

# **PATOGENIA Y CARACTERIZACIÓN DEL ABORTO DURANTE LA FASE AGUDA DE LA TOXOPLASMOSIS OVINA EN UN ESTUDIO EXPERIMENTAL**

**Lema:** Abortos en la fase aguda de la toxoplasmosis ovina.



Trabajo de Investigación presentado al premio **Enrique Coris  
Gruart**

Modalidad A) Medicina, Cirugía y Sanidad Animal Veterinarias  
(Convocatoria 2014)

## ÍNDICE

<b>1. Resumen</b> .....	3
<b>2. Abstract</b> .....	3
<b>3. Introducción</b> .....	4
<b>4. Material y métodos</b> .....	9
4.1. Preparación del inóculo .....	9
4.2. Animales y diseño experimental .....	9
4.3. Estudios en el animal vivo .....	11
4.3.1. Seguimiento clínico y toma de muestras.....	11
4.3.2. Estudio de la respuesta inmunitaria periférica.....	11
4.3.2.1. Análisis de la respuesta inmunitaria humoral.....	11
4.3.2.2. Análisis de la respuesta inmunitaria celular .....	12
4.4. Estudios post-mortem.....	14
4.4.1. Estudios anatomopatológicos: necropsia y toma de muestras .....	14
4.4.1.1. Estudios histológicos e inmunohistoquímicos.....	15
4.4.2. Detección de ADN de <i>T.gondii</i> mediante PCR .....	16
4.4.3. Estudio de la respuesta inmunitaria local: qPCR.....	17
4.5. Análisis estadístico.....	19
<b>5. Resultados</b> .....	20
5.1. Seguimiento clínico.....	20
5.2. Estudio de la respuesta inmunitaria.....	22
5.2.1. Respuesta inmunitaria periférica .....	22
5.2.1.1. Respuesta inmunitaria periférica de tipo humoral .....	22
5.2.1.2. Respuesta inmunitaria periférica de tipo celular .....	23
5.2.2. Respuesta inmunitaria local .....	24
5.3. Caracterización lesional.....	26
5.3.1. Ovejas infectadas que abortaron.....	26
5.3.2. Ovejas infectadas que no abortaron .....	33
5.3.3. Ovejas control .....	33
5.4. Detección del parásito .....	33
5.4.1. Detección por inmunohistoquímica .....	33
5.4.2. Detección por PCR.....	34
<b>6. Discusión</b> .....	35
<b>7. Agradecimientos</b> .....	43
<b>8. Bibliografía</b> .....	43

## **1. Resumen.**

La toxoplasmosis ovina es una enfermedad infecciosa causante de fallo reproductivo que se asocia a la aparición de abortos un mes después de haber ocurrido la primoinfección de ovejas gestantes. Existe una forma de presentación menos conocida, en la fase aguda de la enfermedad, en la que los abortos se producen pocos días después de la infección. En este trabajo se han estudiado los abortos producidos en la fase aguda, entre los días 7 y 11 tras una infección experimental en ovejas gestantes, con el objetivo de caracterizar la respuesta lesional e inmunitaria y estudiar su patogenia. Las lesiones más significativas fueron la presencia de trombosis vasculares en la placenta y leucomalacia periventricular en el cerebro de los fetos. Estas lesiones coexistían con una elevación de la expresión génica de citoquinas proinflamatorias y de un factor protrombótico, *FGL-2 (fibrinogen-like protein 2)*, en la placenta, junto con la ausencia de anticuerpos maternos frente a *T. gondii*. No se detectó ADN parasitario en los fetos abortados, y esporádicamente en la placenta, descartándose la multiplicación activa del parásito en este órgano. Los resultados obtenidos sugieren la implicación de mecanismos patogénicos diferentes, caracterizados por la trombosis y los infartos en placenta, de los que puedan mediar en los abortos asociados a la forma clásica de la toxoplasmosis ovina.

## **2. Abstract.**

Ovine toxoplasmosis is an infectious disease causing reproductive losses in sheep, usually related to abortions one month after primary infection of pregnant sheep. However, in the acute phase of the disease, abortions can occur few days after infection. In this work we have examined abortions during the acute phase of ovine toxoplasmosis, between days 7 and 11 post infection. The aim of this work was to study the pathological and immune responses together with the pathogenesis of these abortions. The most significant lesion was the occurrence of placental thrombosis and leukomalacia in the

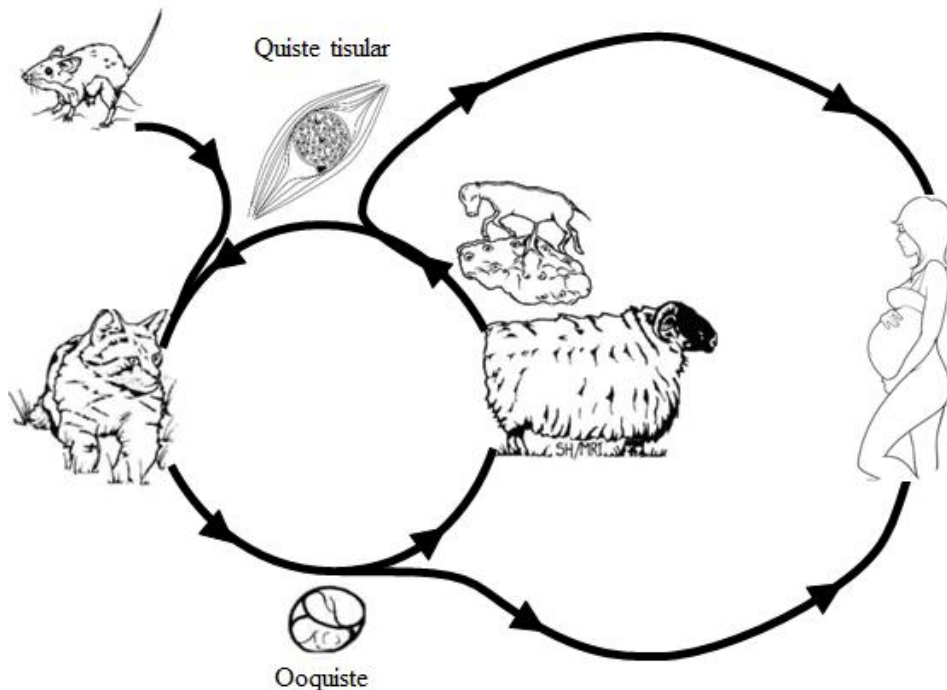
aborted fetuses. They were associated with an elevation in the expression of proinflammatory cytokines and *FGL-2* (*fibrinogen-like protein 2*), a prothrombotic factor, in the placenta. Infected ewes lacked antibody response at the time of abortion. No parasite DNA was identified in aborted fetuses and only sporadically in the placenta, suggesting that no parasite replication occurred. These findings strongly suggest that abortions in acute toxoplasmosis show a pathogenic mechanism, characterized by placental thrombosis and infarcts, different from that of classical toxoplasmosis.

### **3. Introducción.**

La toxoplasmosis ovina es una enfermedad infecto-contagiosa, causada por el protozoo *Toxoplasma gondii* (*T.gondii*), que afecta al ganado ovino en todo el mundo, donde ocasiona importantes pérdidas económicas al causar infertilidad, abortos y muerte perinatal (Buxton *et al.*, 2007; Dubey, 2009). Además, es una enfermedad con gran importancia en salud pública ya que se estima que en la especie humana la toxoplasmosis es una zoonosis parasitaria que se encuentra muy extendida: en Europa se ha estimado que entre el 30 y el 70% de la población estaría infectada (Pappas *et al.*, 2009).

En el ciclo biológico de *T. gondii* (Fig. 1), los hospedadores intermediarios son todos los seres vivos de sangre caliente. Los felinos, fundamentalmente los gatos, son los hospedadores definitivos y suelen infectarse por ingestión de quistes tisulares con bradizoítos a partir de hospedadores intermediarios, normalmente por caza de ratones o de aves silvestres (Dupont *et al.*, 2012). Tras la infección, el parásito completa en poco tiempo (3-10 días) su ciclo sexual, mediante la multiplicación en las células intestinales, y se expulsan los ooquistes al exterior a través de las heces de los felinos. En el caso del ganado ovino, la principal fuente de contagio la suponen los alimentos (pastos, forraje o pienso compuesto) contaminados con heces de gato conteniendo ooquistes (Skariah *et al.*, 2010).

A pesar de la importancia de esta enfermedad y las graves consecuencias que ocasiona tanto en ovinos como en humanos, aún se desconoce gran parte de los mecanismos patogénicos que regulan la infección transplacentaria y causan el aborto. La mayoría de los estudios realizados hasta el momento se han llevado a cabo en infecciones experimentales de animales de laboratorio, principalmente ratón, y asumen que durante la gestación existe una modulación de la respuesta inmunitaria materna (Tait y Hunter, 2009). Sin embargo, debido a las diferencias en la placentación o sistema inmunitario, estos estudios serían difícilmente extrapolables a otras especies, como la ovina o la humana.



**Figura 1.** Ciclo biológico del parásito *T. gondii* (modificado de Buxton *et al.*, 2007).

Clásicamente, la toxoplasmosis se presenta en la especie ovina como una enfermedad infecciosa asociada a la aparición de abortos en las ovejas gestantes infectadas. El aborto y demás manifestaciones clínicas se producirían como consecuencia de la llegada del parásito a los tejidos. Tras la ingestión de heces contaminadas con ooquistes, los taquizoítos llegan al útero durante la fase de parasitemia multiplicándose en los cotiledones, donde se producen focos de necrosis. Sin embargo, a diferencia de lo que

ocurre en otros órganos, los taquizoítos siguen multiplicándose y no se enquistan, ya que en el placentoma la respuesta inmunitaria se encuentra localmente modulada y el parásito no se ve afectado por los mecanismos de inmunidad humoral (Lang *et al.*, 2007). Después de haber invadido las células adyacentes al trofoblasto fetal, los taquizoítos colonizan los órganos internos fetales entre los 5 y 10 días posteriores al cese de la parasitemia (Dupont *et al.*, 2012). De esta forma, las lesiones en la placenta aparecerían 10 días después de haberse producido la infección, caracterizándose por la presencia de pequeños focos de necrosis en los septos carunculares, mientras que las lesiones en el feto se desarrollarían a partir de los 15 días post infección (p.i.), aunque son más frecuentes a partir de los 20 días p.i., afectando al cerebro, corazón, pulmones e hígado, y caracterizadas por múltiples focos de necrosis e inflamación (Buxton y Finlayson, 1986).

Además, las consecuencias de la infección en el feto van a estar estrechamente relacionadas con el momento de la gestación en la que ésta se produce (Innes *et al.*, 2009). La clínica asociada a la toxoplasmosis se observa tras la primera infección (primoinfección) de la oveja gestante. Si sucede en las fases más tempranas de la gestación (primer tercio), la colonización de la placenta suele acompañarse de la invasión del feto por parte del parásito, el cual se multiplica activamente debido a la ausencia de una respuesta inmunitaria fetal suficientemente madura, causando su muerte y, generalmente, su reabsorción (Buxton, 1998). Los abortos que aparecen cuando la infección se produce durante el segundo tercio de gestación serían consecuencia de las lesiones ocasionadas en la placenta. La destrucción tisular, así como la liberación de diversos mediadores de la inflamación comprometerían el traspaso de nutrientes y oxígeno al feto, causando su muerte y posterior expulsión (Dubey, 2009). Cuando la infección se produce en etapas tardías de la gestación, la placenta sería más permisiva a la presencia del parásito, evitándose el desarrollo de una respuesta inflamatoria agresiva,

a la vez que el feto ha desarrollado una respuesta inmunitaria capaz de controlar la multiplicación de *T gondii* y permitiendo que la gestación llegue a término. Sin embargo, esta respuesta inmunitaria fetal no logra evitar la infección del cordero, que nacerá congénitamente infectado (Innes *et al.*, 2009).

De todo lo expuesto, se deduce que la respuesta inmunitaria del hospedador infectado juega un importante papel en la patogenia de la toxoplasmosis. Hasta la fecha, el número de estudios encaminados a conocer los mecanismos que están provocando el aborto, especialmente en el ganado ovino, es muy escaso. Recientemente se ha señalado que, una vez que se produce la infección, las respuestas inmunitarias innata y adaptativa del hospedador, especialmente la de tipo celular, limitan la progresión y multiplicación de los taquizoítos, la forma parasitaria encargada de diseminar la infección por el organismo (Innes *et al.*, 1995; Innes y Vermeulen, 2006). Sin embargo, el papel de la respuesta inmunitaria humoral no será determinante, a lo que se añade la barrera que supone el tipo de placenta que tiene la oveja, donde los anticuerpos (Ac) maternos no pueden llegar al feto, incapacitando de este modo que la respuesta inmunitaria humoral materna pueda ejercer ningún tipo de control sobre la parasitosis fetal (Innes *et al.*, 2009).

Como ya se ha expuesto, el aborto se suele desencadenar a partir de las cuatro semanas posteriores a la primoinfección de ovejas gestantes, por lo que normalmente no se sospecha que la enfermedad esté presente en el rebaño hasta unos meses después de que se haya producido la infección de las ovejas susceptibles (Buxton *et al.*, 2007). Además, el diagnóstico de la toxoplasmosis ovina es difícil de realizar considerando exclusivamente las lesiones macroscópicas o la sintomatología, al ser ambas similares a otros procesos que causan abortos en especies domésticas. Por ello, es necesario recurrir a otras técnicas como el estudio histológico del feto o placenta, la identificación del parásito en tejidos fetales por inmunohistoquímica, la detección de Ac frente a *T.gondii*

en suero u otros fluidos corporales gracias a los inmunoanálisis (ELISA) y la amplificación de ADN parasitario mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Da Motta *et al.*, 2008).

