



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN ÚTEROS DE VACAS INFECTADAS NATURALMENTE POR *Neospora caninum*

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

MIGUEL ANGEL OROZCO OSUNA

TUTOR: ELIZABETH MORALES SALINAS
COMITÉ TUTORAL: FRANCISCO J. TRIGO TAVERA
FERNANDO ALBA HURTADO



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICADA A:

 Mi esposa Aurora quién soportó mi ausencia por tanto tiempo y a pesar de la distancia siempre me apoyó demostrando que todo se puede con amor.

 Mi hijo Miguel que es quién me da esperanza, que es el fruto del amor que me inspira a seguir.

 Mis padres por darme la vida: Miguel y Norma.

 Mi hermano Eduardo a su esposa Angélica y a mis sobrinos Norma y Eduardo.

 La Dra. Nuria de Buen por apoyarme a seguir lo que ya había empezado.

AGRADECIMIENTOS:

A la Dra. Elizabeth Morales Salinas por haber aceptado ser mi tutora sin condición y darme apoyo para formar parte de este proyecto.

A los Doctores Francisco J. Trigo Tavera y Fernando Alba Hurtado por colaborar en la realización y dirección de esta tesis.

A los Doctores que formaron parte de mi jurado al Dr. Héctor Quiroz Romero, a la Dra. Laura Romero Romero, a la Dra. Guillermina Ávila Ramírez y al Dr. Jorge Tórtora Pérez.

A la Dra. Nuria de Buen de Argüero por su amistad y apoyo incondicional.

A Miguel Angel Martínez Ramírez por haberme auxiliado en la realización de la técnica de Inmunohistoquímica y más que nada en la amistad que se generó por las largas jornadas de trabajo, que más que trabajo fue un placer, Gracias "Tocayo".

Al Proyecto PAPIIT IN210207-2 por el apoyo brindado para que se logrará esta tesis.

Al CONACYT por la beca otorgada y contribuir con la investigación.

Al Departamento de Patología de la FMVZ-UNAM por el apoyo brindado para la realización de esta tesis.

Al Dr. José Ramírez y a Larisa Chávez por su amistad y apoyo desde que los conocí.

A mis amigos y compañeros del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal a todos sin excepción.

A la Dra. Frida Salmerón por su colaboración en el análisis estadístico.

A las autoridades y amigos del Rastro Municipal de Mazatlán, Sinaloa "Dr. Rafael Domínguez Gómez" por su colaboración en la recolección de las muestras.

A la Asociación Ganadera Local de Mazatlán y a José Luis Camacho por las facilidades prestadas para el procesado de las muestras para el diagnóstico de Brucelosis, así como la extracción de suero sanguíneo.

A Arnulfo, Christian, y Xol por ser parte de Sinaloa y sentir que no salí de ahí.

“Así como el hierro se oxida por falta de uso, también la inactividad destruye el intelecto”

Leonardo Da Vinci

“Pierdes más por no buscar que por no saber”

Sir William Osler

“Asegúrate de que es cierto lo que vas a decir; Si es verdad, cerciórate de que merezca ser comunicado; Una vez satisfechas estas condiciones previas, pregúntate si servirá para que la gente se informe, se divierta, se supere o aprenda, pero que no se utilice para degradar, humillar o burlarse de personas o grupos”

María Victoria Llamas

RESUMEN

Caracterización de la respuesta inflamatoria en úteros de vacas infectadas naturalmente por *Neospora caninum*

Neospora caninum es una causa de aborto en bovinos a nivel mundial. La neosporosis es una enfermedad que se manifiesta durante la gestación donde el desarrollo del feto es particularmente vulnerable. Debido a que no se ha estudiado la respuesta inflamatoria en úteros de vacas infectadas naturalmente por *N. caninum*, el objetivo del presente estudio fue caracterizar la respuesta inflamatoria en úteros de vacas gestantes y no gestantes infectadas naturalmente por este parásito. Se formaron cuatro grupos de siete animales cada uno: dos grupos de vacas gestantes y no gestantes seropositivas a neosporosis y dos grupos de vacas gestantes y no gestantes seronegativas a neosporosis mediante la prueba de ELISA. Se procesaron cortes de úteros y placentas por la técnica histológica de rutina y cortes homólogos por inmunohistoquímica (IHQ) utilizando anticuerpos anti-*N. caninum*, anti-CD4+, anti-CD8+, anti-CD14 y anti-CD21. Histológicamente los grupos no gestantes seropositivo y seronegativo no mostraron diferencia significativa ($P>0.05$), entre los diferentes tipos celulares. Sin embargo, el grupo gestante seropositivo si mostró diferencia significativa ($P<0.05$) con respecto al grupo no gestante seronegativo para los linfocitos, encontrándose mayor cantidad de estos en el grupo seropositivo, sin embargo, no fue considerado como un proceso inflamatorio en ninguno de los 4 grupos. Por medio de la IHQ se detectaron quistes de *N. caninum* en 8 vacas seropositivas; cinco no gestantes y tres gestantes. Las células T CD4+ se distribuyeron en endometrio y miometrio en las vacas no gestantes y en las gestantes fueron escasas en los placentomas. Las células T CD8+ se distribuyeron en forma similar a las T CD4+ pero en menor cantidad. No hubo reacción positiva con los anticuerpos anti-CD14 y anti-CD21. Se concluye que en los animales infectados naturalmente por *N. caninum* no se genera una respuesta inflamatoria en contra del parásito. La técnica de IHQ modificada fue fundamental para detectar quistes del parásito los cuales no habían sido descritos en los úteros.

Palabras clave: quistes de *N. caninum*, úteros, placentomas, linfocitos, vacas.

ABSTRACT

Characterization of the inflammatory response in uteri of cows naturally infected by *Neospora caninum*

Neospora caninum is cause of abortion in cattle at world-wide. Neosporosis is a disease that appears during pregnancy, where the development of the fetus is particularly vulnerable. Due to the fact that the inflammatory response in uteri of cows naturally infected by *N. caninum* has not been studied, the objective of this study was to characterize the inflammatory response in uteri of naturally infected pregnant and non-pregnant cows. Four groups of seven animals each were formed: 2 groups of seropositive pregnant and non-pregnant cows to neosporosis and 2 groups of seronegative pregnant and non-pregnant cows to neosporosis by ELISA test. Sections of uteri and placentas were processed by the histological routine technique and homologous sections were processed by immunohistochemistry (IHC) using antibodies anti-*N. caninum*, anti-CD4+, anti-CD8+, anti-CD14 and anti-CD21. Histologically, seropositive and seronegative non-pregnant groups did not show a significant difference ($P > 0.05$), on the cellular types. Nevertheless, the seropositive pregnant group showed a significant difference ($P < 0.05$) with respect to the seronegative non-pregnant group for the lymphocytes, finding a greater amount of these cells in the seropositive group, however, it was not considered as an inflammatory process in any of the 4 groups. By the IHC, *N. caninum* tissue cysts were detected in 8 seropositive cows; 5 non-pregnant and 3 pregnant cows. CD4+ cells were distributed in endometrium and miometrium in the non-pregnant cows, and in the pregnant ones were low in placentomes. CD8+ cells were distributed in a similar fashion, but in smaller amount. The antibodies anti-CD14 and CD21 did not mark cells. It can be concluded that in the animals naturally infected by *N. caninum* an inflammatory response does not occur against the parasite. The implemented technique of IHC was fundamental to detect tissue cysts of the parasite which had not been detected in the uteri.

Keywords: *N. caninum* tissue cysts, uteri, placentomes, lymphocytes, cows.

CONTENIDO

	Página
Lista de Cuadros	IX
Lista de Figuras	X
INTRODUCCIÓN	1
Antecedentes	1
Patogénesis del aborto	2
Relación huésped parásito en la neosporosis bovina	3
Respuesta inmune en vacas y fetos, experimental y naturalmente infectados en el primer, segundo y tercer trimestre de gestación	4
Patología de la placenta	6
Patología de los fetos infectados natural y experimentalmente	7
JUSTIFICACIÓN	9
OBJETIVO GENERAL	9
Objetivos específicos	9
HIPÓTESIS	9
MATERIAL Y MÉTODOS	10
Ubicación espacial	10
Toma de muestra y Diseño experimental	10
Criterios de inclusión	10
Estudio serológico para la detección de anticuerpos anti- <i>Neospora caninum</i>	11

Evaluación de otras enfermedades abortivas	13
Histopatología	14
Inmunohistoquímica	14
Análisis Estadístico	18
RESULTADOS	19
Estudio serológico	19
Estudio serológico para la detección de anticuerpos anti- <i>Neospora caninum</i>	19
Evaluación de otras enfermedades abortivas	19
Histopatología	25
Células inflamatorias	25
Análisis Estadístico del estudio histopatológico	29
Inmunohistoquímica	30
<i>Neospora caninum</i>	30
Análisis fenotípico de células del sistema inmune en úteros y placentas	33
Linfocitos T CD4+	33
Linfocitos T CD8+	34
Linfocitos B y Macrófagos	35
DISCUSIÓN	38
LITERATURA CITADA	45

LISTA DE CUADROS

	Página
<i>Cuadro 1.</i> Anticuerpos primarios específicos anti- <i>N. caninum</i> y anti-leucocitos.	18
<i>Cuadro 2.</i> Conteo de células inflamatorias del grupo de vacas no gestantes seropositivas a <i>N. caninum</i> .	26
<i>Cuadro 3.</i> Conteo de células inflamatorias del grupo de vacas no gestantes seronegativas a <i>N. caninum</i> .	27
<i>Cuadro 4.</i> Conteo de células inflamatorias del grupo de vacas gestantes seropositivas y seronegativas a <i>N. caninum</i> .	28
<i>Cuadro 5.</i> Análisis fenotípico de células del sistema inmune en úteros de vacas no gestantes seropositivas a <i>N. caninum</i> .	36
<i>Cuadro 6.</i> Análisis fenotípico de células del sistema inmune en placentas de vacas seropositivas a <i>N. caninum</i> .	37
<i>Cuadro 7.</i> Medidas del diámetro y grosor de la pared de los quistes de <i>N. caninum</i> encontrados en úteros y placentas.	37

LISTA DE FIGURAS

	Página
<i>Figura 1.</i> Frecuencia serológica de anticuerpos anti- <i>N. caninum</i> mediante la técnica de ELISA en vacas sacrificadas en el rastro de Mazatlán, Sinaloa.	21
<i>Figura 2.</i> Frecuencia serológica de anticuerpos anti- <i>Leptospira interrogans</i> serovariedad Canicola mediante MAT en vacas sacrificadas en el rastro de Mazatlán, Sinaloa.	21
<i>Figura 3.</i> Frecuencia serológica de anticuerpos anti- <i>Leptospira interrogans</i> serovariedad Grippytyphosa mediante MAT en vacas sacrificadas en el rastro de Mazatlán, Sinaloa.	22
<i>Figura 4.</i> Frecuencia serológica de anticuerpos anti- <i>Leptospira interrogans</i> serovariedad Hardjo mediante MAT en vacas sacrificadas en el rastro de Mazatlán, Sinaloa.	22
<i>Figura 5.</i> Frecuencia serológica de anticuerpos anti- <i>Leptospira interrogans</i> serovariedad Icterohaemorrhagiae mediante MAT en vacas sacrificadas en el rastro de Mazatlán, Sinaloa.	23
<i>Figura 6.</i> Frecuencia serológica de anticuerpos anti- <i>Leptospira interrogans</i> serovariedad Pomona mediante MAT en vacas sacrificadas en el rastro de Mazatlán, Sinaloa.	23
<i>Figura 7.</i> Frecuencia serológica de anticuerpos anti-DVB mediante la técnica de ELISA en vacas sacrificadas en el rastro de Mazatlán, Sinaloa.	24
<i>Figura 8.</i> Frecuencia serológica de anticuerpos anti-IBR mediante la técnica de ELISA en vacas sacrificadas en el rastro de Mazatlán, Sinaloa.	24
<i>Figura 9.</i> Caso 1. Grupo de taquizoítos (flecha) de <i>N. caninum</i> en septo materno (S) del grupo de vacas gestantes. 1000X CEB-P. Barra 20 µm.	30
<i>Figura 10.</i> Caso 2. Grupo de taquizoítos (flecha) de <i>N. caninum</i> en estrato esponjoso (E) del grupo de vacas no gestantes. 1000X CEB-P. Barra 20 µm.	31
<i>Figura 11.</i> Caso 2. Quiste de <i>N. caninum</i> (flecha) en miometrio del grupo de vacas no gestantes. Nótese la presencia de bradizoitos en el	

interior. 1000X. CEB-P. Barra 20 µm.	31
<i>Figura 12.</i> Caso 7. Quiste de <i>N. caninum</i> en la luz uterina del grupo de vacas no gestantes. 400X. CEB-P. Barra 20 µm. E, estrato esponjoso; M, mucosa.	32
<i>Figura 13.</i> Caso 1. Quiste de <i>N. caninum</i> en miometrio del grupo de vacas gestantes. 400X. CEB-P. Barra 20 µm. Mo, miometrio.	32
<i>Figura 14.</i> Caso 2. Quiste de <i>N. caninum</i> en interfase materno-fetal (cripta) del grupo de vacas gestantes. 1000X. CEB-P. Barra 20 µm. S, septo materno; V, vellosidad fetal; C, cripta.	33
<i>Figura 15.</i> Caso 3. Linfocitos T CD4+ (flechas) en estrato esponjoso (E) del grupo de vacas no gestantes seropositivo a <i>N. caninum</i> . 400X CEB-P. Barra 20 µm. Ep, epitelio glandular.	34
<i>Figura 16.</i> Caso 2. Linfocito T CD8+ (flecha) en estrato esponjoso (E) del grupo de vacas no gestantes seropositivos a <i>N. caninum</i> . 1000X. CEB-P. Barra 20 µm.	35

INTRODUCCION

Antecedentes

El protozoario *Neospora caninum* es una causa importante de aborto en bovinos a nivel mundial (Dubey y Lindsay, 1996; Dubey, 2003; Dubey *et al.*, 2006). La transmisión del parásito en los bovinos (huéspedes intermediarios) puede ser vertical (Transmisión Transplacentaria Endógena) por reactivación de taquizoitos o quistes alojados en los tejidos de las vacas, u horizontal (Transmisión Transplacentaria Exógena) (Dubey *et al.*, 2006), por el consumo de ooquistes eliminados con las heces de perros (huéspedes definitivos) que en el ambiente esporulan y son infectantes (Dubey y Lindsay, 1996; McAllister *et al.*, 1998; Dubey *et al.*, 2002). Hasta hoy, poco se conoce acerca de la patogénesis de la infección cuando las vacas consumen ooquistes presentes en el alimento o agua. Vacas infectadas de cualquier edad pueden abortar entre el tercer y octavo mes de la gestación (Dubey *et al.*, 2006; Innes, 2007), presentándose éste con mayor frecuencia entre el quinto y sexto mes de gestación. Los fetos pueden morir en el útero y ser abortados o nacer vivos (Morales *et al.*, 2001; Dubey, 2003; Hall *et al.*, 2005; Dubey *et al.*, 2006). Aproximadamente el 95% de los becerros infectados vía placentaria son clínicamente sanos, pero persistentemente infectados (Buxton *et al.*, 2002). Sólo en un 5%, los becerros menores de 2 meses de edad presentan problemas neurológicos.

