep (Figure 1). All the foetuses carried by the infected and control ewes culled on days 12 or 21 pi were viable at the time of euthanasia. Finally, two non infected ewes were left to deliver at the end of their pregnancy. Their lambs were culled 12 h after birth.

When analysing the temperature of animals from group B, statistically significant differences in the mean rectal temperature were found between infected and control sheep at days 2, 5 and 6 pi ($P < 0.001$). The mean temperature of the infected group was higher from days 4 to 7 pi, with a peak of 41.3 °C on day 6 pi. When analysing groups of aborting and non aborting animals within the infected sheep, no significant differences were found between them (Figure 1).

Gross and microscopic lesions

Infected ewes showing early spontaneous abortion

From all the sheep that suffered abortion, only eight (four from group A and four from group B) were examined. The remaining placentas were too autolytic to be properly evaluated. These eight placentas and all the aborted foetuses had the same gross and microscopic findings, regardless of the experimental group (Table 2).

The placentas showed a dark red surface. The amniotic liquid was turbid and the foetuses, none of them viable, showed variable degree of autolysis and oedema.

Histologically, few multifocal to coalescent areas of coagulative necrosis surrounded by a marked vascular congestion, consistent with infarcts, were observed in the placentomes. These areas were triangular in shape with the base at the endometrial stalk of the placentome

Table 1 Distribution of experimental animals according to the inoculated dose and dpi when culled or abortion occurred.

Group	Challenge	No sheep per day ^Δ				
		5 dpi	7-11 dpi [‡]	12 dpi	21 dpi	Lambing
A	2×10^3 [†]	4/2	11/0	1/2	0/0	0/4
B	5×10^2	4/2	7/0	2/2	3/2	0/2

^Δ: infected/control sheep; [†]: sporulated oocysts orally dosed; [‡]: spontaneous abortions, the other timepoints correspond to serials culling of pregnant ewes.

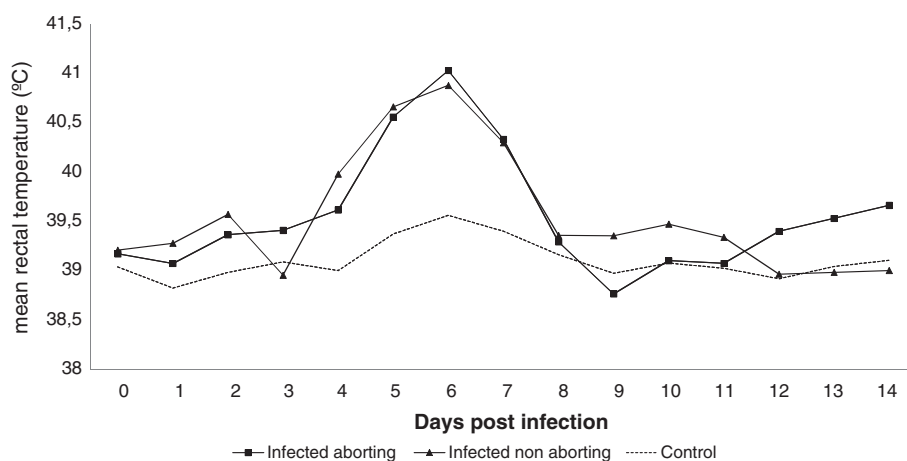


Figure 1 Mean rectal temperature following *T. gondii* oocysts challenge. Infected ewes, either showing abortion or not, showed elevation of rectal temperature between days 4 and 7 pi, with a peak of fever, over 40.5°, at day 6. Mean temperatures of control animals remained under 39.5° for the whole experiment.

(Figure 2a) and involved a discrete group of maternal villi. They generally occupied the mid region of the placentome or could extend to the arcade or chorionic plate.

In the areas of infarct, the stroma of the caruncular villi appeared highly eosinophilic and amorphous, with scant chromatin debris from necrotic cells. These villi were denuded of epithelial cells, which were desquamated and appeared as eosinophilic, necrotic debris between the remnants of caruncular and cotyledonary villi (Figure 2b). Within the septa, the vessels were congested and dilated. Inside some of the vessels of this area, thrombi composed of masses of a hyaline amorphous material stained positive for fibrin by MSB technique and containing interspersed blood cells, were identified (Figures 2c and d). The foetal villi that were located in the vicinity of the necrotic caruncular villi showed hyalinization of the mesenchyme (more evident in those from group A, infected at 90 days of gestation, when the mesenchyme is more prominent) and necrosis of the trophoblasts (Figure 2b). The latter suffered a variety of

degenerative changes, ranging from cytoplasmic eosinophilia shrinkage, nuclear pyknosis and karyorrhexis, to complete detachment from the foetal villi, forming isles of necrotic debris together with the remnants of epithelial maternal cells.

The studied foetuses also showed a variable degree of autolysis that hampered the sampling procedure, especially in those foetuses already expelled when found. In most of these cases, no more than one slide with unrecognizable areas of the brain was available for histological examination. Two of the twenty five examined foetuses were mummified. Histological examination showed microscopic lesions in only eight out of the twenty five foetuses (Table 2). They were located in the brain and characterized by scarce foci of coagulative necrosis and discrete axonal swelling in the periventricular area (Figure 2e), and generalized congestion of the white matter vessels. Besides the foci of leukomalacia, one of these foetuses showed numerous, minute haemorrhages in the white matter. No other brain lesions were found in the rest of the foetuses.

Table 2 Percentage of studied cases showing histological lesions and/or *T. gondii* DNA identification according to the inoculated dose and dpi when culled or abortion occurred.

Group	Challenge	% of positives out of the studied cases [^]									
		5 dpi		7–11 dpi [‡]		12 dpi		21 dpi		Lambing	
		HE	PCR	HE	PCR	HE	PCR	HE	PCR	HE	PCR
A	2 × 10 ³ †	0/0	0/0	100/9	0/0	0/0	100/0	ns	ns	0/0	0/0
B	5 × 10 ²	0/0	0/0	100/63	33/0	0/0	100/0	§100/75	100/100	0/0	0/0
Total		0/0	0/0	100/32	25/0	0/0	100/0	§100/75	100/100	0/0	0/0

[^]: numerator: percentage of placentas showing lesions/*T. gondii* DNA identification, denominator: percentages of foetuses showing lesions/*T. gondii* DNA identification; †: sporulated oocysts orally dosed; ‡: spontaneous abortions, the other timepoints correspond to serials culling of pregnant ewes; §: These were lesions of "classical" toxoplasmosis.

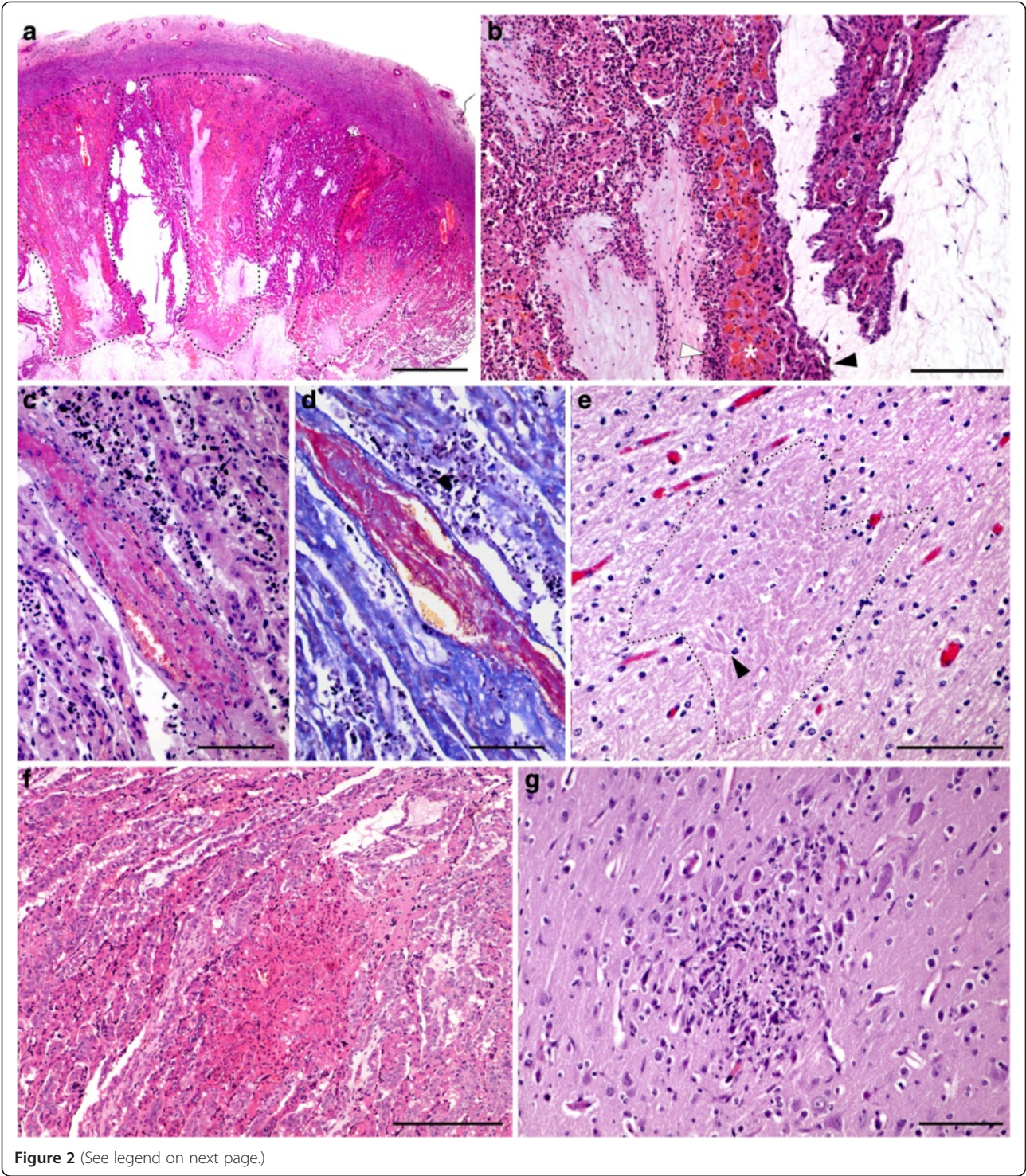


Figure 2 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Figure 2 Histological lesions of placenta and fetuses from infected ewes. **a:** Coronal section of a placentome from an acute case abortion. Several triangular areas of coagulative necrosis, involving both caruncular and cotyledonary villi (dotted line). HE. Bar = 2 mm. **b:** Thrombosis in the placenta of an acute abortion case. The thrombus is partially occluding the lumen of the vessel in the caruncular septa. HE. Bar = 100 µm. **c:** The presence of fibrin forming the thrombus is shown by the red staining in a serial section from the same placentome shown in **b**. MSB. Bar = 100 µm. **d:** Placentome from an acute abortion case. Detail from the margin of an infarct. The picture is divided in two areas by a caruncular villi showing congestion of the septal vessels (asterisk). At the left side there is abundant cellular debris between the denuded caruncular and foetal villi (white arrowhead). Caruncular villi in this area are necrotic, while cotyledonary villi show mesenchymal hyalinization. Note the relatively spare cotyledonary villus at the right side of the picture, with clear mesenchyme and intact trophoblasta layer (black arrowhead), and also the caruncular villus at the right superior corner with no evident lesions. HE. Bar = 200 µm. **e:** Area of leukomalacia (dotted line) in the white matter of a foetal brain from an acute phase abortion. Note numerous axonal spheroids (arrowhead) within the focus of malacia. HE. Bar = 100 µm. **f:** Necrotic in the placentome of an infected ewe culled at 21 dpi. The lesion affects both caruncular and cotyledonary villi. Bar = 25 µm. **g:** Focus of coagulative necrosis in the foetal white matter from an infected ewe culled at day 21 pi. Note the abundant infiltration of glial cells surrounding the necrotic focus. HE. Bar = 100 µm.