A finales de los años 80 se describió en un número escaso de infecciones experimentales, lo que se definieron como **abortos en la fase aguda de la toxoplasmosis**, ya que estos ocurrían pocos días después (entre 10 y 12) de que el animal fuera infectado (Trees *et al.*, 1989; Owen *et al.*, 1998). El estudio de muestras de suero de las madres mostró que en el momento del parto no se podían detectar Ac específicos frente a *T. gondii*, pero que éstos aparecían con posterioridad, a partir del día 21 p.i. (Owen *et al.*, 1998). En ninguno de los casos descritos se realizó un estudio histológico de las placentas o de los fetos abortados, mientras que la ausencia del parásito en la placenta se determinó mediante la prueba de PCR (Owen *et al.*, 1998). En estos estudios se planteó la hipótesis de que la aparición de los abortos en una fase temprana estaría causada por la fiebre desarrollada en la madre tras la infección, sin que se llegara a confirmar ni se llevaran a cabo más estudios para conocer los mecanismos subyacentes (Owen *et al.*, 1998).

La ausencia de respuesta serológica materna en el momento del aborto, junto con la falta de lesiones macroscópicas evidentes y la ausencia del parásito en la placenta o en el feto dificultarían la detección del aborto en la fase aguda de la toxoplasmosis en los casos naturales, lo que probablemente haya sido la causa de que no se hayan llevado a cabo más estudios sobre esta forma de presentación de la enfermedad. Aunque su primera descripción se hizo en estudios experimentales, se llegó a estimar que entre el 15 y el 25% de los abortos asociados a la toxoplasmosis ovina en condiciones naturales podrían pasar desapercibidos por ocurrir en la fase aguda de la enfermedad (Owen *et al.*, 1998). Recientemente, se ha confirmado que esta forma de presentación de la también se observa en casos naturales de infección (Benavides *et al.*, 2014).



El **objetivo principal** de este trabajo de investigación es *caracterizar, desde el punto de vista clínico y lesional, el aborto producido en la fase aguda de la toxoplasmosis ovina y estudiar la respuesta inmunitaria asociada y sus mecanismos patogénicos* que, como ya se ha señalado, son completamente desconocidos. Para ello, se ha trabajado con casos de toxoplasmosis aguda que ocurrieron en el marco de un proyecto de investigación encaminado a estudiar la respuesta inmunitaria que las ovejas desarrollan frente a la primoinfección por *T. gondii* en los diferentes periodos de gestación. Durante la realización del mismo, aparecieron dos episodios de abortos por toxoplasmosis aguda que han proporcionado el material para poder estudiar esta forma de presentación de la enfermedad.

#### **4. Material y métodos.**

##### **4.1. Preparación del inóculo.**

Con el fin de obtener los ooquistes esporulados con los que infectar a las ovejas, se realizó una infección previa de ratones (línea BALB/c) mediante inoculación intraperitoneal de taquizoítos del aislado M4 de *T. gondii* (Benavides *et al.*, 2011). Posteriormente, el encéfalo de estos ratones se administró por vía oral a gatos. Los ooquistes procedentes de las heces de estos gatos se purificaron mediante una solución concentrada de cloruro de sodio (Wainwright *et al.*, 2007), contándolos posteriormente en un hemocitómetro hasta conseguir dos inóculos que contenían una dosis total de 2000 y 500 ooquistes esporulados del aislado M4 de *T. gondii* respectivamente.

##### **4.2. Animales y diseño experimental.**

Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a lo señalado en el RD 1201/2005 y la directiva europea 2010/63/EU que regulan el uso de animales para experimentación. Se utilizaron 70 ovejas de raza Churra de 12 meses de edad nacidas dentro del mismo lote y seronegativas a *T.gondii*, *Neospora caninum*, virus de la

enfermedad de la frontera y *Chlamydophila abortus*. Se sincronizó el celo de las ovejas mediante tratamiento hormonal con esponjas y posteriormente fueron cubiertas mediante monta natural con machos de raza Churra. A los 40 días posteriores a la fertilización, se comprobó el estado de gestación mediante ecografía y un total de 48 ovejas gestantes fueron seleccionadas. Los animales se distribuyeron al azar en dos lotes experimentales (A y B), ambos compuestos por 24 ovejas, 16 de ellas infectadas y 8 utilizadas a modo de control.

En el día 90 de gestación, 12 ovejas del Lote A fueron inoculadas por vía oral con 2000 ooquistes esporulados del aislado M4 de *T. gondii*. Tres meses más tarde, se infectaron 12 animales del Lote B mediante inoculación de 500 ooquistes esporulados por la misma vía. En cada lote, las 6 ovejas controles recibieron únicamente una solución de tampón fosfato (PBS) por vía oral. Se registró diariamente la temperatura rectal de los animales del Lote B hasta el día 14 p.i.

El diseño experimental inicial incluía el sacrificio seriado en cada lote de cuatro animales infectados y dos no infectados los días 5, 12, 21 y 26 p.i. mediante los procedimientos contemplados en la normativa vigente sobre bienestar animal.

LOTE A	LOTE B
18 ovejas primíparas	18 ovejas primíparas
20 meses de edad	22 meses de edad
90 días gestación (dg)	120 días gestación (dg)
12 animales infectados	12 animales infectados
2000 ooquistes en 20 mL de PBS por vía oral	500 ooquistes en 20 mL de PBS por vía oral
6 animales control	6 animales control

**Tabla 1.** Diseño de los 2 Lotes experimentales (A y B) empleados en el proyecto de investigación.

### 4.3. Estudios en el animal vivo.

#### 4.3.1. Seguimiento clínico y toma de muestras.

Los animales experimentales se observaron diariamente para valorar signos clínicos generales o la presencia de abortos u otras alteraciones del aparato reproductor. Se tomaron muestras de sangre completa los días -7, 0, 5, 11, 16, 21 y 25 p.i. con el fin de obtener suero sanguíneo, para la determinación de Ac serológicos frente a *T. gondii*, y células blancas para valorar la secreción de la citoquina interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ) mediante la prueba de linfoestimulación, utilizando un kit ELISA comercial (Bovigam, Prionics).

#### 4.3.2. Estudio de la respuesta inmunitaria periférica.

##### 4.3.2.1. Análisis de la respuesta inmunitaria humoral.

A todos los animales, tanto infectados como no infectados, se les tomaron muestras de sangre en tubos de vacío sin anticoagulante (10 ml) que se dejaron coagular a temperatura ambiente durante 2 horas y posteriormente se conservaron en refrigeración (4°C) durante 18 horas. Finalmente, se separó el suero sanguíneo del coágulo mediante centrifugación y se conservó a -20°C hasta su utilización.

Los antígenos (Ag) solubles preparados a partir de taquizoítos del aislado ME49 de *T. gondii* fueron usados para cubrir los 96 micro pocillos. Para ello, el Ag total fue diluido en tampón carbonato (63mM, pH 9.6) hasta alcanzar una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de la que se añadieron 100  $\mu\text{L}$  a cada pocillo, dejando incubar la placa a 4°C durante toda la noche. Las uniones no específicas del Ag a los pocillos fueron bloqueadas mediante la adición de 100  $\mu\text{L}$  de albúmina sérica bovina (BSA) diluida al 0.05% en tampón fosfato salino (0.1M, pH 7.6) conteniendo 0.05% de Tween 80 (PBST). Tras 2 horas de incubación, se lavó la placa cuatro veces con PBST. Las muestras de suero fueron

previamente diluidas 1:100 en PBST, y 100  $\mu$ L de estas diluciones fueron añadidas a cada micro pocillo, dejando un tiempo de incubación de 1 hora. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

Tras lavar 4 veces la placa en PBST, se añadieron 100  $\mu$ L a cada pocillo de proteína G conjugada con peroxidasa de rábano picante (Biorad, Hercules, USA) diluida 1:1500 en PBST, a modo de Ac secundario y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Tras realizar el lavado de la placa, de manera similar a las veces anteriores, se añadieron 100  $\mu$ L por pocillo del sustrato ABTS (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) diluido 5.48 mg en 50 mL de tampón citrato (0.05 M, pH 4.0 con 0.0016% de peróxido de hidrógeno). Tras la incubación durante 30 min a T<sup>a</sup> ambiente, la reacción se paró mediante la adición de 50  $\mu$ L por pocillo de ácido fluorhídrico 0.1 M. Finalmente se leyeron las densidades ópticas (D.O.) de cada pocillo en un espectrofotómetro (EL-340. Bio-Tek Instruments, Madrid, España) con un filtro de 405 nm.

Para interpretar los valores obtenidos en esta lectura, se calculó la media de las D.O. de cada suero problema, así como la de los controles positivos. Finalmente estos valores fueron transformados en un índice de absorbancia que se obtuvo al dividir el valor medio de la densidad óptica de cada suero entre el valor medio de los controles positivos de cada placa.

#### 4.3.2.2. Análisis de la respuesta inmunitaria de tipo celular.

Se llevó a cabo mediante la estimulación de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) con antígenos de *T. gondii*. Esta prueba se utilizó como indicador de la respuesta inmunitaria celular periférica. Se basa en la valoración de la producción de IFN- $\gamma$  por los linfocitos previamente sensibilizados, tras un segundo contacto con el Ag.

Las muestras de sangre de los animales que componían ambos lotes experimentales fueron recogidas en tubos vacutainer de 10 mL (TerumoEurope) con heparina de litio como anticoagulante. Las PBMCs fueron aisladas por centrifugación en gradiente de Ficoll siguiendo procedimientos previamente descritos (Wattegedera *et al.*, 2004). Una vez aisladas, las PBMCs fueron resuspendidas en medio RPMI 1640 (Gibco, Paisley, UK) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS; Lonza, Belgium) y 100X de solución antibiótico/antimicótica (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) a una concentración de  $1 \times 10^6$  células por pocillo. El procedimiento se realizó en placas de 24 pocillos (Nunc, Roskilde, Denmark), con  $5 \times 10^5$  células por pocillo de Ag soluble de *T.gondii* a una concentración final de 2  $\mu\text{g/mL}$ , concanavalina A (ConA, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) a una concentración de 5  $\mu\text{g/mL}$  o en PBS. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado para cada estímulo.

La placa se colocó en un incubador de 5% de  $\text{CO}_2/37^\circ\text{C}/100\%$  de humedad durante 96 horas. De cada pocillo se recogieron 0.5 mL de sobrenadante que se almacenó a  $-70^\circ\text{C}$  para su posterior análisis. El IFN- $\gamma$  secretado en el sobrenadante se detectó mediante la realización de una técnica de ELISA de captura, empleando el kit comercial “BOVIGAM® *Mycobacterium bovis* Gamma Interferon Test Kit for cattle” (Prionics AG, Suiza). Este kit emplea un Ac monoclonal frente a esta citoquina de la especie bovina, la cual presenta reacción cruzada frente al IFN- $\gamma$  ovino (Pérez *et al.*, 1997).

Los valores de D.O. de cada animal fueron calculados como resultado de dividir la D.O. del sobrenadante estimulado con Ag de *T.gondii* entre la D.O. del sobrenadante estimulado con PBS (a modo de control negativo).

#### **4.4. Estudios post-mortem.**

##### **4.4.1. Estudios anatomopatológicos: necropsia y toma de muestras.**

Se realizó la necropsia completa y sistemática de aquellas ovejas y fetos sacrificados o recuperados tras el aborto (ver sección de resultados). Se tomaron diversas muestras de la placenta (diez placentomas seleccionados al azar), órganos maternos (cerebro, ganglio uterino y mesentérico y nódulos linfáticos) y fetales (cerebro, médula espinal, corazón, pulmones, hígado, riñón, timo y músculo) que fueron fijadas mediante inmersión en formol tamponado al 10% para la realización de estudios histológicos e inmunohistoquímicos. En ningún caso las muestras permanecieron en formol durante más de 7 días.

Se obtuvieron secciones de las muestras de tejido de los placentomas y de hígado fetal que fueron recogidas para su examen histológico e inmunohistoquímico, y se congelaron, manteniéndose a -20°C hasta su utilización para la detección de ADN de *T. gondii* mediante PCR. En cada animal, se analizaron cinco placentomas diferentes, realizando tres extracciones y amplificaciones de ADN por cada placentoma. En los fetos se realizaron también tres extracciones y amplificaciones a partir de una muestra de hígado. El número de animales y distribución por lotes en los que se realizó la detección parasitaria por PCR se detallan en el capítulo de resultados (punto 3.4.2).

Además, se tomaron fragmentos de los cotiledones placentarios ya muestreados y se preservaron en una solución protectora del ARN (RNAlater, Ambion). Posteriormente, fueron conservados a -20°C para la determinación de citoquinas mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR).

#### 4.4.1.1. Estudios histológicos e inmunohistoquímicos.

Las muestras previamente fijadas en formol se incluyeron en parafina tras su deshidratación en un gradiente creciente de alcoholes y tratamiento con xilol. Posteriormente, se realizaron los bloques de parafina que fueron cortados en un microtomo, obteniéndose secciones de 2.5 micras ( $\mu$ ), empleadas para la valoración de lesiones tras su tinción con la técnica de hematoxilina-eosina (HE) y la tinción de Martius-Scarlet-Blue (MSB), para detectar la presencia de fibrina. La valoración de lesiones se llevó a cabo mediante el apoyo del sistema digital de análisis de imágenes ImageJ (Rasband, W.S., Image J, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014).

En secciones de tejido seleccionadas, se llevaron a cabo diferentes tinciones inmunohistoquímicas. Tras la desparafinación e hidratación de las muestras, se procedió a inactivar la peroxidasa endógena mediante su inmersión en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en metanol a temperatura ambiente. Después de realizar 2 lavados en PBS (0.1 M, pH 7.5) durante 10 minutos, se llevó a cabo el tratamiento de desenmascaramiento de Ag (ver tabla 2). A continuación se realizaron 2 nuevos lavados y las muestras fueron incubadas con el Ac primario a la dilución apropiada (ver tabla 2) a 4°C durante toda la noche, tras lo cual las muestras fueron lavadas de nuevo en PBS para eliminar las uniones no específicas y se añadió el Ac secundario (Dako Real Envision/HRP, K5007) durante 40 minutos. Finalmente, la reacción se reveló mediante la adición de 100  $\mu$ L del kit comercial DAB (Dako Real DAB+Chromogen, K5007) durante 30 segundos, seguido de un lavado de las preparaciones en agua corriente durante 5 minutos. Por último, se realizó una tinción de contraste con hematoxilina para posteriormente observar las preparaciones al microscopio óptico.

