

PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE BRADIZOÍTOS DE *Neospora caninum*#

Risco Castillo, Verónica., Fernández García, Aurora y Ortega Mora, Luis Miguel¹

RESUMEN

Neospora caninum es un parásito identificado como una de las principales causas de aborto en ganado bovino y de enfermedad neurológica en diversas especies animales. Está íntimamente relacionado a *Toxoplasma gondii*, con quien comparte la habilidad de persistir indefinidamente, en estado latente y dentro del hospedero, formando quistes tisulares con bradizoítos de lenta división. Aquí comparamos diferentes métodos para inducir la conversión *in vitro* de los bradizoítos, usando células MARC-145 infectadas con el aislado Nc-Liverpool. La tasa de conversión taquizoíto-bradizoíto fue monitorizada a los días 3, 5 y 7 post-estrés en un ensayo de doble inmunofluorescencia, usando un anticuerpo monoclonal frente al antígeno superficial de taquizoíto SAG1, y el suero policlonal de conejo dirigido contra el antígeno intracitoplasmático de bradizoíto BAG1. El tratamiento durante 7 días con nitroprusiato sódico 70 μ M, produjo la mejor tasa de transformación a bradizoíto y la mayor cantidad de vacuolas parasitóforas totales observadas. Presentamos un método alternativo, más venajoso y simplificado de producción de bradizoítos de *N. caninum*, usando un sistema de cultivo celular estable y de fácil manejo, con una prometedora capacidad de purificación del parásito.

Palabras clave: *Neospora caninum*; conversión taquizoíto-bradizoíto; cultivo *in vitro*

ABSTRACT

Neospora caninum is a parasite identified as a major cause of abortion in cattle and neurological disease in various animal species. It is closely related to *Toxoplasma gondii*, sharing the ability to persist indefinitely in latent stage within the host as a tissue cyst containing slow-dividing bradyzoites. Here we compared different stress methods to induce *in vitro* bradyzoite conversion, using MARC-145 cells infected with Nc-Liverpool isolate. The tachyzoite-to-bradyzoite conversion rate was monitored at days 3, 5, and 7 post-stress in a double-immunofluorescence assay using a mAb against the tachyzoite antigen SAG1 (aSAG1) and a rabbit serum directed to the intracytoplasmatic bradyzoite antigen BAG1 (aBAG1). Seven-day treatment with sodium nitroprusside 70 μ M, offered the highest bradyzoite transformation rate and the best yield of total parasitophorous vacuoles observed. In the present work, we introduce an alternative, simplified and more advantageous method for bradyzoite production of *N. caninum*, using a reliable cell culture system easy to handle and with promising capacity of parasite purification.

Key Words: *Neospora caninum*; tachyzoite-bradyzoite conversion; *in vitro* culture

INTRODUCCIÓN

Neospora caninum es un protozoario apicompleja capaz de parasitar un amplio rango de mamíferos y que adquiere importancia mundial al identificarse como causa de abortos en el ganado bovino. La neosporosis puede afectar a perros, que desarrollan una sintomatología caracterizada por polimiositis, encefalitis y parálisis ascendente hasta la muerte (Lindsay y Dubey, 1989; Buxton et al., 2002). *N. caninum* posee un ciclo biológico que incluye tres diferentes estadios: el esporozoíto, que dentro de los oocistos expulsados en las heces del hospedador definitivo puede infectar al hospedador intermediario a través de su ingestión; el taquizoíto, que se divide y disemina rápidamente a través de los tejidos del hospedador, y el bradizoíto, que se mantiene latente en quistes tisulares hasta su reactivación (Antony y Williamson, 2001; Buxton et al., 2002).

La vía de transmisión de la neosporosis puede ser horizontal o vertical. La vía transplacentaria es su principal forma de transmisión en vacas, siendo responsable de abortos repetidos y del nacimiento de animales infectados congénitamente (Anderson et al., 2000). Aunque aún no han sido esclarecidos los mecanismos para la reactivación de bradizoítos y la recrudescencia de la infección en animales con infección subclínica, parece ser que puede verse influenciada por varios factores incluyendo la virulencia del parásito y las características genéticas del hospedador (McAllister y Latham, 2002).