No parasite was detected in any of the sections from the placenta or the foetal brain when the immunohistochemical technique was applied.

Non-aborted infected ewes culled according to schedule

No gross or microscopic lesions were found in the placentas or fetuses of any of the animals culled on day 5 pi (eight sheep in total, four from each group), or on day 12 (one from group A and two from group B, Table 2).

The placentas and three out of four fetuses from the three sheep culled on day 21 pi from group B showed lesions compatible with those described classically as associated with ovine toxoplasmosis (Table 2). In the placenta, they were characterized by a mild multifocal necrotic placentitis denoted by several well-delimited areas of coagulative necrosis in the septum of caruncular villi with absence of evident inflammatory cell infiltration (Figure 2f). No vascular changes were detected in any case.

While no parasites were recognised under HE staining, numerous parasitophorous vacuoles were evident inside this foci when section were immunolabeled against *T. gondii* antigen.

Affected fetuses showed a multifocal non-purulent hepatitis characterized by several randomly distributed foci of lymphocytes and macrophages; occasionally, they were surrounding a small area of central necrosis. This inflammatory infiltrate was also present in the periportal spaces of the liver. Two out of these fetuses also showed a perivascular infiltration of mononuclear cells in the lung. Few glial foci with a central area of necrosis were detected in the brain of one foetus (Figure 2g). Immunohistochemical labelling of these samples showed the presence of few parasitophorous vacuoles within the necrotic area of the brain and liver in the three fetuses.

Control ewes

No gross or microscopic lesions were found in any of the placentas or fetuses from the control ewes studied.

Identification of *T. gondii* DNA in tissue samples

Tissue samples from the placentomes of four aborted ewes (one from group A and three from group B) were analysed by PCR for parasite detection. Besides, placentome samples from further five non aborting ewes (three infected and two control) were also processed for PCR analysis: one from group A, culled at day 12 pi; two from group B euthanized at 12 and 21 dpi respectively and one uninfected control animal from each group.

As shown in Table 2, toxoplasma specific DNA was detected in the placentomes from one ewe (Group B, aborted on day 9 pi) out of four aborted dams analysed (25%), and in two out of the three infected non aborted ewes examined (66.6% of the examined), one studied at day 12 pi (group A) and the other culled at day 21 pi (group B). No parasite DNA was identified in the placentas from the control sheep studied.

Liver samples from aborted fetuses (eleven from Group A and nine from Group B), fetuses from infected and non aborted ewes (one from group A, culled at 12 dpi, and three from Group B, two culled at day 12 pi and one at day 21 pi) and fetuses from non infected dams (two, one from each group, culled at day 12 pi) were processed for molecular detection of *T. gondii*.

The liver samples from the twenty aborted fetuses were all negative (Table 2). Regarding the fetuses from infected non aborted ewes, only the foetal liver from one sheep culled at day 21 pi (Group B) was positive for *T. gondii* DNA while no parasite was found in the remaining five fetuses studied. The two fetuses from control ewes were also negative (Table 2).

Serological antibodies against *T. gondii*

Figure 3 shows the Ab production in the different experimental animals. With the purpose of analysing the relationship between the presence of serological Ab against *T. gondii* and the occurrence of acute phase abortions, experimental ewes have been grouped regardless of the time of gestation when they were infected, into the following

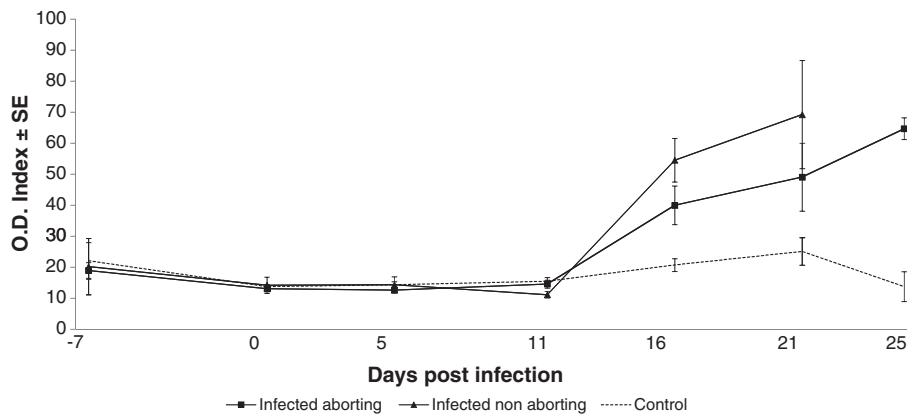


Figure 3 Kinetics of the antibody production in infected and control ewes. Infected animals showed an increase on serological antibodies from day 16 pi. Differences between ewes suffering or not acute phase abortions were not significant.

three groups: sheep suffering abortion, infected and non aborting ewes (culled at day 5 pi -Groups A and B- and days 12 and 21 pi -only Group B) that had not suffered abortion, and finally a control group made up of all the non infected sheep. It is noteworthy that ten, out of eighteen aborted sheep, were not culled and remained alive for the duration of the experiments, so they were sampled for γ -IFN production and serological antibodies assays. In any case, no significant differences were observed in the kinetic of serological antibodies when comparing the infected sheep from group A and B.

All infected ewes, regardless of the occurrence or not of abortion, showed a sudden increase in the O.D. value at 16 dpi that was progressively increasing until the end of sampling. At days 16, 21 and 26 pi, the O.D. of the infected sheep (aborting and non aborting) was significantly higher ($p < 0.01$ on days 16 and 21 pi, and $p < 0.001$ on day 26 pi) than the control sheep. Although the aborting

ewes showed a lower mean O.D. value than the infected non aborting sheep on days 16 and 21 pi, this difference was not statistically significant.

IFN- γ production analysis

Similarly as with the analysis of the serological response, γ -IFN production by PBMCs was analysed grouping data according to the occurrence of abortion or not on sheep and a control group. All infected sheep showed a weak increase in the production of IFN- γ (< 2.5 fold-change over basal levels). However, there was a significant ($p < 0.001$) increase in IFN- γ production at day 5 pi of the aborting sheep when compared to the control group, while the mean OD index of the infected non aborting sheep was in between both groups. A non significant increase in IFN- γ production was observed in the infected but non aborting ewes when compared to the control group at day 11 pi (Figure 4).

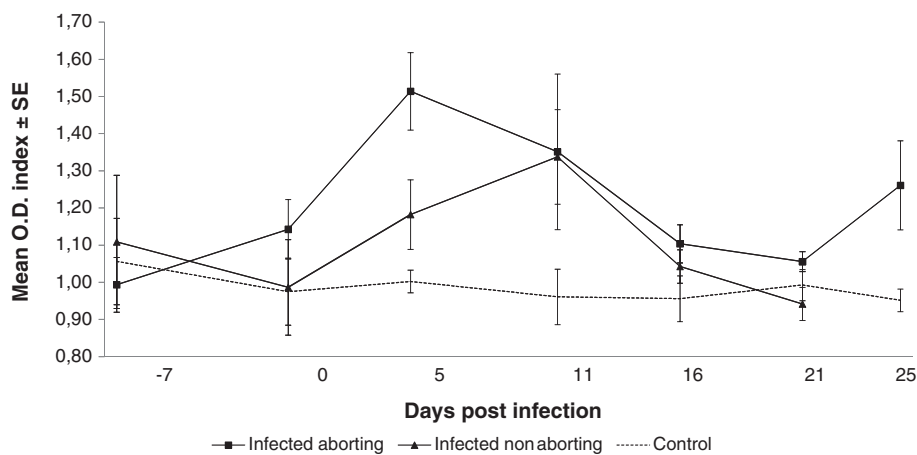


Figure 4 Kinetics of the specific IFN- γ release by PBMC stimulation assay against *T. gondii* antigen. Although differences between ewes suffering or not acute phase abortions were not significant, the peak of IFN- γ release appeared sooner in the former than in the latter. Values of the O.D. index in the control group remained low over the whole experiment.

Discussion

In this study we analyse the main clinical, pathological, parasitological and immunological findings associated with the occurrence of numerous acute phase abortions in experimentally infected sheep after oral inoculation with 2000 or 500 sporulated oocysts of *T. gondii* M4 isolate. The occurrence of acute phase abortions in ovine toxoplasmosis has been previously reported in a few experimental studies [7,8]. Similarly to those descriptions, the ewes suffering acute phase abortion in the current study had no detectable serological antibodies against *T. gondii* at the time of abortion nor foetal or placental lesions associated with the presence of *T. gondii*. None of the placentas or foetuses from aborting ewes showed *T. gondii* antigen either. Furthermore, parasite DNA detection was limited to some placentomes from one out of eight aborting sheep and it was undetected in foetal samples. All these features are different from what is regularly found in "classical" toxoplasmosis abortions. This has serious implication for the diagnosis of the disease in field cases of reproductive failure, as samples usually taken when the abortion occurs, generally foetus, foetal membranes and maternal serum, would be negative to parasite DNA or specific antibodies detection.

