

LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE PROGESTERONA NO SE VE ALTERADA EN NOVILLAS GESTANTES QUE NO ABORTARON TRAS LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON *NEOSPORA CANINUM*

Mur-Navales, R., Serrano-Pérez, B., Almería, S., Alabart, J.L., López-Gatius, F., y Garcia-Ispuerto, I¹.

¹Departamento de Ciencia Animal, Universidad de Lleida- Agrotecnio Center; Alcalde Rovira Roure 191, 25198, Lleida; irinag@ca.udl.cat

INTRODUCCIÓN

El feto mamífero es antigénicamente un cuerpo extraño para la madre y para sobrevivir se producen una serie de interacciones de inmunosupresión entre la madre y el mismo. La hormona clave que provoca inmunotolerancia fetal por parte de la madre es la progesterona (Hansen et al. 1986), produciendo un cambio hacia la respuesta inmune tipo Th2 y evitando así el aborto que produciría una excesiva respuesta Th1 (Roberston, 2000). El efecto regulador de la progesterona es ejercido directa o indirectamente a través de mediadores secundarios como las serpinas uterinas, conocidas como SERPINA14, que se encuentran presentes en el endometrio, fluidos fetales y el ovario (Padua y Hansen, 2010).

Neospora caninum es un protozoo intracelular obligado considerado la causa más importante de aborto en vacuno lechero a nivel mundial. En las granjas lecheras la ruta de infección más frecuente es la transplacentaria, donde las madres infectadas naturalmente transmiten el parásito a los fetos durante la gestación (Almería y López-Gatius, 2013). La mayoría de terneros nacen clínicamente normales, aunque aproximadamente un 95% están infectados por *N. caninum*. El aborto o la infección congénita ocurren cuando el parásito atraviesa la barrera placentaria e infecta al feto, provocando el aborto principalmente hacia los 5-7 meses de gestación (Almería y López-Gatius, 2013). Las razones por las cuales algunas vacas infectadas abortan y otras no, siguen siendo desconocidas. Es bien conocido que la infección por *N. caninum* modifica los patrones hormonales durante la gestación en vacuno lechero. Por ejemplo, la seropositividad frente a este parásito ha sido asociada con incremento de prolactina y progesterona plasmática (García-Ispuerto et al. 2010, 2013) y reducción de glicoproteínas asociadas a gestación (PAGs) (García-Ispuerto et al., 2015). También, se ha observado una correlación negativa entre la expresión génica de SERPINA14 en la placenta y la respuesta adaptativa humoral y celular en la placenta y linfonodos uterinos de vacas infectadas experimentalmente con *N. caninum* (Serrano-Pérez et al., 2016, 2017). El presente estudio se realizó durante el segundo trimestre de gestación en terneras gestantes experimentalmente infectadas con *N. caninum* el día 110 de gestación. Se seleccionó este momento de infección debido a que es cuando la mayoría de abortos tienen lugar en animales infectados en condiciones de campo. Debido al tropismo del parásito por el folículo ovárico (Silva et al., 2012) y al aumento de progesterona detectado en animales seropositivos a *N. caninum*, el objetivo de este estudio fue determinar si las novillas infectadas experimentalmente mostraban cambios en la concentración plasmática de progesterona tras la infección. Un segundo objetivo fue correlacionar la expresión génica de SERPINA14 en el cuerpo lúteo con la concentración plasmática de progesterona.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los animales utilizados y el protocolo de infección han sido descritos por Almería et al. (2016) y aprobados por el Comité de Ética de Animales de Experimentación de la Universidad Autónoma de Barcelona (CEEAH.1426-08/02/2012) y la Universidad de Lleida (CEEA.06-01/12). En resumen, diez novillas de 14-16 meses de edad de raza frisona libres de agentes infecciosos abortivos y seronegativas a *N. caninum* (CIVTEST®, Hipra, Girona, España) fueron sincronizadas e inseminadas artificialmente. La seronegatividad fue reconfirmada los días 60, 90 y 110 de gestación. La gestación fue determinada mediante ecografía transrectal los días 30, 45, 90 y 110 tras la IA. En el día 110 de gestación, 6 novillas fueron inoculadas vía intravenosa con 10⁷ taquizoitos de *N. caninum* Nc-Spain7 cedidos por el Dr. Ortega-Mora (SALUVET, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España). Dos novillas abortaron los días 14 y 21 tras la infección, y en otra novilla se encontró un feto momificado tras la eutanasia, por lo que se excluyeron del análisis. Las restantes 3 novillas que no abortaron fueron eutanasiadas el día 152 de gestación, al igual