Hoy en día se sabe que la forma de transmisión más eficiente de *Neospora caninum* en los bovinos es la vertical, la cual se puede dar por infecciones repetidas del útero en el mismo animal durante varias gestaciones (Innes, 2007). Se ha sugerido que en la vaca gestante se reactiva una infección latente provocando parasitemia como mecanismo de infección al útero, la placenta y posteriormente al feto (Buxton *et al.*, 2002). La hipótesis de la reactivación de la infección se ha mantenido aún cuando *Neospora caninum* solamente se ha aislado de los cerebros de dos vacas adultas clínicamente sanas (Dubey *et al.*, 2006), y se ha detectado DNA del parásito en diversos tejidos de otras vacas (Dubey, 2003).

Patogénesis del aborto

El feto es particularmente vulnerable durante el primer tercio de la gestación, cuando el timo, bazo y nódulos linfoides periféricos se están formando. Durante el segundo tercio, estos tejidos comienzan a reconocer y responder a microorganismos (Buxton *et al.*, 2002; Dubey *et al.*, 2006; Innes, 2007). De los 100 a los 150 días de gestación, el feto comienza a generar una respuesta inmune, después de los 150 días de gestación se hace progresivamente más competente para reconocer y responder por completo a varios patógenos (Buxton *et al.*, 2002; Maley *et al.*, 2003; Innes, 2007). De tal modo que en el primer trimestre, el feto es excepcionalmente vulnerable a la infección por *N. caninum* y es poco probable que sobreviva (Buxton *et al.*, 2002; Dubey *et al.*, 2006). En el segundo tercio de la gestación, el feto es capaz de desarrollar una pobre respuesta inmune, la cual todavía no es suficiente para defenderlo, ya que en este tercio es cuando la mayoría de los abortos ocurren (Buxton *et al.*, 2002; Bartley *et al.*, 2004).

Después de la parasitemia, *N. caninum* es capaz de establecerse en el septo de la carúncula materna antes de cruzar al cotiledón placentario (Maley *et al.*, 2003; Macaldowie *et al.*, 2004). Para que el aborto ocurra, el feto o su placenta tienen que ser dañados. En primera instancia, el daño placentario inducido por el parásito puede poner en peligro directamente la sobrevivencia del feto, o causar la liberación de prostaglandinas maternas que en su momento causen luteólisis y por consecuencia el aborto (Dubey *et al.*, 2006). Por otro lado, el daño fetal puede ocurrir debido a las lesiones del tejido primario causado por la multiplicación de *N. caninum* en el feto, o debido a la insuficiente oxígeno/nutrición, secundario al daño placentario. Además, el rechazo inmunológico materno hacia el feto puede ocurrir por la liberación de citocinas pro-inflamatorias por parte del tejido materno en la placenta (Innes *et al.*, 2002; Innes *et al.*, 2005; Innes, 2007). Todos estos mecanismos pueden estar asociados de una u otra manera, y todo esto puede estar influenciado por el estado de la gestación en que la vaca se encuentre (Macaldowie *et al.*, 2004; Dubey *et al.*, 2006).

Relación huésped parásito en la neosporosis bovina

Vacas no gestantes

La neosporosis es una enfermedad que se manifiesta durante la gestación donde el desarrollo del feto es particularmente vulnerable. La enfermedad clínica rara vez es observada en ganado no gestante, con la excepción de algunos becerros infectados congénitamente, que pueden mostrar signos de daño neurológico como miembros posteriores hiperextendidos después del nacimiento (Dubey y Lindsay, 1996). El estudio de la respuesta inmune en el ganado no preñado puede ayudar a determinar los componentes importantes de la inmunidad protectora en contra del parásito (Innes *et al.*, 2005).

N. caninum, como muchos otros parásitos del Phylum Apicomplexa, es un patógeno intracelular (Lundén *et al.*, 1998; Dubey *et al.*, 2006). Esto sugiere una respuesta inmune mediada por células (RIC), que probablemente juegue un papel importante en la inmunidad protectora. El interferón gamma (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) inhiben la multiplicación de taquizoitos de *N. caninum* dentro de cultivos primarios de células cerebrales de bovino y fibroblastos (Innes *et al.*, 2005; Boysen *et al.*, 2006; Innes, 2007). Algunos autores han demostrado linfoproliferación celular antígeno-específico y producción de IFN- γ , en el ganado infectado tanto natural, como experimentalmente (Lundén *et al.*, 1998). Las células T CD4+ específicas contra *N. caninum* obtenidas de ganado infectado, fueron capaces de destruir las células blanco autólogas infectadas por el parásito (Staska *et al.*, 2003; Innes *et al.*, 2005; Innes, 2007).

Una herramienta útil que ha sido usada en el ganado para el diagnóstico y estudios epidemiológicos, es la respuesta de anticuerpos anti-*N. caninum*. Actualmente se sabe poco sobre la eficacia de los anticuerpos en la inmunidad protectora, sin embargo, es probable que su papel sea reducir la infección por los taquizoitos (Innes *et al.*, 2002; Innes *et al.*, 2005; Innes, 2007).

En resumen, parecería que las citocinas pro-inflamatorias y la generación de la respuesta de tipo Th1, puedan jugar un papel importante en la inmunidad protectora en contra de *N. caninum* (Innes *et al.*, 2005).

Vacas gestantes

La gestación representa un desafío interesante para el sistema inmune de la vaca, ya que el feto posee la mitad de su información genética sin que haya un rechazo inmunológico hacia él, es por eso que se han planteado varias teorías para explicar éste fenómeno (Innes *et al.*, 2005). Ciertas citocinas en la interfase materno fetal son benéficas para la gestación, mientras que otras no. Las citocinas pro-inflamatorias tipo Th1, como el TNF- α , IFN- γ e Interleucina 2 (IL-2) en cantidades suficientes, pueden ser perjudiciales a la gestación y comprometer la vida del feto (Innes *et al.*, 2002).

La respuesta tipo Th1 parece ser importante en la protección contra *N. caninum* y otros patógenos intracelulares. Las condiciones de las citocinas en la placenta favorecen más la regulación de citocinas Th2, como IL-10, IL-4 y el factor de crecimiento transformador beta (TGF- β), las cuales contrarrestan la respuesta inflamatoria inducida por las citocinas tipo Th1 (Innes *et al.*, 2005). Por otro lado, también se sabe que las hormonas producidas durante la gestación tienen efectos inmunoreguladores. Por ejemplo, la progesterona induce a las células T hacia un fenotipo Th2 y puede estimular la producción de IL-4 (Innes *et al.*, 2002). Por lo tanto, la vaca puede controlar la infección por *N. caninum* durante la gestación, sin embargo, la inmunomodulación natural que ocurre durante ésta puede alterar su habilidad de controlar la infección (Innes *et al.*, 2005).

Respuesta inmune en vacas y fetos, experimental y naturalmente infectados en el primer, segundo y tercer trimestre de gestación

La infección experimental de las vacas en la gestación temprana (primer tercio) resulta en muerte fetal. La infección en gestación tardía (segundo tercio), tiene consecuencias menos severas y el becerro puede nacer infectado pero aparentemente sano (Bartley *et al.*, 2004). Después de la inoculación de ganado gestante con *N. caninum* en el día 140 de gestación, tanto las vacas como los fetos generan una respuesta específica mediada por células y humoral. Dentro de los factores que influyen en el resultado de la infección por *N. caninum*, la etapa

de la gestación en la que el feto se encuentra parece ser crucial (Bartley *et al.*, 2004). Esto puede explicar el por qué la mayoría de los abortos asociados a *N. caninum* ocurren cerca de los 5 meses de gestación (150 días), cuando la inmunidad del feto es todavía débil (Bartley *et al.*, 2004). Aunque la respuesta inmune materna no puede prevenir completamente la invasión de la placenta al feto, puede reducir la magnitud (Bartley *et al.*, 2004).

Maley y colaboradores (2003), demostraron la infiltración de células mononucleares y polimorfonucleares en los placentomas en gestación media (140 días), a los 28 días post inoculación de *N. caninum*, sugiriendo que la RIC había iniciado. Este estudio mostró que los fetos de las madres infectadas por *N. caninum* en gestación media, (segundo tercio) generaron tanto respuesta humoral como RIC.

En un estudio realizado por Moore y colaboradores (2005a), los títulos de anticuerpos séricos en contra de *N. caninum* fueron mayores en vacas inmunizadas que en las vacas naturalmente infectadas, y los niveles de IFN- γ fueron similares. La respuesta inmune que involucra la producción de anticuerpos IgG₂ se ha asociado con la infección experimental por *N. caninum* con taquizoitos viables. Estudios realizados en fetos de bovino infectados experimentalmente con *N. caninum* a los 159 y 169 días de gestación, evidenciaron una respuesta predominantemente Th2, que fue indicada por la presencia de IgG₁ específica a *N. caninum* (Moore *et al.*, 2005b). En contraste, en otros estudios se ha informado que en ganado infectado experimentalmente puede predominar tanto IgG₁ como IgG₂. Además, sin haber diferencias significativas entre los niveles de IgG₁ e IgG₂ encontrados en ganado infectado naturalmente, incluyendo vacas no gestantes (Moore *et al.*, 2005a). Sin embargo, vacas infectadas naturalmente, las cuales llevan a término becerros congénitamente infectados, desarrollan altos títulos de IgG₂. Un trabajo reciente que caracterizó la expresión génica de citocinas en fetos y vacas inoculadas a los 110 días de gestación, describe que existió un balance entre las respuestas Th1/Th2 (Moore *et al.*, 2005b).

En un estudio realizado por Andrianarivo y colaboradores (2005), con 10 vacas no vacunadas infectadas naturalmente, y 11 vacas vacunadas infectadas naturalmente con taquizoitos muertos, se encontró que el tiempo en el cual se incrementan los anticuerpos se correlaciona con el resultado de aborto fetal o infección congénita. En las vacas no vacunadas que no abortaron, el incremento de los anticuerpos específicos contra el parásito, principalmente IgG₂, ocurrió después de la gestación media y fue simultáneo con el incremento no significativo de la producción de IFN- γ . Esto sugiere que la reactivación de una infección latente por *N. caninum* ha ocurrido en las vacas con la estimulación simultánea de la respuesta Th1. A pesar de la producción de IFN- γ , las vacas inmunizadas no evitaron la infección fetal, aunque éstas no abortaron.

Así, un balance a favor de una respuesta Th1 durante el primer trimestre de la gestación bovina controlaría la infección, pero resultaría nociva en la interfase materno fetal. Por otra parte, la modulación a favor de una respuesta inmune Th2 observada en el segundo trimestre de la gestación, no permitiría controlar la infección y el parásito ocasionaría lesiones inflamatorias no sólo en la placenta sino también en el feto (Moore *et al.*, 2005b). Durante el tercer trimestre, se observaría infección congénita, con menor probabilidad de un aborto, debido a la maduración del sistema inmune fetal (Moore *et al.*, 2005b).

Patología de la placenta

En las infecciones experimentales las lesiones más severas se han encontrado en la placenta y en el cerebro del feto. Varios experimentos han demostrado que cuando *N. caninum* invade las células en el útero bovino, causa destrucción focal por multiplicación tanto de tejido materno como del fetal en la interfase materno-fetal, produciéndose una mayor respuesta inflamatoria no supurativa (Maley *et al.*, 2003; Macaldowie *et al.*, 2004). En vacas inoculadas con taquizoitos a los 70 días de gestación, las primeras lesiones se observaron a los 14 días post-inoculación (Macaldowie *et al.*, 2004). Estas se debieron a la multiplicación del parásito que provocó necrosis de las vellosidades placentarias fetales, algunas veces con

infiltrado sérico entre estas vellosidades y el septo materno, e inflamación no supurativa del septo materno. Análisis anteriores han demostrado que las células inflamatorias maternas estuvieron compuestas en su mayoría por linfocitos T CD4+, T CD8+ y células T $\gamma\delta$ y mediante hibridación *in situ* se demostró que una proporción de las células en el infiltrado eran capaces de producir IFN- γ (Innes *et al.*, 2005; Dubey *et al.*, 2006). Lo anterior sustenta que en algunos casos, la muerte fetal es el resultado menos directo de la multiplicación del parásito, y que realmente ésta se debe a la respuesta inmune materna desencadenada por el parásito (Innes *et al.*, 2005). En vacas inoculadas por vía intravenosa a los 70 días de gestación, todos los fetos fueron abortados después de 14 días. En las vacas inoculadas por vía subcutánea, las lesiones sólo se observaron en la mitad de las vacas infectadas a los 28 días después de ser inoculadas, encontrándose daño de los placentomas con la separación de los cotiledones fetales de las carúnculas maternas. En esta etapa temprana de la gestación no se observó inflamación en el feto (Macaldowie *et al.*, 2004).

Patología de los fetos infectados natural y experimentalmente

Al inicio de la infección placentaria, el parásito entra a la circulación fetal e invade más órganos como corazón, hígado, bazo, riñón, músculo esquelético, con predilección por el sistema nervioso central (SNC) (Macaldowie *et al.*, 2004; Dubey *et al.*, 2006), localizándose inicialmente dentro y alrededor de los vasos sanguíneos (Dubey *et al.*, 2006). En el feto de una gestación temprana, la multiplicación del parásito puede causar destrucción del neurópilo, con poca o nula inflamación (Buxton *et al.*, 2002; Dubey *et al.*, 2006). Los fetos de gestaciones avanzadas son capaces de responder a la infección por el parásito, y la multiplicación es más limitada; la necrosis se localiza en pequeños focos rodeados por un infiltrado inflamatorio intenso por células de la microglia, astrocitos reactivos y células de la serie linfoide y monocitos. (Buxton *et al.*, 2002; Dubey *et al.*, 2006). Estos focos pueden tener mineralización (Dubey *et al.*, 2006), y también puede haber una meningitis leve. En los fetos abortados infectados por *N. caninum* se

puede observar necrosis multifocal e infiltraciones mononucleares generalizadas en muchos tejidos, incluyendo corazón, músculo esquelético, pulmones e hígado. También en algunos fetos se ha podido demostrar la presencia del parásito en órganos como el corazón y el hígado. En resumen, las lesiones características de la neosporosis pueden ser encontradas por histopatología en varios órganos, de los cuales el cerebro fetal es el más afectado, y está demostrado que es parasitado desde el inicio del ciclo. Rara vez *N. caninum* se encuentra en tejidos sin lesiones, por lo tanto la inmunohistoquímica es más confiable que la técnica convencional de Hematoxilina y Eosina (H&E), para demostrar la presencia del parásito (Dubey *et al.*, 2006).

JUSTIFICACIÓN

Debido a que los estudios realizados hasta la fecha se han enfocado a la identificación y caracterización de lesiones en las placentas y en los fetos, y que no se ha estudiado la respuesta inflamatoria en úteros de vacas gestantes y no gestantes infectadas naturalmente por *Neospora caninum*, es de gran importancia caracterizar que tipo de poblaciones celulares del sistema inmune son las que intervienen en el útero para limitar la multiplicación de *N. caninum*.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la respuesta inflamatoria en úteros de vacas gestantes y no gestantes infectadas naturalmente por *Neospora caninum*.

