

**REUNIÓN DE LA ACADEMIA DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA
ACTUALIZACIÓN EN NEOSPOROSIS BOVINA
BALCARCE 2006**

Dra. María Cecilia Venturini, Dra. Lucila Venturini

Lab. de Inmunoparasitología, Cátedra de Parasitología,
Facultad de C.Veterinarias, UNLP. 60 y 118, (1900) La Plata, Argentina.
e-mail: cventuri@fcv.medvet.unlp.edu.ar

INMUNIDAD

**Estructura de *Neospora caninum* y proteínas relevantes en la
respuesta inmune**

El phylum Apicomplexa incluye todos aquellos protozoos que poseen un Complejo Apical. El Complejo Apical consta de uno o más anillos polares; un conoide formado por varios microtúbulos enrollados en espiral dentro del anillo polar y un grupo de organelas secretorias ubicadas en el extremo anterior del parásito, que facilitan la adhesión y/o penetración a la célula hospedadora. La forma infectante (taquizoíto) penetra activamente en la célula hospedadora, determinando la formación de una vacuola parasitófora (VP) dentro de la cual se ubica y se multiplica. La membrana de la VP se forma a partir de la membrana plasmática de la célula hospedadora. Durante su formación se excluyen las proteínas de membrana del hospedador, lo que impediría la posterior unión con los lisosomas (Buxton y col., 2002). La capacidad invasiva estaría dada por receptores específicos para el protozoo, ubicados en la superficie celular (Hemphill y col., 2006).

Las roptrias, micronemas y gránulos densos de los Apicomplexa son elementos claves en la invasión de la célula hospedadora a través de la interacción con los citados receptores de la superficie celular y la liberación de proteínas. Los micronemas participan en el proceso de adhesión a la célula hospedadora, las roptrias en la biogénesis de la VP y los gránulos densos en la modificación de la VP, contribuyendo a la formación de la red tubulovesicular.

Pasado un período corto se forman los quistes tisulares, en cuyo interior se encuentran los bradizoítos, que son formas de multiplicación lenta que pueden ser viables durante un tiempo indeterminado.

Actualmente se están desarrollando pruebas de diagnóstico y estrategias para el desarrollo de vacunas con proteínas recombinantes correspondientes a diferentes estructuras del parásito mencionadas más arriba. Para eso se están tratando de expresar los genes que las codifican, como por ejemplo, proteínas de los gránulos densos (NcGRA), de las roptrias (NcROP) y micronemas (NcMIC).

Respuesta inmune mediada por células

N. caninum es un protozoo de vida intracelular. En términos generales, en las infecciones por parásitos de vida intracelular, la respuesta inmune relacionada con la protección depende en parte, de la respuesta Th1, es decir de los linfocitos colaboradores/ CD4 o “helper”1 (Lh1) y sus productos. Los LTh1 son activados por epitopes expresados en la superficie de células procesadoras y presentadoras de antígenos (macrófagos, dendríticas), asociados a Moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) clase II. Como consecuencia de esta interacción se producen citoquinas que intervienen en la activación de los mecanismos de protección derivados de la respuesta inmune mediada por células. Cuando las proteínas antigénicas se procesan en el interior de las células, los epitopes también son presentados a los linfocitos citotóxicos (Lc/CD8) asociados a moléculas del CMH I.

En infecciones por protozoos Apicomplexa, como en el caso de *N. caninum*, la respuesta inmune relacionada con la protección es principalmente de tipo Th1 con la producción de interferón gamma (INF- γ), Interleuquina 12, Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la presencia de células NK (también productoras de INF- γ (Hemphill y col, 2006). Algunas de estas citoquinas, beneficiosas para intentar controlar la infección, resultan perjudiciales para la unidad feto-placenta, antagonizando con el buen término de la preñez (Quinn y col 2002, Innes y col. 2002, Innes y col. 2005).

Los tejidos de unión feto-placenta producen citoquinas pro-gestacionales características de la respuesta Th2 (IL4, 5, 10), debido a los altos niveles de progesterona. Esta hormona inhibe la producción de óxido nítrico, con actividad microbicida, TNF- α y la actividad de las células NK.

Por lo tanto es necesaria una respuesta Th1 dominante para combatir la infección, dando como resultado la producción de citoquinas inflamatorias y perjudiciales para el feto en el inicio de la preñez.

La determinación de la respuesta inmune mediada por células puede realizarse mediante la detección de los niveles de INF- γ , o bien indirectamente mediante la detección de IgG2, producida durante la respuesta inmune celular.

El estudio de la inmunidad mediada por células durante la preñez en vacas infectadas con *N. caninum* permitirá comprender su relación diseñar efectivas estrategias de prevención.