The pathogenesis of the abortion in ovine toxoplasmosis is not yet well understood [1] but it seems to require the presence of the parasite in the placenta. It is thought that abortion in early pregnancy is a consequence of the damage caused by the replication of the parasite in foetal tissues [5] or due to immunological imbalance in the maternal-foetal interface [2], while foetal death in late gestation would be the consequence of lack of placental function due to extensive necrotic lesions in the placentomes caused by the parasite [14]. However, in previous descriptions of acute phase abortions, parasite DNA was not found in the placentas or foetal samples [7,8]. The improved sensitivity of the ITS-nested PCR technique used in the current analysis, compared to previous studies, may have allowed the identification of *T. gondii* DNA in one out of four placentas analysed from aborting ewes. The scarcity of positive identification by PCR, plus the absence of parasite antigen in the placentomes, may suggest that the replication of the parasite in placenta or foetus was not the direct cause of these abortions. In previous studies, it was suggested that the pyrexia developed after the infection could have been the trigger for those abortions, although no specific mechanism for their occurrence was elucidated [7,8]. It has been shown that hyperthermia from febrile infections can result in abortions or, when the temperature elevation is not too high, in birth defects mainly affecting the central nervous system [15]. In the present study, those infected sheep not suffering abortion showed a similar curve of body temperature

than ewes having acute phase abortions, reaching more than 41 °C degrees at the peak of the fever episode, with no significant differences in the temperature between both infected groups. In none of the cases were malformations of the CNS noticed during post mortem analysis. Furthermore, in numerous studies where pregnant sheep were also orally infected with sporulated oocysts and showed similar episodes of fever, developing body temperatures higher than 41°, the occurrence of acute phase abortions was not described in any of them [5,16-18]. According to these results, it can be concluded that hyperthermia alone is unlikely to be the cause of acute phase abortions in toxoplasmosis.

The infectious inoculum, either the dose, the viability of the inoculated oocysts or the virulence of the used isolate, could have played a role in the triggering of abortions. The dose administered at day 90 of gestation (2000 sporulated oocysts), has been previously used in several studies without the occurrence of acute phase abortions [16,18-20]; however, acute phase abortions were recorded in other studies using the same dose [7,8]. A recent study employed a higher dose of oocysts (3000) of the same isolate (M4) without finding any acute phase abortion [21], also suggesting that the isolate used in this experimental inoculation was not especially virulent. In the current study, the dose used at day 120 of gestation in group B, which was dropped to 500 oocysts, caused a significant reduction in the number of acute abortions in comparison with the 2000 oocysts administered to group A (91.6% vs. 58.3%). Both results are striking not only due to the lack of occurrence of acute phase abortions using 2000 oocysts in previous works [16,18-21], but also because a dose as low as 500 oocysts induced such high rate of them at the last term of pregnancy, suggesting that the dose inoculated is playing a role in the occurrence of acute phase abortions. In our study, sporulated oocysts were used shortly after their shedding from cats, within a month. It seems then feasible to speculate that the viability of these oocysts was extremely high and this could be the cause of an overwhelming exposure of the pregnant ewes to a high number of parasites at one point. It has been suggested that significant variability in the viability of oocysts could be the cause of different findings in experimental studies using similar doses, so the verification of the infectivity by bioassay was recommended as a way to standardized protocols [1]. A dose of 100 oocysts from the batch used in the current experiment caused 100% mortality 4 weeks after infection of mice, Porton strain (Frank Katzer, data not shown).

On the other hand, the participation of the virulence of the isolate in the occurrence of the abortions should also be considered. It has been described that the continuous passage of toxoplasma in mice could enhance its virulence [22]. Because the oocysts used in the current

experiment were from an isolate (M4) that cannot be considered a strain, there is a possibility that there has been a selection towards high virulence within the isolate during the successive passages, especially because of the sulphadimidine treatment. This sulfonamide would mitigate the effect of the more aggressive variants within the isolate and helped to maintain them without being lethal to the mice. The increase of virulence of the isolate is sudden, occurring from one passage to another [22], which may explain why previous infections with the same isolate were not associated with acute abortions [21] while causing them in the current study after a limited number of passages.

The gestational age, and not only the reduction of the infectious dose, could have also influenced in the variation of abortion rate between both groups. The period of gestation when infection occurs is a key factor which determines the consequences of ovine toxoplasmosis. While abortion is the most common consequence after infection in midgestation, viable congenitally infected lambs could be born when it occurs later [2]. Also, the breed of the sheep may be another factor involved in the high number of acute phase abortions found in this study. It has been suggested that certain breeds, such as Charollais, are more susceptible to suffer abortions caused by *T. gondii* infection than Suffolk sheep [23]. It might be the case that Churra breed is more susceptible to develop acute phase abortions than other breeds when infected by *T. gondii*. However, toxoplasmosis is a common disease among sheep in our region and practitioners or farmers with Churra flocks have not observed any abnormal susceptibility of this species to suffer from abortions, either from *T. gondii* or any other abortifacient agent. The implication of these two variables, gestational age and breed, in the pathogenesis of acute phase abortions deserves further investigation.

None of the studied placentas or fetuses from ewes suffering acute phase abortion showed typical lesions of toxoplasmosis, in opposition to those ewes culled at 21 dpi. Instead, all placentomes from acute phase abortions showed infarcts and thrombosis in the caruncular septum. Besides, a number of fetuses from these episodes showed periventricular leukomalacia, a lesion already associated with fetuses suffering hypoxia at midgestation [24]. These pathological findings strongly suggest a different pathogenic mechanism in the development of abortion between acute phase and classical toxoplasmosis.

Thrombosis and associated ischemic necrosis (infarcts) in the caruncle are common lesions related to abortion in ruminants. They are mainly due to mycotic and few bacterial infections of the placenta that cause severe vasculitis characterized by abundant infiltration of inflammatory cells [25]. Such infiltration was absent in all the studied cases of acute phase abortions, so the pathogenesis of the

thrombosis is thought to be triggered by mechanisms other than the inflammation of the vascular wall. *T. gondii* tachyzoites can replicate in a broad range of cell types such as endothelial cell [3], and thrombosis due to the direct damage of endothelial cells provoked by tachyzoite replication in these cells has been described in immunosuppressed patients suffering human acquired immunodeficiency syndrome [26,27] or elderly dogs with underlying diseases causing immunosuppression [28]. However, in those cases, *T. gondii* tachyzoites were numerous in the lesions and readily demonstrable by immunohistochemical labeling [27,28]. In the current study, the absence of parasite antigen in all the placentomes from the abortion cases, plus the very low frequency of detection of parasite DNA by the highly sensitive ITS- nested PCR, suggest that the cause for thrombosis, and thus abortion, was other than the direct damage of the endothelium by the parasite.

It has been demonstrated that murine trophoblasts secrete fibrinogen-like protein 2 (fgl2), a prothrombotic factor that favors fibrin deposition and thrombosis, in response to proinflammatory cytokines, such as IFN- γ or TNF- α [29]. *T. gondii* infection is known to trigger the secretion of IFN- γ in sheep [30] and mice [31]. Furthermore, it has been recently shown that the mere inoculation of secretion antigens from toxoplasma causes elevation of IFN- γ serum levels and abortion in mice, with no need of parasite replication [32]. Bearing in mind that these results are from different experimental models, it is tempting to hypothesize that fgl2 might be playing a role in favoring the occurrence of placental thrombosis found in these acute phase abortions, being its secretion related to an increase of IFN- γ levels that could be consequence of the infectious dose. In the present study, all infected sheep showed secretion of IFN- γ in the lymphocyte stimulation assays soon after infection, but in the group of sheep suffering acute phase abortions, this peak of secretion appeared one week before those not suffering abortion. The relation between IFN- γ secretion both at peripheral or local levels, the occurrence of these abortions, and its possible relation to FGL2 expression, deserves further investigation.

In conclusion, this study describes, and analyzes, the occurrence of acute phase abortions during an experimental infection of ovine toxoplasmosis. The microscopic lesions found in the placenta and fetuses from aborted ewes suggest the involvement of pathogenic mechanisms different from those proposed for classical toxoplasmosis, where the abortion would be consequence of the damage caused by parasite replication in the placenta or foetus [2,5,14]. The occurrence of thrombosis and infarcts in the placenta, without the necessary presence of the parasite in relation to the lesions, suggests that the acute phase abortions in toxoplasmosis could be the consequence of the vascular damage caused by mechanisms other than parasite replication.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

PC performed the experiment, participated in all the immune response and pathological studies and collaborated in the analysis of the data and writing the paper. MFue contributed to the sample collection, pathological studies and interpretation of the results. IF prepared the infectious inocula and collaborated in writing the paper. MFer participated in the sample collection and pathological studies. MCF participated in the sample collection pathological studies and collaborated in the manuscript preparation. JMG participated in preparation of the infectious inocula. CGL collaborated in the immunological studies and sample collection. FK collaborated in the design of the experiment and helped to draft the manuscript as well as to the preparation of the infectious inocula. JRC collaborated in the molecular analysis of the samples and helped to writing the manuscript. LMOM contributed to the design and supervision of the experiment and helped to draft the manuscript. VP collaborated in the designs, development and supervision of the experiment, participated in all the pathological studies, analysis of the data and writing the paper. JB conceived and designed the experiment, participated in the pathological studies, analysed the data and wrote the paper. All the authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by grants AGL2011-30205, of the Spanish Ministry of Science and Innovation, and LE253U13, from the Junta de Castilla y Leon, Spain. The authors are in deep gratitude to Dr F. J. Giraldez, from the IGM (CSIC-ULE) for the statistical analysis of the data and his support during the experimental phase of this study, and to the reviewers of the manuscript for the constructive criticism and suggestions that greatly improved the quality of the discussion. The authors wish also to thank all the staff of the IGM (CSIC-ULE) responsible for handling the experimental animals, and the technical assistance of Mr. Panero and Mrs. Espiniella. M. Fernández is founded by a predoctoral contract from the "Junta de Castilla y León". J. Benavides is supported by CSIC through the JAE-Doc program, financed in part by European Social Fund (ESF).

Author details

¹Departamento de Sanidad Animal, Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), Grulleros, 24346 León, Spain. ²SALUVET, Animal Health Department, Faculty of Veterinary Sciences, Complutense University of Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain. ³Moredu Research Institute, Pentlands Science Park, Bush Loan, Edinburgh EH26 0PZ, UK.

