

INFECCIÓN EXPERIMENTAL POR *Toxoplasma gondii* EN EL PRIMER, SEGUNDO Y ÚLTIMO TERCIO DE GESTACIÓN EN OVEJAS. RESPUESTA LESIONAL Y DISTRIBUCIÓN DEL PARÁSITO

CASTAÑO, P.¹; FUERTES, M.¹; REGIDOR-CERRILLO, J.²;
GONZÁLEZ-LANZA, C.¹; MORENO-GONZALO, J.²; FERRE, I.²;
FERNÁNDEZ, M.¹; FERRERAS, M.C.¹; KATZER, F.³;
ORTEGA-MORA, L.M.²; PÉREZ, V.¹ y BENAVIDES, J.¹

¹Dpto. de Sanidad Animal, Instituto de Ganadería de Montaña. Fac. de Veterinaria. (CSIC-Universidad de León). 24346 Grulleros, León.

²SALUVET, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Univ. Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria s/n 28040-Madrid.

³Moredun Research Institute, Pentlands Science Park, Bush Loan, Edimburgo, EH26 0PZ, Reino Unido.

RESUMEN

Aunque existe una clara relación entre el estado de gestación y el riesgo de muerte fetal en la toxoplasmosis ovina, los mecanismos implicados en este proceso aún se desconocen. Con el fin de investigar los mismos, se infectaron 36 ovejas gestantes (12 animales por grupo), provenientes del mismo rebaño y lote, en los días 40 (G1), 90 (G2) y 120 (G3) de gestación mediante inoculación oral de ooquites esporulados del aislado M4 de *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). En cada grupo, se sacrificaron 4 animales en la segunda, tercera y cuarta semana post infección (pi). No se observaron diferencias significativas entre los grupos en la evolución de la temperatura rectal o la respuesta serológica. En el G1, el ADN del parásito y las lesiones histológicas fueron identificadas tanto en los placentomas como en las vísceras fetales únicamente en la semana 4 pi. En el grupo 2, el ADN del parásito se encontró en las mismas localizaciones desde la semana 3 pi, identificándose en un número mayor de muestras en la semana 4 pi, momento en el que también se observaron lesiones histológicas, siendo éstas las de mayor gravedad en todo el experimento. En el G3, tanto el ADN parasitario como las lesiones se encontraron en ambas localizaciones desde la semana 3 pi.

En esta semana, tres animales de este grupo abortaron, siendo la carga parasitaria identificada en las vísceras fetales menor que en los otros dos grupos. Estos resultados sugieren que el momento de gestación en el que se produce la infección influye en la propagación del parásito en los tejidos fetal y materno y en el consecuente desarrollo de lesiones histológicas, determinando de este modo las consecuencias clínicas de la toxoplasmosis ovina.

Palabras clave: Aborto. *Toxoplasma gondii*. Respuesta inmune. Curso clínico. Lesiones.

INTRODUCCIÓN

La toxoplasmosis ovina es una importante enfermedad parasitaria asociada a fallo reproductivo en el ganado ovino, donde ocasiona importantes pérdidas económicas, al causar infertilidad, abortos y muerte perinatal. Se trata además de una importante zoonosis, motivo de preocupación en el ámbito de la Salud Pública. La enfermedad está causada por el protozoo *Toxoplasma gondii* y las consecuencias de la infección dependerán del momento de gestación en el que ésta se produzca. La transmisión al feto, y el mayor riesgo de que se produzca aborto, ocurre cuando las ovejas gestantes se infectan por primera vez (primoinfección), y se ha comprobado que, tras sucesivas infecciones, no existe riesgo de aborto en las madres gestantes. Dependiendo del momento de gestación en el que se produzca, la primoinfección podrá ocasionar la muerte fetal y el aborto (primera mitad de gestación), o bien la transmisión del parásito al feto y el nacimiento de corderos infectados (segunda mitad de gestación). A pesar de la importancia de esta enfermedad y las graves consecuencias que ocasiona, tanto en ovinos como en humanos, aún se desconocen gran parte de los mecanismos que regulan la infección transplacentaria y causan el aborto (Dubey, 2008). La mayoría de los estudios realizados hasta el momento se basan en infecciones experimentales de animales de laboratorio, principalmente ratón, y asumen que durante la gestación existe una modulación de la respuesta inmune materna. Sin embargo, debido a diversas diferencias interespecíficas en la gestación y en la respuesta inmune, estos resultados no siempre pueden extrapolarse a otras especies, como la ovina o la humana, donde existen muy pocos trabajos que aborden este aspecto de la enfermedad (Tait y Hunter, 2009). La finalidad de este trabajo es analizar la dinámica de la infección (distribución y multiplicación del parásito en los tejidos), la evolución de la respuesta lesional en ovejas cuando se produce la primoinfección por *Toxoplasma gondii* y la influencia del estado de gestación en esta respuesta.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 36 ovejas de raza Churra de 20 meses de edad nacidas dentro del mismo lote. Las ovejas fueron sincronizadas y cubiertas mediante monta natural. Los animales se distribuyeron al azar en tres grupos experimentales (G1, G2 y G3), cada uno de los cuales estaba compuesto por 12 ovejas: 9 infectadas y 3 testigos. En los días 40 (G1), 90 (G2) y 120 (G3) de gestación, los 9 animales de cada grupo fueron inoculados por vía oral con 50 ooquistes esporulados del aislado M4 de *T. gondii*. Los animales controles fueron sometidos a las mismas condiciones experimentales, inoculándoles únicamente PBS por vía oral y actuaron como grupo testigo. Se registró la temperatura rectal de los animales hasta el día 14 post infección (pi) y se realizó el sacrificio secuencial de 3 animales infectados y 1 control los días 12, 21 y 26 pi. Se tomaron muestras de sangre dos veces por semana hasta el momento del sacrificio con el fin de estudiar la presencia de anticuerpos frente a *T. gondii*.