que las controles no inoculadas. A día 152 de gestación (42 días postinfección), se recogió sangre de la vena de la cola en tubos heparinizados (BD Vacutainer, Becton-Dickinson and Company, Plymouth, RU) para determinar la concentración de progesterona plasmática. El plasma se obtuvo de la centrifugación de las muestras antes de 30 minutos de la extracción y se congelaron a -20°C hasta su posterior análisis. Las concentraciones de progesterona se analizaron mediante un kit ELISA diseñado para plasma bovino (Ridgeway Science, St. Briavels, Gloucestershire, RU) de acuerdo con las instrucciones de la casa comercial. La sensibilidad del análisis fue de 0,3 ng/ml. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado. Los coeficientes de variación intra-análisis para los controles de 1 y 2 ng/ml fueron 6,4 y 4,8%, respectivamente. En el momento del sacrificio se tomaron muestras de los cuerpos lúteos (CL) que se conservaron en nitrógeno líquido hasta el momento de su extracción. El ARN de los CL se extrajo mediante el protocolo Trizol (Invitrogen), se trató con DNAsas y se obtuvo ADN copia (cDNA) mediante transcripción reversa en presencia de iniciadores random con el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU). La expresión de ARN mensajero para la *SERPINA14* y el gen de referencia β -*ACTINA* se determinó mediante PCR a tiempo real empleando el sistema SYBR Green (Thermoscientific) en un aparato de detección ABI PRISM TM 7500 (Applied Biosystem, Foster City, CA, EEUU) según lo descrito en Serrano-Pérez et al., (2016). Los resultados se expresaron en expresión relativa (RQ). Se compararon las concentraciones de progesterona plasmática entre novillas controles (seronegativas) e infectadas con *N. caninum* no abortadas mediante el test T de Student. Se empleó el coeficiente de correlación de Spearman, ρ (rho) para estudiar la relación entre la concentración de progesterona y la expresión génica de *SERPINA14* en el cuerpo lúteo. Para ello se utilizó el programa estadístico SPSS versión 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). La significancia utilizada fue de $P \leq 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La infección experimental con *Neospora caninum* no afectó a la concentración de progesterona plasmática. La concentración en las madres control e infectadas no abortadas fue de $12,53 \pm 1,5$ ng/ml y $12,85 \pm 3,7$ ng/ml, respectivamente. Estos análisis parecen demostrar que la infección no afecta a la función luteal, como mínimo en términos de concentraciones de progesterona. Este resultado parece contradecir a Garcia-Ispuerto et al. (2010), que observaron que las vacas en lactación seropositivas infectadas naturalmente presentaron mayor concentración de progesterona que las seronegativas. Esta hormona reduce la respuesta Th1 (respuesta proinflamatoria), y se ha determinado que un aumento de respuesta de este tipo provoca aborto en animales seropositivos crónicamente infectados (Bech-Sàbat et al., 2007). Por eso, es lógico pensar que la respuesta de los animales sea aumentar la progesterona para evitar el aborto. La neosporosis es una enfermedad de la placenta o el feto, y su patogénesis aún no está completamente elucidada. Quizás, las novillas que aún no tienen estrés de producción no necesitan aumentar el nivel de progesterona para prevenir el aborto causado por *N. caninum*, mientras que vacas de alta producción que ya tienen un metabolismo hormonal elevado, sí necesitan hacerlo. Otro factor es el corto periodo de estudio en la infección experimental mientras que el estudio en vacas naturalmente infectadas se llevó a cabo a lo largo de la gestación. A pesar de que la secreción de *SERPINA14* luteal está regulada por esteroides (Ulbrich et al., 2009), la correlación entre la concentración plasmática de P4 y la expresión de *SERPINA14* no alcanzó la significación estadística ($r: 0,607, P=0,148$), quizás debido al bajo número de casos estudiados, por lo que debería confirmarse en una muestra mayor. Más estudios son necesarios para determinar la patogénesis del parásito sobre la funcionalidad del cuerpo lúteo, tanto en vacas como en novillas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almería, S. & López-Gatius, F., 2013. Res Vet Sci 95:303-309.
- Almería, S., Serrano-Pérez, B., Darwich, L., Domingo, M., Mur-Novales, R., Regidor-Cerrillo, J., Cabezón, O., Pérez-Maillo, M., López-Helguera, I., Fernández-Aguilar, X., Puig-Ribas, M., Ortega-Mora, L.M., García-Ispuerto, I., Dubey, J.P. & López-Gatius, F., 2016. Exp Parasitol 168:62-69.
- Bech-Sàbat, G., López-Gatius, F., Santolaria, P., García-Ispuerto, I., Pabón, M., Nogareda, C., Yániz, J.L., Almería, S., 2007. Vet Parasitol 145:164-167.
- García-Ispuerto, I., Nogareda,