Objetivos específicos

1. Identificar a dos grupos de vacas de desecho positivas a anticuerpos anti-*Neospora caninum*, gestantes y no gestantes, así como a dos grupos de vacas negativas a anticuerpos anti-*Neospora caninum* gestantes y no gestantes (testigos negativos) por el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA).
2. En los úteros de las vacas de los grupos seropositivos y seronegativos, caracterizar el tipo de respuesta inflamatoria por medio de histopatología e inmunohistoquímica, utilizando anticuerpos en contra de *Neospora caninum*, linfocitos T (CD4+ y CD8+), linfocitos B (CD21) y macrófagos (CD14).
3. Comparar los resultados de los grupos positivos a anticuerpos anti-*Neospora caninum* con los grupos testigos de animales gestantes y no gestantes.

HIPÓTESIS

Neospora caninum, por ser un patógeno intracelular obligado, es capaz de inducir una repuesta inflamatoria conformada por linfocitos y macrófagos en úteros de bovinos infectados naturalmente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Ubicación espacial

La toma de muestra se llevó a cabo en el rastro Municipal “Dr. Rafael Domínguez Gómez” ubicado en Antonio Plaza s/n Col. Rafael Buelna de la Ciudad y Puerto de Mazatlán, Sinaloa, el cual se encuentra en la parte Noroeste de México. Tiene un clima Aw (1) (Cálido Subhúmedo con lluvias en verano de humedad media) su precipitación media anual es de 840.9 mm. La temperatura media anual es de 24.6°C (INEGI, 2005).

Toma de muestra y Diseño Experimental

En el rastro se tomaron muestras sanguíneas por punción de la vena coccígea o la vena yugular para poder integrar 4 grupos de animales. Vacas de los grupos 1 y 2 no gestantes, seropositivas y seronegativas respectivamente a *Neospora caninum* por la técnica de ELISA. Vacas de los grupos 3 y 4 gestantes seropositivas y seronegativas respectivamente a *Neospora caninum* por la técnica de ELISA. Las muestras fueron transportadas a la Asociación Ganadera Local de Mazatlán, Sinaloa, para ser centrifugadas y obtener los sueros, los cuales se almacenaron a -20 °C hasta su procesamiento. Al mismo tiempo de la toma de las muestras sanguíneas, se colectaron muestras de los úteros de animales gestantes y no gestantes, se realizaron varios cortes iguales de ambos cuernos uterinos y del cuerpo del útero incluyendo carúnculas y/o placentomas y se fijaron por lo menos 24 horas en formalina amortiguada al 10%. Las muestras fueron procesadas en el Departamento de Patología de la FMVZ, UNAM.

Criterios de inclusión

Se realizaron pruebas serológicas para descartar otras probables enfermedades abortivas tales como Brucelosis, Leptospirosis, Diarrea Viral Bovina (DVB) y Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR). Las muestras de los animales que resultaron serológicamente positivas a estas enfermedades se descartaron del estudio.

Estudio serológico para la detección de anticuerpos anti-*Neospora caninum*

Para la identificación de los sueros positivos a *N. caninum* se realizó la técnica de ELISA (serological Detection of Specific antibodies to *Neospora caninum* ELISA method) del Institut Pourquier serum screening Versión: P00511/01¹. Se siguieron las instrucciones del fabricante, el protocolo se describe a continuación.

Procedimiento

Depósito de las muestras

Los testigos y las muestras se diluyeron a 1/20 usando el siguiente método:

Se Distribuyeron:

190 µl de “Solución Amortiguadora 2” por pozo

10 µl de testigo negativo

10 µl de testigo positivo por duplicado

10 µl por pozo por cada muestra a probar

Se homogenizó el contenido de cada pozo

Se cubrió la microplaca (con papel aluminio)

Se incubó durante una hora a 21°C ($\pm 5^{\circ}\text{C}$)

Se vació el contenido de la placa con un movimiento rápido para eliminar el contenido total de los pozos.

Lavados

- a) Se diluyó un vial de “Solución de Lavado Concentrada (20x)” en 1900 ml de agua destilada. Se colocaron 300 µl de la solución de lavado diluida por pozo.
- b) Se vació el contenido de la placa con un movimiento rápido para eliminar el contenido total de solución de lavado. Los pozos se volvieron a llenar con 300 µl de solución de lavado. Este paso se repitió dos veces.

¹ Biotecnología Industrial, S.A. de C.V. Darwin No. 68-201 Col. Anzures, México D.F. C.P. 11590

Depósito del Conjugado

- a) Se diluyó el conjugado a 1/100 con la “Solución Amortiguadora 1”
- b) Se vertieron 100 µl de conjugado diluido en cada pozo.
- c) Se cubrió la placa (con papel aluminio) y se dejó incubar durante 30 minutos (\pm 3 min) a 21°C (\pm 5°C).
- d) Pasado éste tiempo, se eliminó el conjugado volteando la placa de un solo movimiento para eliminarlo en su totalidad.

Posteriormente la placa se lavó como se especificó en el procedimiento anterior.

Revelado

- a) Se vertieron 100 µl de “Solución de Revelado 2” lista para usarse por pozo.
- b) Se incubaron por 20 minutos a 21°C (\pm 5°C) (lejos de la luz).
- c) Se adicionaron 100 µl de “solución de paro” por pozo.
- d) Se agitó la placa hasta que la solución se homogenizó, la parte inferior de la placa se limpió cuidadosamente.

Lectura

La lectura de la absorbancia fue a 450 nm (DO.450).

Se calculó el porcentaje por cada muestra (S/P%):

Criterio de Validación:

La reacción es considerada válida cuando se obtiene el siguiente criterio:

El testigo positivo tiene una media mínima de DO.450 de 0.600 y una proporción entre el valor de la media DO.450 del testigo positivo y el valor DO.450 del testigo negativo igual o mayor que 3.5.

Interpretación:

Calculado por cada muestra, el S/P porcentaje:

$$S/P\% = \frac{(\text{DO.450 Valor de la muestra})}{(\text{media de los DO.450 del valor de los testigos positivos})} \times 100$$

Cualquier muestra con un S/P % \leq 30% se consideró negativa a anticuerpos específicos anti- *Neospora caninum*.

Cualquier muestra con un S/P % entre 30% y 50% fue considerada como sospechosa.

Cualquier muestra con un S/P % \geq 50% se consideró positiva a anticuerpos específicos anti-*Neospora caninum*.

Evaluación de otras enfermedades abortivas

Las muestras de las vacas que resultaron positivas a anticuerpos anti-*Brucella*, anti-*Leptospira*, anti-virus de DVB y anti-virus de IBR fueron eliminadas del estudio. El diagnóstico serológico de Brucelosis fue realizado en la Ciudad de Mazatlán y fue evaluado usando la Prueba de Aglutinación en Tarjeta, los sueros que resultaron positivos fueron confirmados por medio de la Prueba de Rivanol (Sensibilidad 99.2% y Especificidad 55.4% de acuerdo con Dajer *et al.* 1999), usando reactivos y el método descrito por la Campaña Nacional para la Erradicación y Control de la Tuberculosis y Brucelosis Bovina. Los animales fueron considerados positivos a *Brucella abortus* cuando los títulos de aglutinación en Rivanol fueron iguales o mayores a 1:50 (Leal *et al.*, 2001). Para el diagnóstico de Leptospirosis se realizó la Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT, por sus siglas en inglés) (Sensibilidad 98.2% y Especificidad 96.4%, de acuerdo con Bajani *et al.*, 2003), usando reactivos y el método descrito por la FMVZ, UNAM. De acuerdo al criterio de Faine (1994) y Levett, (2001), se excluyeron del estudio las muestras que presentaron títulos de aglutinación anti-*Leptospira interrogans* mayores que 1:800, ya que de acuerdo a las características clínicas y seroepidemiológicas de los animales observadas en el presente estudio, Mazatlán, Sinaloa, se consideró como una región enzoótica de leptospirosis. Los anticuerpos contra el virus de DVB fueron detectados usando reactivos y el método descrito por CIVTEST BOVIS P80, Laboratorios Hipra S.A.² Los sueros con porcentaje de inhibición mayor a 50 fueron clasificados como positivos. Los anticuerpos anti- virus de IBR fueron detectados usando reactivos y el método descrito por

² LESCA S.A. de C.V. Empresa No. 21-1 Col. Insurgentes Mixcoac C.P. 03920 México, D.F.

CIVTEST BOVIS IBR, Laboratorios Hipra, S.A. Los sueros con Índice Relativo IR (x100) mayores a 20% fueron clasificados como positivos.

Histopatología

Los cortes de úteros se procesaron por la técnica histológica de rutina, se cortaron a 3 µm de grosor y se tiñeron con H&E. Se realizó la observación microscópica. Se utilizó un analizador de imágenes Image Pro Plus de Media Cybernetics para determinar el conteo de células inflamatorias por campo, el tipo de células así como su distribución (cuadros 2, 3, 4, 5, 6 y 7). Se eligieron seis cortes para los úteros y cinco para los placentomas a los que se les tomaron 10 fotografías por laminilla, analizando 1540 fotografías a un aumento de 400X.

Inmunohistoquímica

Después de la revisión histopatológica se seleccionaron dos cortes homólogos de útero y de placentoma respectivamente, de animales que resultaron seropositivos y seronegativos a anticuerpos anti-*Neospora caninum*, fueron procesados por inmunohistoquímica utilizando anticuerpos primarios anti-*Neospora caninum*, y anticuerpos monoclonales para marcar células de bovino anti-Linfocitos T CD4+ y T CD8+, anti-linfocitos B y anti-macrófagos.

Para identificar taquizoítos y quistes de *Neospora caninum*, así como a las células inflamatorias presentes en úteros de bovino se utilizó el método de detección Complejo Estreptoavidina-Biotina-Peroxidasa (CEB-P).

Tejidos testigo positivo y negativo para *N. caninum*

Como testigo positivo se utilizó una sección de encéfalo de feto bovino, al cual se demostró previamente la presencia de quistes y taquizoítos de *Neospora caninum* por inmunohistoquímica.

Como testigos negativos se utilizaron cortes de los mismos úteros en los cuales se sustituyó el anticuerpo primario por amortiguador de carbonatos 0.1 M, pH 9.4.

Tejidos testigo positivo y negativo para células inflamatorias

Como testigo positivo, se utilizó un nódulo linfoide normal de bovino.

Como testigo negativo se utilizaron cortes de los mismos nódulos linfoides en los cuales se sustituyó el anticuerpo primario por amortiguador de carbonatos 0.1 M, pH 9.4.

Procesamiento del tejido.

De cada caso previamente analizado por histopatología, se realizaron cortes seriados de 3-5 μm de grosor utilizando un micrótomo estándar. Se colocaron en laminillas tratadas previamente con poli-L-lisina³ al 3% diluida en acetona. Posteriormente se desparafinaron por una hora a 60°C y se realizaron dos lavados con xilol de 10 minutos cada uno.

Inhibición de la peroxidasa endógena

Para inhibir la peroxidasa endógena de los tejidos en los cuales se utilizó el anticuerpo contra *N. caninum*, los cortes se trataron con una solución de peróxido de hidrógeno al 30%⁴ y metanol absoluto a una relación de 1:10, durante cinco minutos a temperatura ambiente. Para los tejidos en donde se aplicaron anticuerpos monoclonales dirigidos en contra de las células de tipo inflamatorio, se sustituyó el metanol por agua destilada.

Hidratación de tejidos

Los tejidos fueron rehidratados con etanol a diferentes concentraciones (96%, 80%, 70%) y agua destilada haciendo lavados de tres minutos cada uno.

Recuperación antigénica

Para la recuperación de antígenos de los tejidos a los cuales se les aplicaron anticuerpos en contra de las células inflamatorias, los cortes se sumergieron en

³ Sigma-Aldrich P.O. Box 14508 St. Louis M.O. 63178 USA

⁴ J.T. Baker Mallinckrodt Baker, S.A. de C.V. Xalostoc, 55320, Edo. de Mex, México

solución amortiguadora de boratos 0.05M pH 8.0, se metieron en horno de microondas por cinco minutos a máxima potencia, repitiendo dos veces este paso, dejando durante un minuto a temperatura ambiente entre cada repetición. Una vez retirados los tejidos del horno de microondas, se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 15 minutos. A los tejidos que se les aplicó el anticuerpo contra *N. caninum*, además de la recuperación antigénica por calor se trataron con tripsina al 0.1% en Tris 0.05M pH 7.6, incubándose a temperatura ambiente durante cinco minutos.

Bloqueos de avidina y biotina endógenas

Para bloquear la avidina y biotina⁵ endógenas en los tejidos, se utilizó la solución bloqueadora de avidina y biotina. La cantidad utilizada para cada una de ellas fue de 70 µL incubándose a temperatura ambiente durante 15 minutos. Entre cada solución bloqueadora se realizó un lavado con amortiguador de carbonatos 0.1 M, pH 9.4 durante tres minutos.

Aplicación de anticuerpo anti-*Neospora caninum*

Como anticuerpo primario anti-*N. caninum* (Cuadro 1), se utilizó un anticuerpo policlonal de origen caprino diluido 1/500 en amortiguador de carbonatos 0.1M, pH 9.4; se agregaron 70 µL a cada corte y se incubó durante 40 minutos a temperatura ambiente. Después los tejidos fueron sometidos a un lavado con amortiguador de carbonatos 0.1 M, pH 9.4 durante tres minutos.

Aplicación de anticuerpo secundario anti-cabra

Como anticuerpo secundario biotinilado se utilizó un anticuerpo producido en ratón anti-cabra⁶. Se agregaron 70 µL a los tejidos y se incubaron durante 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se realizó un lavado con amortiguador de carbonatos 0.1 M, pH 9.4 durante tres minutos.

⁵ Avidin/Biotin 00-4303 Zymed Laboratories Inc. Invitrogen, Carlsbad, CA 92008

⁶ MG610H BIOCARE MEDICAL 2940 Camino Diablo, Suite 300, Walnut Creek, CA 94597

Aplicación de anticuerpos anti- marcadores para CD de linfocitos y macrófago

Como marcadores de CD se utilizaron anticuerpos primarios monoclonales anti-CD4+, anti-CD8+, anti-CD 14 y anti-CD21 (Cuadro 1). Se diluyeron 1/50 con amortiguador de carbonatos 0.1 M, pH 9.4, se vertieron 70 µl por corte y los tejidos se incubaron durante 60 minutos a 37°C en cámara húmeda. Después de esta incubación los tejidos se lavaron con amortiguador de carbonatos 0.1 M, pH 9.4 durante tres minutos.

Aplicación de anticuerpo secundario anti-ratón

Como anticuerpo secundario biotinilado se utilizó un anticuerpo producido en cabra anti-ratón⁷. Se diluyó 1/300 con amortiguador Tris 0.05M pH 7.6, se vertieron 70 µL a los tejidos y se incubaron durante 20 minutos en cámara húmeda a 37°C. Transcurrido este tiempo, se realizó un lavado con amortiguador de carbonatos 0.1 M, pH 9.4 durante tres minutos.