Ac <sup>Y</sup>	Clon/ Laboratorio/ Referencia	Tipo	Desenmascaramiento	Concentración	Detección de ...
anti- <i>T. gondii</i>	Benavides <i>et al.</i> , 2011	Policlonal	No	1:2 000	Ag parasitario
anti- PPA $\beta$	22C11/ Millipore	Monoclonal	Microondas, citrato pH 6	1: 10 000	Daño axonal
anti- <i>GFAP</i>	Dako	Policlonal	No	1: 500	Astrocitos
anti-Vim	V9/ Dako	Monoclonal	Olla, citrato pH 6	1:1000	Oligodendrocitos inmaduros
anti- Iba-1	Wako	Policlonal	Olla, citrato pH 6	1: 2 000	Microglia

**Tabla 2.** Descripción de los Ac empleados en los estudios inmunohistoquímicos. (YAc=anticuerpo; PPA $\beta$ = Anti-Alzheimer Precursor Protein A4 Antibody; GFAP = Glial Fibrillary Acidic Protein; Vim= vimentine; Iba-1 = Ionized calcium Binding Adapter molecule 1).

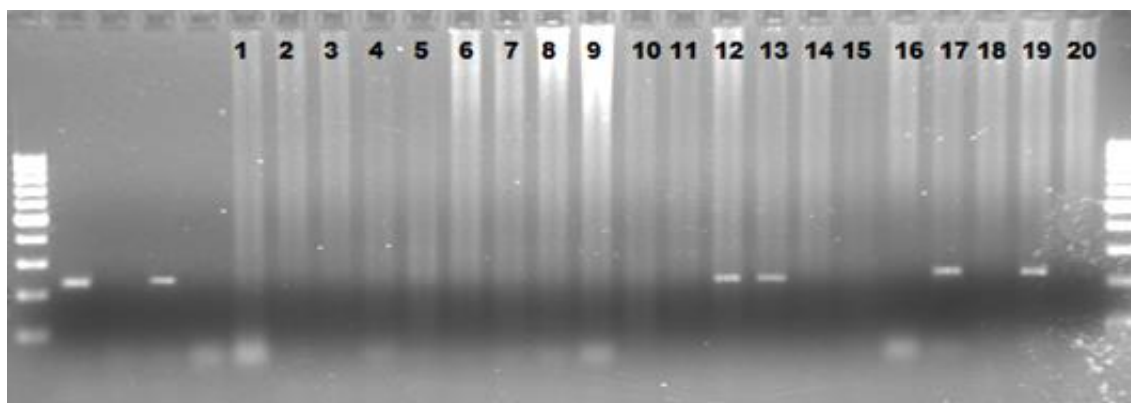
La valoración de la intensidad de la inmunotinción para los diferentes anticuerpos (excepto el antígeno parasitario) se llevó a cabo de forma subjetiva, clasificando cada sección con un valor entre 0 y 4, donde 0 indica ausencia total de tinción y 4 la intensidad máxima.

#### 4.4.2. Detección de ADN de *T. gondii* mediante PCR.

Para extraer el ADN de las muestras de tejido (placenta e hígado fetal) se tomaron cantidades de entre 20 y 50 mg, empleándose el kit comercial Maxwell® 16 Mouse Tail DNA Purification Kit, desarrollado por Maxwell® 16 System (Promega, Wisconsin, USA), 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/ $\mu$ L. Cada reacción de PCR fue realizada en un volumen final de 25 $\mu$ L usando 5 $\mu$ L 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 anidada del gen ITS1 (Hurtado *et al.*, 2001). En el estudio se incluyeron controles negativos, que consistieron en reacciones sin el molde 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, considerándose la reacción como positiva al observarse una banda de 227 pares de bases (pb) (Fig. 2).



**Figura 2.** Visualización mediante electroforesis en gel de agarosa del ADN de *T. gondii*. En ambos extremos del gel se muestra un patrón de pesos moleculares. Las muestras positivas pueden observarse en los carriles n<sup>os</sup> 12, 13, 17 y 19 con una banda de 227 pb. El primer y tercer carril empezando por la izquierda contienen los controles positivos. El segundo y cuarto, los controles negativos.

#### 4.4.3. Estudio de la respuesta inmunitaria local: qPCR.

En la placenta, se evaluó la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (IFN- $\gamma$ , y TNF- $\alpha$ ) representativas de la respuesta Th1, así como de las moléculas FGL-2 y factor tisular (TS) participantes en la hemostasis y formación de trombos. Para ello, se estudiaron muestras de placentoma (tres por animal) tomadas al azar y mantenidas en solución RNAlater (Sigma-Aldrich) a -20 °C mediante hasta su análisis por RT-PCR a tiempo real.

En primer lugar se extrajo el RNA mensajero utilizando el kit Maxwell® 16 LEV simplyRNATissue Kit desarrollado para el sistema automático Maxwell® 16 System (Promega, Madison, Wisconsin, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ARN total eluído se determinó por medición en espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm y la pureza a partir del índice obtenido a 260/280nm. Hasta un total de 2,5  $\mu$ g de ARN fue utilizado como molde para la síntesis de ADN complementario en la reacción de retrotranscriptasa. El ADN complementario fue

sintetizado en una reacción de 20  $\mu$ l mediante la prueba comercial SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Paisley, UK), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Se diseñaron cebadores específicos (ver Tabla 3) (Sigma-Aldrich) para cada una de las citoquinas y el gen normalizador de la  $\beta$ -actina de ovino de acuerdo a la secuencias depositadas en el banco de datos del NCBI. Al menos uno de los dos cebadores específicos utilizados para cada citoquina fueron diseñados en la unión exón-exón de la secuencia para evitar la amplificación a partir del ADN genómico como contaminante de la muestra. Posteriormente, se llevó a cabo la PCR a tiempo real para cada muestra en un volumen final de 20  $\mu$ l que contenía 10  $\mu$ l de la mezcla comercial Power SYBR® PCR Master Mix (Applied Biosystems). Esta mezcla incluye todos los reactivos necesarios para la PCR excepto los cebadores, que fueron posteriormente añadidos a una concentración de 500 nM, y 5  $\mu$ l de ADN obtenido de las reacciones de síntesis de ADN complementario a una dilución 1:25 (4 pg de ADN estimados). Las amplificaciones se llevaron a cabo utilizando el programa normalizado en el ABI 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems). La cuantificación se basó en el incremento de la fluorescencia detectado por la unión del Sybr green al ADN de doble cadena sintetizado *de novo*.

Para cada gen, se preparó una curva normalizada basada en diluciones decimales a partir de la concentración de 10 ng/ $\mu$ l de ADN plasmídico portador del ADN complementario que codifica para cada gen. La curva de normalización para cada gen desde la dilución  $10^{-2}$  a  $10^{-9}$  fue incluida por duplicado en cada reacción. La cantidad de ADN complementario para cada citoquina fue calculado por interpolación del Ct en la curva normalizada de ADN plasmídico, y normalizada mediante el Ct determinado para el gen de  $\beta$ -actina ( $2^{-\Delta Ct}$ ). El incremento de la expresión relativa de cada citoquina

(número de veces que incrementó respecto al grupo control) con respecto al grupo testigo del aborto se calculó de acuerdo a  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001).

Molécula	Cebador	Secuencia del cebador	Amplicon	R <sup>2</sup> <sup>a</sup>	K <sup>b</sup>
IFN- $\gamma$	QIFN-UP	5'-GATTCAAATTCCGGTGGATG-3'	110 pb	0,9997	-3.425
	QIFN-RP	5'-TTCTCTCCGCTTTCTGAGG-3'			
TNF- $\alpha$	QTNF-UP	5'-CCAGAGGGAAGAGCAGTCC-3'	157 pb	0,9983	-3.364
	QTNF-RP	5'-GGAGCGCTGATGTTGGCTAC-3'			
$\beta$ - Actina	BACTIN-UP	5'-ACACCGCAACCAGTTCGCCAT-3'	126 pb	0,9978	-3.716
	BACT216-RP	5'-GTCAGGATGCCTCTCTTGCT-3'			
FGL-2	QFGL2-UP	5'-TACAATCACTCCCAGTTCAG-3'	145 pb	0.998	-3.564
	QFGL2-RP	5'-ATGGTCTCCATGTCGCAGAA-3'			
TS	QTPTS-UP	5'-ACACCAGCATTTCCTACTGTG-3'	80 pb	0.996	-3.391
	QTPTS-RP	5'-CTGTCCAAGTTTTGTCTCTA-3'			

**Tabla 3.** Cebadores utilizados en PCR a tiempo real para la determinación de diferentes mediadores (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , FGL-2 y TS) en tejido ovino. (<sup>a</sup> Coeficiente de regresión en la curva de normalización con ADN plasmídico; <sup>b</sup> Pendiente de la curva de normalización con ADN plasmídico).

#### 4.5. Análisis estadístico.

Los datos de temperatura rectal, Ac y nivel de IFN- $\gamma$  fueron sometidos a un análisis de varianza, utilizando el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS (SAS Inst. Inc.). La comparación entre los valores de Ac y de IFN- $\gamma$  ofrecidos por las ovejas infectadas y las del lote control, se llevó a cabo mediante la técnica t de Student, considerando un nivel de significación del 95%. La normalización de los niveles de expresión de los mediadores TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , FGL-2 y TS se llevó a cabo mediante los valores medios de Ct (resultado de los duplicados) para cada muestra y citoquina, normalizándolos frente al valor de Ct de la  $\beta$ - Actina. Los valores de expresión génica de citoquinas y los de intensidad de tinción inmunohistoquímica fueron finalmente analizados mediante la prueba estadística U-Mann Whitney (caso-control) de acuerdo al nivel de significación  $p < 0.05$ . (Software: GraphPadPrism v.5.00).

## 5. Resultados.

### 5.1. Seguimiento clínico.

El hallazgo más llamativo de este estudio fue la aparición de abortos tempranos, entre los días 7 y 11 p.i. en ambos lotes (Tabla 4).

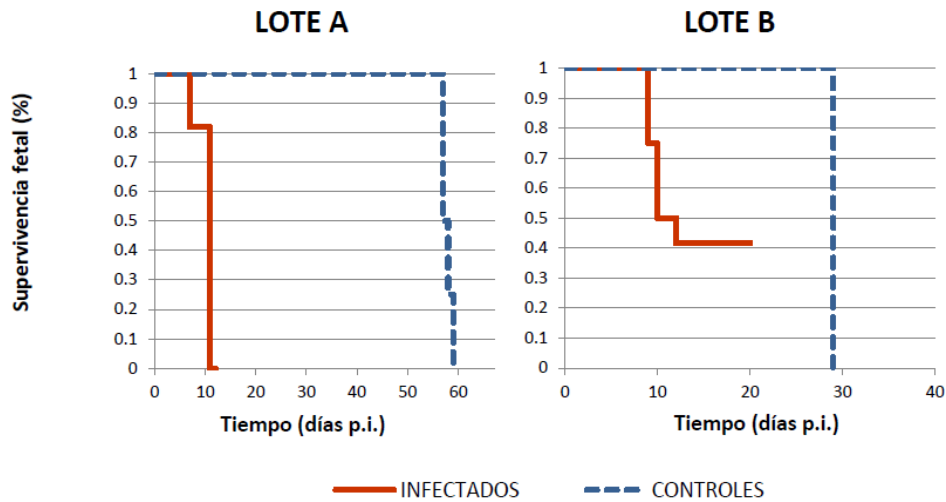
Lote	Dosis	N° de ovejas por día post infección (dpi) <sup>^</sup>				
		5 dpi	7-11 dpi <sup>‡</sup>	12 dpi	21 dpi	Parto natural
A	2x10 <sup>3</sup> <sup>†</sup>	4/2	11/0	1/2	0/0	0/4
B	5x10 <sup>2</sup>	4/2	7/0	2/2	3/2	0/2

**Tabla 4.** Distribución de los animales experimentales según la dosis inoculada y los días post infección (dpi) cuando fueron sacrificados o se produjo el aborto. ( <sup>^</sup>: ovejas infectadas/control; <sup>†</sup>: ooquistes esporulados de *T. gondii*; <sup>‡</sup>: periodo en el que ocurrieron los abortos espontáneos. El resto de días corresponden al sacrificio seriado, o parto natural, de las ovejas).

En el Lote A, infectado con 2 x 10<sup>3</sup> ooquistes, seis ovejas (cuatro infectadas y dos controles) fueron sacrificadas el día 5 p.i. de acuerdo al diseño experimental inicial, no observándose lesiones macroscópicas o signos de enfermedad ni en las madres ni en los fetos. Después, entre los días 7 y 11 p.i., abortaron de forma espontánea once ovejas infectadas (91.6% de las restantes ovejas infectadas). Posteriormente, la única oveja infectada que no abortó, así como dos animales del lote control, fueron sacrificados el día 12 p.i. En las cuatro ovejas controles la gestación llegó a término y los corderos fueron sacrificados a las 12 h posteriores al nacimiento.

Tras este elevado porcentaje de abortos ocurridos en el Lote A, se decidió reducir la dosis del inóculo infectante del Lote B de 2 x 10<sup>3</sup> a 500 ooquistes. De acuerdo al diseño experimental, se procedió al sacrificio de seis ovejas (cuatro animales infectados y dos controles) los días 4 y 5 p.i., no observándose lesiones ni signos de enfermedad en estos animales. Sin embargo, entre el día 9 y 11 p.i., abortaron siete ovejas infectadas de este lote (58.3% de las restantes ovejas infectadas). El resto de animales fue sacrificado de acuerdo al diseño original (Tabla 4).