Received: 29 October 2013 Accepted: 16 January 2014

Published: 29 January 2014

References

- Dubey JP: Toxoplasmosis in sheep—the last 20 years. *Vet Parasitol* 2009, **163**:1–14.
- Buxton D, Maley SW, Wright SE, Rodger S, Bartley P, Innes EA: **Ovine toxoplasmosis: transmission, clinical outcome and control.** *Parassitologia* 2007, **49**:219–221.
- Dubey JP: *Toxoplasmosis of Animals and Humans*. 2nd edition. Boca Raton, Florida: CRC Press; 2010.
- Buxton D: Protozoan infections (Toxoplasma gondii, Neospora caninum and Sarcocystis spp.) in sheep and goats: recent advances. *Vet Res* 1998, **29**:289–310.
- Buxton D, Finlayson J: Experimental infection of pregnant sheep with Toxoplasma gondii: pathological and immunological observations on the placenta and foetus. *J Comp Pathol* 1986, **96**:319–333.
- Losson B, Buxton D: **Toxoplasmosis.** In *Protozoal Abortion in Farm Ruminants: Guidelines for Diagnosis and Control*. Edited by Ortega-Mora LM, Gottstein B, Conraths FJ, Buxton D. UK: Athenaem Press; 2007:122–171.
- Trees AJ, Crozier SJ, Buxton D, Blewett DA: **Serodiagnosis of ovine toxoplasmosis: an assessment of the latex agglutination test and the value of IgM specific titres after experimental oocyst-induced infections.** *Res Vet Sci* 1989, **46**:67–72.
- Owen MR, Clarkson MJ, Trees AJ: **Acute phase toxoplasma abortions in sheep.** *Vet Rec* 1998, **142**:480–482.
- Fritz H, Barr B, Packham A, Melli A, Conrad PA: **Methods to produce and safely work with large numbers of Toxoplasma gondii oocysts and bradyzoite cysts.** *J Microbiol Methods* 2012, **88**:47–52.
- Wainwright KE, Lagunas-Solar M, Miller MA, Barr BC, Gardner IA, Pina C, Melli AC, Packham AE, Zeng N, Truong T, Conrad PA: **Physical inactivation of Toxoplasma gondii oocysts in water.** *Appl Environ Microbiol* 2007, **73**:5663–5666.
- Benavides J, Maley S, Pang Y, Palarea J, Eaton S, Katzer F, Innes EA, Buxton D, Chianini F: **Development of lesions and tissue distribution of parasite in lambs orally infected with sporulated oocysts of Toxoplasma gondii.** *Vet Parasitol* 2011, **179**:209–215.
- Hurtado A, Aduriz G, Moreno B, Barandika J, Garcia-Perez AL: **Single tube nested PCR for the detection of Toxoplasma gondii in fetal tissues from naturally aborted ewes.** *Vet Parasitol* 2001, **102**:17–27.
- Wattegedera S, Sills K, Howard CJ, Hope JC, McInnes CJ, Entrican G: **Variability in cytokine production and cell proliferation by mitogen-activated ovine peripheral blood mononuclear cells: modulation by interleukin (IL)-10 and IL-12.** *Vet Immunol Immunopathol* 2004, **102**:67–76.
- Buxton D, Gilmour JS, Angus KW, Blewett DA, Miller JK: **Perinatal changes in lambs infected with Toxoplasma gondii.** *Res Vet Sci* 1982, **32**:170–176.
- Graham JM Jr, Edwards MJ, Edwards MJ: **Teratogen update: gestational effects of maternal hyperthermia due to febrile illnesses and resultant patterns of defects in humans.** *Teratology* 1998, **58**:209–221.
- Buxton D, Blewett DA, Trees AJ, McColgan C, Finlayson J: **Further studies in the use of monensin in the control of experimental ovine toxoplasmosis.** *J Comp Pathol* 1988, **98**:225–236.
- Buxton D, Ugglu A, Lovgren K, Thomson K, Lunden A, Morein B, Blewett DA: **Trial of a novel experimental Toxoplasma iscom vaccine in pregnant sheep.** *Br Vet J* 1989, **145**:451–457.
- Buxton D, Thomson K, Maley S, Wright S, Bos HJ: **Vaccination of sheep with a live incomplete strain (S48) of Toxoplasma gondii and their immunity to challenge when pregnant.** *Vet Rec* 1991, **129**:89–93.
- Buxton D, Thomson KM, Maley S: **Treatment of ovine toxoplasmosis with a combination of sulphamezathine and pyrimethamine.** *Vet Rec* 1993, **132**:409–411.
- Buxton D, Thomson KM, Maley S, Wright S, Bos HJ: **Experimental challenge of sheep 18 months after vaccination with a live (S48) Toxoplasma gondii vaccine.** *Vet Rec* 1993, **133**:310–312.
- Gutierrez J, O'Donovan J, Williams E, Proctor A, Brady C, Marques PX, Worrall S, Nally JE, McElroy M, Bassett H, Sammin D, Buxton D, Maley S, Markey BK: **Detection and quantification of Toxoplasma gondii in ovine maternal and foetal tissues from experimentally infected pregnant ewes using real-time PCR.** *Vet Parasitol* 2010, **172**:8–15.
- Shimizu K, Kito S, Shirahata T: **Experiments on mouse passage of the cyst type strain of Toxoplasma gondii for enhancement of virulence.** *Nihon Juigaku Zasshi* 1967, **29**:71–78.
- Williams RH, Morley EK, Hughes JM, Duncanson P, Terry RS, Smith JE, Hide G: **High levels of congenital transmission of Toxoplasma gondii in longitudinal and cross-sectional studies on sheep farms provides evidence of vertical transmission in ovine hosts.** *Parasitology* 2005, **130**:301–307.
- Penning DH, Grafe MR, Hammond R, Matsuda Y, Patrick J, Richardson B: **Neuropathology of the near-term and midgestation ovine fetal brain after sustained in utero hypoxemia.** *Am J Obstet Gynecol* 1994, **170**:1425–1432.
- Schlafer DH, Miller RB: **Female genital system.** In *Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals*. 5th edition. Edited by Maxie MG. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier; 2007:429–564.
- Huang TE, Chou SM: **Occlusive hypertrophic arteritis as the cause of discrete necrosis in CNS toxoplasmosis in the acquired immunodeficiency syndrome.** *Hum Pathol* 1988, **19**:1210–1214.
- Chaudhari AB, Singh A, Jindal S, Poon TP: **Haemorrhage in cerebral toxoplasmosis. A report on a patient with the acquired immunodeficiency syndrome.** *S Afr Med J* 1989, **76**:272–274.
- Hoffmann AR, Cadieu J, Kiuppel M, Lim A, Bolin SR, Mansell J: **Cutaneous toxoplasmosis in two dogs.** *J Vet Diagn Invest* 2012, **24**:636–640.
- Clark DA, Ding JW, Yu G, Levy GA, Gorczynski RM: **Fgl2 prothrombinase expression in mouse trophoblast and decidua triggers abortion but may be countered by OX-2.** *Mol Hum Reprod* 2001, **7**:185–194.

30. Innes EA, Panton WR, Thomson KM, Maley S, Buxton D: Kinetics of interferon gamma production in vivo during infection with the S48 vaccine strain of *Toxoplasma gondii*. *J Comp Pathol* 1995, **113**:89–94.
31. Ge YY, Zhang L, Zhang G, Wu JP, Tan MJ, Hu E, Liang YJ, Wang Y: In pregnant mice, the infection of *Toxoplasma gondii* causes the decrease of CD4 + CD25+ – regulatory T cells. *Parasite Immunol* 2008, **30**:471–481.
32. Chen JL, Ge YY, Zhang J, Qiu XY, Qiu JF, Wu JP, Wang Y: The dysfunction of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells contributes to the abortion of mice caused by *Toxoplasma gondii* excreted-secreted antigens in early pregnancy. *PLoS One* 2013, **8**:e69012.

doi:10.1186/1297-9716-45-9

Cite this article as: Castaño *et al.*: Placental thrombosis in acute phase abortions during experimental *Toxoplasma gondii* infection in sheep. *Veterinary Research* 2014 **45**:9.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit




RESEARCH ARTICLE

Open Access



Peripheral and placental immune responses in sheep after experimental infection with *Toxoplasma gondii* at the three terms of gestation

Pablo Castaño¹, Miguel Fernández¹, Javier Regidor-Cerrillo², Miguel Fuertes¹, Pilar Horcajo², Ignacio Ferre², M. Carmen Ferreras¹, Luis Miguel Ortega-Mora², Valentín Pérez¹ and Julio Benavides^{1*} 

Abstract

Although it is known that gestation could influence the clinical course of ovine toxoplasmosis, the precise effect of the term of gestation when sheep are infected are yet mostly unknown. The aim of this study was to evaluate the peripheral and placental immune responses developed in pregnant sheep after experimental infection with *Toxoplasma gondii* at different times of gestation. Thirty-six pregnant sheep were allocated in different groups, orally inoculated with sporulated oocysts of *T. gondii* at early, mid and late gestation and culled within 30 days post-infection. The peripheral humoral and cytokine responses were evaluated, as well as the transcription of cytokines at the placenta. Serological analysis revealed that, regardless the term of gestation when infected, specific IgG against *T. gondii* were detected from day 8 post-infection and there was an early peripheral release of IFN- γ at the first week post-infection followed by a short peak of IL10 and TNF- α at the second week post-infection. There were no significant differences in this response between infected groups. At the placenta, a similar increase in transcription of IFN- γ , and TNF- α was found at the three terms of gestation, while IL-4 increased mainly at the first and second terms and IL-10 transcription was higher at the last term. While these findings show that both Th1 and Th2 cytokines play a key role in the pathogenesis of ovine toxoplasmosis and that placental and peripheral immune responses do not closely correlate, there seems to be no clear modulation of these responses along the gestation.

Introduction

Ovine toxoplasmosis is an important infectious disease, caused by the protozoan *Toxoplasma gondii*, that results in heavy economic losses in the sheep industry worldwide as it is related to reproductive failure, principally abortions and weak newborn lambs [1]. Despite the great importance of this disease little is known about the mechanisms underlying the abortions, as it is not clear whether the cause of abortion is a direct consequence of the parasite multiplication in the foetus or the placenta,

or, it is caused by a deregulation of hormones or immune responses in this tissue [2].