Tras realizar la necropsia completa y sistemática de todos los animales, se tomaron diversas muestras de la placenta, órganos maternos (encéfalo y nódulos linfáticos uterino y mesentérico) y fetales (encéfalo, hígado, pulmón, corazón y músculo esquelético) que fueron fijadas en formol tamponado y procesadas para su examen histológico e inmunohistoquímico (detección del parásito). A su vez, fragmentos de los mismos placentomas y encéfalo, hígado y pulmón fetales fueron congelados y procesados para la cuantificación del parásito mediante amplificación de ácidos nucleicos (PCR cuantitativa).

Los datos de temperatura rectal y anticuerpos séricos fueron sometidos a un análisis de varianza y comparación de medias, utilizando el procedimiento GENERAL LINEAR MODEL del paquete estadístico SAS (SAS Inst. Inc.). La carga parasitaria fue analizada mediante un test no paramétrico Kruskal-Wallis seguido por un test de Dunn para la comparación entre grupos y de un test Mann-Whitney para las comparaciones por pares.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras la infección, en los tres grupos se observó un aumento transitorio de la temperatura rectal entre los días 2 y 12 pi, presentando un pico de temperatura el día 6 pi, no siendo las diferencias observadas entre los 3 grupos estadísticamente significativas. El análisis serológico puso de manifiesto la aparición de anticuerpos específicos frente a *T. gondii* en la segunda semana pi, aumentando progresivamente en los tres

grupos a lo largo del experimento. Estos resultados sugerirían que no existiría una relación directa entre el momento de gestación en que los animales son infectados y las variaciones registradas en su temperatura rectal o en la respuesta humoral específica frente al parásito. Estos resultados son similares a otros estudios experimentales previos en los que, a lo largo de la gestación ovina, no se observaron variaciones de la respuesta inmunitaria periférica humoral ni celular inducidas tras la sensibilización frente a ovoalbúmina (Wattegedera *et al.*, 2008).

Es de destacar la aparición de aborto en los tres grupos del experimento. Éstos podían dividirse en dos tipos: aquellos que tuvieron lugar durante la segunda semana pi, o fase aguda de la enfermedad, y aquellos que ocurrieron a partir de la tercera semana pi. Los primeros aparecieron en los tres grupos, pero fueron más frecuentes (n=4) entre aquellos animales infectados en el segundo tercio de la gestación (G2), mientras que los abortos producidos a partir de la tercera semana pi únicamente se observaron en el G3. Si bien ambas clases de abortos están asociados a la infección, se ha sugerido que estarían causados por mecanismos diferentes, ya que en los abortos ocurridos a partir de la tercera semana pi se confirmó la presencia y la multiplicación del parásito en la placenta y los tejidos fetales, y la presencia de lesiones inflamatorias en estas localizaciones, mientras que en aquellos ocurridos en la fase aguda de la enfermedad la presencia del parásito en la placenta o vísceras fetales no es frecuente y las lesiones observadas en estas localizaciones son consecuencia de alteraciones vasculares (Castaño *et al.*, 2014). Las diferencias encontradas demostrarían la existencia de mecanismos subyacentes diferentes en ambos tipos de abortos y que el momento de gestación influye de forma variable sobre éstos.

En los tres grupos se identificó la presencia del parásito, mediante la amplificación de ácidos nucleicos, tanto en muestras de placenta como de vísceras fetales. En los animales del G1, únicamente se detectó en la semana 4 pi, mientras que en los otros dos grupos (G2 y G3), ya se identificó desde la tercera semana pi. A su vez, al comparar estos dos últimos grupos se observan también diferencias: mientras que en el G2 la carga parasitaria es menor en la semana 3 pi que en la semana 4 pi, en el G3 se observa lo contrario, la carga parasitaria disminuye en la semana 4 pi respecto a la semana 3, sobre todo en las vísceras fetales. Estos hallazgos sugerirían que, cuando las infecciones se producen durante el último tercio de gestación, existiría una mayor facilidad para la diseminación del parásito a la placenta y tejidos fetales, posiblemente debido a variaciones en la respuesta del hospedador frente a éste.

