

## Desarrollo de un Modelo *in vitro* de Conversión de Taquizoíto a Bradizoíto en *Besnoitia besnoiti*

### Development of an *in vitro* Tachyzoite-Bradizoite Conversion Assay in *Besnoitia Besnoiti*

María Fernández Álvarez y Laura Rico San Román

Tutores:

Alejandro Jiménez Meléndez y Gema Álvarez García

Universidad Complutense de Madrid

#### Resumen

*Besnoitia besnoiti* es un protozoo apicomplejo formador de quistes responsable de la besnoitiosis bovina. Esta enfermedad, de curso crónico y debilitante que produce lesiones en piel y alteraciones sistémicas, origina importantes pérdidas económicas. En el curso de la enfermedad en el ganado bovino se desarrollan dos estadios parasitarios intracelulares diferentes, los taquizoítos y los bradizoítos, responsables de la fase aguda y crónica de la enfermedad, respectivamente. La transformación del estadio de taquizoíto a bradizoíto juega un papel clave en la evasión de la respuesta inmunitaria y la progresión de la enfermedad. Hasta el momento, no se ha establecido un modelo *in vitro* que reproduzca dicha transformación, lo cual es indispensable para esclarecer los mecanismos moleculares implicados y para el desarrollo de futuros modelos de infección experimental *in vivo*. Por ello, en la actualidad, se está desarrollando un modelo *in vitro* de transformación del taquizoíto al bradizoíto en *B. besnoiti*. Para ello, se están seleccionando los marcadores de bradizoíto y se están empleando diferentes agentes estresantes que inducen este cambio en otros protozoos apicomplejos como *Neospora caninum* o *Toxoplasma gondii*.  
*Palabras clave:* *Besnoitia besnoiti*, taquizoíto, bradizoíto, *in vitro*, conversión.

#### Abstract

*Besnoitia besnoiti* is a cyst-forming apicomplexan protozoa and the etiological agent of bovine besnoitiosis. This chronic and debilitating disease is characterized by skin lesions and systemic manifestations and is responsible for important economic losses. Two asexual intracellular stages develop in cattle, tachyzoites and bradyzoites, responsible for the acute and chronic stages of the disease, respectively. The switch of tachyzoites into bradyzoites is a parasite dependent mechanism of immune response evasion and determinant for disease progression. However, an *in vitro* model that mimics this conversion has not been developed yet, which is essential for addressing the molecular mechanisms involved and for the development of future experimental *in vivo* models. Thus, the aim of the present work was to develop an *in vitro* model of tachyzoite to bradyzoite conversion in *B. besnoiti*. To accomplish this, appropriate markers of bradyzoites are being selected and different stress agents, that induce bradyzoite production in other apicomplexan protozoa such as *Neospora caninum* or *Toxoplasma gondii*, are being tested.

*Keywords:* *Besnoitia besnoiti*, tachyzoite, bradyzoite, *in vitro*, conversion.

---

Trabajo presentado en las XII Jornadas Complutenses, XI Congreso Nacional de Investigación en Ciencias de la Salud para Alumnos Pregraduados y XVI Congreso de Ciencias Veterinarias y Biomédicas.

Este trabajo ha sido financiado gracias a dos proyectos del Ministerio de Economía y Competitividad (Ref. AGL2013-04462 y AGL2016-75202R). Alejandro Jiménez-Meléndez es beneficiario de un contrato predoctoral del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Ref. FPU13/05481).

## Introducción

*Besnoitia besnoiti* es un protozoo intracelular obligado apicomplejo formador de quistes perteneciente al género *Besnoitia*, a su vez englobado dentro de la subfamilia *Toxoplasmatinae*, junto con *Toxoplasma*, *Neospora* y *Hammondia*. *Besnoitia besnoiti* es el agente etiológico de la besnoitiosis bovina, una enfermedad crónica y debilitante que afecta a los parámetros productivos y reproductivos ocasionando importantes pérdidas económicas (Álvarez-García, García-Lunar, Gutiérrez-Expósito, Shkap y Ortega-Mora, 2014). En el ganado bovino se desarrollan dos estadios asexuales e intracelulares diferentes: los taquizoítos y los bradizoítos, responsables de la fase aguda y crónica de la enfermedad, respectivamente. Las células diana de los taquizoítos son las células endoteliales, mientras que los bradizoítos muestran tropismo por los fibroblastos (Álvarez-García et al., 2014).

Hasta el momento, no se ha desarrollado un modelo *in vitro* de infección por *B. besnoiti* que induzca la conversión de taquizoíto a bradizoíto. Por tanto, se desconocen las bases moleculares que determinan esta transformación, la cual es un mecanismo de evasión de la respuesta inmunitaria desarrollada por el hospedador que permite asegurar la supervivencia del parásito y facilitar su transmisión (Risco-Castillo, 2008).