La supervivencia fetal tras la infección en ambos lotes se muestra en la gráfica 1:



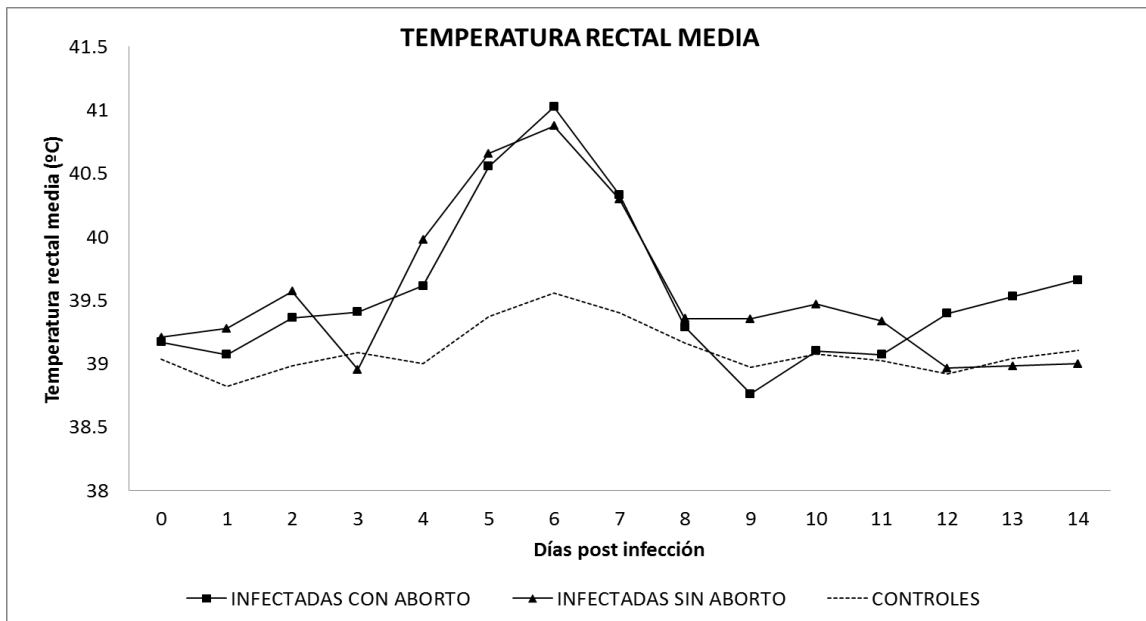
**Gráfica 1.** Representación de la curva de supervivencia fetal de los lotes experimentales A y B.

Como puede observarse, en el Lote A se produjeron abortos espontáneos como consecuencia del desarrollo del proceso infeccioso en todas las ovejas infectadas entre los días 7 y 11 p.i., mientras que en las ovejas control no se produjo ningún aborto, llegando a producirse el parto natural de todas ellas en torno al día 60 p.i., siendo todos los corderos viables y sin ningún signo clínico de enfermedad.

Por su parte, en el Lote B, puede observarse cómo entre los días 8 y 12 p.i. abortaron el 58% de las ovejas infectadas (7 animales de 12 infectados). El día 22 p.i. se sacrificaron el resto de las ovejas infectadas que no habían abortado (3 animales). Con respecto a las ovejas control, el parto natural de las mismas se produjo alrededor del día 30 p.i. (150 días de gestación), alcanzando la supervivencia fetal de estas ovejas el valor de 0 en ese momento. Al igual que en el Lote A, los corderos de estas ovejas nacieron viables y sin signos clínicos de enfermedad.

En las ovejas del Lote B se registraron las **temperaturas rectales** de las ovejas. Se observaron diferencias significativas en la temperatura rectal media de los animales infectados y los controles en los días 2, 5 y 6 p.i. ( $p < 0.001$ ). La temperatura rectal media del grupo de ovejas infectadas fue mayor entre los días 4 y 7, con un pico de 41.3 °C en

el día 6 p.i. No se encontraron diferencias significativas entre la temperatura rectal media de los animales infectados que abortaron y los que no lo hicieron (Gráfica 2).



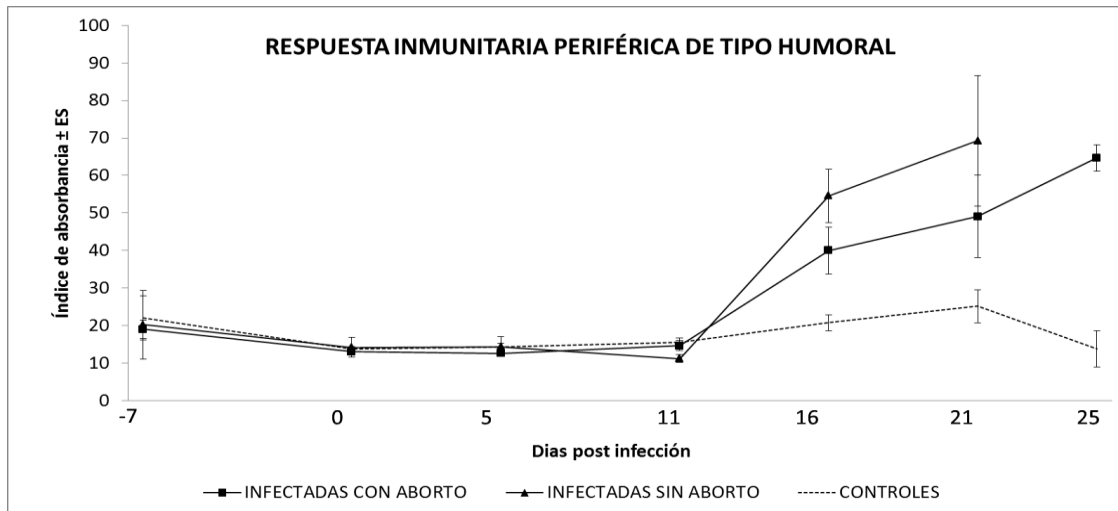
Gráfica 2. Temperatura rectal media de los animales (infectados y controles) del lote experimental B.

## 5.2. Estudio de la respuesta inmunitaria.

### 5.2.1. Respuesta inmunitaria periférica.

#### 5.2.1.1. Respuesta inmunitaria periférica de tipo humoral.

Con el objetivo de analizar la relación entre la presencia de Ac serológicos específicos frente a *T. gondii* y la aparición de los abortos en la fase aguda de la enfermedad, los animales se agruparon independientemente del tiempo de gestación en el que fueron infectados en estos tres grupos: las ovejas que abortaron, las ovejas infectadas que no abortaron (sacrificadas en los días 5, -Lotes A y B-, 12 y 21 p.i. – sólo Lote B -) y las ovejas control (Gráfica 3).

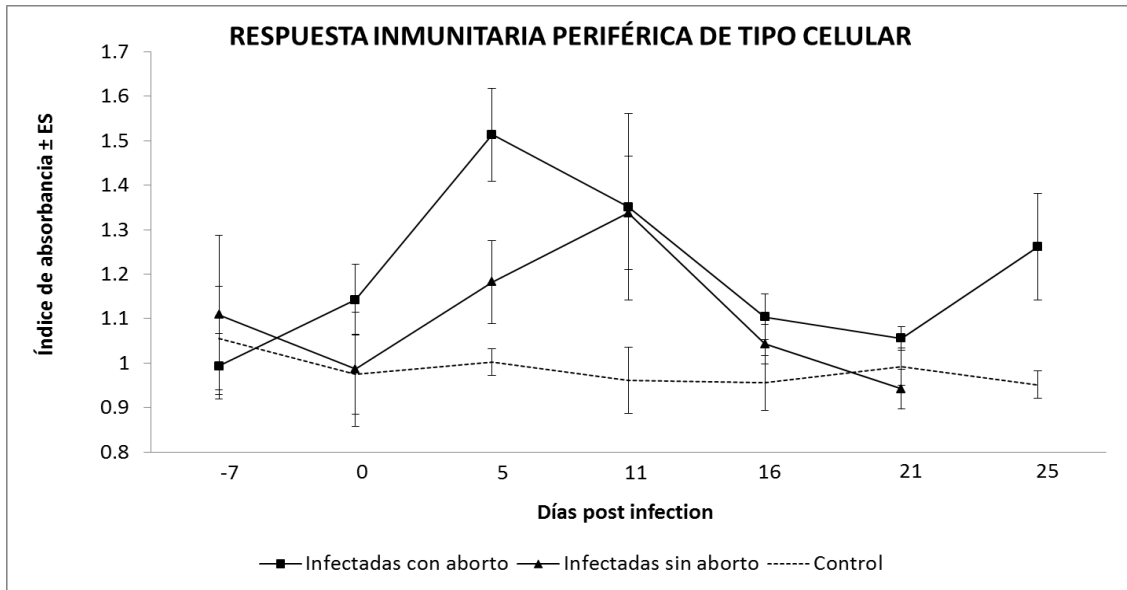


**Gráfica 3.** Cinética de la producción de anticuerpos en las ovejas infectadas (incluyendo las que abortaron y las que no lo hicieron) y controles.

Como puede observarse en la gráfica, la cinética de producción de anticuerpos de las ovejas infectadas de ambos lotes experimentales, tanto las que abortaron como las que no lo hicieron, fue muy similar, registrándose un incremento en el valor de D.O. a partir del día 16 p.i. que aumentaba progresivamente hasta el final del experimento. Todas las madres eran seronegativas en el momento de producirse los abortos. El valor de D.O. de estas ovejas en los días 16, 21 y 26 p.i. fue significativamente mayor ( $p < 0.01$  en los días 16 y 21 p.i. y  $p < 0.001$  en el día 21 p.i.) que en las ovejas control. A pesar de que el valor de D.O. medio de las ovejas infectadas que abortaron fue menor que el de las ovejas infectadas que no sufrieron abortos, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ).

#### 5.2.1.2. Respuesta inmunitaria periférica de tipo celular.

La producción de IFN- $\gamma$  por las PBMCs fue analizado de acuerdo a la división previamente establecida al analizar la respuesta serológica de los animales en tres grupos.



**Gráfica 4.** Cinética de la producción de INF- $\gamma$  en las ovejas infectadas (incluyendo las que abortaron y las que no lo hicieron) y controles.

En términos generales, los animales que sufrieron abortos de fase aguda mostraron una elevación más temprana en la secreción de IFN- $\gamma$  en la pruebas de linfoestimulación (Gráfica 4), aunque las diferencias con las ovejas infectadas que no abortaron no fueron estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ).

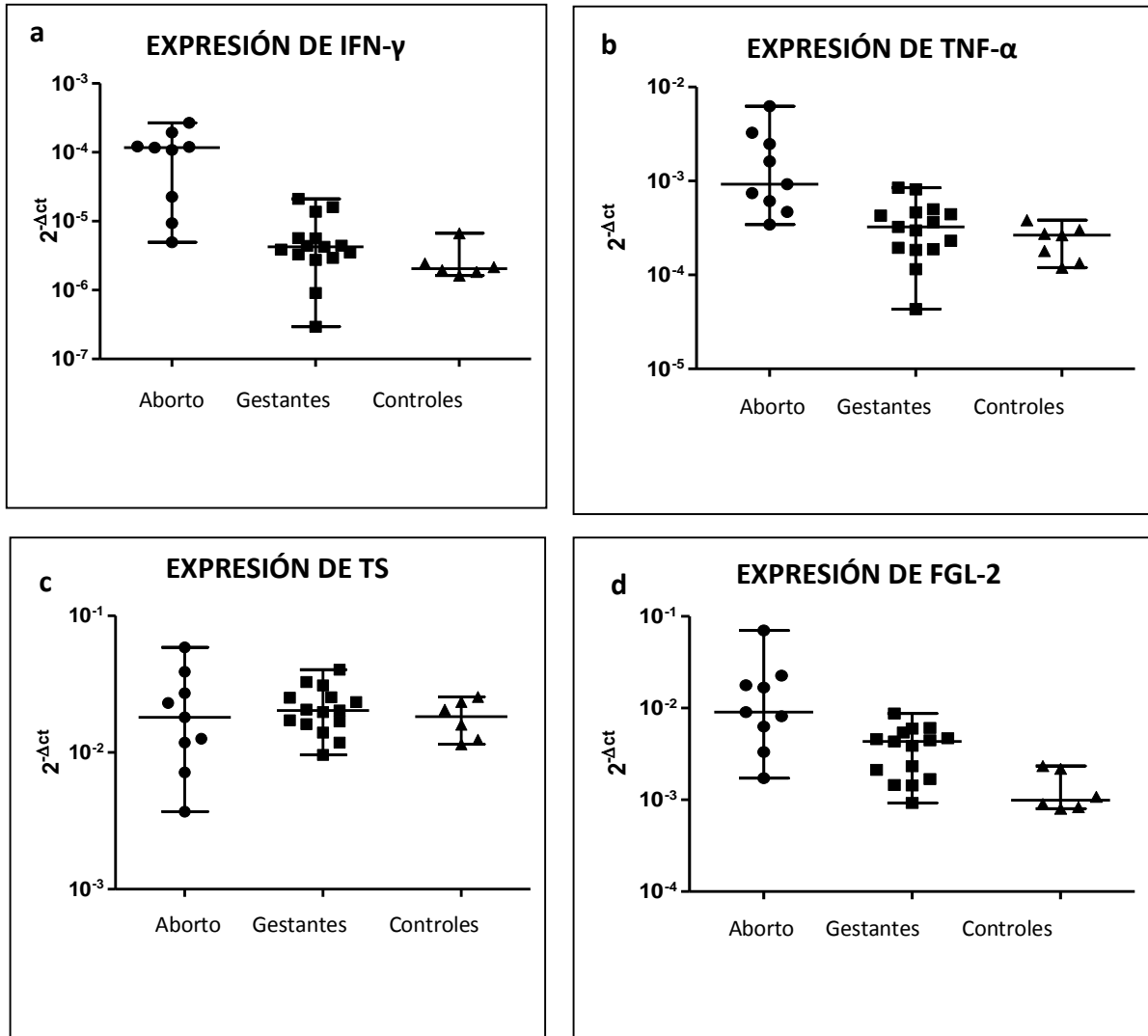
En el día 5 p.i., se observa un incremento significativo ( $p < 0.001$ ) en la producción de la citoquina por parte de las ovejas infectadas que abortaron con respecto a las ovejas control, situándose la D.O. de las ovejas infectadas que no abortaron entre ambos valores. Sin embargo, en el día 11 p.i., hubo un incremento no significativo ( $p > 0.05$ ) en la producción de IFN- $\gamma$  en las ovejas infectadas que no abortaron con respecto al grupo de ovejas control.