There is clear evidence that the consequences of ovine toxoplasmosis heavily depend on the term of gestation when infection occurs [2]. Although there is clear evidence that the placenta is under immunomodulation during pregnancy and that placental and peripheral immune responses differ at this time [3], this premise has not yet been proven to occur in pregnant sheep [4]. The paradigm that maternal immune response at the placenta level shifts from a Th1 phenotype, characterized by IFN- γ and TNF- α production, towards a Th2 phenotype, mainly represented by IL4 and IL10 production, from mid gestation is mostly based on murine experimental models [5]. However, these evidence cannot be extrapolated to

*Correspondence: j.benavides@eae.csic.es

¹ Departamento de Sanidad Animal, Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), Grulleros, 24346 León, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



sheep as there are several differences between mice and sheep in the histological structure of placenta, immune response and duration of pregnancy [6]. In fact, the few studies carried out to investigate this paradigm in sheep have not found differences at the peripheral immune response between pregnant and non-pregnant ewes [7, 8].

The studies that focus on the immune response following infection of pregnant ewes with the protozoan *T. gondii* are scarce [9–11]. It seems clear that an early production of the pro-inflammatory cytokine IFN-γ is an important mechanism to control the infection by inducing a Th1 immune response [12, 13]. In addition to cellular mechanisms, *T. gondii* infection in ewes is known to stimulate humoral immune response as well [14], although it is not until the second week after infection when antibodies are detected in maternal peripheral blood [15] and they play a minor role in controlling the parasite [16]. On the other hand, it is well known the importance that the placenta has as an inductor of immunity to prevent foetus infections and to allow the normal course of pregnancy in ruminants [17]. However, despite the relevance of ovine toxoplasmosis, there are very few studies investigating the placental immune response developed during this disease. The influence of the time of gestation when infections occurs on the clinical course, development of lesions and parasite multiplication on ovine toxoplasmosis has been recently studied in an experimental model of pregnant sheep [2]. Bearing in mind the lack of evidence on immunomodulation at the peripheral level [8], we hypothesized that the placental immune response and its possible modulation during gestation play a key role in the pathogenesis of ovine toxoplasmosis. The present study is aimed to compare the placental and peripheral immune responses developed in pregnant sheep after oral infection with sporulated oocysts at the three terms of gestation. The samples for this study come from a previous study where the influence of gestation on the clinical course was shown [2].

Materials and methods

Animals and experimental design

A full description of the experimental design was described previously [2]. Thirty-six pure Churra breed primiparous sheep aged 24–30 months, seronegative for *T. gondii*, *Neospora caninum*, border disease virus, *Coxiella burnetii* and *Chlamydia abortus* were oestrus synchronized and mated with pure breed Churra tups for 2 days, after which the rams were removed from the ewes. Pregnancy and foetal viability were confirmed by ultrasound scanning (US) on day 40 after mating and again before infection. The pregnant sheep were randomly distributed into three experimental groups, each

of them formed by 9 infected sheep and 3 negative, non-infected, control sheep.

Depending on the term of gestation when infected, sheep were allocated into Group 1 (n=12, G1), inoculated at day 40 of gestation; Group 2 (n=12, G2), inoculated at day 90 of gestation, and Group 3 (n=12, G3), inoculated at day 120 of gestation (Table 1). Nine sheep from each three groups were orally inoculated with 50 sporulated oocysts of the M4 isolate of *T. gondii* (More-dun Research Institute, Edinburgh, Scotland, UK), a Type II isolate (Dr Frank Katzer, personal communication) diluted in 50 mL of PBS, whereas the 3 control sheep of each group received 50 mL of PBS as negative control of inoculation. The experiment was designed in order to cull four sheep, three infected sheep and one control of each group, at 12, 19 and 26 days post-infection (dpi) or when foetal death was observed at the US scan or the sheep delivered a stillbirth. However, due to the occurrence of early (i.e. between 9 and 16 dpi) and late (between 17 and 26 dpi) spontaneous abortions, the number of infected ewes culled on days 12, 19 and 26 pi for G2 and G3 had to be modified with regard to the initial experimental design (Table 1).

This experiment was carried out according to the Guidelines of the European Union Council (2010/63/EU) for the use of laboratory animals and was in accordance with local national guidelines (RD 53/2013) which regulates the welfare of animals used for experimentation. They were also approved by the CSIC bioethics committee (OH416-2016).

Pregnancy monitoring and sample collection

Once inoculated, foetal viability was determined by monitoring the heartbeat through US scan 3 days a week.

Blood samples were collected at -1, 1, 5, 8, 12, 15, 19, 22 and 26 dpi by jugular veni-puncture and at the

Table 1 Experimental design and clinical outcome of experimental animals according to the day of gestation when infected: day 40 (G1), day 90 (G2) and day 120 (G3) and the day post-infection (dpi) when ewes were culled or abortion occurred

	Number of sheep				
	Foetal death/stillbirths ^a		(Serial culling)		
	6–16 dpi	17–26 dpi	12 dpi	19 dpi	26 dpi
G1 (n = 12)	2/0 ^b	1/0 ^b	1/1 ^b	3/1 ^b	2/1 ^b
G2 (n = 12)	4/0	1/0	1/1	2/1	1/1
G3 (n = 12)	2/0	4/0	2/1	1/1	0/1

^a Spontaneous abortions or stillbirths occurring in that group, the other timepoints (12, 19 and 26 dpi) correspond to serials culling of pregnant ewes.

^b Infected/control sheep.

day of culling from the dams before euthanasia and from umbilical cord veins or heart during necropsy from the foetuses. These samples were collected into Vacutainer tubes (Becton–Dickinson and Company, Plymouth, UK) without anticoagulant and allowed to clot. Serum was obtained by centrifugation and samples were stored at -80°C until analysis.

At 12, 19 and 26 dpi, or after spontaneous abortions (see chapter above) sheep were sedated with xylazine (Rompun™, Bayer, Mannheim, Germany) and then immediately euthanized by an intravenous overdose of embutramide and mebezonium iodide (T61, Intervet, Salamanca, Spain). Immediately after euthanasia, both placental and foetal tissues were selected and recovered. Ten randomly selected placentomes recovered from each placenta were transversally cut and immersed in RNAlater (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) for cytokine mRNA expression analysis.

Detection of specific anti-*T. gondii* IgG in sera

Serum recovered from all the ewes and foetuses were used in an in-house indirect ELISA [15] to measure specific anti-*T. gondii* antibodies. Soluble antigen from tachyzoites of ME49 isolate was used to coat 96 well microtiter plates. Briefly, 100 μL /well of antigen solution at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ diluted in carbonate buffer (63 mM, pH 9.6) was incubated overnight at 4°C . Subsequently, non-specific binding was blocked by adding 100 μL of bovine serum albumin diluted 0.05% in phosphate buffer saline (0.1 M, pH 7.6) containing 0.05% Tween 80 (PBST). After 2 h incubation at room temperature, the plates were washed four times with PBST. Sera samples were diluted 1:100 in PBST and 100 μL of this dilution was added to each well and incubated for 60 min at room temperature. All samples were analyzed in duplicate. After four washes in PBST, 100 μL of horseradish peroxidase conjugate protein G (Bio-rad, Hercules, USA) diluted 1:1500 in PBST was added as secondary antibody (Ab) and incubated for 1 h at room temperature. After washing again, 100 μL per well of substrate ABTS (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) diluted 5.48 mg in 50 mL of citrate buffer 0.05 M, pH 4.0 with 0.0016% hydrogen peroxide was added to each well. Finally, after 30 min of incubation, 40 μL per well of a solution of hydrofluoric acid 0.1 M was at room temperature to stop the reaction and the optical density of each well (OD) was read at 405 nm (OD405). The results were given as an optical index (OI) of the OD ration value ($\text{OI} = [\text{OD sample} - \text{OD negative control}] / [\text{OD positive control} - \text{OD negative control}]$).

Determination of IFN- γ , TNF- α , IL4 and IL10 levels in maternal sera

The levels of IFN- γ and IL4 cytokines were measured using the Bovine IFN- γ and IL4 ELISA development kits (Mabtech, AB, Sweden), following the kit manual instructions. On the other hand, TNF- α and IL10 assays were performed using the specific Cusabio® competitive inhibition ELISA for each cytokine, according to manufacturer's recommendations. In all cases, plates were read at 450 nm and the results were interpreted using the "Curve Expert Professional" software program (Hyams Development, AL, USA). In order to compare the evolution of the serological level of cytokines in each term of gestation, data from 1, 5, 8, 12, 15, 19, 22 and 26 dpi were normalized to the -1 dpi value of each group and expressed as a ratio.

RNA extraction and quantitative real-time PCR (qPCR)

RNA was extracted from five random placentomes using the commercial Maxwell® 16 LEV simplyRNA Purification Kit, developed for automated Maxwell® 16 System (Promega, Wisconsin, USA), following the manufacturer's recommendations. RNA integrity was checked by 1% agarose gel and RNA concentrations were determined using the spectrophotometer Nanophotometer (Implen GmbH, MU, GER). cDNA was obtained by reverse transcription using the master mix SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Paisley, UK) following the procedures described previously [16]. Primers and real-time PCR reactions (Additional file 1) were performed, as described previously by Arranz-Solis et al. [18]. The mRNA expression was calculated normalizing the Ct value of the target gene with the Ct value of the housekeeping gen. Normalized Ct values from infected animals were subtracted from average Ct values obtained from control animals. The resulting differences ($\Delta\Delta\text{Ct}$) were transformed to, and express as, linear fold increase regarding the control animals and subjected to statistical analysis, as described previously [18, 19].

Statistical analysis

Given the limited group sample sizes after the initial culling schedule had to be modified because of the occurrence of early and late spontaneous abortions, the effect of the day post-infection when sheep was culled or aborted were assumed to be non-significant and in each group data were pooled in three categories according to the time of gestation when ewes were infected (G1, G2 and G3).

Antibody responses for each experimental group were analyzed using the one-way ANOVA test. When statistically significant differences were found, a Tukey's

Multiple Range test was applied to examine all possible pairwise comparisons at each sampling time. Variations in serological cytokine levels from sera were analyzed by multiple t tests, using the Holm–Sidak method to establish a correction for multiple comparisons.

Finally, to assess differences between each infected group a Mann–Whitney test was performed on cytokine mRNA expression levels in placenta.

In all analysis, statistical significance was established in $P < 0.05$. GraphPad Prism 6.01 software (San Diego, CA, USA) was employed to analyze all the data.

Results

Detailed results of the clinical course, lesional development and parasite distribution were published in Castaño et al. [2]. Additional file 2 shows a brief comparison of the parasite burden and histological score values of infected ewes from the three groups (G1, G2 and G3) studied at 26 dpi.