En otros protozoos estrechamente relacionados con *B. besnoiti*, como *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii*, se han optimizado diferentes protocolos de obtención de bradizoítos *in vitro*, en los que la alcalinización del pH (Skariah, McIntyre y Mordue, 2010) y el tratamiento con nitroprusiato sódico, o SNP, (Risco-Castillo, 2008) han mostrado los mejores resultados. Estos ensayos de obtención de bradizoítos *in vitro* han permitido comparar el genoma y el transcriptoma de ambos estadios en el caso de *Toxoplasma gondii*.

## Objetivo

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un modelo *in vitro* de conversión del estadio de taquizoíto al de bradizoíto en *B. besnoiti*.

## Materiales y métodos

### Cultivos celulares y mantenimiento del parásito

Los taquizoítos de los aislados Bb-Spain3 de *B. besnoiti* y Tg-ME49 de *T. gondii* se mantuvieron en la línea celular Marc-145 (García-Lunar, 2016) y, posteriormente, fueron purificados a las 72 horas post-infección (hpi) para realizar los ensayos de transformación.

## Diseño experimental

### Marcadores estudiados

Al no existir anticuerpos específicos frente a bradizoítos o quistes de *B. besnoiti*, se estudiaron diversos marcadores de bradizoítos de *N. caninum* (anticuerpos específicos de bradizoíto) y del quiste de *T. gondii* (lectina de *Dolichos biflorans* conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC)) que podrían reconocer los bradizoítos y quistes de *B. besnoiti* (Tabla 1).

### Caracterización de los anticuerpos

El reconocimiento de antígenos de bradizoíto de *B. besnoiti* se evaluó mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras de un extracto de bradizoítos de *B. besnoiti* y Western Blot (García-Lunar, 2016), utilizando los anticuerpos específicos de bradizoíto de *N. caninum* como anticuerpos primarios. La unión específica de dichos anticuerpos se visualizó mediante quimioluminiscencia.

Asimismo, también se realizó una inmunohistoquímica (IHQ) sobre cortes histológicos de piel procedentes de animales crónicamente infectados y con quistes de *B. besnoiti* utilizando los mismos reactivos.

### Ensayos de conversión taquizoíto-bradizoíto

Los diferentes ensayos de conversión se realizaron en placas de 24 pocillos con cristales estériles, sembradas con  $10^5$  células por pocillo e infectadas con taquizoítos a una dosis de infección parásito: célula hospedadora de 1:1.

La conversión fue inducida mediante la alcalinización del pH del medio de cultivo a 8,1 a las 24 horas post-infección (hpi) y realizando un tratamiento de 4 días en un incubador a 37% sin aporte exógeno de  $CO_2$  para evitar la acidificación del medio. Posteriormente, se monitorizó la transformación mediante una inmunofluorescencia doble (IFD) (García Lunar, 2016). En el marcaje de los bradizoítos se empleó antiNcSAG4 (diluido a 1:50 en el anticuerpo monoclonal 3.10.8), y la pared de los quistes se marcó con lectina diluida 1:50 en tampón fosfato salino (PBS). Como testigo positivo de conversión a bradizoíto se utilizaron cultivos infectados con el aislado Tg-ME49 de *T. gondii* y como control negativo cultivos infectados no sometidos a la alcalinización del medio e incubados a 37 °C con un 5%  $CO_2$ .

Cada ensayo se realizó por triplicado y en cada uno se incluyeron tres réplicas de cada condición.

## Resultados y discusión

### Marcadores de conversión

Los resultados obtenidos en relación a la selección de marcadores de bradizoítos de *B. besnoiti* indican que el anti-

Tabla 1

Reactivos estudiados como posibles marcadores de la conversión *in vitro* de taquizoíta a bradizoíta de *B. besnoiti*.

Anticuerpo	Especie de protozoo y estadio que reconoce
Anti-NcSAG4 (obtenido en conejo)	<i>N. caninum</i> , bradizoíta <sup>1</sup>
Anti-Nc-BSR4 (obtenido en conejo)	<i>N. caninum</i> , bradizoíta <sup>1</sup>
Anti-NcSRS9 (obtenido en conejo)	<i>N. caninum</i> , bradizoíta <sup>2</sup>
Lectina de <i>Dolichos biflorans</i> -FITC	<i>T. gondii</i> , pared del quiste <sup>3</sup>
Anticuerpo monoclonal 10.3.8 (obtenido en ratón)	<i>B. besnoiti</i> , taquizoíta <sup>4</sup>
Anticuerpo policlonal anti-taquizoíta de <i>B. besnoiti</i> (obtenido en conejo)	<i>B. besnoiti</i> , taquizoíta <sup>4</sup>

<sup>1</sup>Risco-Castillo, 2008; <sup>2</sup>Risco-Castillo et al., 2011; <sup>3</sup>Skariah et al., 2010; <sup>4</sup>García-Lunar, 2016.