Aplicación del Conjugado enzimático Estreptoavidina-peroxidasa

Se vertieron 70 µL de estreptoavidina-peroxidasa⁸ y se dejó incubar durante 20 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente, posteriormente se realizó un lavado con amortiguador de carbonatos 0.1 M, pH 9.4 durante tres minutos.

Revelado

Para determinar la presencia o ausencia de antígeno en los tejidos se utilizó un reactivo comercial de reveladoⁱ que consta de cromógeno (amino-etil-carbazol), amortiguador para la reacción y peróxido de hidrógeno al 0.6%, el cual se preparó colocando una gota de cada uno de los reactivos en un mL de agua destilada. A cada tejido se le aplicaron 70 µL de esta mezcla durante 5 a 6 minutos. Para

⁷ 81-6540 Zymed Laboratories Inc. Invitrogen, Carlsbad, CA 92008

^{8, i, j} 95-6143 Zymed Laboratories Inc. Invitrogen, Carlsbad, CA 92008

detener la reacción, los tejidos se colocaron en agua destilada durante cinco minutos.

Tinción con Hematoxilina de Mayer

Para contrastar la coloración obtenida con el cromógeno se utilizó hematoxilina de Mayer^j aplicando 70 µL durante 4 minutos. Finalmente a los tejidos se les colocó un cubreobjetos sellado con resina acuosa.

Interpretación de resultados

Los tejidos se consideraron inmunopositivos al detectar taquizoitos y/o quistes, y las células inflamatorias en útero y placenta que se tiñeron de color café rojizo.

Cuadro 1. Anticuerpos primarios específicos anti-*N. caninum* y anti-leucocitos

Fuente	Origen	No. Catalogo	Anticuerpos	Tipo de Célula Marcada	Referencia
VMRD*	Cabra	210-70-NC	<i>N. caninum</i>	Taquizoítos	Ramos-Vara y Beissenherz, 2000
VMRD	Ratón	CACT138A	CD4	T Cooperadores	Naessens <i>et al</i> , 1997
VMRD	Ratón	BAQ111A	CD8	T Citotóxicos	Naessens <i>et al</i> , 1997
VMRD	Ratón	BAQ151A	CD14	Macrófagos	Sopp <i>et al</i> , 1996
VMRD	Ratón	BAQ15A	CD21	Linfocitos B	Naessens <i>et al</i> , 1997

*Veterinary Medical Research & Development, Inc. P.O. Box 502 Pullman, WA 99163, U.S.A.

Análisis Estadístico

Los resultados de las observaciones del estudio histopatológico en donde se realizaron comparaciones de la respuesta inflamatoria de los úteros de las vacas de los grupos seropositivos y seronegativos a *N. caninum* no gestantes y gestantes, fueron analizados con la prueba U de Mann-Whitney. Para el estudio inmunohistoquímico se realizó una descripción con cuadros.

RESULTADOS

Estudio serológico

Estudio serológico para la detección de anticuerpos anti-*Neospora caninum*

Se obtuvieron 141 muestras de sueros sanguíneos, así como de úteros gestantes y no gestantes de los mismos animales. Cuarenta y cuatro (31.21%) fueron positivos, 12 (8.51%) fueron sospechosos y 85 (60.28%) fueron negativos a anticuerpos anti- *N. caninum* (Figura 1).

Evaluación de otras enfermedades abortivas

Los 141 sueros (100%) fueron negativos a la Prueba de Aglutinación en Tarjeta para brucelosis, lo cual se confirmó mediante la Prueba de Rivanol.

Los resultados serológicos de la Prueba de Aglutinación Microscópica para las serovariedades de *Leptospira interrogans* de mayor importancia en el ganado bovino fueron los siguientes:

Para la serovariedad Canicola: 66 (46.81%) no presentaron títulos; 63 (44.68%) con títulos 1:50; 8 (5.67%) con títulos 1:100 y 4 (2.84%) con títulos 1:200 (Figura 2).

Para la serovariedad Grippotyphosa: 131 (92.91%) no presentaron títulos; 4 (2.84%) con títulos 1:50; 3 (2.13%) con títulos 1:100; 2 (1.42%) con títulos 1:200 y 1 (0.71%) con títulos 1:800 (Figura 3).

Para la serovariedad Hardjo: 50 (35.46%) no presentaron títulos; 11 (7.8%) con títulos 1:50; 11 (7.8%) con títulos 1:100; 11 (7.8%) con títulos 1:200; 14 (9.93%) con títulos 1:400; 21 (14.89%) con títulos 1:800; 6 (4.26%) con títulos 1:1600; 7 (4.96%) con títulos 1:3200; 5 (3.55%) con títulos 1:6400; 3 (2.13%) con títulos 1:12800; 1 (0.71%) con títulos 1:25600 y 1 (0.71%) con títulos 1:204800 (Figura 4).

Para la serovariedad Icterohaemorrhagiae: 75 (53.19%) no presentaron títulos; 48 (34.04%) con títulos 1:50; 12 (8.51%) con títulos 1:100; 5 (3.55%) con títulos 1:200 y 1 (0.71%) con títulos 1:400 (Figura 5).

Para la serovariedad Pomona: 72 (51.06%) no presentaron títulos; 27 (19.25%) con títulos 1:50; 10 (7.09%) con títulos 1:100; 11 (7.8%) con títulos 1:200; 7 (4.96%) con títulos 1:400; 4 (2.84%) con títulos 1:800; 5 (3.55%) con títulos 1:1600; 2 (1.42%) con títulos 1:3200; 2 (1.42%) con títulos 1:6400 y 1 (0.71%) con títulos 1:12800 (Figura 6).

Los resultados serológicos obtenidos para la detección de anticuerpos anti-virus de DVB fueron los siguientes: 50 sueros (35.46%) resultaron positivos y 91 (64.54%) resultaron negativos (Figura 7).

Los resultados serológicos para la detección de anticuerpos contra el virus de IBR fueron: 80 sueros (56.74%) resultaron positivos y 61 (43.26%) fueron negativos (Figura 8).

Como prueba complementaria para descartar que las muestras de animales seleccionados hayan estado en contacto con *Toxoplasma gondii*, los sueros fueron enviados al Instituto Nacional de Pediatría. Todos los sueros resultaron negativos a anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* por el método de ELISA.

De acuerdo a todos los resultados serológicos, se seleccionaron muestras de úteros de 28 vacas, las cuales se dividieron en 4 grupos de 7 animales cada uno. Los grupos 1 y 2 se integraron con úteros de vacas no gestantes seropositivas y seronegativas respectivamente a *Neospora caninum*. Los grupos 3 y 4 se integraron con úteros de vacas gestantes seropositivas y seronegativas a *Neospora caninum*.

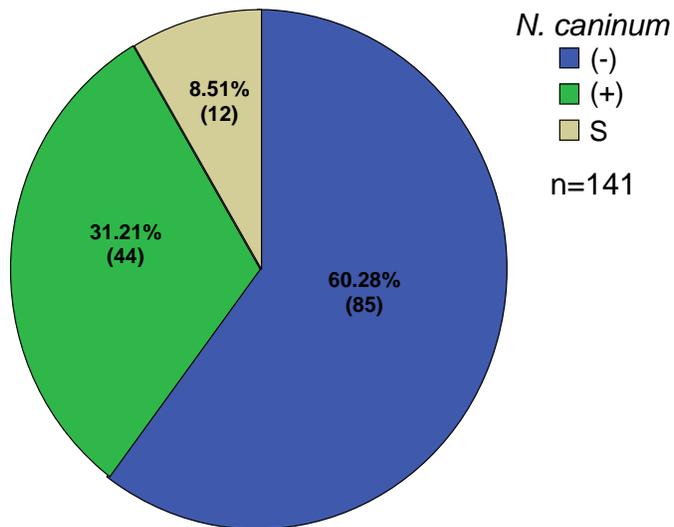


Figura 1. Frecuencia serológica de anticuerpos anti-*N. caninum* mediante la técnica de ELISA en vacas sacrificadas en el rastro de Mazatlán, Sinaloa. En cada área se muestra el número de animales y su porcentaje. (-), negativo; (+), positivo; S, sospechoso.

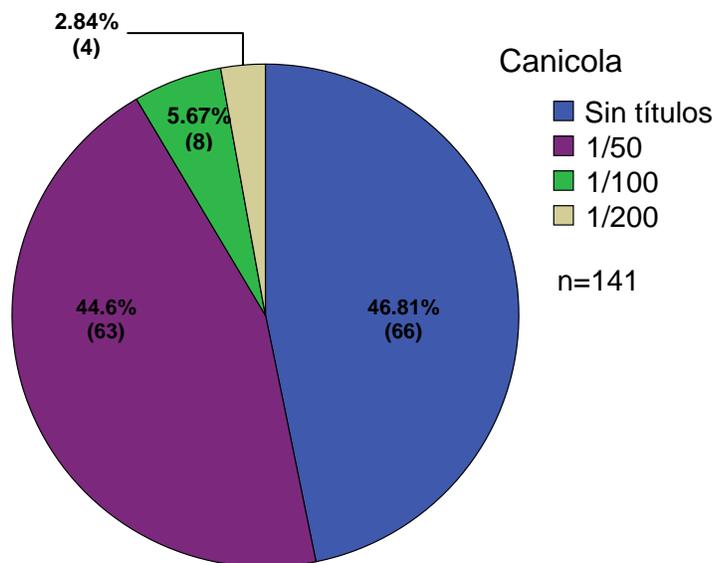


Figura 2. Frecuencia serológica de anticuerpos anti-*Leptospira interrogans* serovariedad Canicola mediante MAT en vacas sacrificadas en el rastro de Mazatlán, Sinaloa. En cada área se muestra el número de animales y su porcentaje.

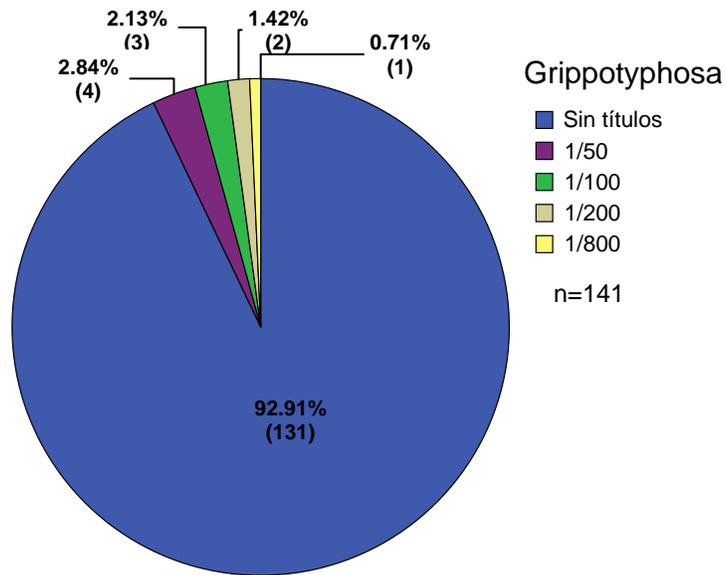


Figura 3. Frecuencia serológica de anticuerpos anti-*Leptospira interrogans* serovariedad Grippotyphosa mediante MAT en vacas sacrificadas en el rastro de Mazatlán, Sinaloa. En cada área se muestra el número de animales y su porcentaje.

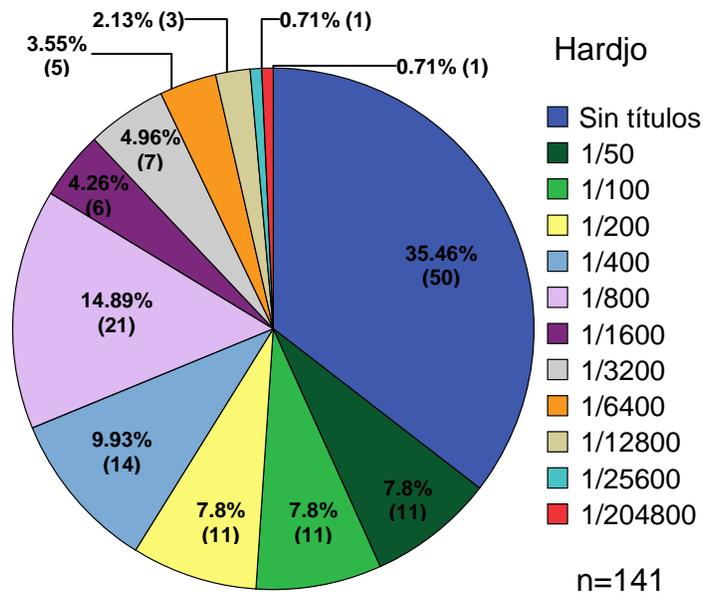


Figura 4. Frecuencia serológica de anticuerpos anti-*Leptospira interrogans* serovariedad Hardjo mediante MAT en vacas sacrificadas en el rastro de Mazatlán, Sinaloa. En cada área se muestra el número de animales y su porcentaje.

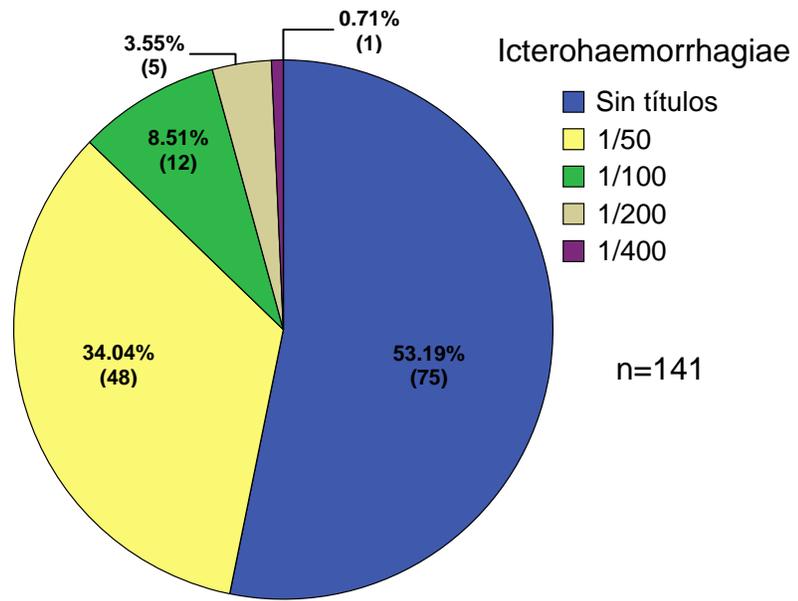


Figura 5. Frecuencia serológica de anticuerpos anti-*Leptospira interrogans* serovariedad Icterohaemorrhagiae mediante MAT en vacas sacrificadas en el rastro de Mazatlán, Sinaloa. En cada área se muestra el número de animales y su porcentaje.