#### 5.2.2. Respuesta inmunitaria local.

La expresión génica de IFN- $\gamma$  en la placenta, valorada mediante qPCR, fue en términos generales mayor en las ovejas infectadas que abortaron con respecto a las controles (Gráfica 5a), no encontrándose diferencias significativas entre este último grupo y las ovejas infectadas que no abortaron ( $p > 0.05$ ). Además, se observaron diferencias



estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en los valores de expresión génica de esta citoquina en las ovejas infectadas que sufrieron abortos con respecto a las que no abortaron.



**Gráfica 5.** Distribución de los animales estudiados en función de la expresión de los diferentes mediadores (a: IFN- $\gamma$ ; b: TNF- $\alpha$ ; c: TS; d: FGL-2) en las muestras de placenta de los diferentes grupos experimentales (ovejas infectadas que sufrieron abortos, ovejas infectadas que no abortaron, ovejas control).

Los resultados de expresión génica de TNF- $\alpha$  fueron muy similares a los de IFN- $\gamma$ , ya que las ovejas infectadas mostraron un mayor índice que las ovejas control (Gráfica 5b). La expresión de TNF- $\alpha$  en las ovejas infectadas que abortaron fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) que en aquellas que no abortaron.

En cuanto a la expresión de TS (Gráfica 5c) fue muy similar en los tres grupos estudiados, no encontrándose diferencias significativas entre ellos ( $p > 0.05$ ).

Finalmente, los niveles de expresión génica de FGL-2 (Gráfica 5d) fueron significativamente mayores ( $p < 0.05$ ) en las ovejas infectadas que abortaron con respecto a las ovejas control, no encontrándose diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) al comparar el resto de grupos.

### 5.3. Caracterización lesional.

#### 5.3.1. Ovejas infectadas que abortaron.

Respecto a la placenta, de las 18 ovejas que abortaron en la fase aguda, solamente se pudo realizar la valoración lesional en ocho (cuatro del lote experimental A y cuatro del lote B), ya que las demás estaban muy autolíticas, lo que impedía su estudio. Estas ocho placentas y todos los fetos que abortaron mostraban las mismas lesiones microscópicas y macroscópicas, independientemente del lote experimental al que perteneciesen (Tabla 5).

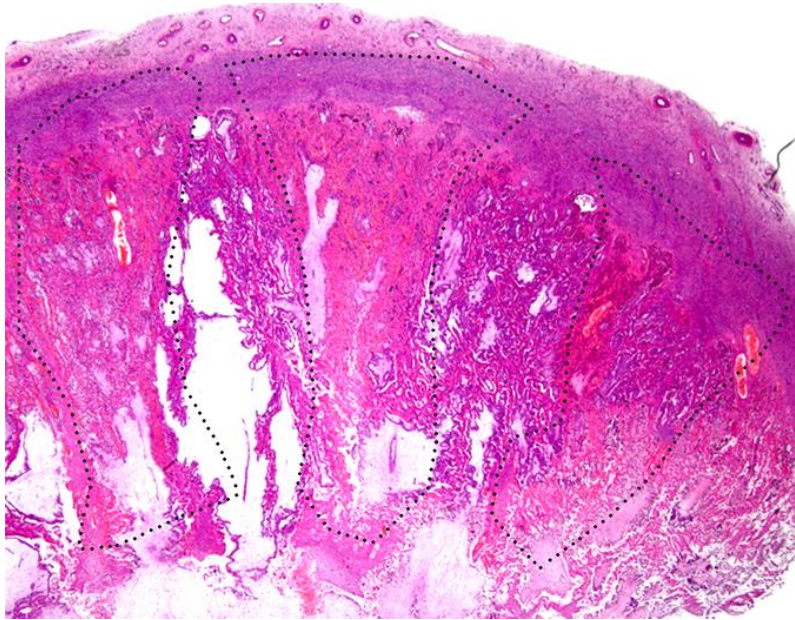
Lote	Dosis infectiva	% de positivos de los fetos estudiados <sup>^</sup>									
		5 dpi		7-11 dpi <sup>‡</sup>		12 dpi		21 dpi		Parto de las ovejas	
		HE	PCR	HE	PCR	HE	PCR	HE	PCR	HE	PCR
A	$2 \times 10^3$ <sup>†</sup>	0/0	0/0	100/9	0/0	0/0	100/0	ns	ns	0/0	0/0
B	$5 \times 10^2$	0/0	0/0	100/63	33/0	0/0	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

**Tabla 5.** Porcentaje de casos estudiados en relación con las lesiones histológicas y/o detección de ADN de *T. gondii* según la dosis inoculada y el día p.i. en el que se sacrificó a las ovejas o abortaron.

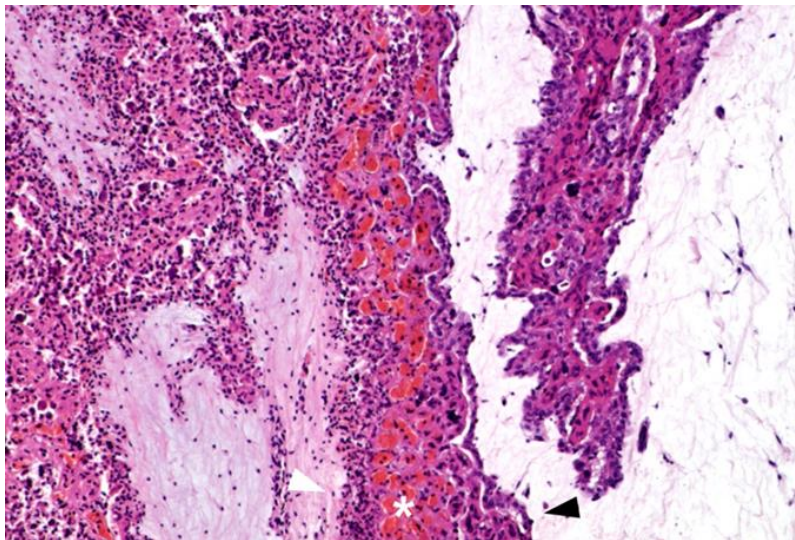
Macroscópicamente, no se encontraron lesiones significativas en las placentas. Únicamente se observaba una superficie enrojecida y el líquido amniótico era turbio. Los fetos, ninguno de ellos viable, presentaban un grado variable de autólisis y edema.

Microscópicamente, en los **placentomas** estudiados se apreciaron múltiples focos de necrosis por coagulación delimitados por una intensa congestión (Figs. 3 y 4), morfológicamente compatibles con infartos (necrosis isquémica). Dentro de estas áreas, en el interior de algunos vasos pertenecientes a la carúncula materna, se apreció la

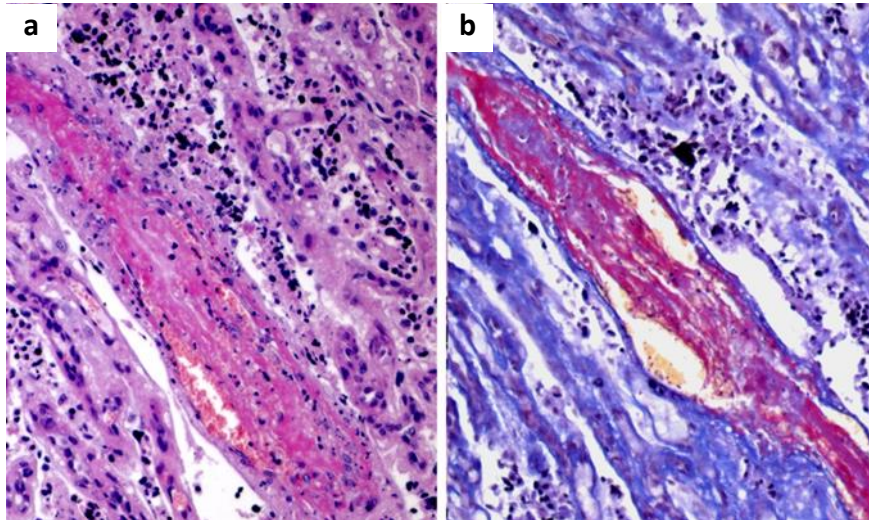
presencia de trombos de fibrina ocluyendo total, o parcialmente, la luz de los mismos (Fig. 5a), que se teñían de forma distintiva mediante la técnica MSB (Fig. 5b). En el resto de órganos de las ovejas no se observaron lesiones significativas.



**Figura 3.** Sección coronal de un placentoma de un aborto de fase aguda. Se han demarcado con líneas de puntos las áreas de necrosis por coagulación (infartos). HE. 40x.

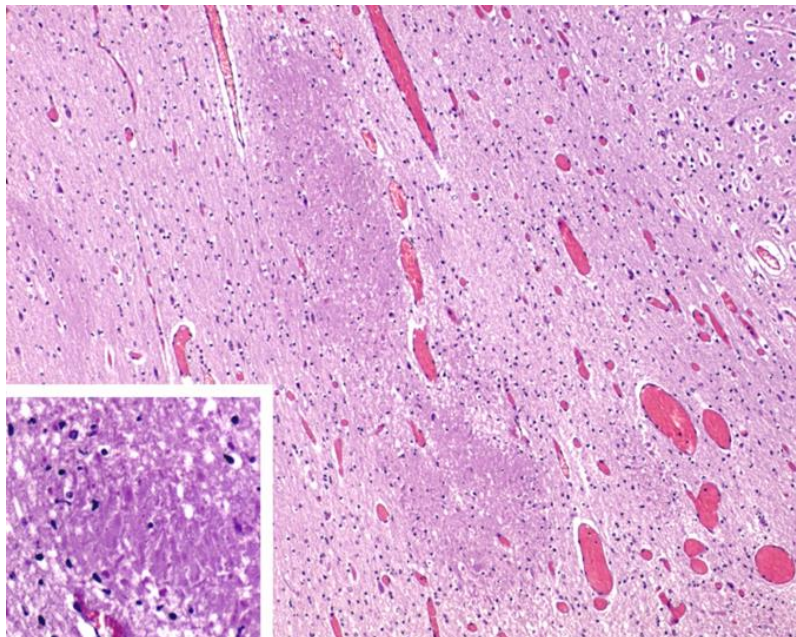


**Figura 4.** Detalle de un área de infarto. Se observa la zona de congestión en una vellosidad (asterisco) entre el área de hialinización del meséquima y restos necróticos (flecha blanca) y una zona de tejido sano donde se observa la capa de trofoblastos intactos (flecha negra). HE. 100x.



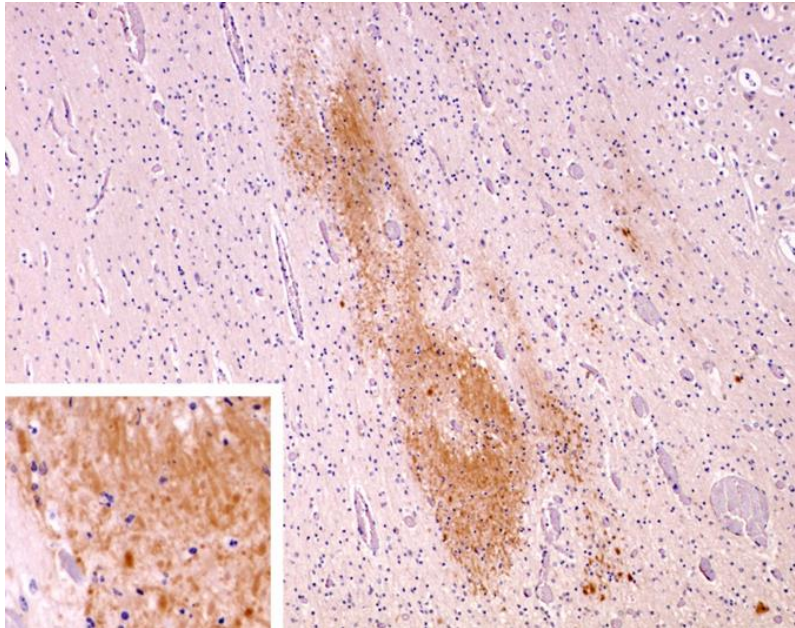
**Figura 5.** a) Presencia de material eosinofílico y amorfo (trombo) ocluyendo casi la totalidad de la luz vascular. b) La tinción de MSB demuestra la presencia de fibrina (color rojo) como componente principal de este trombo. 200x.

En ocho de los veinticinco **fetos** estudiados (32%) provenientes de las ovejas que sufrieron abortos se observaron áreas focales de leucomalacia en el encéfalo mediante la tinción HE (Fig. 6). Estas lesiones aparecían como focos ligeramente más eosinofílicos, poco delimitados y en los que se apreciaba una menor densidad celular en comparación con las áreas adyacentes, no dañadas, de sustancia blanca. En la periferia de estos focos aparecían axones degenerados (esferoides).



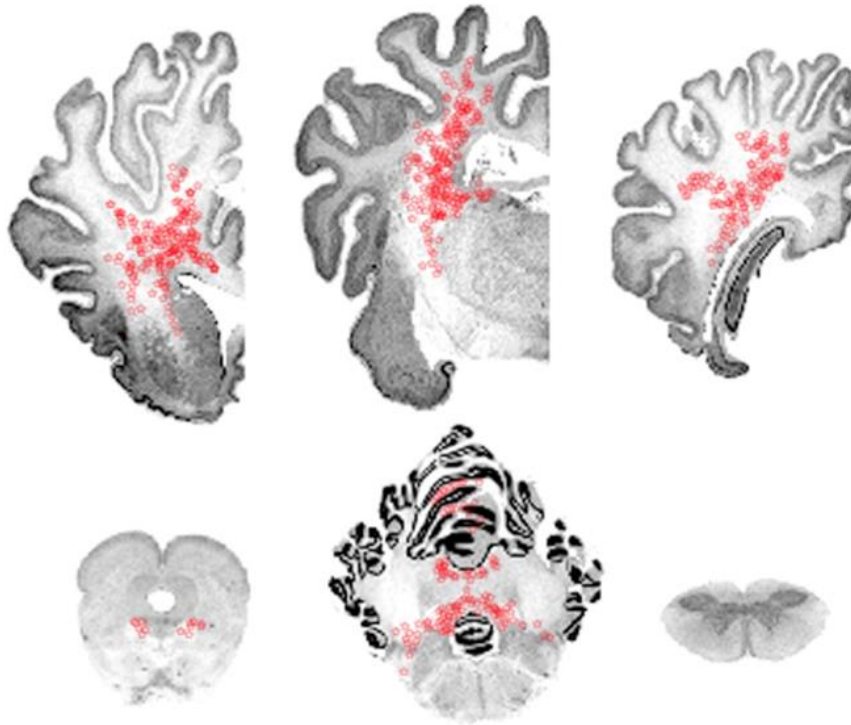
**Figura 6.** Foco de leucomalacia en la sustancia blanca fetal. En el área de lesión, se aprecia una disminución en el número de células. HE. 100x. Detalle: en la periferia del foco de leucomalacia se encuentran numerosos axones degenerados, además de restos celulares necróticos. 200x.