C., Yániz, J.L., Almería, S., Martínez-Bello, D., de Sousa, N.M., Beckers, J.F. & López-Gatius, F., 2010. *Theriogenology* 74:212–220. • García-Ispierto, I., Almería, S., Serrano, B., de Sousa, N.M., Beckers, J.F. & López-Gatius, F., 2013. *Reprod Domest Anim* 48:613-618. • García-Ispierto, I., Serrano-Pérez, B., Almería, S., Martínez-Bello, D., Tchimbou, A.F., de Sousa, N.M., Beckers, J.F., & López-Gatius, F., 2015. *Theriogenology* 83:491–496. • Hansen, P.J., Bazer, F.W. & Segerson, E.C. Jr., 1986. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 12:48-54. • Roberston, S.A., 2000. *Rev Reprod* 5:164-164. • Padua, M.B. & Hansen, P.J. 2010. *Am J Reprod Immunol*. 64:265-74. • Serrano-Pérez, B., Hansen, P.J., Mur-Navales, R., García-Ispierto, I., de Sousa, N.M., Beckers, J.F., Almería, S., & López-Gatius, F. 2016. *Theriogenology*. 86:824-30. • Serrano-Pérez, B., Almería, S., Mur-Navales, R., López-Helguera, I., García-Ispierto, I., Alabart, J.L., Darwich, L. & López-Gatius, F. *Reprod Domest Anim*. 2017 doi: 10.1111/rda.12937. • Silva, A.F., Rangel, L., Ortiz, C.G., Morales, E., Zanella, E.L., Castillo-Velázquez, U. & Gutiérrez, C.G., 2012. *Vet Parasitol* 188:175-178. • Ulbrich SE, Frohlich T, Schulke K, Englberger E, Waldschmitt N, Arnold GJ, Reichenbach HD, Reichenbach M, Wolf E, Meyer HH, Bauersachs S. 2009. *Biol Reprod*. 81:795-805.

Agradecimientos: Este estudio fue financiado por MINECO (AGL2012-39830-C02-01/02) y fondos FEDER. R. Mur-Navales disfruta de una beca FPI (BES-2013-063215).

PLASMA PROGESTERONE CONCENTRATION IS NOT REDUCED IN PREGNANT NON-ABORTING HEIFERS EXPERIMENTALLY INFECTED WITH *NEOSPORA CANINUM*

ABSTRACT: *Neospora caninum* is a major cause of abortion in cattle worldwide. However, immune-endocrine interactions during pregnancy in *Neospora*-infected cows remain unknown. This study examines plasma progesterone concentration in dairy heifers experimentally infected with *N. caninum* that did not abort, and also assessed possible interrelations between expression patterns of *SERPINA14* in corpus luteum tissues and plasma progesterone concentrations. The study population was constituted of four non-infected controls and three heifers experimentally infected with *N. caninum* on Day 110 of pregnancy with live fetuses at euthanasia. Both groups were euthanized on Day 152 of gestation. At euthanasia, blood samples were collected to determine progesterone concentrations. Samples of corpus luteum tissues (CL) were collected to determine gene expression of *SERPINA14*. No relationships were detected between infection and plasma progesterone concentration (12.5 ± 1.5 ng/ml in controls vs. 12.8 ± 3.7 ng/ml in infected dams). There was not significant correlation between plasma progesterone concentration and *SERPINA14* expression in CL ($r: 0.607, P=0.148$). In conclusion, *N. caninum* had no impacts on luteal function, at least in terms of repercussions on plasma progesterone concentrations.

Keywords: Neosporosis, reproduction, endocrinology, parasite