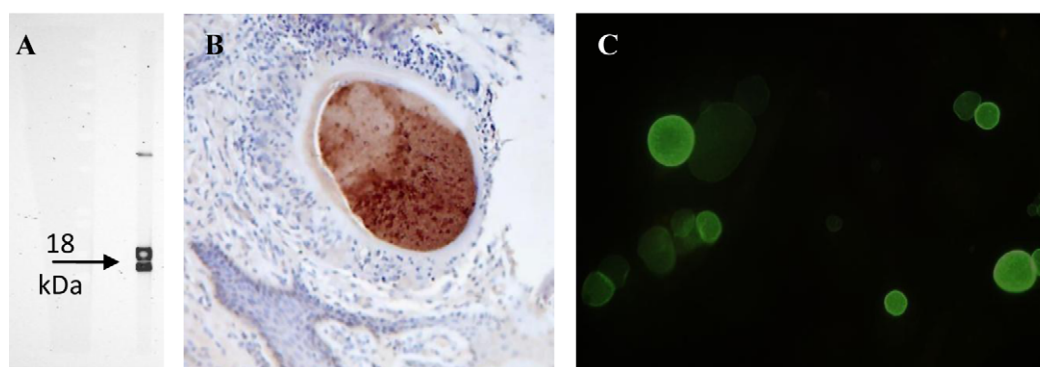


Figura 1. Detección de antígenos de bradizoítos y quistes de *B. besnoiti*. A: anticuerpo anti-NcSAG4 mediante WB (dilución 1:500); B: anticuerpo antiNcSAG4 mediante inmunohistoquímica en un corte histológico de piel con quistes de *B. besnoiti*; C: *Dolichos biflorans*-FITC mediante IFD en cultivo celular. Los quistes aparecen señalados con una flecha (20x).

cuerpo anti-NcSAG4 reconoce antígenos del estadio de bradizoíta de *B. besnoiti*, ya que se reconoció por Western Blot un antígeno con un peso molecular de 18 kDa que coincide con el tamaño de la proteína nativa NcSAG4 (Fig. 1A). Posteriormente, estos resultados fueron corroborados mediante el reconocimiento de bradizoítos en el interior de quistes por IHQ (Fig. 1B). Se descartaron los anticuerpos anti-NcSRS9 y anti-NcBSR4 como marcadores al no reconocer antígenos de bradizoítos de *Besnoitia* por ninguna de las técnicas empleadas.

También se observó que la lectina *Dolichos biflorans*, que se une de forma específica a los glicosaminoglicanos de la pared del quiste de *T. gondii*, se une a la pared quística de los quistes de *B. besnoiti* obtenidos *in vitro* (Fig. 1C). Estos resultados son similares a los obtenidos en otros protozoos apicomplejos de la familia Sarcocystidae, como *T. gondii* (Skariah et al., 2010). No obstante, por el momento se desconoce si otros agentes estresantes *in vitro* como el nitroprusiato sódico (SNP), que también se han utilizado para inducir la transformación de taquizoíta a bradizoíta en protozoos como *Neospora caninum* (Risco Castillo, 2009), serían capaces de inducir dicha conversión en *B. besnoiti*.

## Conclusiones

Estos resultados preliminares confirman que es posible inducir la transformación *in vitro* del taquizoíta al bradizoíta de *B. besnoiti* mediante la alcalinización del medio de cultivo. En futuros estudios deberán investigarse otros posibles marcadores, comparar diferentes protocolos de conversión para optimizar el modelo y determinar el porcentaje de conversión y la viabilidad de los bradizoítos de *B. besnoiti* obtenidos *in vitro*.

## Referencias

- Alvarez-García, G., García-Lunar, P., Gutiérrez-Expósito, D., Shkap, V., & Ortega-Mora, L. M. (2014). Dynamics of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle. *Parasitology*, *141*(11), 1419-1435. <http://doi.org/10.1017/S0031182014000729>
- García-Lunar, P. (2016). *Estrategias para la mejora del diagnóstico serológico de la besnoitiosis bovina* (Tesis doctoral, Universidad Complutense, Madrid, España). Recuperado de <https://eprints.ucm.es/38790/1/T37621.pdf>

Risco-Castillo, V. (2008). *Identificación y caracterización de antígenos específicos del estadio de bradizoíto de "Neospora caninum"*. (Tesis doctoral, Universidad Complutense, Madrid, España). Recuperado de <https://eprints.ucm.es/8765/1/T30947.pdf>

Risco-Castillo, V., Marugán-Hernández, V., Fernández-García, A., Aguado-Martínez, A., Jiménez-Ruiz, E., Rodríguez-Marco, S., ... Ortega-Mora, L. M. (2011). Identification of

a gene cluster for cell-surface genes of the SRS superfamily in *Neospora caninum* and characterization of the novel *SRS9* gene. *Parasitology*, *138*, 1832-1842. <http://doi.org/10.1017/S0031182011001351>

Skariah, S., McIntyre, M. K., & Mordue, D. G. (2010). *Toxoplasma gondii*: Determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. *Parasitology Research*, *107*(2), 253-260. <http://doi.org/10.1007/s00436-010-1899-6>