La tinción inmunohistoquímica frente al antígeno PPA $\beta$  permitió la identificación de focos de leucomalacia en un número mayor de fetos: diecinueve de los veinticinco estudiados (76%) (Fig. 7), pudiendo detectarse estos focos con mayor nitidez que en las tinciones de HE.



**Figura 7.** Áreas de leucomalacia positivas a la inmunotinción frente a PPA $\beta$ . 100x. Detalle: imagen a mayores aumentos de la periferia de la lesión donde se aprecia un marcaje más intenso de los axones degenerados. 400x.

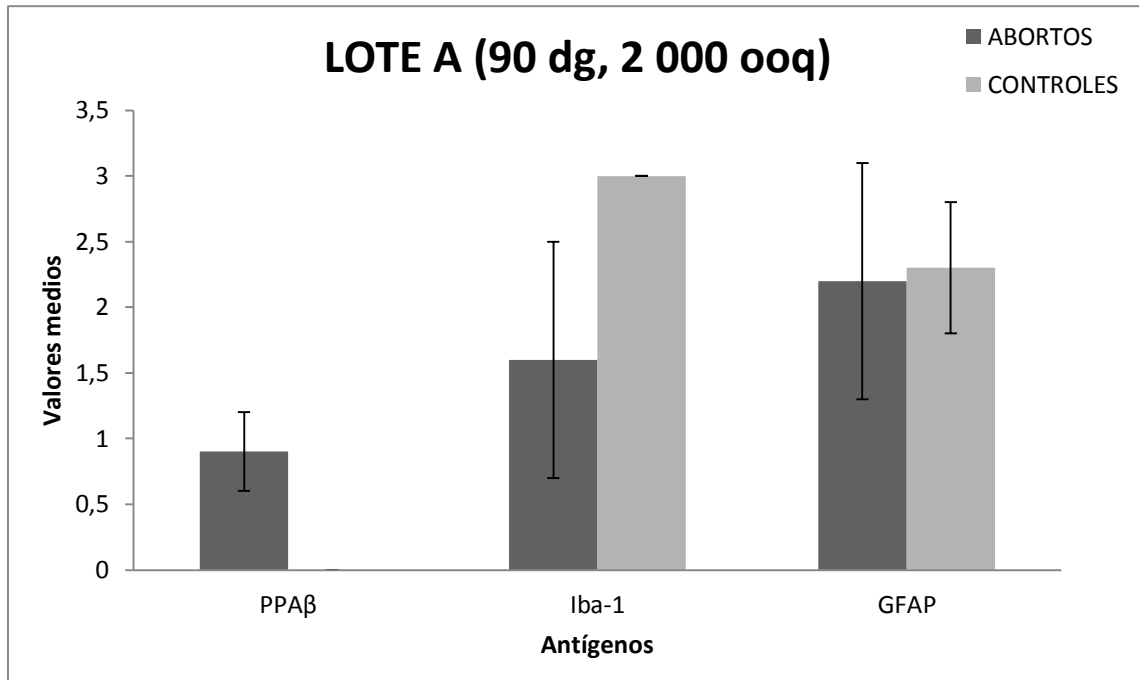
Se llevó a cabo una valoración de la frecuencia de distribución de las lesiones en las diferentes secciones del encéfalo, encontrándose que las áreas de leucomalacia fueron más frecuentes en los niveles rostrales del encéfalo (capsula interna, cuerpo calloso e hipocampo). En estas zonas, las áreas de leucomalacia aparecían principalmente en la sustancia blanca periventricular, extendiéndose hacia la corona radiada y áreas subcorticales de la misma. En los pedúnculos cerebelosos y sustancia blanca cerebelar también se observaron lesiones, aunque en un número menor de animales. (Fig.8).



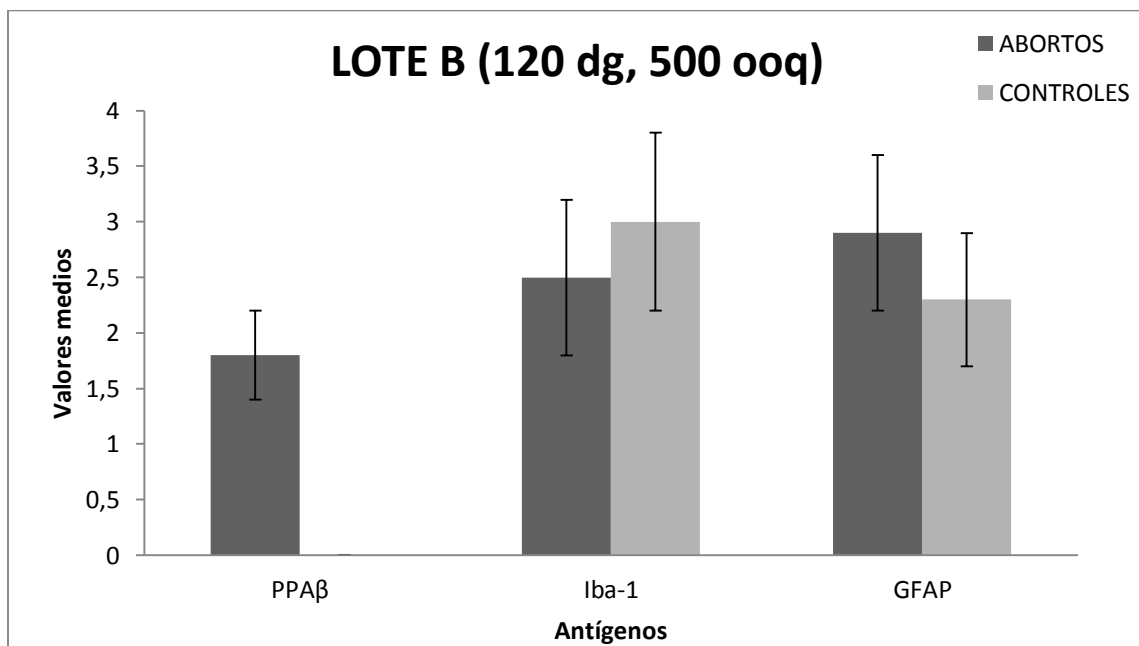
**Figura 8.** Distribución de las lesiones de leucomalacia en las diferentes secciones del encéfalo fetal estudiadas. El punteado de color rojo indica frecuencia de aparición de focos de malacia. (Imágenes del encéfalo tomadas de Johnson J, Sudheimer K, Davis K, Kerndt G, Brian M. The Navigable Atlas of the Sheep Brain. <https://www.msu.edu/~brains/brains/sheep/index.html>).

Cuando se llevó a cabo la valoración de intensidad de inmunotinción de los distintos marcadores empleados, respecto a la vimentina (empleada para la detección de oligodendrocitos inmaduros) la única diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) encontrada fue en el grupo de los fetos controles, observándose una menor inmunotinción en los infectados a los 120 dpi que a los 90 dpi ( $0,9 + 0,4$  vs  $2 + 0,7$ ), lo que indicaría un mayor grado de maduración de los oligodendrocitos asociado al desarrollo fetal. No se encontraron diferencias significativas entre los controles y abortos en cada lote ( $p > 0.05$ ).

En las gráficas 6 y 7 se representan los valores medios de intensidad de la inmunotinción frente a los antígenos PPA $\beta$  (leucomalacia), Iba-1 (microglía) y GFAP (astrocitos) en los lotes A y B.



**Gráfica 6.** Representación gráfica de la intensidad media de tinción inmunohistoquímica frente a los diferentes antígenos (PPAβ, Iba-1 y GFAP) en los fetos que mostraban leucomalacia periventricular frente a los controles no infectados del lote A.

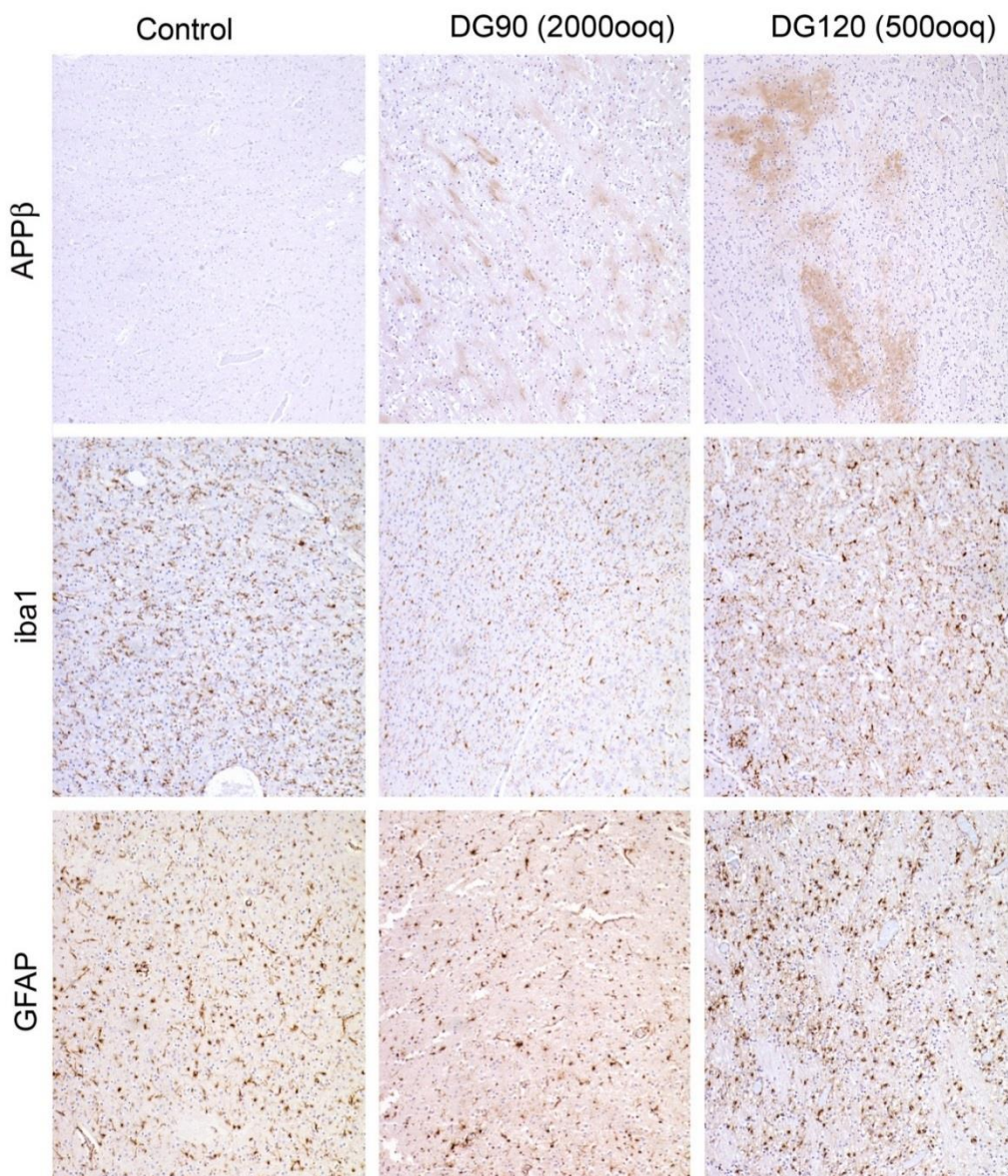


**Gráfica 7.** Representación gráfica de la intensidad media de tinción de los diferentes antígenos (PPAβ, Iba-1 y GFAP) en los fetos que mostraban leucomalacia periventricular frente a los controles no infectados del lote B.

Se observa que únicamente los fetos abortados expresaban el antígeno PPAβ. Su intensidad de inmunotinción (Fig. 9) era significativamente mayor en los fetos abortados en el lote B que en el A ( $p < 0.05$ ).

Respecto a la cantidad de microglía, se observa una reducción en la expresión del antígeno Iba-1 en los fetos abortados respecto a los controles, en ambos lotes de tratamiento (Fig. 9), si bien en el caso del lote B las diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ).

Finalmente, en relación con la expresión del antígeno GFAP, únicamente se observó una mayor intensidad de inmunotinción en los fetos abortados del lote B respecto a sus controles (Fig. 9), sin que dicha diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ).



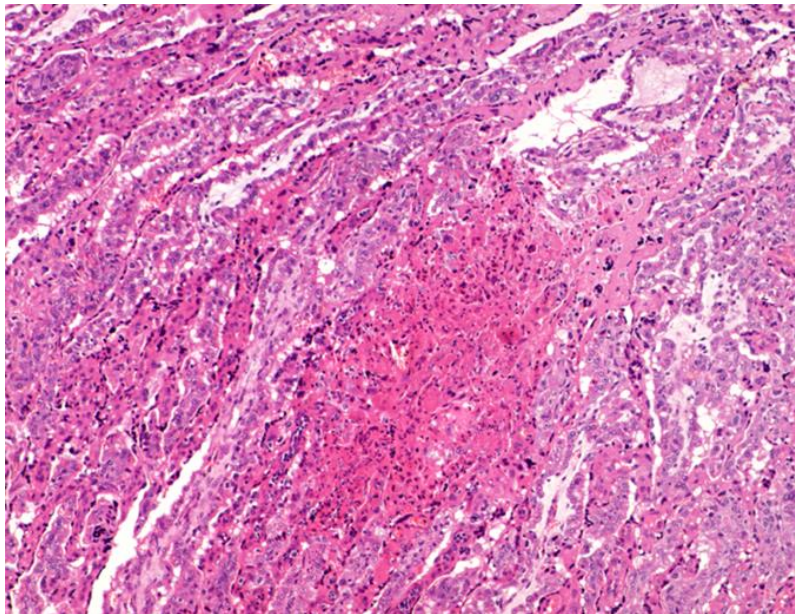
**Figura 9.** Tinciones inmunohistoquímicas (PPAβ, Iba-1 y GFAP) en las ovejas control e infectadas que abortaron en los lotes experimentales A y B. 100x.