De forma similar, el grupo G3 fue el único en el que se encontraron lesiones histológicas en la semana 3 pi, mientras que en la semana 4

pi se encontraron en los tres grupos. Este hallazgo indicaría que existe una mayor capacidad del parásito para inducir lesiones en este periodo, posiblemente ligado a la presencia de una mayor carga parasitaria en la semana 3 pi, en comparación con los otros dos tercios de gestación. Por otro lado, al comparar todas las lesiones observadas en los fetos en la semana 4 pi, son aquellos infectados durante el segundo tercio de gestación (G2), los que presentan lesiones de mayor gravedad, lo que podría ser debido a que el estado de gestación también influye sobre las características de la respuesta inflamatoria desarrollada en el feto. Respecto a las lesiones asociadas a los abortos en la fase aguda de la enfermedad, durante la semana 2 pi, éstas fueron más evidentes en los fetos infectados durante el último tercio de gestación (G3), donde cabe destacar que estas lesiones se caracterizaron por áreas de leucomalacia en el encéfalo, en ausencia de parásito. El que las lesiones más graves asociadas al aborto en la fase aguda se observaran en el G3, mientras que las más graves asociadas a abortos “clásicos” se observaran en el G2 es posiblemente debido a que los mecanismos patogénicos de ambos abortos son diferentes (Castaño *et al.*, 2014) y que el momento de gestación en el que se produzca la infección influye de forma diferente según la patogenia del aborto.

CONCLUSIONES

Las diferencias observadas tanto en la carga parasitaria como en las lesiones histológicas sugiere que el momento de gestación condiciona la distribución y multiplicación del parásito, probablemente por variaciones en la respuesta del hospedador frente a *T. gondii* y su capacidad de control de la infección. La ausencia de variaciones en la respuesta inmune humoral y temperatura rectal estudiadas podría implicar que las variaciones en la respuesta del hospedador se producirían localmente (feto y placenta), sin ser tan evidentes en la respuesta periférica del hospedador.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado gracias los proyectos AGL2011-30205, del Ministerio de Ciencia e Innovación, y LE253U13, de la Junta de Castilla y León.

BIBLIOGRAFÍA

- Castaño P, Fuertes M, Ferre I, *et al.*. 2014. Placental thrombosis in acute phase abortions during experimental *Toxoplasma gondii* infection in sheep. *Vet Res* 45:9.
- Dubey J. 2008. The history of *Toxoplasma gondii*--the first 100 years. *J Eukaryot Microbiol* 55:467-475.
- Tait ED, Hunter CA. 2009. Advances in understanding immunity to *Toxoplasma gondii*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 104: 201-210.
- Wattegedera S, Rocchi M, Sales J, *et al.* 2008. Antigen-specific peripheral immune responses are unaltered during normal pregnancy in sheep. *J Reprod Immunol*. 77:171-178.

Toxoplasma gondii EXPERIMENTAL INFECTION IN PREGNANT SHEEP AT EARLY, MID AND LATE GESTATION. PATHOLOGICAL RESPONSE AND PARASITE DISTRIBUTION

SUMMARY

The relation between gestational age and foetal death risk in ovine toxoplasmosis is already known, but the mechanisms involved are yet not clear, especially in sheep. In order to study these mechanisms, pregnant sheep of the same age and genetic background were orally dosed with 50 oocysts of *T. gondii* (M4 isolate) at days 40 (G1), 90 (G2) and 120 (G3) of gestation. In each group, four animals were culled on the second, third and fourth week post infection (wpi) in order to evaluate parasite distribution and loads and lesions in target organs. There were no significant differences between groups in either rectal temperatures, with a peak temperature at days 6 and 7 pi, or serological maternal antibody kinetics. Parasite DNA and lesions were found in the placentomes and foetal viscera of sheep from G1 only at the fourth wpi. In G2, parasite was found from the third wpi, also in placenta and foetal viscera, increasing both at the fourth week, but lesions were only present at the fourth wpi. These lesions were the most severe found in whole experiment. In G3, parasite DNA but also placental and foetal lesions were found in the third wpi. Three out of four sheep from G3 aborted at this time. At the fourth wpi, parasite burden in G3 foetal viscera was lower than those on G1 and G2. These results suggest that the period of gestation influence the parasite multiplication and development of lesions in the placenta and foetus, and as a consequence the clinical course in ovine toxoplasmosis.

Key words: Abortion, *Toxoplasma gondii*, Immune response, Pathology.