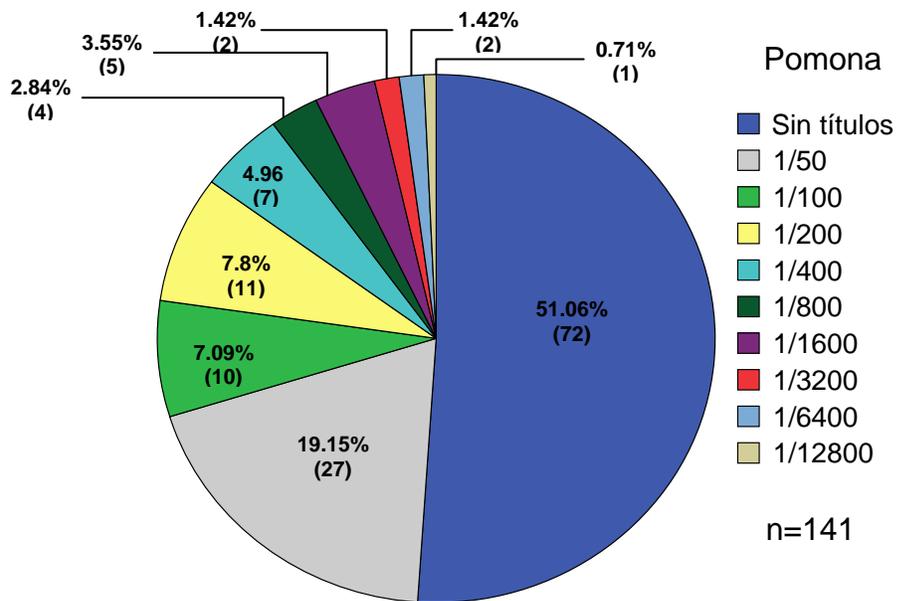


Figura 6. Frecuencia serológica de anticuerpos anti-*Leptospira interrogans* serovariedad Pomona mediante MAT en vacas sacrificadas en el rastro de Mazatlán, Sinaloa. En cada área se muestra el número de animales y su porcentaje.

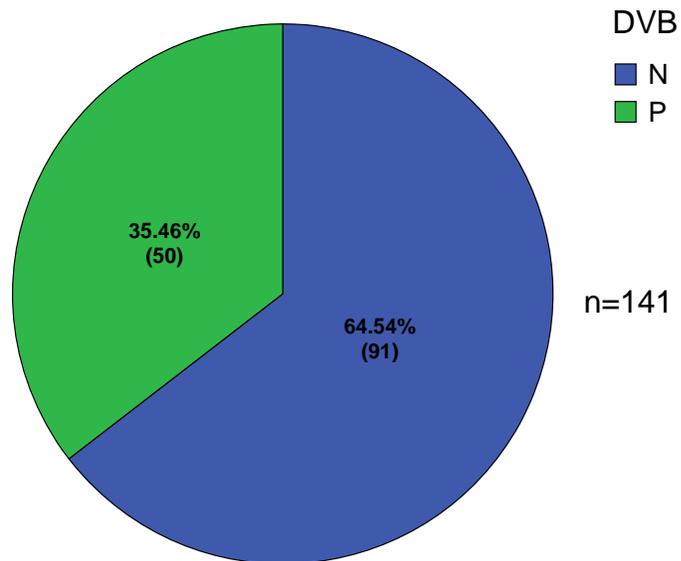


Figura 7. Frecuencia serológica de anticuerpos anti-DVB mediante la técnica de ELISA en vacas sacrificadas en el rastro de Mazatlán, Sinaloa. En cada área se muestra el número de animales y su porcentaje. N, negativo; P, positivo.

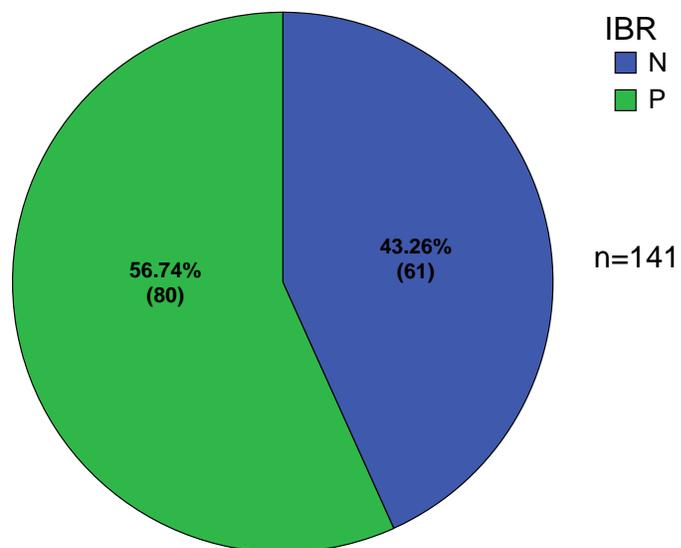


Figura 8. Frecuencia serológica de anticuerpos anti-IBR mediante la técnica de ELISA en vacas sacrificadas en el rastro de Mazatlán, Sinaloa. En cada área se muestra el número de animales y su porcentaje. N, negativo; P, positivo.

Histopatología

Células Inflamatorias

De las poblaciones celulares del sistema inmune los linfocitos se observaron en mayor cantidad en todos los grupos de vacas. En un placentoma del animal número 4 seropositivo a *N. caninum* se observó una zona de necrosis que involucraba las vellosidades fetales y septo materno. Y en un placentoma del animal número 7 seropositivo a *N. caninum* presentó algunos focos de necrosis en las vellosidades fetales. En los grupos de las vacas gestantes no se observaron mastocitos. Los resultados del conteo por campo, el tipo de células inflamatorias así como su distribución en el útero y placenta de los 4 grupos de animales, se resumen en los cuadros 2, 3 y 4.

Cuadro 2. Conteo de células inflamatorias del grupo de vacas no gestantes seropositivas a *N. caninum*.

No.	útero	Linfocitos	Cél Plásmatica	Macrófagos	Mastocitos	Neutrófilos	Eosinófilos
1	Mucosa						
	Estrato compacto	43	17		1		
	Estrato esponjoso	85	32	3	9	1	
	Muscular						
	Serosa						
2	Mucosa						
	Estrato compacto	163	17	53	1	42	
	Estrato esponjoso	141	14	19		8	
	Muscular					23	
	Serosa						
3	Mucosa	17					
	Estrato compacto	61		20			
	Estrato esponjoso	155	157	144		3	
	Muscular	46	4	2			
	Serosa						
4	Mucosa						
	Estrato compacto	1		1			
	Estrato esponjoso	49	155	141	101	1	
	Muscular	2	1				
	Serosa						
5	Mucosa						
	Estrato compacto	20	10	22			
	Estrato esponjoso	113	113	33		2	4
	Muscular	35					19
	Serosa						
6	Mucosa	1					
	Estrato compacto	1	6		2		
	Estrato esponjoso	255	194	51	178	3	1
	Muscular		3				
	Serosa						
7	Mucosa						
	Estrato compacto	16		1			
	Estrato esponjoso	151		29			11
	Muscular						24
	Serosa	4				1	11

Cuadro 3. Conteo de células inflamatorias del grupo de vacas no gestantes seronegativas a *N. caninum*.

No.	útero	Linfocitos	Cél Plásmatica	Macrófagos	Mastocitos	Neutrófilos	Eosinófilos
1	Mucosa	190					
	Estrato compacto	1602	87	30	61	5	
	Estrato esponjoso	262	41	5	33	1	
	Muscular						
	Serosa						
2	Mucosa						
	Estrato compacto	31			12	52	
	Estrato esponjoso	112	2	1	64	35	1
	Muscular						
	Serosa						
3	Mucosa	193				2	
	Estrato compacto	260		32	1	3	
	Estrato esponjoso	117	10	1	6	9	2
	Muscular						
	Serosa						172
4	Mucosa	20					
	Estrato compacto	103				1	
	Estrato esponjoso	75				1	
	Muscular						
	Serosa						136
5	Mucosa	9					
	Estrato compacto	111		5	3	3	
	Estrato esponjoso	84	4	7	52		
	Muscular						
	Serosa						
6	Mucosa	4					
	Estrato compacto	180	36		11		3
	Estrato esponjoso	66	8		14	1	4
	Muscular						50
	Serosa						87
7	Mucosa						
	Estrato compacto						
	Estrato esponjoso	34		57	4	9	186
	Muscular						75
	Serosa						120

Cuadro 4. Conteo de células inflamatorias del grupo de vacas gestantes seropositivas y seronegativas a *N. caninum*.

No.	Ubicación	<i>N. caninum</i>	Linfocitos	Célula Plásmatica	Macrófagos	Neutrófilos	Eosinófilos
1	Septo Materno	1	188		109	1	
	Estroma Fetal	1	2				
2	Septo Materno	1	60			3	
	Estroma Fetal	1	13				
3	Septo Materno	1	45			16	
	Estroma Fetal	1					
4	Septo Materno	1	134		14	19	1
	Estroma Fetal	1	7				
5	Septo materno	1	154			1	1
	Estroma Fetal	1	4				4
6	Septo materno	1	113			23	
	Estroma Fetal	1					
7	Septo Materno	1	30	2	167	48	
	Estroma Fetal	1	8				
1	Septo Materno	2	20				
	Estroma Fetal	2	1				
2	Septo Materno	2	45	2	2	9	
	Estroma Fetal	2					
3	Septo Materno	2	5			6	
	Estroma Fetal	2					
4	Septo Materno	2	21			3	
	Estroma Fetal	2					
5	Septo Materno	2	5			4	
	Estroma Fetal	2	1				
6	Septo Materno	2	12				
	Estroma Fetal	2					
7	Septo Materno	2	6			6	
	Estroma Fetal	2					

N. caninum: 1, seropositivas; 2, seronegativas.

Análisis Estadístico del estudio histopatológico.

Una vez obtenidos los resultados del estudio histopatológico se utilizó la Prueba U de Mann-Whitney para comparar los grupos seropositivos contra los seronegativos a *N. caninum* de las vacas no gestantes y gestantes.

Los resultados entre los grupos no gestantes seropositivos y seronegativos a *N. caninum* no mostraron diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) entre las distintas poblaciones de células inflamatorias analizadas en este estudio.

Entre los grupos gestantes seropositivos y seronegativos a *N. caninum* el resultado del análisis estadístico para linfocitos ($P < 0.05$) mostró diferencia estadística significativa, siendo mayor ésta población celular para el grupo de animales seropositivos.

El resultado del resto de las poblaciones celulares no mostraron diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) entre los grupos gestantes seropositivos y seronegativos a *N. caninum*.

Inmunohistoquímica

Neospora caninum

En las vacas no gestantes seropositivas a *N. caninum* se localizaron taquizoítos (Figuras 9 y 10) y quistes en endometrio y miometrio (Cuadro 5). Siete quistes se apreciaron en 5 animales; tres en miometrio (Figura 11), tres en endometrio y uno en la luz uterina (Figura 12).

En el grupo de vacas gestantes seropositivas a *N. caninum*, en todos los animales se observaron taquizoítos y en tres animales se apreciaron quistes (Cuadro 6). Un total de cinco quistes se observaron en este grupo; uno en miometrio (Figura 13), uno en endometrio (estrato esponjoso), uno en septo materno, uno en vellosidades fetales (corion) y uno en la interfase materno-fetal (cripta) (Figura 14). Por las características morfológicas, de inmunotinción y localización de los quistes, otros protozoarios Apicomplexa como *Toxoplasma gondii* y *Sarcocystis sp.*, fueron descartados.

El diámetro de los quistes osciló entre 53.3 y 75 μm y el grosor de su pared midió entre 2.3 y 3.3 μm (Cuadro 7). En los grupos de vacas seronegativas a *N. caninum* no se encontraron parásitos.

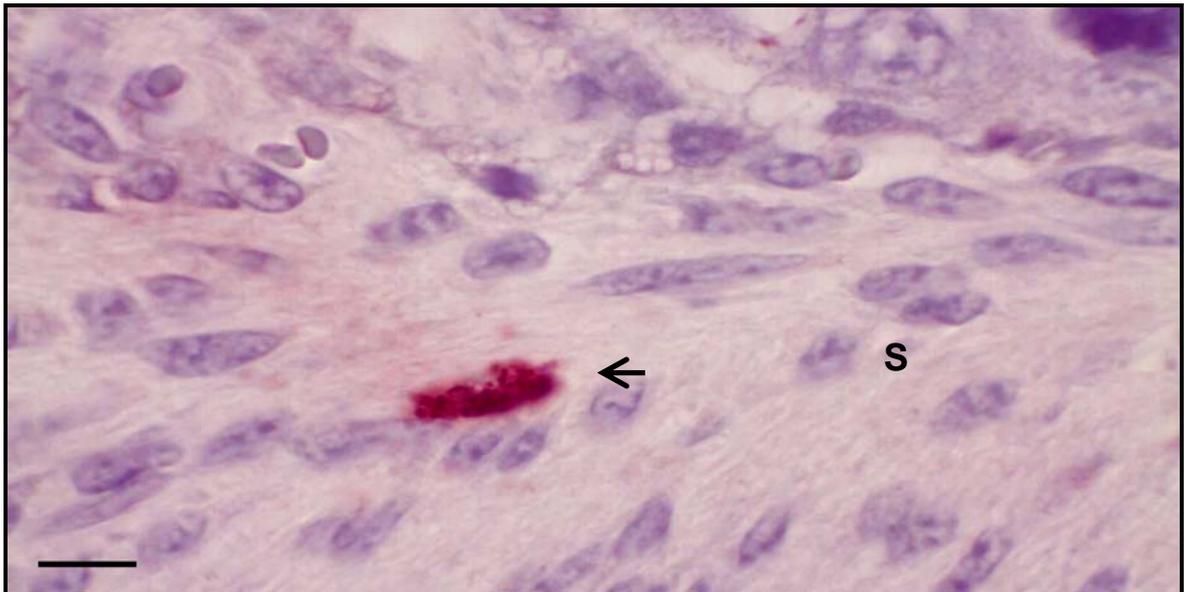


Figura 9. Caso 1. Grupo de taquizoítos (flecha) de *N. caninum* en septo materno (S) del grupo de vacas gestantes. 1000X CEB-P. Barra 20 μm .