Specific serological anti-*T. gondii* IgG antibody response

Specific serological antibodies in the three infected groups were detected from day 5 post-infection (pi) and increased until the end of the experiment. While the pattern of serological antibodies was very similar among the three groups, those ewes infected at mid gestation (G2) showed significantly higher OI than those animals infected at early gestation, specifically on days 1, 5, 8 and 12 pi, and those infected at late gestation, specifically on days 8, 12, 19 and 22. All control animals showed basal levels throughout the study (Figure 1).

Cytokine kinetics in maternal sera

The strongest and more evident response, also the earliest, measured by ELISA and found in maternal sera was that of IFN- γ (Figure 1). While the three infected groups showed significant increase of serological IFN- γ at day 8 pi when compared to control animals, G2 and G3 infected sheep also showed higher levels than control at day 5 pi. There were no statistically significant differences between infected groups. On the other hand, the increase of TNF- α at day 12 dpi was not the same in the three groups as this increase was mainly found in G2, which had significantly higher level than controls and G1 at days 12 and 15 pi. Regarding IL10, there were no statistically significant differences between infected groups at day 12 pi, when all of them showed higher level than control animals, although G1 levels were higher than G2 at day 22 pi. G1 showed higher level of cytokine than controls at day 19 pi. There were no significant differences between cytokine levels at any of the three infected groups or control animals regarding IL4 (Figure 1).

Cytokine RNA expression at the placenta

The immune response at the placenta was characterized by analyzing the RNA transcription of IFN- γ , TNF- α , IL4, IL10 and IL12 at the placentomes (Figure 2). All the cytokines except IL12 showed significant increase of fold change in at least one term of gestation when compared to the control, non-infected animals. Regarding those that increased only at certain terms, fold change increase in IL10 was not significantly different to the control animals at the first term of gestation (G1), while in IL4 the loss of significance occurred on the third term (G3).

Analyzing those results when infected animals showed significant differences with the control sheep, and similarly as found in the serological cytokines, the highest fold change was found in IFN- γ at the three times of gestation. When comparing between the groups, no significant differences were found among them, so the transcription of IFN- γ was similar regardless the time of gestation when infection occurred. Similarly, the increase of the transcription in TNF- α was similar among the three groups.

When analyzing Th2 cytokine transcription levels at the placentomes, besides differences with their control animals, there were also differences between terms of gestation. While IL4 was significantly higher at the first and second term, IL10 was precisely higher at the last term.

Discussion

We have previously reported the clear influence of the time of gestation when sheep are infected on the pathogenesis of experimental ovine toxoplasmosis, when sheep infected at the third term of gestation showed the earlier occurrence of lesions and colonization of the placenta by the parasite (day 19 pi vs. day 26 at the second and first term). However, the most severe lesions and higher burden of the parasite were found at 26 dpi after infection at mid gestation [2]. In order to gain insight into the pathogenesis of this disease, the objective of this work was to further characterize the immune response induced in pregnant ewes, both peripherally and placentally.

When analyzing the humoral immune response, all infected groups showed higher levels of specific antibodies than control group from day 12 pi. The kinetic of the serological antibodies was similar regardless the time of gestation when infected, although G2, infected at mid-gestation, had statistically significant ($P < 0.0001$) higher levels of antibodies than G1 on days 12 and 19 pi, but the level of antibodies become similar for the three groups after that and until the end of the experiment. This pattern of serological antibodies, rising from the second week post-infection is similar to that reported in previous

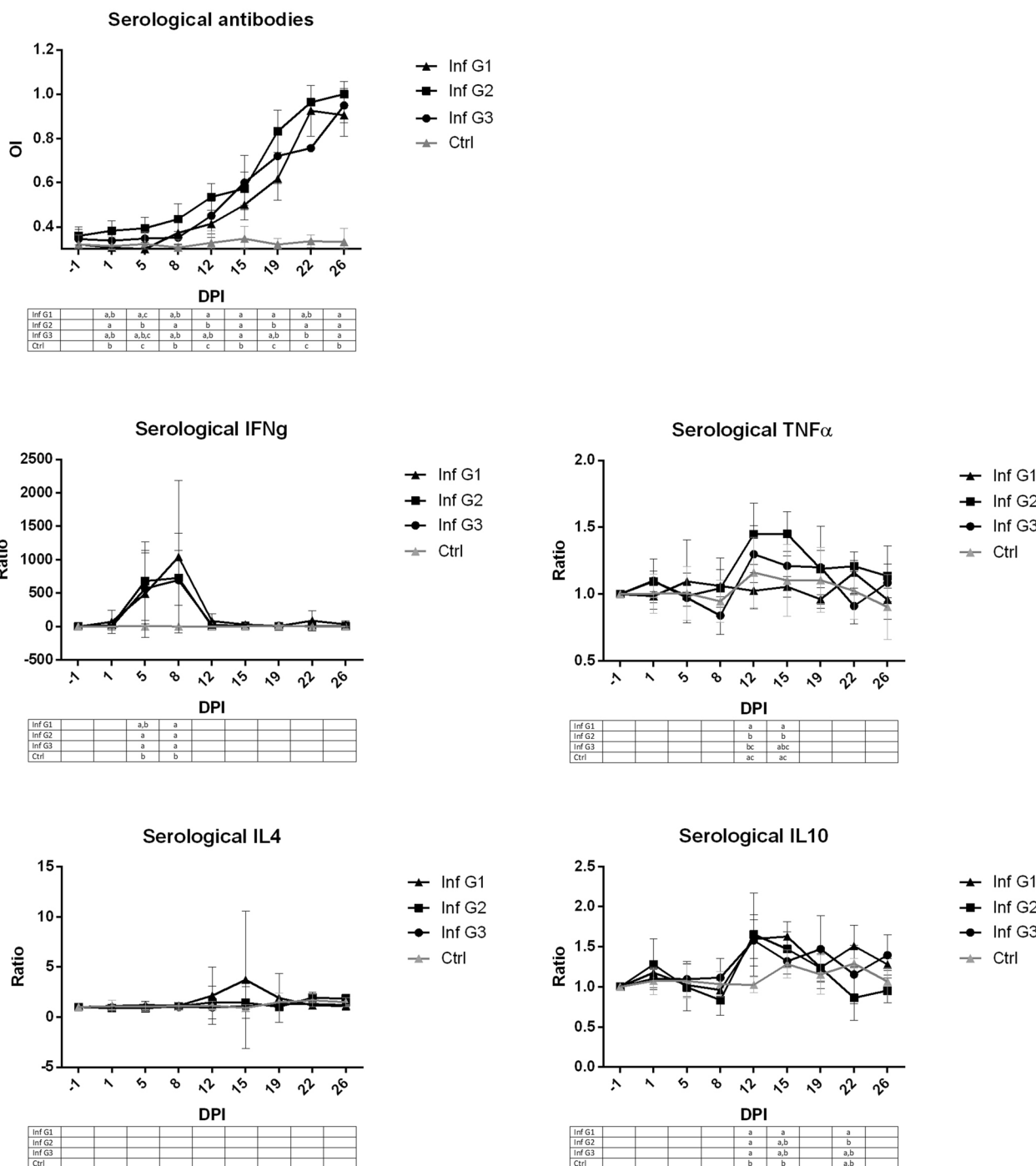


Figure 1 Antibody and cytokine production in sera from the three infected groups and control ewes. Graphs representing optical index (OI) of antibodies and cytokines ratio of infected ewes at early (Inf G1), mid (Inf G2) and late (Inf G3) gestation as well as in non-infected animals (Ctrl) to analyse the influence of the gestation term when infected with the protozoan *T. gondii* occurred on the peripheral immune response. Different letters in the same column in each table beneath the graphics indicate statistical differences ($P < 0.05$) between groups when comparing them at the same dpi.

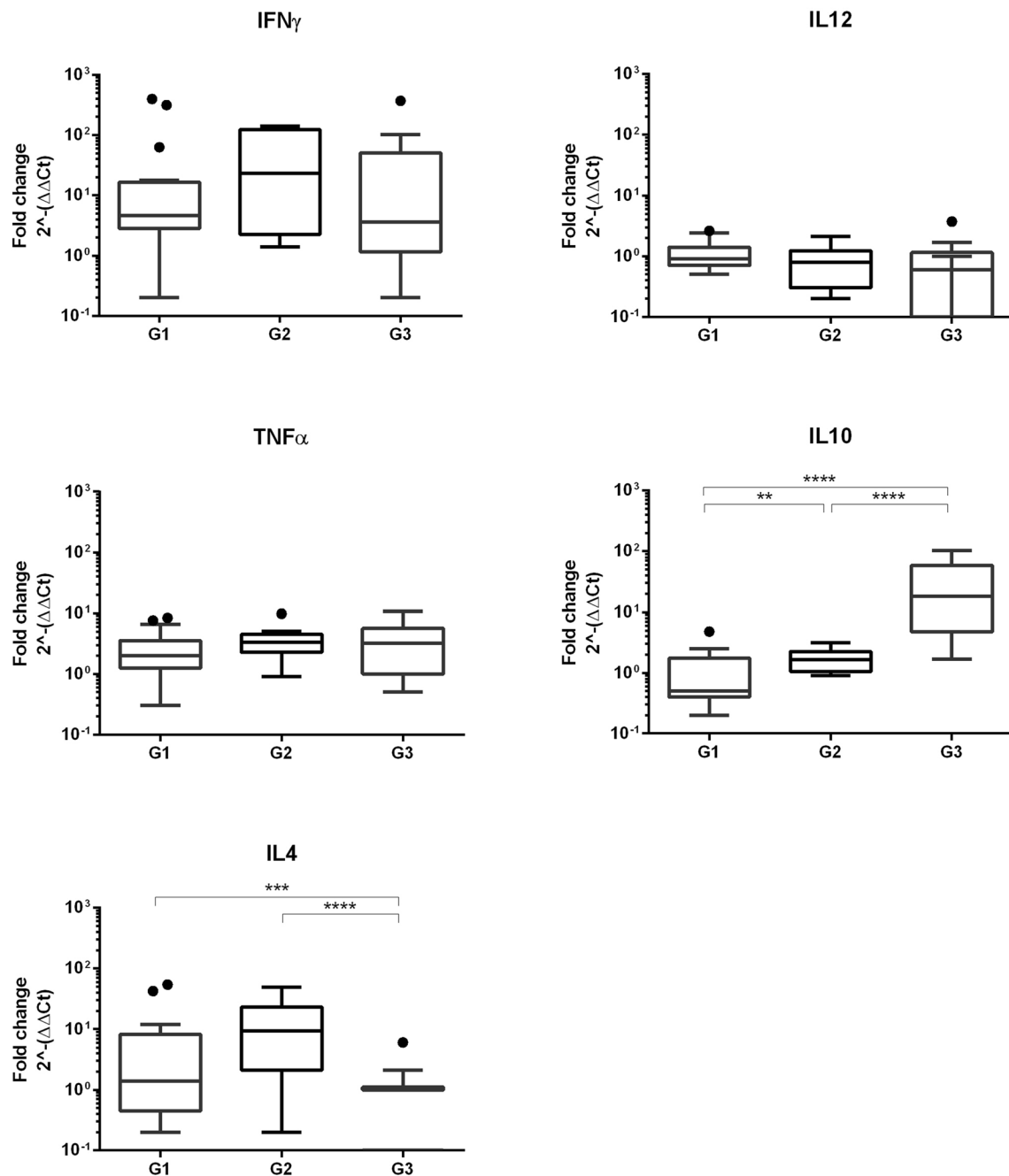


Figure 2 Cytokine transcription at the ovine placentomes of the three infected groups and control ewes. Graphs representing Th1 (IFN- γ and TNF- α) and Th2 (IL4 and IL10) cytokine transcription at the placentomes from infected ewes at early (Inf G1), mid (Inf G2) and late (Inf G3) gestation in comparison with the non-infected ewes of their respective groups (Ctrl 1, Ctrl 2 and Ctrl 3) to analyse the influence of the gestation term when infected with the protozoan *T. gondii* occurred on the placental immune response.

experimental infections [10, 11, 20], and the similar results between groups suggest that the term of gestation when infection occurs does not influence significantly on the peripheral humoral immune response.