Métodos de diagnóstico

Los métodos de diagnóstico pueden ser directos e indirectos. Para lograr el diagnóstico definitivo es necesario el aislamiento de *N. caninum*. Algunas de las líneas de ratones utilizadas con esos fines son Swiss Webster, Balb/c endocriados e inmunodeprimidos y más recientemente las líneas inmunodeficientes, como los Nude mice y Knock out mice (Hemphill, 1999) y los meriones (*Meriones unguiculatus*) (Dubey y Lindsay, 2000, Venturini y col. 2001). El aislamiento en meriones a partir de diferentes tejidos puede utilizarse con fines diagnósticos. El éxito del aislamiento a partir de tejidos fetales bovinos en cultivos celulares es muy bajo, debido a que la mayoría de los parásitos mueren con la autólisis de las células hospedadoras (Conrad y col., 1993). Se suma a ello la frecuente contaminación del cerebro de fetos abortados.

La inmunohistoquímica contribuye con el diagnóstico histopatológico en cerebro y corazón de fetos abortados, ya que generalmente hay muy pocos parásitos presentes en tejidos autolisados y normalmente son difíciles de identificar con las técnicas de coloración de rutina (Dubey, 1999). En 1998 Campero y col. describieron por primera vez en Argentina la presencia del protozoo por IHQ en fetos abortados (Campero y col. 1998). El reconocimiento de los taquizoítos en los órganos lesionados y la eliminación de otras causas de abortos, asociando la utilización de varias pruebas de diagnóstico permitirá relacionar a *N. caninum* como agente causal del aborto (Dubey y Schares, 2006)

La prueba de PCR es un valioso auxiliar para la detección de *N.caninum* en tejidos infectados. Se han desarrollado pruebas de inmunotransferencia, con diferentes preparaciones antigénicas, con el fin de reconocer fracciones antigénicas con valor diagnóstico.

Los métodos serológicos se basan en la detección de anticuerpos para *N. caninum* e incluyen diversas técnicas de ELISA, aglutinación y la inmunofluorescencia indirecta (IFI) (Bjorkman C. y Uggla A. 1999, Dubey, 2003). Esta última fue la primera de las técnicas utilizadas, empleando como antígeno taquizoítos de *N. caninum*. Se la ha utilizado como la prueba de referencia para el desarrollo de otras técnicas. En Argentina, se detectó el parásito en bovinos por primera vez en 1995 utilizando la prueba de IFI (Venturini L. y col. 1995). Existen distintos criterios con respecto a los títulos serológicos considerados positivos ya que es variable el tiempo de seroconversión, luego de una infección. La detección de anticuerpos en líquidos fetales tiene valor diagnóstico.

Bibliografía

1. Buxton D, Mac Allister M, Dubey J.P. The comparative pathogenesis of neosporosis. Trends in Parasitology 16:546-552. 2002.
2. Bjorkman C., Uggla A. (1999). Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. Int. J. for Parasitol. 29: 1497-1507.
3. Campero, C. M., Anderson, M. L., Conosciuto, G., Odriozola, H., Bretschneider, G., Poso. M. A. (1998). *Neospora caninum*-associated abortion in a dairy herd in Argentina. Vet. Rec. 143, 228-229.
4. Conrad, P., Barr, B., Sverlow, K., Anderson, M., Dalf, B., Kindle, H., Dubey, J.P., Munson, L., Adams, A. (1993). In vitro isolation and characterization of a *Neospora sp.* from aborted bovine foetuses. Parasitology, 106: 239-249.
5. Dubey J.P. Neosporosis in cattle. J.Parasitol.89: S42- S56. 2003
6. Dubey J.P y Schares G. (2006) Diagnosis of bovine neosporosis. Vet. Parasitol. 140: 1-34.
7. Dubey, J. P. and Lindsay, D. S. (2000). Gerbils (*Meriones unguiculatus*) are highly susceptible to oral infection with *Neospora caninum* oocysts
8. Dubey JP, Buxton D, Wouda W. (2006) Pathogenesis of Bovine Neosporosis. J.Comp.Pathol.134: 267-289.

9. Hemphill, A. (1999). The host-parasite relationship in Neosporosis. *Advances in Parasitology* 43, 47-92.
10. Hemphill, A. Vonlaufen N, Naguleswaran A. (2006). Cellular and immunological basis of the host-parasite relationship during infection with *Neospora caninum*.
11. Innes y col. (2002). Immune response to *Neospora caninum* and prospect for vaccination. *Trends in Parasitology*. 18: 497-503.
12. Innes E y col. (2005). The host – parasite relationship in bovine neosporosis. *Vet.Immunol.Immunopathol*. 108: 29-36.
13. Quinn H, Ellis J, Smith N. (2002) *Neospora caninum* a cause of immune mediated failure in pregnancy?. *Trends in Parasitology*. 18: 391-394.
14. Venturini L, Di Lorenzo C, Venturini M.C, .Romero J. Anticuerpos anti *Neospora* sp. en vacas que abortaron.1995 *Vet. Arg.* XII, 113, 167 - 170. ISSN 0326-4629
15. Venturini M.C, Bacigalupe D, Venturini L, Basso W, Moore P, Unzaga J.M, Machuca M, Campero C. (2001). Isolation of *Neospora sp* from the brain of a dairy calf in Argentina. WAAP, Strega, Italia . Poster B9p.