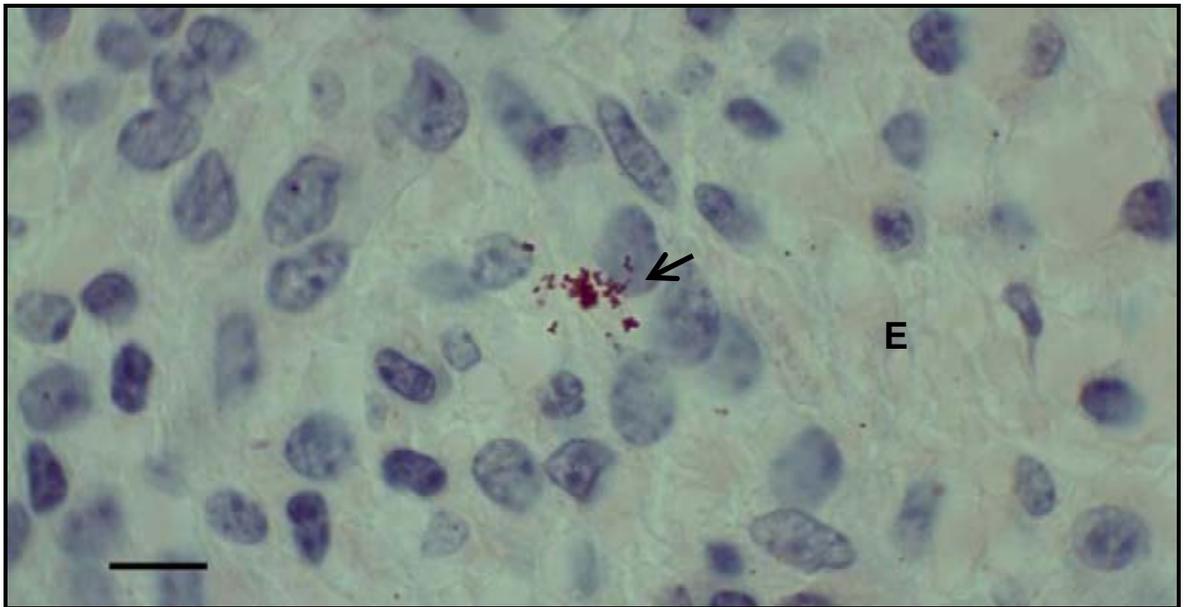


Figura 10. Caso 2. Grupo de taquizoítos (flecha) de *N. caninum* en estrato esponjoso (E) del grupo de vacas no gestantes. 1000X CEB-P. Barra 20 μ m.

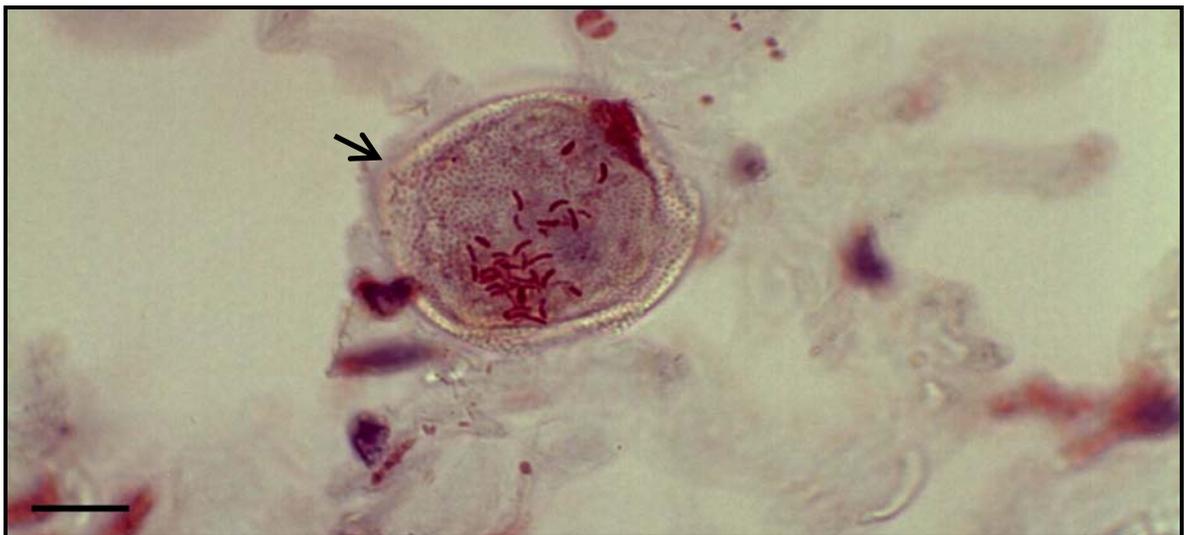


Figura 11. Caso 2. Quiste de *N. caninum* (flecha) en miometrio del grupo de vacas no gestantes. Nótese la presencia de bradizoítos en el interior. 1000X. CEB-P. Barra 20 μ m.

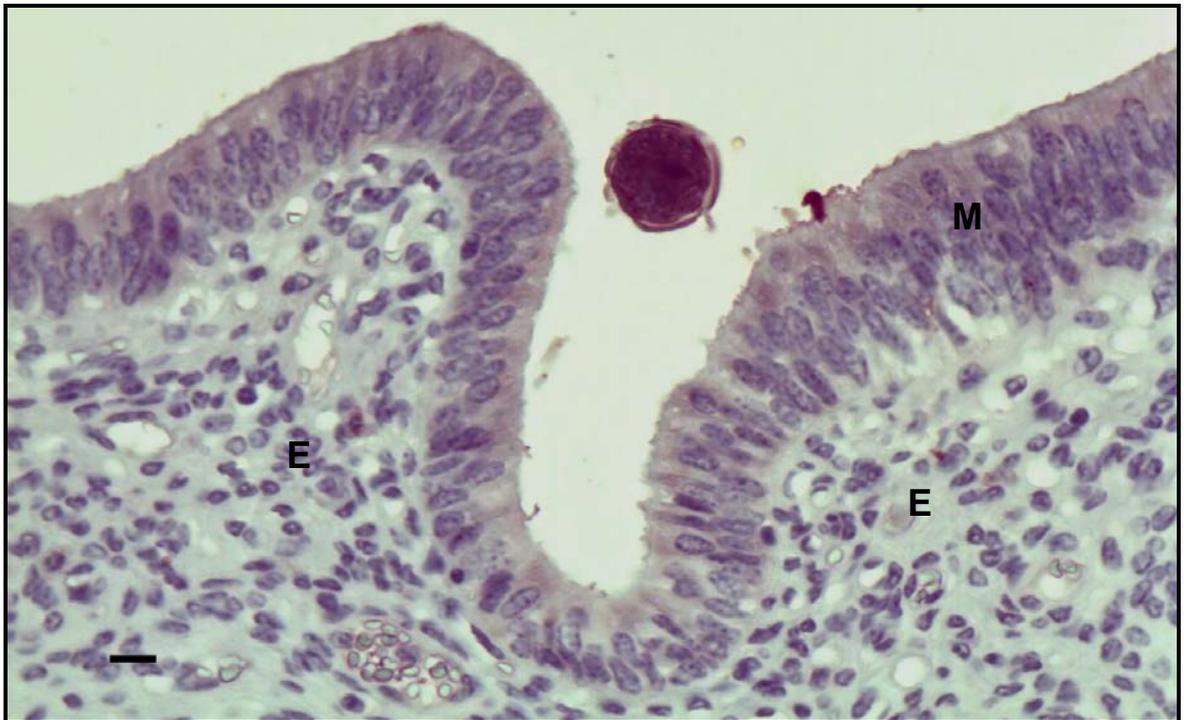


Figura 12. Caso 7. Quiste de *N. caninum* en la luz uterina del grupo de vacas no gestantes. 400X. CEB-P. Barra 20 μ m. E, estrato esponjoso; M, mucosa.

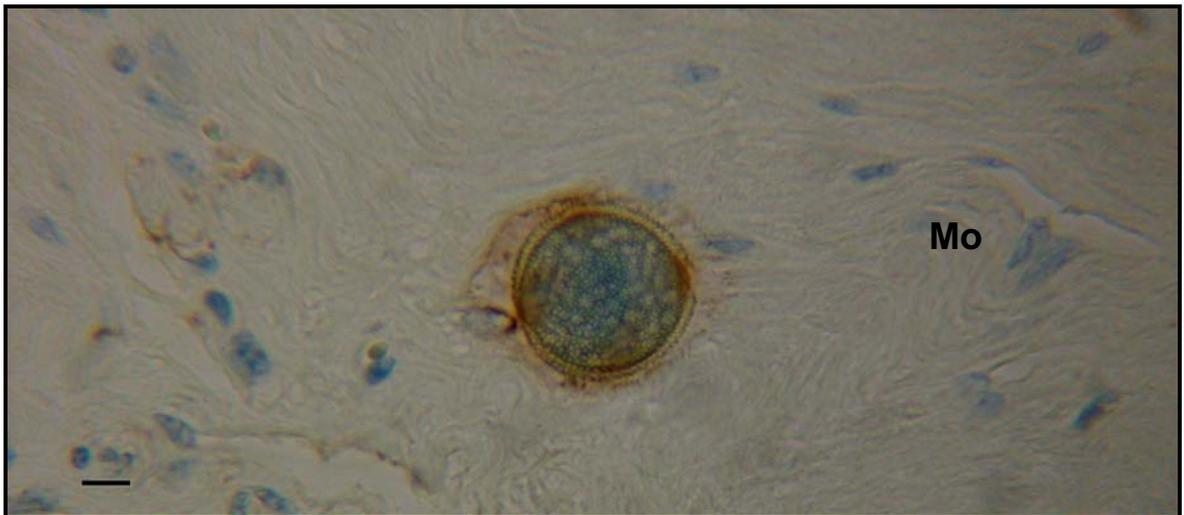


Figura 13. Caso 1. Quiste de *N. caninum* en miometrio del grupo de vacas gestantes. 400X. CEB-P. Barra 20 μ m. Mo, miometrio.

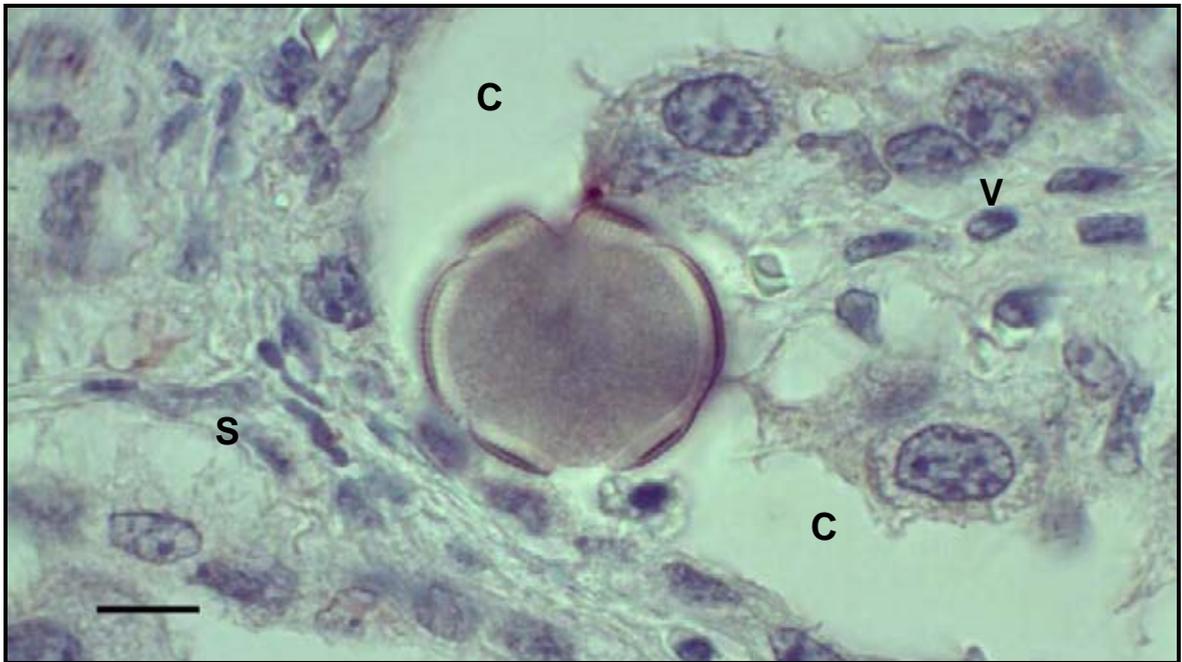


Figura 14. Caso 2. Quiste de *N. caninum* en interfase materno-fetal (cripta) del grupo de vacas gestantes. 1000X. CEB-P. Barra 20 μ m. S, septo materno; V, vellosidad fetal; C, cripta.

Análisis fenotípico de células del sistema inmune en úteros y placentas

Linfocitos T CD4⁺

La distribución de las células T CD4⁺ en úteros de vacas no gestantes positivas a *N. caninum* se observaron principalmente en endometrio (estrato compacto y estrato esponjoso), (Figura 15) y miometrio, encontrándose esparcidas y escasas, en cantidad moderada (Cuadro 5).

En las vacas gestantes positivas a *N. caninum*, la distribución de las células T CD4⁺ se observó únicamente en los placentomas de dos animales, en el septo materno esparcidas y eran escasas. En un animal se encontraron linfocitos escasos en la base del placentoma (estrato esponjoso), así como en el miometrio de otro animal (Cuadro 6).

En los grupos de vacas no gestantes y gestantes seronegativas a *N. caninum* se observó la misma distribución de linfocitos T CD4⁺ que en los grupos de vacas

seropositivas, principalmente en endometrio y miometrio y en placentomas respectivamente, encontrándose escasos linfocitos.

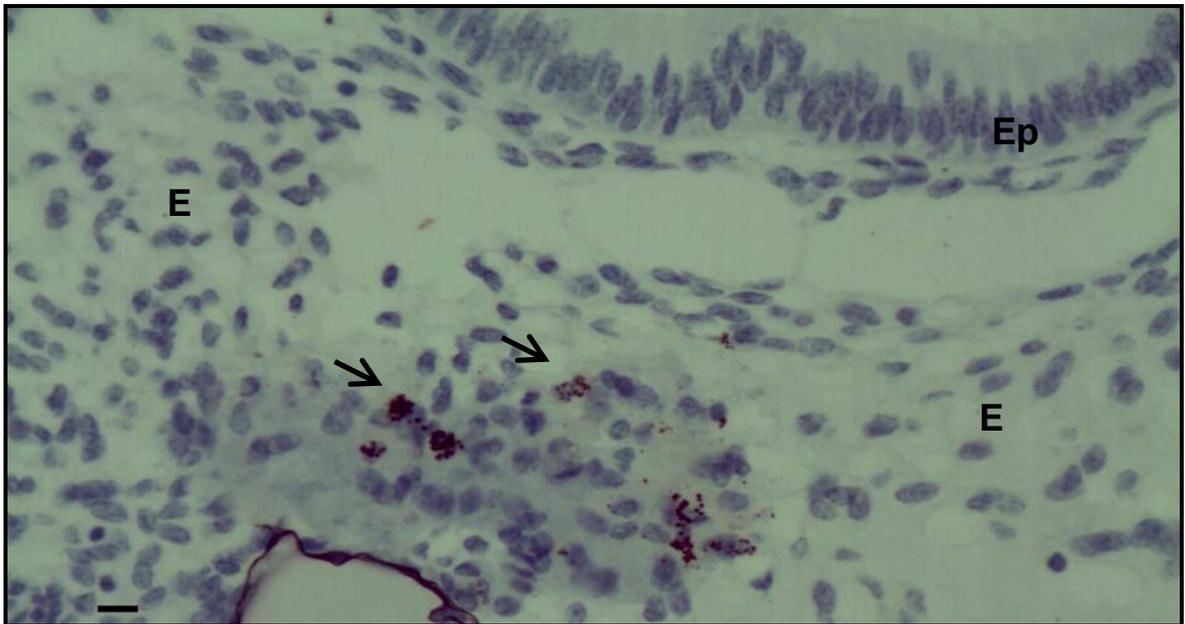


Figura 15. Caso 3. Linfocitos T CD4+ (flechas) en estrato esponjoso (E) del grupo de vacas no gestantes seropositivo a *N. caninum*. 400X CEB-P. Barra 20 μ m. Ep, epitelio glandular.