### 5.3.2. Ovejas infectadas que no abortaron.

En los fetos provenientes de las ovejas infectadas que no abortaron en la fase aguda, únicamente se apreciaron lesiones microscópicas en aquellas sacrificadas a los 21 días p.i. (Lote B). En la placenta de estos animales se observó una placentitis necrótica multifocal (Fig.10).

Los fetos mostraron lesiones características de los abortos asociados a toxoplasmosis de forma clásica, caracterizadas por focos de necrosis e inflamación no purulenta en el encéfalo e hígado.



**Figura 10.** Placentitis necrótica focal en una oveja infectada del Lote B sacrificada el día 21 p.i. HE 100x.

### 5.3.3. Ovejas control.

En las ovejas control no se encontraron lesiones macroscópicas ni microscópicas en ninguna de las placentas, fetos u otros órganos estudiados.

## **5.4. Detección del parásito.**

### 5.4.1. Detección inmunohistoquímica.

Ni en las placentas de las ovejas gestantes infectadas que abortaron en la fase aguda ni en los tejidos fetales, se pudo detectar antígeno parasitario mediante la tinción

inmunohistoquímica empleada. Sin embargo, en las ovejas gestantes infectadas que no abortaron se pudo observar la abundante presencia del parásito asociada a las lesiones tanto en feto como en la placenta. En las ovejas control no se detectaron antígenos de *T. gondii* en ninguna de las placentas estudiadas.

#### 5.4.2. Detección por PCR.

Se analizaron las muestras de tejido de los placentomas de cuatro ovejas infectadas que abortaron (una del Lote A y tres del Lote B) para detectar la presencia del parásito por PCR. Además, las muestras de placentoma de otras cinco ovejas que no abortaron (tres infectadas y dos controles) fueron empleadas en el estudio: una del Lote A sacrificada el día 12 p.i.; dos del Lote B a las que se sacrificó los días 12 y 21 p.i. respectivamente y una oveja control de cada lote experimental. Como se muestra en la Tabla 5, el ADN parasitario pudo detectarse en los placentomas de una (Lote B, abortó el día 9 p.i.) de las cuatro ovejas infectadas que abortaron (25% de las examinadas) y en dos de las tres ovejas infectadas que no abortaron (66.6% de las examinadas), una estudiada el día 12 p.i. (Lote A) y otra estudiada en el día 21 p.i. (Lote B). En las placentas de las ovejas controles no se detectó ADN de *T. gondii*.

Para detectar el ADN parasitario también se utilizaron muestras de hígado fetales de fetos cuyas madres habían abortado (once del Lote A y nueve del B), de fetos procedentes de ovejas gestantes que no abortaron (uno del Lote A sacrificado el día 12 p.i. y tres del Lote B, dos de ellas sacrificadas el día 12 p.i. y otra el día 21 p.i.) y de fetos de madres no infectadas (una de cada lote experimental, sacrificadas el día 12 p.i.). Todas las muestras de hígado procedentes de los veinte fetos abortados que se examinaron fueron negativas a la presencia de ADN parasitario (ver Tabla 5). Respecto a las muestras de hígado fetales de aquellos fetos cuyas madres estaban infectadas pero no abortaron, sólo

uno de estos fetos (procedente de una oveja sacrificada el día 21 p.i.) resultó positivo a ADN de *T.gondii*.

Respecto a las muestras procedentes de los fetos de las madres control, todas resultaron negativas a la presencia de ADN parasitario por PCR (ver Tabla 5).

## **6. Discusión.**

En este trabajo de investigación se han estudiado los hallazgos clínicos, lesionales e inmunológicos asociados a la aparición de abortos en la fase aguda de la toxoplasmosis ovina. Estos abortos ocurrieron durante la realización de un proyecto de investigación encaminado a estudiar la respuesta inmunitaria desarrollada por las ovejas frente a la primoinfección por *T. gondii* en los diferentes periodos de gestación. Debido a la aparición de abortos en la fase aguda de la primera infección experimental, con una dosis de 2000 ooquistes de *T. gondii*, se decidió reducir la dosis a 500 ooquistes en un segundo lote experimental, donde también aparecieron abortos, aunque en menor número.

La aparición de abortos en la fase aguda de la toxoplasmosis ovina ya había sido descrita en infecciones experimentales previas (Treeset *al.*, 1989; Owen *et al.*, 1998). En ellas se describió cómo ovejas gestantes abortaban a los 10 días tras ser infectadas con ooquistes esporulados de *T. gondii* sin que pudieran observarse lesiones macroscópicas evidentes ni pudiera identificarse el parásito en las muestras de placenta o fetos. Los resultados de estas primeras descripciones son similares a los hallazgos de este estudio, con la salvedad de que el estudio histológico ha permitido identificar lesiones tanto en la placenta (trombosis) como en el encéfalo de los fetos (leucomalacia). Además, por las implicaciones que tiene en el diagnóstico, es de destacar la ausencia de respuesta serológica materna detectable en el momento del aborto que en nuestro estudio apareció en épocas más tardías (a partir de los 16 días p.i.) en coincidencia con estudios experimentales previos (Coughlan *et al.*, 1995; McColgan *et al.*, 1988; Esteban-Redondo

*et al.*, 1999). Normalmente las membranas y vísceras fetales, junto a suero sanguíneo materno, son las muestras que se toman para realizar un diagnóstico de casos naturales de aborto. Los resultados de este estudio muestran la dificultad de diagnosticar los abortos en la fase aguda de la toxoplasmosis mediante un diagnóstico convencional, ante la ausencia de lesiones macroscópicas evidentes, de respuesta serológica materna y a que únicamente se ha podido identificar la presencia del parásito en una de las ocho placentas estudiadas, y ello gracias a la elevada sensibilidad de la técnica de PCR mediante la amplificación anidada del gen ITS1 empleada en este estudio.

Actualmente aún se desconoce en gran parte la patogénesis del aborto asociado a la toxoplasmosis ovina, aunque parece claro que se requiere de la presencia del parásito en la placenta (Dubey, 2009). Se ha sugerido que el aborto ocurrido durante la primera mitad de la gestación se produce como consecuencia del daño causado por la replicación directa del parásito en los tejidos fetales (Buxton y Finlayson, 1986), consecuencia del estado aún inmaduro del sistema inmunitario fetal (Buxton *et al.*, 2007), mientras que la muerte del feto en la segunda mitad de la gestación estaría asociada a las lesiones inflamatorias y necróticas originadas en el placentoma como consecuencia de la replicación del parásito, y a la consiguiente desregulación de la homeostasis placentaria (Buxton *et al.*, 1982). Sin embargo, en los abortos en la fase aguda descritos en este estudio, no pudo detectarse el parásito en ninguno de los fetos analizados y tan solo se encontró en dos de las ocho placentas estudiadas, lo que sugiere que la presencia del parásito en la placenta o feto no es un requisito indispensable en la patogenia de estos abortos.

Las únicas descripciones previas de los abortos en la fase aguda de la enfermedad sugirieron que el proceso febril desencadenado en las ovejas gestantes infectadas sería la causa desencadenante de los abortos, aunque sin llegar a explicar los mecanismos subyacentes (Trees *et al.*, 1989; Owen *et al.*, 1998). Existen evidencias claras de que la

hipertermia asociada a infecciones o factores físicos puede provocar abortos en animales experimentales (Graham *et al.*, 1998). Sin embargo, en este trabajo de investigación, el incremento de la temperatura corporal desarrollado en las ovejas infectadas que no abortaron fue casi idéntico al encontrado en las ovejas que sufrieron abortos, alcanzando picos de 41 °C. Además, se han realizado numerosas infecciones experimentales mediante inoculación oral de ovejas gestantes en las cuales los animales desarrollaron procesos febriles, llegando a alcanzar temperaturas superiores a 41 °C, sin que desembocaran en abortos (Buxton y Finlayson, 1986; Buxton *et al.*, 1988; 1989; 1991). Estos hallazgos sugieren que la hipertermia, si bien está implicada en la patogenia general de la toxoplasmosis ovina, no se sería la causa desencadenante de la aparición de los abortos en la fase aguda de la misma.

En la presente infección experimental se emplearon dos dosis infectivas: 2000 y 500 ooquistes esporulados respectivamente, observándose que el número de abortos en los 12 primeros días p.i. se reducía a la mitad en el grupo infectado con la dosis más baja. Además, en estudios posteriores (Castaño *et al.*, 2013) la infección de ovejas con tan sólo 50 ooquistes esporulados se asoció con una tasa muy baja (12%) de abortos en la fase aguda. Estos resultados permiten sugerir que existe una relación directa entre la dosis empleada para infectar a los animales y la tasa de abortos observada. Sin embargo, no sería el único factor implicado en la patogenia de estos abortos, ya que se han seguido produciendo aún con dosis bajas y además se han realizado numerosos estudios en los que se han empleado dosis superiores a 500 ooquistes, algunas con el mismo aislado empleado en este estudio, sin observarse la aparición de abortos en la fase aguda de la enfermedad (Dubey, 2009). Es posible que la replicación sexual del parásito ocurrida durante la infección de los gatos en el proceso de obtención de los ooquistes haya producido un nuevo aislado con una virulencia superior al original.

A diferencia de las ovejas que fueron sacrificadas el día 21 p.i., donde se observaron lesiones descritas como características de la toxoplasmosis ovina (necrosis multifocal e infiltración inflamatoria), ninguna de las placentas de las ovejas que sufrieron episodios de abortos en la fase aguda de la enfermedad presentaban alteraciones clásicamente asociadas a esta infección. Sin embargo, en todos los placentomas de estos casos pudo apreciarse la presencia de infartos y trombosis en los septos carunculares. Estas lesiones son comunes en abortos ovinos causados por enfermedades bacterianas, como el aborto enzoótico o fiebre Q, o fúngicas, como la aspergilosis. Sin embargo, en estos casos, las alteraciones vasculares e infartos están causados por una vasculitis intensa que daña la pared vascular y desencadena la formación del trombo (Schlafer y Miller, 2007). En la placenta de las ovejas que sufrieron los abortos en la fase aguda no se observó inflamación alguna o degeneración evidente de la pared vascular, lo que sugiere que la aparición de los trombos, y consiguientes infartos tendrían una causa diferente.

Debido a su función y desarrollo, la placenta es un órgano muy vascularizado donde tiene lugar un delicado equilibrio hemostático en el que coexisten al mismo tiempo fenómenos anti- y procoagulantes, con el fin de garantizar una activación rápida y regulada de la coagulación (Lanir *et al.*, 2003). Se ha demostrado que los trofoblastos secretan factores como FGL-2 y TS fundamentales para mantener el equilibrio hemostático en la placenta (Clark *et al.*, 1999; Aharon *et al.*, 2004). Se ha descrito que dicho equilibrio puede verse alterado por diferentes factores, como la liberación de mediadores solubles de la inflamación y citoquinas entre otros, que durante una respuesta inflamatoria aguda pueden inducir una mayor expresión de factores procoagulantes, como FGL-2, y con ello desencadenar la formación de trombos en la placenta (Clark *et al.*, 2001). En este estudio, en las ovejas que sufrieron aborto se ha observado una elevación significativa de los niveles de expresión génica de FGL-2, pero no TS, lo que apoyaría

esta hipótesis y sugeriría que el primero tiene un papel principal en la patogenia de los abortos en la fase aguda de la enfermedad.

Entre las causas que pueden originar una elevación en la secreción de FGL-2 se encuentran las citoquinas proinflamatorias como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (Clark *et al.*, 2001). En este sentido, se ha demostrado que la infección por *T. gondii* provoca la liberación de grandes cantidades de IFN- $\gamma$  en las ovejas (Innes *et al.*, 1995) y en modelos murinos (Ge *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta estos hallazgos, y que en este estudio se han encontrado niveles significativamente superiores de expresión génica tanto de IFN- $\gamma$  como de TNF- $\alpha$  en los placentomas de las ovejas que sufrieron aborto, así como una elevación en la secreción periférica de IFN- $\gamma$  en las pruebas de linfoestimulación antes de ocurrir estos abortos, parece posible plantear que los elevados niveles de citoquinas proinflamatorias indujeron una mayor secreción de FGL-2 en los placentomas, desencadenando de este modo la aparición de trombos. Previamente se ha descrito en un modelo experimental murino que, al igual que lo observado en el actual estudio, no es necesaria la replicación parasitaria para originar una respuesta proinflamatoria en madres gestantes, ya que la mera inoculación de antígeno de *T. gondii* desencadena una respuesta proinflamatoria y la muerte fetal en ratonas gestantes (Chen *et al.*, 2013).