Regarding the serological cytokines, the three groups again show a very similar pattern, especially regarding IFN- γ , of which there is a significant ($P < 0.0001$) increase in serum levels after infection as early as 5 and 8 dpi. These results show that IFN- γ is a key cytokine after *T.*

gondii infection during gestation, similarly as previously shown in non-pregnant sheep [15, 21]. After this peak of serological IFN- γ , it decreases coinciding with a gradual increase of specific anti-*T. gondii* serological antibodies, TNF- α and IL10. The increase in these two cytokines respectively, has been previously described in human trophoblasts experimentally infected with *T. gondii* [22]. The comparison between groups shows that the significant differences between groups were not consistent along the days after infection, appearing only on specific days, with the exception of TNF- α , which was higher on those animals infected at mid-gestation (i.e. G2) than the control animals but also than those infected at early gestation (i.e. G1) on days 12 and 15 pi. Bearing in mind, as we reported previously [2], that the more severe lesions, both placental and foetal, but also the higher parasite burden were found in ewes infected at mid gestation, it is possible to suggest that the cytokines measured when studying the peripheral immune response developed in ewes infected at mid gestation (i.e. G2), serological TNF- α , as well as antibodies against *T. gondii* infection, might be formed by cytokines secreted both in the placenta but also in peripheral lymph nodes, and that it could be related in some ways to the severe damage observed in both placental and foetal tissues. There were no significant differences ($P > 0.5$) between control and infected groups, nor between infected groups either, regarding IL4 serum levels, which agrees with previous results in experimental murine models of *T. gondii* infection [23]. In view of these results it is possible to elucidate that, most probably, IL4 does not play a pivotal role in promoting the host peripheral immune response during infection with *T. gondii*.

The influence of the infection was also investigated at placental level, studying the cytokine transcript expression profile at the materno-foetal interface. An increase mRNA transcription for all the cytokines analyzed, except from IL12, was detected in the placenta of the infected animals with regard to the control group. This finding suggests that, similarly to the peripheral level, there is a mixed Th1 and Th2 type placental immune response after infection with *T. gondii* in pregnant ewes. A similar response has been shown to occur after infection with the close protozoan *Neospora caninum*, both in sheep [18] and cattle [24], suggesting that in both diseases, toxoplasmosis and neosporosis, both types of cytokines, Th1 and Th2, are involved in the response against the parasite, and that there is not a clear polarization of the immune response during gestation. When analysing those Th1 cytokines which increased after the infection (i.e. TNF- α and IFN- γ), there are no statistically significant differences between groups. IFN- γ is the one that shows the highest fold increase in the three groups,

suggesting again its importance not only at peripheral level but also at the placental level. The importance of this cytokine in the pathogenesis of ovine toxoplasmosis has been previously suggested [25, 26], and the current study shows that it plays a similar role regardless the term of gestation when the sheep is infected.

On the other hand, the pattern found in IL10 and IL4, are opposed. While IL10 increased after infection at the last term of gestation, IL4 showed higher levels on the first and second term. This behavior does not fit with the classical idea of the immune modulation paradigm during gestation, where Th2 cytokines, i.e. IL4, would be favored at the second half of gestation [5]. Our results show that there is not a clear tendency towards a Th2 preponderant immune response towards the end of gestation in pregnant ewes. On the contrary, it seems that IL4 mRNA levels at the foetal-maternal interface were higher at first and second term of gestation. Other studies analyzing the transcription of this cytokine after infection by the closely related protozoan, *N. caninum*, found an increase in IL4 levels in the placenta from sheep [18] and cattle [24] and even mice [27], confirming that this cytokine plays a key role in the pathogenesis of neosporosis. Specifically, in pregnant sheep, the level of IL4 mRNA after infection with *N. caninum*, was the same at the first and third terms of gestation [18]. Taken together the results from TNF- α , IFN- γ and IL4, both peripherally and at the placental level suggest that there is not a clear modulation of the immune response in pregnant sheep, at least under the circumstances of these studies. A previous study using a nominal antigen (i.e. not an infectious antigen), found no differences either in the production of different cytokines by peripheral blood mononuclear cells along the gestation in sheep immunized with chicken egg albumin as antigen (i.e. ovalbumin) [8]. Although comparisons between this study and ours are difficult due to the different nature of the challenging stimuli (a nominal antigen, ovalbumin, vs. a life protozoan, *T. gondii*).

On the other hand, there is a clear increase in the transcription of IL10 at the placenta at the second and third term of gestation. IL10 has been proposed as playing a key role in the maintenance of the gestation for its relation to regulatory T-cells [28]. Its role during *T. gondii* infection during pregnancy has not been deeply investigated, but recent studies in murine experimental models have shown that IL10 might be induced by *T. gondii* infection as an evasion strategy against the host immune response as a way to establish chronic infection [29]. It is then tempting to hypothesize that, in the current experiment, the higher fold change in IL10 at the third term of gestation might have favored the earlier colonization of the placenta by the parasite, as observed in the previous study [2]. In this sense,

and bearing in mind the results from IL4 and IL10, it is possible then that some modulation of the placental immune response might occur along gestation, but this modulation would not be orientated toward a Th2 response at the end of gestation. These results warrant further research into the modulation of the placental immune response in sheep and its role on the host response against infections.

However, when analyzing the behavior of these two cytokines, IL10 and IL4 at the peripheral levels and at the three terms of gestation, there is no correlation with the variations observed at the placenta. This would suggest that there are differences between those responses and that the host immune response against *T. gondii* infection might be different depending on the location. The fact that the immune response against *T. gondii* infection is modulated at the foetal–maternal interface, but not peripherally, has been previously documented in experimental *T. gondii* infections in mice [30], where regulatory T cells at the placenta express higher levels of CTLA-4 and PD-L1 than the same populations of cells at the spleen. Altogether, the findings from the current study suggest that, in sheep, there might be a subtle basal, and limited, modulation of the immune response in the placenta during gestation, similarly as described in other species, but this modulation may not reflect in changes at the peripheral level. The role of hormones on *T. gondii* infection has been widely discussed and several studies, based on murine or human cell lines, suggest that they could contribute to the modulation of *T. gondii* infection [31]. However, the only studies that analyzed the involvement of hormones in ovine toxoplasmosis were both carried out at the same term of gestation (mid gestation) and found that progesterone decreased after infection, possible due to the damage caused by the parasite, but did not establish any relation between the hormone and a possible modulation of the immune response [32, 33].

In conclusion, this work further characterizes the peripheral and placental immune responses after *T. gondii* experimental infection at the three terms of gestation in sheep, adding detailed information on ovine immune response to a previous work [2]. Our results show that infection with this protozoan influences the peripheral and placental immune response and that it is mediated by a mixed of Th1 (IFN- γ and TNF- α), Th2 (IL4) and Treg (IL10) cytokines. They also show differences between placental and peripheral immune responses, regarding those cytokines evaluated, and how there could be differences, especially on IL10 and IL4 at the placenta, depending on the term of gestation when infected. These differences are most probably a consequence of several complex processes

where various factors, including gestation, parasite and host, play an interrelated role that warrants further investigation.

Supplementary information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0681-8>.

Additional file 1. Sequences of primers used for cytokine real-time PCR (qPCR) and standard curve data. a NCBI accession numbers are for ovine cDNA sequences used in primer design. Primer annealing was also checked with the *Ovis aries* genomic DNA sequences of the chromosome 3 for IFN- γ , the chromosome 20 for TNF- α , the chromosome 5 for IL4, the chromosome 12 for IL10 and the chromosomes 14 and 24 for β -actin in NCBI database [29]. b Minimal coefficient of regression (R^2) of standard curves for each PCR target in all batches of amplification, based on tenfold dilutions (10^{-1} – 10^{-7}) of 10 ng/ μ L from plasmid stocks. Ct values increased linearly until the level of 10^{-7} dilution of all plasmids. c Standard curve slopes. Minimal and maximal values for slopes for each PCR target in all batches of amplification. d Inter-assay coefficient of variation. CV values indicate the maximum and minimum CVs of all points from standard curves for each PCR target run in this study. Subscript numbers indicate curve point for CV values. (*) Indicates primers annealing at intron splice junctions. No amplification products were detected when ovine genomic RNA free-DNA samples were tested with cytokine primers (data not shown). All sequences of primers were previously described by Arranz-Solis et al. [14].

Additional file 2. Comparison of average values of parasite burden and histological lesion at day 26 post-infection at the animals infected at the three terms of gestation: day 40 (G1), day 90 (G2) and day 120 (G3). Table summarizing the result from the Castaño et al. [2] where the experimental design and clinical and lesional results from this experiment are detailed.