Linfocitos T CD8⁺

En el grupo de las vacas no gestantes seropositivas se apreciaron escasos linfocitos en endometrio (estrato esponjoso) (Figura 16) en tres animales y en un animal, se observaron también escasos linfocitos en endometrio (estrato compacto) y miometrio (Cuadro 5). En las placentas de tres animales se identificaron escasos linfocitos T CD8⁺ (Cuadro 6). Los linfocitos T CD8⁺ en los grupos seronegativos a *N. caninum* fueron escasos, igual que en los grupos seropositivos a *N. caninum*.

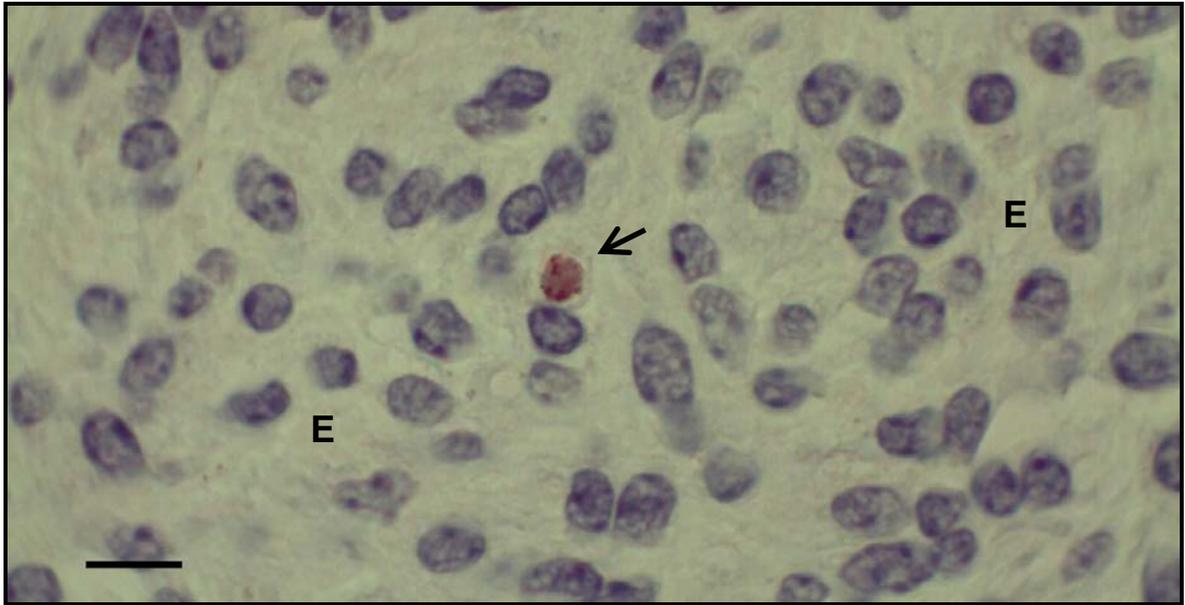


Figura 16. Caso 2. Linfocito T CD8+ (flecha) en estrato esponjoso (E) del grupo de vacas no gestantes seropositivos a *N. caninum*. 1000X. CEB-P. Barra 20 μ m.

Linfocitos B y Macrófagos

Para los cuatro grupos de animales, no se apreciaron células inflamatorias marcadas con anticuerpos anti-CD21 (linfocitos B), así como anti-CD14 (macrófagos) (Cuadros 5 y 6).

Cuadro 5. Análisis fenotípico de células del sistema inmune en úteros de vacas no gestantes seropositivas a *N. caninum*.

No	Ubicación	<i>N. caninum</i>	CD4+	CD8+	CD14	CD21
1	Estrato Compacto		±	-	-	-
	Estrato Esponjoso	T y Q	±	±	-	-
	Miometrio	T	-	-	-	-
2	Estrato Compacto		±	±	-	-
	Estrato Esponjoso	T	±	-	-	-
	Miometrio	T y Q	±	±	-	-
3	Estrato Compacto	T	-	-	-	-
	Estrato Esponjoso	T	+	-	-	-
	Miometrio	T	±	-	-	-
4	Estrato Compacto	T	±	-	-	-
	Estrato Esponjoso		±	-	-	-
	Miometrio		±	-	-	-
5	Estrato Compacto	T	-	-	-	-
	Estrato Esponjoso	T	+	±	-	-
	Miometrio	Q	±	-	-	-
6	Estrato Compacto	Q	-	-	-	-
	Estrato Esponjoso	Q	+	±	-	-
	Miometrio		±	-	-	-
7	Luz uterina	Q				
	Estrato Compacto	T	-	-	-	-
	Estrato Esponjoso	T	+	-	-	-
	Miometrio	Q	+	-	-	-

-, Sin células; ±, escasas (1-2); +, Moderada cantidad (3-5); T, taquizoítos; Q, quiste.

Cuadro 6. Análisis fenotípico de células del sistema inmune en placentas de vacas seropositivas a *N. caninum*.

No	Ubicación	<i>N. caninum</i>	CD4+	CD8+	CD14	CD21
1	Septo materno	T	±	±	-	-
	Vellosidad fetal	T	-	±	-	-
	Estrato esponjoso	Q	-	-	-	-
	Miometrio	Q	-	-	-	-
2	Septo materno	T	±	-	-	-
	Vellosidad fetal	T	-	-	-	-
	Cripta	Q	-	-	-	-
3	Septo materno	T	-	-	-	-
	Vellosidad fetal	T	-	±	-	-
	Miometrio		±	-	-	-
4	Septo materno	T	-	-	-	-
	Vellosidad fetal		-	-	-	-
5	Septo materno	T	-	-	-	-
	Vellosidad fetal		-	-	-	-
6	Septo materno	T	-	-	-	-
	Vellosidad fetal		-	-	-	-
	Estrato esponjoso		±	-	-	-
7	Septo materno	T y Q	-	±	-	-
	Vellosidad fetal	T y Q	-	-	-	-

-, Sin células; ±, escasas (1-2); +, Moderada cantidad (3-5); T, taquizoítos; Q, quiste.

Cuadro 7. Medidas del diámetro y grosor de la pared de los quistes de *N. caninum* encontrados en úteros y placentas.

No.	Grupo	Ubicación	Diámetro (µm)	Pared (µm)
1	NG	Endometrio (estrato esponjoso)	66.9	3.0
2	NG	Miometrio	70.3	2.9
5	NG	Miometrio	61.9	3.0
6	NG	Endometrio (estrato compacto)	53.3	3.0
	NG	Endometrio (estrato esponjoso)	55.8	3.1
7	NG	Luz uterina	61.7	3.0
	NG	Miometrio	63.0	3.1
1	G	Miometrio	59.8	3.3
	G	Endometrio (estrato esponjoso)	62.7	3.9
2	G	Interfase materno-fetal (Cripta)	64.2	2.9
7	G	Vellosidades fetales (Corion)	61.1	2.3
	G	Septo materno	75.0	2.6

NG, No Gestante; G, Gestante; µm, Micrómetro.

DISCUSIÓN

La descripción histomorfológica de úteros de vacas sanas es escasa (Cobb y Watson, 1995). Con respecto a neosporosis, su enfoque ha sido principalmente en vacas gestantes experimentalmente infectadas. El resultado del análisis histopatológico del presente estudio indica que no hubo diferencia en los animales no gestantes entre los grupos seropositivos y seronegativos a neosporosis en las diferentes poblaciones de células inflamatorias ($P > 0.05$). La distribución y la cantidad de células inflamatorias encontradas no fueron consistentes con un proceso inflamatorio de acuerdo con lo descrito por McEntee (1990) y Cobb y Watson (1995), quienes mencionan que los linfocitos en úteros normales se observan en mayor cantidad en la zona subepitelial del endometrio y se distribuyen uniformemente. Estos no son influenciados por la variación del ciclo estral (McEntee, 1990). Debido a que la neosporosis es una enfermedad que se manifiesta durante la gestación (Dubey *et al.*, 2006; Innes *et al.*, 2005; Innes, 2007), posiblemente las poblaciones celulares del sistema inmune que se encuentran normalmente en útero no gestante, sean las encargadas de evitar que microorganismos como *N. caninum* se multipliquen (Cobb y Watson, 1995), obligando al parásito a que permanezca en el interior de las células (Buxton *et al.*, 2002), esperando las condiciones apropiadas de la gestación como fluctuaciones hormonales (aumento en los niveles de progesterona) e inmunosupresión, para seguir invadiendo más células.

El resultado del análisis histopatológico del presente estudio indica que existe diferencia entre los grupos gestantes seropositivos y seronegativos a neosporosis para linfocitos ($P < 0.05$), siendo mayor la cantidad de este tipo celular para el grupo seropositivo. Sin embargo, las células inflamatorias encontradas en estos dos grupos, tampoco son consistentes con un proceso inflamatorio. Esto concuerda con lo encontrado por Bergeron y colaboradores (2001), quienes no observaron cambios significativos en 11 placentas de vacas seropositivas a *N. caninum* de partos eutócicos, las cuales presentaban un leve infiltrado linfocitario. Sin embargo, es probable que la mayor cantidad de linfocitos que se encontraron

en las placentas de las vacas seropositivas del presente estudio se asocia a la presencia de *N. caninum*. También en los placentomas de dos vacas del grupo seropositivo se apreciaron focos de necrosis, lo cual concuerda con Shivaprasad y colaboradores (1989), quienes encontraron estructuras consistentes con taquizoítos en el interior de trofoblastos y necrosis en las vellosidades fetales, pero no apreciaron infiltrado inflamatorio. De igual forma en estudios donde experimentalmente se inocularon taquizoítos en vacas con gestación temprana (70 días), así como en gestación media (140 días), se encontraron focos de necrosis en placentomas a los 14 días post-inoculación (Maley *et al.*, 2003; Macaldowie *et al.*, 2004; Maley *et al.*, 2006). Esto sugiere que los linfocitos y la necrosis en las placentas de las vacas que se infectan naturalmente por *N. caninum* no están relacionados necesariamente al aborto. Esto puede deberse a que las vacas estuvieron expuestas al parásito antes de la gestación.

Los resultados obtenidos con la técnica de Inmunohistoquímica de las vacas seropositivas no gestantes y gestantes en este estudio mostraron la presencia de taquizoítos de *N. caninum* en tejido uterino de todos los animales (100%) y la presencia de quistes en 8 vacas (57%); cinco no gestantes y tres gestantes. En este estudio se localizaron quistes en vacas adultas no gestantes en endometrio, miometrio y en la luz uterina, y en endometrio, septo materno, vellosidades fetales y en la cripta de un placentoma en las vacas gestantes. Alrededor de los quistes no se observó reacción inflamatoria. Siendo un hecho relevante, ya que los quistes no habían sido encontrados con técnicas convencionales de inmunohistoquímica en el útero. Se puede deducir que la adecuación de la técnica de inmunohistoquímica utilizada en el presente estudio, en la que se utilizó como recuperador antigénico la solución amortiguadora de boratos y tripsina fue fundamental para detectar antígenos, que por alguna razón no se habían identificado en útero. Al respecto se sugiere que las condiciones del medio ambiente uterino proporcionan un enmascaramiento antigénico diferente a las que se presentan en el sistema nervioso central, ya que en este tejido se han podido detectar quistes con relativa facilidad con cualquier método de

inmunohistoquímica. Por otro lado, es probable que en estudios en donde se han inoculado taquizoítos experimentalmente, el tiempo no haya sido suficiente para que se formen quistes, por lo cual en el momento en que se sacrifican las vacas éstos no se hayan observado en úteros y placentas. Cabe mencionar que en un estudio realizado por Peters y colaboradores (2001) en bovinos, lograron identificar quistes de *N. caninum* en músculo esquelético por inmunohistoquímica y ultraestructuralmente, en dos becerros de dos días de edad.

Los resultados de la técnica de inmunohistoquímica para los marcadores de las células inflamatorias en úteros no gestantes, mostraron escasas células T CD4+ y distribuidas al azar en endometrio y miometrio. Las células T CD8+ se observaron en menor cantidad que las células T CD4+, localizándose en endometrio (estrato esponjoso). Los linfocitos B y Macrófagos no fueron inmunopositivos en este estudio, lo cual concuerda con lo obtenido por Cobb y Watson (1995), quienes recolectaron 34 úteros de vaquillas en el rastro, marcando las células inflamatorias con anticuerpos contra CD5, CD4, CD8, MHC II, macrófagos (CD14) y células B, con el fin de obtener información de su distribución en endometrio en las fases del ciclo estral. En este estudio se observaron linfocitos T CD4+ en el estrato esponjoso principalmente, linfocitos T CD8+ en estrato esponjoso (glandular) y estrato compacto, los macrófagos se distribuyeron en el estrato esponjoso y compacto sin variación durante el ciclo, y los linfocitos B no mostraron inmunopositividad. En el presente estudio, no fue posible identificar macrófagos por inmunohistoquímica, sin embargo, la distribución de los macrófagos observados por histología concuerda con lo encontrado por Cobb y Watson (1995), además de que también observaron mayor cantidad de linfocitos T CD4+ que T CD8+ en endometrio. En contraste, los resultados del presente estudio difieren con lo obtenido por Leung y colaboradores (2000), quienes utilizaron anticuerpos contra CD4+, CD14 y CD21 para identificar la distribución de estas células en úteros de tres grupos de vacas a los 16 días después del estro: no gestantes, gestantes y vacas inseminadas pero sin embrión. No se encontraron diferencias en la distribución de las células en los tres grupos; pero si se observó

inmunopositividad contra CD14 en endometrio y miometrio, y contra CD21 en endometrio (estrato compacto y esponjoso), difiriendo del presente estudio, ya que no se logró identificar estas células en los úteros de los grupos evaluados. Debido a la escasa información del uso de anticuerpos para marcar células de la respuesta inmune en úteros de vacas tanto sanas como seropositivas a *N. caninum*, y a lo encontrado en el presente estudio, se infiere que en úteros de vacas naturalmente infectadas por el parásito no se desencadena una reacción inflamatoria consistente.