Un resultado destacable de este estudio lo constituye el hallazgo de lesiones de leucomalacia periventricular (LPV) en un alto porcentaje (76%) de los fetos abortados. La LPV es una condición caracterizada por áreas multifocales de malacia que afecta a la sustancia blanca en la proximidad de los ventrículos laterales (Back, 2004). En medicina humana, se ha demostrado que la LPV es una de las principales lesiones nerviosas asociadas a complicaciones de diferente tipo durante la gestación, especialmente durante el último tercio de la misma y en el momento del parto. Esta condición se ha relacionado con el posterior desarrollo de trastornos nerviosos en la infancia (Back *et al.*, 2001). En

medicina veterinaria, las descripciones de casos naturales de animales recién nacidos mostrando LPV son muy escasas, habiéndose realizado únicamente en una camada de perros (Rentmeister *et al.*, 2004) y dos macacos (Okabayashi *et al.*, 2011). La mayoría de las descripciones se han llevado a cabo en modelos experimentales de hipoxia fetal, desarrollados en ovejas y animales de laboratorio (Back, 2004). El alto número de casos observados en los fetos abortados durante la fase aguda de la toxoplasmosis sugiere que el daño a la sustancia blanca fetal desempeña un papel fundamental en la patogenia de estos abortos. La tinción inmunohistoquímica frente a PPA $\beta$  ha demostrado ser de gran utilidad a la hora de estudiar esta lesión, ya que permitió su identificación en el 76% de los fetos abortados, mientras que mediante tinción con HE solo se halló en el 32% de los mismos. La PPA $\beta$  es una glicoproteína expresada de forma constitutiva, a bajos niveles, en las neuronas y células de la glía y está implicada en la comunicación intercelular y en la regulación intracelular de los niveles de calcio (Baiden-Amisshah *et al.*, 1998). Se ha descrito que, tras una agresión al sistema nervioso central, existe una acumulación progresiva de esta proteína en los axones. Esta acumulación sería consecuencia de dos fenómenos, por un lado la interrupción del transporte de esta proteína a través del axón, originando su acumulación, y por otro su sobreexpresión por parte de la célula con el fin de regular los niveles de calcio intracelular y protegerse frente a los daños tóxicos e isquémicos consecuencia del daño tisular (Arai *et al.*, 1995). Resulta interesante la diferencia en el nivel de expresión observada entre los lotes, donde los fetos abortados de las ovejas infectadas en el día 120 de gestación presentaban una mayor cantidad de esta proteína que aquellos fetos abortados en el segundo tercio de gestación. Debido a que, además de diferentes momentos de gestación (segundo *vs.* último tercio de gestación), los lotes fueron infectados con diferentes dosis (2000 *vs.* 500 ooquistes esporulados respectivamente), pueden haber sido varios los factores implicados en estas variaciones.



No obstante, parece lógico pensar que las diferencias en el desarrollo del sistema nervioso fetal puedan influir en la susceptibilidad de la sustancia blanca a padecer LPV, sugiriendo que los fetos en el último tercio de gestación serían más sensibles a padecerla. Esta observación concuerda con estudios experimentales previos que han encontrado que la aparición de LPV estaría asociada a la agresión del sistema nervioso central en periodos muy concretos del desarrollo fetal, donde el momento de maduración de las células de la glía, concretamente los oligodendrocitos, y los axones determinase una especial susceptibilidad a daños isquémicos o agresiones químicas por sustancias como especies reactivas del oxígeno (Riddle *et al.*, 2006; 2012).

A pesar de la importancia de esta condición, la patogenia de la LPV es compleja y aún se desconocen gran parte de los factores implicados. Sin embargo, sí que se han identificado dos mecanismos a través de los cuales se ha podido reproducir esta condición en animales experimentales: hipoxia fetal e inflamación en la placenta o feto (Hagberg *et al.*, 2002). En los abortos asociados a la fase aguda de la toxoplasmosis ovina concurren ambos factores, ya que los infartos en los placentomas, hallados en las ocho placentas estudiadas, pueden comprometer la oxigenación de la sangre fetal y, a su vez, se han identificado niveles significativamente elevados de las citoquinas proinflamatorias (IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ). Aunque ambos mecanismos (inflamación e hipoxia) producen LPV, en los modelos experimentales referidos se han encontrado diferencias en las características histológicas de la lesión. Ambos mecanismos inducen una disminución en el número de astrocitos y oligodendrocitos inmaduros, pero la LPV asociada a inflamación se acompaña, además, de una activación de la microglía y mayor infiltración de macrófagos y neutrófilos (Hagberget *al.*, 2002). Sin embargo, otros estudios experimentales han descrito un incremento tanto de la microglía como los astrocitos asociados a LPV causada por hipoxia (Jellema *et al.*, 2013). Esta discrepancia puede ser debida a los diferentes

parámetros empleados en los modelos experimentales, que aunque realizados en la especie ovina, emplean diversos mecanismos para inducir la hipoxia fetal o inflamación nervosa. Atendiendo a los resultados de este trabajo, en los abortos ocurridos durante la fase aguda de la toxoplasmosis ovina se ha observado una disminución en el número de células de la microglia, más evidente en el lote infectado en el segundo tercio de gestación, mientras que el número de astrocitos permanecía igual, o ligeramente superior. Tampoco se observaron variaciones en el número de oligodendrocitos entre los abortos y los corderos control, a excepción de la encontrada en los animales de los lotes A y B, debidas probablemente al grado de desarrollo del sistema nervioso asociado a la edad. La variabilidad de los resultados al comparar estos hallazgos con los estudios experimentales antes citados seguramente tenga su origen en los múltiples factores implicados en la LPV asociada a la toxoplasmosis ovina, donde participan ambos mecanismos (hipoxia e inflamación) además de cualquier otro asociado a la infección sistémica.

En conclusión, este trabajo describe y analiza la aparición de abortos durante la fase aguda de la toxoplasmosis ovina, una consecuencia de la enfermedad poco conocida pero potencialmente muy importante en condiciones naturales. El análisis histológico de la placenta y el feto sugiere que las alteraciones en el flujo circulatorio de la placenta, como consecuencia del desarrollo de trombosis, serían una causa fundamental para el desencadenamiento de estos abortos. Además, la respuesta inflamatoria tanto sistémica como local, ambas de carácter proinflamatorio, podría participar también en el desencadenamiento de la trombosis placentaria y los daños al sistema nervioso fetal. Ambos mecanismos, hipoxia e inflamación, pueden ser el origen de las lesiones de LPV halladas en los fetos. Tanto las alteraciones vasculares observadas en la placenta como la LPV identificada en los fetos son lesiones no asociadas clásicamente a la toxoplasmosis

ovina y sugieren la participación de mecanismos patogénicos diferentes de la replicación parasitaria como causa de los abortos en la fase aguda de esta enfermedad.

## **7. Agradecimientos.**

Este trabajo ha sido realizado con financiación del proyecto AGL2011-30205 del Ministerio de Ciencia e Innovación.

## **8. Bibliografía.**

Aharon A, Brenner B, Katz T, Miyagi Y, Lanir N: **Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor levels in trophoblast cells: implications for placental hemostasis.** Thromb Haemost 2004, **92**(4):776-786.

Arai Y, Deguchi K, Mizuguchi M, Takashima S: **Expression of beta-amyloid precursor protein in axons of periventricular leukomalacia brains.** Pediatr Neurol 1995, **13**(2):161-163.

Back SA, Luo NL, Borenstein NS, Levine JM, Volpe JJ, Kinney HC: **Late oligodendrocyte progenitors coincide with the developmental window of vulnerability for human perinatal white matter injury.** J Neurosci 2001, **21**(4):1302-1312.

Back SA, Rivkees SA: **Emerging concepts in periventricular white matter injury.** Semin Perinatol 2004, **28**(6):405-414.

Baiden-Amisshah K, Joashi U, Blumberg R, Mehmet H, Edwards AD, Cox PM: **Expression of amyloid precursor protein (beta-APP) in the neonatal brain following hypoxic ischaemic injury.** Neuropathol Appl Neurobiol 1998, **24**(5):346-352.

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**(1-3):209-215.

Benavides J, Castaño P, Ortega-Mora LM, Pérez V. **Abortos de fase aguda en la toxoplasmosis ovina.** XVI Foro Nacional del Ovino. Aranda de Duero (Burgos), 27-31 de Mayo de 2014.

Buxton D: **Protozoan infections (Toxoplasma gondii, Neospora caninum and Sarcocystis spp.) in sheep and goats: recent advances.** Vet Res 1998, **29**(3-4):289-310.

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**(2):225-236.

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**(3):319-333.

Buxton D, Gilmour JS, Angus KW, Blewett DA, Miller JK: **Perinatal changes in lambs infected with Toxoplasma gondii.** Res Vet Sci 1982, **32**(2):170-176.

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

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**(5):89-93.

Buxton D, Ugglá 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**(5):451-457.

Castano P, Fuertes M, Ferre I, Fernandez M, Ferreras Mdel C, Moreno-Gonzalo J, Gonzalez-Lanza C, Katzer F, Regidor-Cerrillo J, Ortega-Mora LM, Perez V, Benavides J: **Placental thrombosis in acute phase abortions during experimental Toxoplasma gondii infection in sheep.** Vet Res 2014, **45**:9-9716-45-9.

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**(7):e69012.

Clark DA, Ding JW, Chaouat G, Coulam CB, August C, Levy GA: **The emerging role of immunoregulation of fibrinogen-related procoagulant Fgl2 in the success or spontaneous abortion of early pregnancy in mice and humans.** Am J Reprod Immunol 1999, **42**(1):37-43.

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**(2):185-194.

Coughlan SN, Saman E, Jacobs D, Mercier C, Cesbron-Delauw MF, Trees AJ: **Cellular and humoral immune responses to recombinant antigens in sheep infected with Toxoplasma gondii.** Parasite Immunol 1995, **17**(9):465-468.

Da Motta AC, Vieira MI, Bondan C, Edelweiss MI, Dametto MA, Gomes A: **Ovine abortion associated with toxoplasmosis: serological, anatomo-pathological and**

- immunohistochemistry characterization.** Rev Bras Parasitol Vet 2008, **17 Suppl** 1:204-208.
- Dubey JP: **Toxoplasmosis in sheep--the last 20 years.** Vet Parasitol 2009, **163**(1-2):1-14.
- Dupont CD, Christian DA, Hunter CA: **Immune response and immunopathology during toxoplasmosis.** Semin Immunopathol 2012, **34**(6):793-813.
- Esteban-Redondo I, Maley SW, Thomson K, Nicoll S, Wright S, Buxton D, Innes EA: **Detection of T. gondii in tissues of sheep and cattle following oral infection.** Vet Parasitol 1999, **86**(3):155-171.
- 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**(9):471-481.
- 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**(5):209-221.
- Hagberg H, Peebles D, Mallard C: **Models of white matter injury: comparison of infectious, hypoxic-ischemic, and excitotoxic insults.** Ment Retard Dev Disabil Res Rev 2002, **8**(1):30-38.
- 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**(1-2):17-27.
- Innes EA, Bartley PM, Buxton D, Katzer F: **Ovine toxoplasmosis.** Parasitology 2009, **136**(14):1887-1894.

- Innes EA, Panton WR, Sanderson A, Thomson KM, Wastling JM, Maley S, Buxton D: **Induction of CD4+ and CD8+ T cell responses in efferent lymph responding to Toxoplasma gondii infection: analysis of phenotype and function.** Parasite Immunol 1995, **17**(3):151-160.
- Innes EA, Vermeulen AN: **Vaccination as a control strategy against the coccidial parasites Eimeria, Toxoplasma and Neospora.** Parasitology 2006, **133** Suppl:S145-68.
- Jellema RK, Lima Passos V, Zwanenburg A, Ophelders DR, De Munter S, Vanderlocht J, Germeraad WT, Kuypers E, Collins JJ, Cleutjens JP, Jennekens W, Gavilanes AW, Seehase M, Vles HJ, Steinbusch H, Andriessen P, Wolfs TG, Kramer BW: **Cerebral inflammation and mobilization of the peripheral immune system following global hypoxia-ischemia in preterm sheep.** J Neuroinflammation 2013, **10**:13-2094-10-13.
- Lang C, Gross U, Luder CG: **Subversion of innate and adaptive immune responses by Toxoplasma gondii.** Parasitol Res 2007, **100**(2):191-203.
- Lanir N, Aharon A, Brenner B: **Procoagulant and anticoagulant mechanisms in human placenta.** Semin Thromb Hemost 2003, **29**(2):175-184.
- Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** Methods 2001, **25**(4):402-408.
- McColgan C, Buxton D, Blewett DA: **Titration of Toxoplasma gondii oocysts in non-pregnant sheep and the effects of subsequent challenge during pregnancy.** Vet Rec 1988, **123**(18):467-470.

- Okabayashi S, Uchida K, Nakayama H, Ohno C, Hanari K, Goto I, Yasutomi Y: **Periventricular leucomalacia (PVL)-like lesions in two neonatal cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*)**. J Comp Pathol 2011, **144**(2-3):204-211.
- Owen MR, Clarkson MJ, Trees AJ: **Acute phase toxoplasma abortions in sheep**. Vet Rec 1998, **142**(18):480-482.
- Pappas G, Roussos N, Falagas ME: **Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis**. Int J Parasitol 2009, **39**(12):1385-1394.
- Perez V, Tellechea J, Badiola JJ, Gutierrez M, Garcia Marin JF: **Relation between serologic response and pathologic findings in sheep with naturally acquired paratuberculosis**. Am J Vet Res 1997, **58**(8):799-803.
- Rentmeister K, Schmidbauer S, Hewicker-Trautwein M, Tipold A: **Periventricular and subcortical leukoencephalopathy in two dachshund puppies**. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med 2004, **51**(7-8):327-331.
- Riddle A, Luo NL, Manese M, Beardsley DJ, Green L, Rorvik DA, Kelly KA, Barlow CH, Kelly JJ, Hohimer AR, Back SA: **Spatial heterogeneity in oligodendrocyte lineage maturation and not cerebral blood flow predicts fetal ovine periventricular white matter injury**. J Neurosci 2006, **26**(11):3045-3055.
- Riddle A, Maire J, Gong X, Chen KX, Kroenke CD, Hohimer AR, Back SA: **Differential susceptibility to axonopathy in necrotic and non-necrotic perinatal white matter injury**. Stroke 2012, **43**(1):178-184.
- Schlafer DH, Miller RB 2007: **Female genital system**. In: Maxie M (Eds.): Jubb, Kennedy, and Palmer's pathology of domestic animals. Elsevier Limited, China, pp. 429-564



Skariah S, McIntyre MK, Mordue DG: **Toxoplasma gondii: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion.** Parasitol Res 2010, **107**(2):253-260.

Tait ED, Hunter CA: **Advances in understanding immunity to Toxoplasma gondii.** Mem Inst Oswaldo Cruz 2009, **104**(2):201-210.

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**(1):67-72.

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**(17):5663-5666.

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**(1-2):67-76.