Acknowledgements

The authors are in deep gratitude to Dr F. J. Giraldez, from the IGM (CSIC-ULE) for the statistical analysis of the data and his support during the experimental phase of this study, and to the reviewers of the manuscript for the constructive criticism and suggestions that greatly improved the quality of the discussion. The authors wish also to thank to Dr Frank Katzer, from Moredun Research Institute for kindly providing the tachyzoites from M4 isolate, all the staff of the IGM (CSIC-ULE) responsible for handling the experimental animals, and the technical assistance of Mr. Panero, Mrs. Espiniella, Mrs. González and Mrs. Agudín. P. Castaño is founded by a predoctoral contract from the "Junta de Castilla y León". We also gratefully acknowledge Esperanza Selva from the SALUVET group (Complutense University of Madrid, Spain) for their excellent technical assistance. We acknowledge support of the publication fee by the CSIC Open Access Publication Support Initiative through its Unit of Information Resources for Research (URICI).

Authors' contributions

PC performed the experiment, participated in all the pathological studies, analysed the data and wrote the paper. MFuertes contributed to the sample collection, pathological studies and interpretation of the results. IF prepared the infectious inocula and collaborated in writing the paper. JRC and PH performed in the molecular analysis of the samples and helped to writing the manuscript. MFernández participated in the sample collection and pathological studies. MCF participated in the sample collection, pathological studies and collaborated in the manuscript preparation. CGL collaborated in the clinical studies and sample collection. LMOM contributed to the design and supervision of the experiment and helped to draft the manuscript. VP collaborated in the designs, development and supervision of the experiment, participated in all the pathological studies, analysis of the data and writing the paper. JB conceived and designed the experiment, participated in the pathological studies, analysed the data and wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported by Grants AGL2011-30205 and AGL2016-75935-C2-2-R and of the Spanish Ministry of Science and Innovation, and LE253U13, from the Junta de Castilla y León, Spain.

Availability of data and materials

The datasets generated during and/or analysed during the current study available from the corresponding author on reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

This experiment was carried out according to the Guidelines of the European Union Council (2010/63/EU) for the use of laboratory animals and was in accordance with local national guidelines (RD 53/2013) which regulates the welfare of animals used for experimentation. They were also approved by the CSIC bioethics committee (OH416-2016).

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹ Departamento de Sanidad Animal, Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), Grulleros, 24346 León, Spain. ² SALUVET, Animal Health Department, Faculty of Veterinary Sciences, Complutense University of Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain.

Received: 6 May 2019 Accepted: 6 August 2019

Published online: 18 September 2019

References

- Dubey JP (2009) Toxoplasmosis in sheep—the last 20 years. *Vet Parasitol* 163:1–14
- Castaño P, Fuertes M, Regidor-Cerrillo J, Ferre I, Fernández M, Ferreras MC, Moreno-Gonzalo J, González-Lanza C, Pereira-Bueno J, Katzer F, Ortega-Mora LM, Pérez V, Benavides J (2016) Experimental ovine toxoplasmosis: influence of the gestational stage on the clinical course, lesion development and parasite distribution. *Vet Res* 47:43
- Chaouat G (2003) Innately moving away from the Th1/Th2 paradigm in pregnancy. *Clin Exp Immunol* 131:393–395
- Entrican G, Wattedegera SR, Griffiths DJ (2015) Exploiting ovine immunology to improve the relevance of biomedical models. *Mol Immunol* 66:68–77
- Krishnan L, Nguyen T, McComb S (2013) From mice to women: the conundrum of immunity to infection during pregnancy. *J Reprod Immunol* 97:62–73
- Innes EA (1997) Toxoplasmosis: comparative species susceptibility and host immune response. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 20:131–138
- McClure L, Connor AEO, Hayward S, Jenkin G, Walker DW, Phillips DJ (2005) Effects of age and pregnancy on the circulatory activin response of sheep to acute inflammatory infect by lipopolysaccharide. *J Endocrinol* 185:139–149
- Wattedegera S, Rocchi M, Sales J, Howard CJ, Hope JC, Entrican G (2008) Antigen-specific peripheral immune responses are unaltered during normal pregnancy in sheep. *J Reprod Immunol* 77:171–178
- Buxton D, Finlayson J (1986) Experimental infection of pregnant sheep with *Toxoplasma gondii*: pathological and immunological observations on the placenta and foetus. *J Comp Pathol* 96:319–333
- Castaño P, Fuertes M, Ferre I, Fernández M, Ferreras MC, Moreno-Gonzalo J, González-Lanza C, Katzer F, Regidor-Cerrillo J, Ortega-Mora LM, Pérez V, Benavides J (2014) Placental thrombosis in acute phase abortions during experimental *Toxoplasma gondii* infection in sheep. *Vet Res* 45:9
- Sánchez-Sánchez R, Ferre I, Regidor-Cerrillo J, Gutiérrez-Expósito D, Ferrer LM, Arteche-Villasol N, Moreno-Gonzalo J, Müller J, Aguado-Martínez A, Pérez V, Hemphill A, Ortega-Mora LM, Benavides J (2019) Virulence in mice of a *Toxoplasma gondii* type II isolate does not correlate with the outcome of experimental infection in pregnant sheep. *Front Cell Infect Microbiol* 8:436
- Gazzinelli R, Amichay D, Sharton-Kersten T, Grunwald E, Farber JM, Sher A (1996) Role of macrophage-derived cytokines in the induction and regulation of cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. *Curr Top Microbiol Immunol* 219:127–139
- Oura C, Innes EA, Wastling JM, Entrican G, Panton WR (1993) The inhibitory effect of ovine recombinant interferon-gamma on intracellular replication of *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol* 15:535–538
- Stanley AC, Buxton D, Innes EA, Huntley JF (2004) Intranasal immunisation with *Toxoplasma gondii* tachyzoite antigen encapsulated into PLG microspheres induces humoral and cell-mediated immunity in sheep. *Vaccine* 22:3929–3941
- Innes EA, Wastling JM (1995) Analysis of in vivo immune responses during *Toxoplasma gondii* infection using the technique of lymphatic cannulation. *Parasitol Today* 11:268–271
- Innes EA, Bartley PM, Maley SW, Wright SE, Buxton D (2007) Comparative host-parasite relationships in ovine toxoplasmosis and bovine neosporosis and strategies for vaccination. *Vaccine* 25:5495–5503
- Fair T (2015) The contribution of the maternal immune system to the establishment of pregnancy in cattle. *Front Immunol* 6:7
- Arranz-Solís D, Benavides J, Regidor-Cerrillo J, Horcajo P, Castaño P, Ferreras MC, Jiménez-Pelayo L, Collantes-Fernández E, Ferre I, Hemphill A, Pérez V, Ortega-Mora LM (2016) Systemic and local immune responses in sheep after *Neospora caninum* experimental infection at early, mid and late gestation. *Vet Res* 47:2
- Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc* 3:1101–1108
- Maley SW, Thomson KM, Bos HJ, Buxton D (1997) Serological diagnosis of toxoplasmosis in sheep following vaccination and challenge. *Vet Rec* 140:558–559
- Verhelst D, De Craeye S, Entrican G, Dorny P, Cox E (2014) Parasite distribution and associated immune response during the acute phase of *Toxoplasma gondii* infection in sheep. *BMC Vet Res* 10:293
- Barbosa BF, Lopes-Maria JB, Gomes AO, Angeloni MB, Castro AS, Franco PS, Fermio ML, Roque-Barreira MC, Ietta F, Martins-Filho OA, Silva DAO, Mineo JR, Ferro EAV (2015) IL10, TGF beta1, and IFN gamma modulate intracellular signaling pathways and cytokine production to control *Toxoplasma gondii* infection in BeWo trophoblast cells. *Biol Reprod* 92:82
- Dogruman-AI F, Fidan I, Celebi B, Yesilyurt E, Erdal B, Babur C, Kustimur S (2011) Cytokine profile in murine toxoplasmosis. *Asian Pac J Trop Med* 4:16–19
- Rosbottom A, Gibney EH, Guy CS, Kipar A, Smith RF, Kaiser P, Trees AJ, Williams DJL (2008) Upregulation of cytokines is detected in the placentas of cattle infected with *Neospora caninum* and is more marked early in gestation when fetal death is observed. *Infect Immun* 76:2352–2361
- Innes EA, Panton WR, Thomson KM, Maley S, Buxton D (1995) Kinetics of interferon gamma production in vivo during infection with the S48 vaccine strain of *Toxoplasma gondii*. *J Comp Pathol* 113:89–94
- Verhelst D, De Craeye S, Jennes M, Dorny P, Goddeeris B, Cox E (2015) Interferon-gamma expression and infectivity of *Toxoplasma* infected tissues in experimentally infected sheep in comparison with pigs. *Vet Parasitol* 207:7–16
- López-Pérez IC, Collantes-Fernández E, Rojo-Montejo S, Navarro-Lozano V, Risco-Castillo V, Pérez-Pérez V, Pereira-Bueno J, Ortega-Mora LM (2011) Pathological and immunological findings in placentas from pregnant BALB/c mice infected with *Neospora caninum* at early and late stages of gestation. *Acta Parasitol* 56:245–254
- Cubro H, Kashyap S, Nath MC, Ackerman AW, Garovic VD (2018) The role of interleukin-10 in the pathophysiology of preeclampsia. *Curr Hypertens Rep* 20:36
- Jeong YI, Hong SH, Cho SH, Park MY, Lee SE (2016) Induction of IL-10-producing regulatory B cells following *Toxoplasma gondii* infection is important to the cyst formation. *Biochem Biophys Res* 7:91–97
- Liu Y, Zhao M, Xu X, Liu X, Zhang H, Jiang Y, Zhang L, Hu X (2014) Adoptive transfer of Treg cells counters adverse effects of *Toxoplasma gondii* infection on pregnancy. *J Infect Dis* 210:1435–1443
- Galván-Ramírez ML, Gutiérrez-Maldonado AF, Verduzco-Grijalva F, Dueñas Jiménez JM (2014) The role of hormones on *Toxoplasma gondii* infection: a systematic review. *Front Microbiol* 5:503
- Aiumlamai S, Fredriksson G, Uggla A, Kindahl H, Edqvist LE (1990) The effect of *Toxoplasma gondii* infection in flunixin meglumine treated pregnant ewes as monitored by plasma levels of 15-ketodihydroprostaglandin F2 alpha, progesterone, oestrone sulphate and ultrasound scanning. *Zentralblatt für Veterinärmedizin B* J Vet Med 37:23–34
- Fredriksson G, Buxton D, Uggla A, Kindahl H, Edqvist LE (1990) The effect of *Toxoplasma gondii* infection in unvaccinated and iscom-vaccinated pregnant ewes as monitored by plasma levels of 15-ketodihydroprostaglandin F2 alpha, progesterone, and oestrone sulphate. *Zentralbl Veterinärmed A* 37:113–122

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.