En los grupos de vacas gestantes el resultado de la técnica de Inmunohistoquímica para las células inflamatorias, presentó un menor número de linfocitos inmunomarcados en placentomas, las células T CD4+ y T CD8+ fueron escasas y no se apreciaron en todos los animales del estudio. Para linfocitos B y macrófagos los resultados fueron similares a los grupos no gestantes, ya que no presentaron inmunoreacción. La distribución celular entre grupos seropositivos y seronegativos fue similar. Estos hallazgos fueron similares a los obtenidos por Maley y colaboradores (2006), quienes inmunomarcaron células para caracterizar la respuesta celular provocada por la inoculación de taquizoítos de *N. caninum* por dos vías en placentas en gestación temprana (70 días). En este estudio se utilizaron anticuerpos contra CD3, CD4, CD8, T $\gamma\delta$, CD79 α (linfocitos B), CD335 (NK) e IFN- γ . El infiltrado inflamatorio estuvo constituido principalmente por células CD3 (todas las poblaciones de linfocitos T), de las cuales predominaban T CD4+ y T $\gamma\delta$, en menor cantidad T CD8+. Las células NK fueron observadas en la base de las carúnculas y las células B fueron escasas en el infiltrado inflamatorio. Lo anterior hace suponer que tal vez la mayor cantidad de linfocitos observados por H&E en las vacas seropositivas gestantes haya estado compuesto por linfocitos NK o por linfocitos T $\gamma\delta$ los cuales no fueron analizados en el presente estudio. Con respecto a estas células, en la actualidad no se sabe cual es su función en la respuesta inmune en vacas gestantes y no gestantes, sin embargo, en un estudio realizado por Boysen y colaboradores (2006), demostraron que en cultivos de fibroblastos infectados por *N. caninum* fueron capaces de producir INF- γ para

destruir a las células infectadas. En un estudio similar realizado por Klevar y colaboradores (2007), demostraron que los linfocitos NK fueron capaces de producir altos niveles de IFN- γ en becerros expuestos a *N. caninum*. Los linfocitos T $\gamma\delta$ representan en primates y roedores el 5% de los linfocitos sanguíneos y se encuentra en las superficies de las mucosas principalmente, en contraste en rumiantes jóvenes representan hasta el 50% del total de los linfocitos T en sangre periférica y órganos linfoides (Maley *et al.*, 2006).

Probablemente *N. caninum* se protege del sistema inmune enquistándose, cuando la vaca no se encuentra gestante, esperando el momento donde los niveles de progesterona en el tercio medio y tardío de la gestación son mayores, los cuales suprimen la respuesta inmune Th1 en el útero (Hansen, 1997; Lewis, 2003; Innes *et al.*, 2005), y así desencadena una respuesta inmune Th2 (Innes *et al.*, 2005), permitiendo que los bradizoítos puedan salir de su fase de enquistamiento. Otra forma probable de evasión de la respuesta inmune por parte del parásito puede ser que salga a la luz uterina momentáneamente (Abbas and Lichtman, 2004), lo cual podría explicar la presencia de un quiste observado en la luz uterina de una vaca gestante en el presente estudio (Figura 12).

De acuerdo con Hansen (1997), durante la gestación temprana y tardía el número de linfocitos y macrófagos se reduce para evitar el daño y la expulsión del feto por parte del sistema inmune, a partir de la gestación media (segundo tercio). Estas células se encuentran principalmente en el endometrio intercaruncular (Leung *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2008), sugiriendo que al igual que sucede en vacas no gestantes los linfocitos se encuentran en espera de una probable infección (Cobb y Watson, 1995), como lo observado en los placentomas de este estudio. Tal vez los linfocitos presentes están para prevenir que taquizoítos y quistes de *N. caninum* crucen la interfase materno-fetal, y así evitar que se dé la transmisión transplacentaria endógena.

Aprovechando la fase de quiste, *N. caninum* durante la gestación podría alcanzar las membranas fetales atravesando la interfase materno fetal (Figura 14), como lo observado en dos casos de animales gestantes positivos del presente estudio. Probablemente el quiste de *N. caninum* aprovecha que el sistema inmune del feto se encuentra inmaduro y al no ser eficientemente atacado, libere bradizoítos que por vía hematogena llegan a los diferentes órganos blanco.

La inflamación observada en placentas, de vacas infectadas experimentalmente con *N. caninum* (Macaldowie *et al.*, 2004; Maley *et al.*, 2006), en donde se utilizaron animales que no habían estado expuestos al parásito antes de la gestación, hizo suponer que por ser una primo-infección fueran capaces de inducir una inmunidad protectora (Lundén *et al.*, 1998; Innes *et al.*, 2002; Innes *et al.*, 2005). Es viable pensar que *N. caninum* posee mecanismos de evasión del sistema inmune como lo hace *T. gondii* (Lang *et al.*, 2007), por lo tanto, es probable que el huésped genere una respuesta inmune incompleta en contra del parásito. Lo cual puede explicar que en gestaciones posteriores una vaca tenga menor riesgo de abortar (Innes *et al.*, 2002), ya que la inflamación es limitada y no habría daño a las membranas fetales por parte del sistema inmune de la madre (Innes *et al.*, 2002; Innes *et al.*, 2005; Dubey *et al.*, 2006; Innes, 2007), al intentar detener la infección por *N. caninum*.

Por otro lado, se sabe que a mayor número de gestaciones se favorece el desarrollo de una respuesta inmune humoral, por lo que se ha postulado que la presencia de anticuerpos específicos contra taquizoítos de *N. caninum*, probablemente limita la parasitemia por su neutralización, o facilita la lisis de los taquizoítos extracelulares contribuyendo a disminuir el riesgo de aborto (Hemphill, 1999; Moore *et al.*, 2005b).

La presencia de quistes de *N. caninum* en miometrio y endometrio de vacas no gestantes, así como en la interfase materno-fetal y en las vellosidades fetales de vacas gestantes infectadas naturalmente, hace suponer que esta fase parasitaria se encuentra esperando las condiciones propicias del medio ambiente uterino para

producir una transmisión transplacentaria endógena, la cual probablemente se lleva a cabo mediante mecanismos de evasión del parásito en contra de la respuesta inmune del huésped, por lo que no se induce una respuesta inflamatoria o esta es parcial en contra de *N. caninum*.

Con el fin de obtener más información acerca de la patogenia y un mayor conocimiento de la respuesta inmune en úteros y placentas de vacas infectadas naturalmente por *N. caninum*, se propone que en estudios futuros se utilicen anticuerpos marcadores de linfocitos NK y linfocitos T $\gamma\delta$, empleando la técnica de inmunohistoquímica modificada con solución amortiguadora de boratos y tripsina para poder detectar la probable presencia de quistes en otros tejidos.

LITERAURA CITADA

- Abbas, A.K. and Lichtman, A.H., 2004. Inmunología celular y molecular. Edición en español Elsevier España, S.A. Infanta Mercedes, 90, 7.^a pl 28020 Madrid, España.
- Andrianarivo, A.G., Anderson, M.L., Rowe, J.D., Gardner, I.A., Reynolds, J.P., Choromanski, L., and Conrad, P.A. 2005. Immune responses during pregnancy in heifers naturally infected with *Neospora caninum* with and without immunization. Parasitol Res 96:24-31.
- Bajani, M.D., Ashford, A.D., Bragg, L.S., Woods, W.Ch., Aye, T., Spiegel, A.R., Plikaytis, D.B., Perkins, A.B., Phelan, M., Levett, N.P., and Weyant, S.R. 2003. Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of Leptospirosis. J Clin Microbiol. 41: 803-809.
- Bartley, P.M., Kirvar, E., Wright, S., Swales, C., Esteban-Redondo I., Buxton, D., Maley, S.W., Schock, A., Rae A.G., Hamilton, C. and Innes, E.A., 2004. Maternal and Fetal Immune Responses of Cattle Inoculated with *Neospora caninum* at Mid-Gestation. J. Comp. Path.130: 81-91.
- Bergeron, N., Girard, C., Paré, J., Fecteau, G., Robinson, J. and Baillargeon, P., 2001. Rare detection of *Neospora caninum* in placentas from seropositive dams giving birth to full-term calves. J. Vet Diagn Invest 13: 173-175
- Boysen, P., Klevar, S., Olsen, I and Storset, A.K. 2006. The Protozoan *Neospora caninum* Directly Triggers Bovine NK Cells to Produce Gamma Interferon and to Kill Infected Fibroblasts. Infect Immun 74: 953-960.
- Buxton, D., McAllister, M. and Dubey J.P., 2002. The comparative pathogenesis of neosporosis. Trends Parasitol 18: 546-552.
- Cobb, S.P. and Watson, E.D., 1995. Immunohistochemical study of immune cells in the bovine endometrium at different stages of the oestrus cycle. Res Vet Sci 59: 238-41.

- Dajer, A., Luna-Martínez, E., Zapata, D., Villegas, S., Gutiérrez Peña G., Gurria, F., Nielsen, K., Gal, I.D., 1999. Evaluation of a fluorescence-polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis in Mexico. *Prev Vet Med.* 40: 67-73.
- Dubey, J.P., and Lindsay, D.S., 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet. Parasitol.* 67, 1–59.
- Dubey, J.P., Bjerås, I., Björkman, C., Blagburn, B.L., Bowman, D.D., Buxton, D., Ellis, J.T., Gottstein, B., Hemphill, A., Hill, D. E., Howe, D. K., Jenkins, M. C., Kobayashi, Y., Koudela, B., Marsh, A. E., Mattsson, J. G., McAllister, M. M., Modrý, D., Omata, Y., Sibley, L. D., Speer, C. A., Trees, A. J., Ugglá, A., Upton, S. J., Williams, D. J. L. and Lindsay, D. S. 2002. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *Int J Parasitol*, 32: 929-946.
- Dubey, J.P., 2003. Neosporosis in cattle. *J Parasitol*, 89 (Suppl.), S42-S46.
- Dubey, J.P., Buxton, D. and Wouda, W., 2006. Pathogenesis of Bovine Neosporosis. *J. Comp. Path.* 134: 267-289.
- Faine, S. 1994. *Leptospira* and leptospirosis. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Hall, C.A., Reichel, M.P., and Ellis, J.T., 2005. Neospora abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. *Vet. Parasitol.* 128: 231-241.
- Hansen, P.J., 1997. Interactions between the immune system and the bovine conceptus. *Theriogenology* 47:121-130
- Hemphill, A., 1999. The host-parasite relationship in neosporosis. *Adv. Parasitol.* 43:47-104
- INEGI, 2005. Cuaderno Estadístico Municipal de Mazatlán, Sinaloa. Edición 2005.
- Innes, E.A., Adrianarivo A.G., Björkman C., Williams D.J.L., and Conrad P.A., 2002. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends Parasitol* 18: 497-504.
- Innes, E.A., Wright, S., Bartley, P., Maley, S., Macaldowie, C., Esteban-Redondo, I. and Buxton, D., 2005. The host-parasite relationship in bovine neosporosis. *Vet Immunol Immunopathol* 108: 29-36.

- Innes, E.A., 2007. The host-parasite relationship in pregnant cattle infected with *Neospora caninum*. *Parasitology* 134: 1903-1910
- Klevar, S., Kulber, S., Boysen, P., Storset, A.K., Moldal, T., Björkman, C., and Olsen, I., 2007. Natural killer cells act as early responders in an experimental infection with *Neospora caninum* in calves. *Int J Parasitol* 37: 329-339
- Leal, H.M., Martínez, M.L., Prueba de Rivanol. En: Díaz, E., Hernández, L., Valero, G., Arellano, B., eds. 2001. Diagnóstico de Brucelosis Animal. SAGARPA, INIFAP, IICA, OPS, México, 82-84.
- Leung, S.T., Derecka, K., Mann, G.E., Flint, A.P.F. and Wathes, D.C., 2000. Uterine lymphocyte distribution and interleukin expression during early pregnancy in cows. *J. Reprod. Fertil.* 119: 25-33
- Levett, P.N., 2001. Leptospirosis *Clin Microbiol Rev* 14: 296-326.
- Lewis, G.S., 2003. Steroidal regulation of uterine immune defenses. *Anim. Reprod. Sci* 82-83: 281-294
- Lundén, A., Marks, J., Maley S.W. and Innes, E.A., 1998. Cellular immune responses in cattle experimentally infected with *Neospora caninum*. *Parasite Immunol* 20: 519–526
- Macaldowie, C., Maley, S.W., Wright, S., Bartley, P., Esteban-Redondo, I., Buxton, D., Innes, E.A., 2004. Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. *J Comp Pathol* 131: 142–156
- Maley, S.W., Buxton, D., Rae, A.G., Wright, S.E., Shock, A., Bartley, P.M., Esteban-Redondo, I. Swales, C., Hamilton, C.M., Sales, J. And Innes E.A. 2003. The Pathogenesis of Neosporosis in Pregnant Cattle: Inoculation at Mid-gestation. *J Comp Pathol* 129: 186-195.
- Maley, S.W., Buxton, D., Macaldowie, C.N., Anderson, I.E., Wright, S.E., Bartley, P.M., Esteban-Redondo, I., Hamilton, C.M., Storset, A.K. and Innes, E.A., 2006. Characterization of the Immune Response in the Placenta of Cattle

- Experimentally Infected with *Neospora caninum* in early gestation. J Comp Pathol 135: 130-141.
- McAllister, M.M., Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Jolley, W.R., Wills, R.A., and McGuire A.M. 1998. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. Int J Parasitol 28: 1473-1478.
- McEntee, K., 1990. Reproductive Pathology of Domestic Mammals. Academic Press, Inc. San Diego, California 92101
- Moore, D.P., Leunda, M.R., Zamorano, P.I., Odeón, A.C., Romera, S.A., Cano, A., de Yaniz, G., Venturini, M.C. and Campero, C.M. 2005a. Immune response to *Neospora caninum* in naturally infected heifers and heifers vaccinated with inactivated antigen during the second trimestre of gestation. Vet Parasitol 130: 29-39.
- Moore, D.P., Odeón, A.C., Venturini, M.C y Campero, C.M. 2005b. Neosporosis bovina: conceptos generales, inmunidad y perspectivas para la vacunación. Revista Argentina de Microbiología 37:217-228.
- Morales, E., Trigo, F.J., Ibarra, F., Puente, E. and Santacruz, M., 2001. Neosporosis in Mexican Dairy Herds: Lesions and Immunohistochemical Detection of *Neospora caninum* in Fetuses. J Comp Pathol 125: 58-63.
- Naessens, J., Howard, C.J., Hopkins, J., 1997. Nomenclature and characterization of leukocyte differentiation antigens in ruminants. Immunol Today. 18: 365-368
- Peters, M., Lütkefels, E., Heckerth, A.R. and Shares, G., 2001. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. Int J Parasitol 31: 1144-1148.
- Ramos-Vara, J.A., and Beissenherz, M.E., 2000. Optimization of immunohistochemical methods using two different antigen retrieval methods on formalin-fixed paraffin-embedded tissues: Experience with 63 markers. J Vet Diagn Invest 12:307-311.

- Reinhardt, G., Carrasco, L., Tadich, N., Riedemann, S., 2001. Comparación entre dos técnicas de diagnóstico para diarrea viral bovina (DVB) en 50 predios de la X región, Chile. Seroneutralización y enzimoimmunoensayo indirecto (ELISA-I). Arch Med Vet 33: 173-183.
- Shivaprasad, H.L., Ely, R. and Dubey, J.P., 1989. A *Neospora*-like Protozoon Found in an Aborted Bovine Placenta. Vet Parasitol 34:145-148
- Singh, J., Murray, R.D., Mshelia, G. and Woldehiwet, Z., 2008. The immune status of the bovine uterus during the peripartum period. Vet J 175: 301-309
- Sopp, P., Kwong, L.S., Howard, C.J., 1996. Identification of bovine CD14. Vet Immunol Immunopathol 52: 323-8
- Staska, L.M., McGuire, T.C., Davies, C.J., Lewin, H.A. and Basler, T.V., 2003. *Neospora caninum*-infected cattle develop parasite-specific CD4+ cytotoxic T lymphocytes. Infect Immun 71: 3272-3279