A la fecha, la inducción de conversión *in vitro* de taquizoíto a bradizoíto y viceversa en *T. gondii* y los mecanismos implicados en ello se han estudiado ampliamente (Lyons et al., 2002), utilizando variados métodos inductores de estrés (Bohne et al., 1994; Soete et al., 1994; Kirkman et

al., 2001; Weiss et al., 1998; Yahiaoui et al., 1999). Mientras tanto, varios estudios han demostrado que algunos aislados de *N. caninum* también pueden inducirse para expresar antígenos específicos de bradizoíto (Weiss et al., 1999), y que su diferenciación podría estar influenciada por el tiempo de cultivo bajo condiciones estresantes, aunque no con la misma eficiencia de *T. gondii*.

El presente estudio compara y evalúa la capacidad de diversos agentes estresantes para inducir la conversión a bradizoíto, presentando un método alternativo para la producción *in vitro* de bradizoítos de *N. caninum*, lo que permitirá el desarrollo posterior de métodos diagnósticos y profilácticos basados en proteínas específicas de estadio del parásito, a fin de analizar aspectos relacionados con la neosporosis aguda y crónica.

¹ Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, España

MATERIAL Y MÉTODOS

a. Cultivo celular y parásito

Se ensayó preliminarmente el uso de las líneas celulares Vero, de riñón de mono adulto, CHO, de ovario de hámster chino, C 6-9, de tumor glial de rata, y MARC-145, clon de MA104 de riñón fetal de mono (Kim et al., 1993). Se escogieron las células MARC-145 para este experimento y se mantuvieron en DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, incubándose a 37°C y 5% CO₂ hasta su confluencia.

Se seleccionó el aislado Nc-Liverpool (Nc-Liv) de *N. caninum* (Barber et al., 1995) por su mejor habilidad para diferenciarse a bradizoíto.

b. Anticuerpos y conjugados

Para determinar la conversión in vitro de taquizoíto a bradizoíto, se usó el anticuerpo monoclonal Ncmab-4, frente al antígeno superficial de taquizoíto NcSAG1 (aSAG1) (Björkman and Hemphill, 1998) a una dilución de 1:150, mientras que el suero policlonal anti recombinante BAG1 de *T. gondii* (aBAG1), que reacciona frente al antígeno intracitoplasmático de bradizoíto BAG1 de *N. caninum* (McAllister et al., 1996) se usó a la dilución de 1:100. Además, se confirmó el proceso de maduración de estructuras análogas a la pared quística utilizando el mAb CC2 que reacciona frente a bradizoítos de *T. gondii* (Gross et al., 1995) diluido a 1:100 y asociado a aBAG1.

Como conjugados, se usaron aquellos anti-IgG de ratón o de conejo -según correspondiera- asociados a TRITC o a FITC para permitir una doble inmunofluorescencia.

c. Inducción In vitro de conversión de estadio

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos con cristales cubreobjetos, se infectaron a las 24 horas con taquizoítos de Nc-Liv a una dosis de 2:1. Pasadas otras 24 horas se cambió el medio con o sin tratamiento, reemplazándose diariamente. Como tratamientos estresantes se utilizaron: 1) Nitroprusiato sódico (SNP) 50µM, 70µM o 100µM; 2) Forskolin 10µM; 3) Incubación axénica del parásito a 37°C and 5% CO₂, 15 horas antes de la infección de las células (BIM; Yahiaoui et al., 1999); 4) Tratamiento de los parásitos con SNP 100µM. 2

horas antes de la infección, para luego mantener el estrés en el cultivo infectado con SNP 50µM; y 5) Aumento del pH del medio de cultivo (pH 8.1). Cultivos celulares infectados con medio a pH 7.2 o suplementado con DMSO 0.1% sirvieron de controles.

Se fijaron los cubreobjetos al 3º, 5º, 7º y 9º día post-estrés. Los parásitos que expresaban solo SAG1 se consideraron como taquizoítos, mientras que aquellos que expresaban tanto SAG1 como BAG1 se designaron como bradizoítos intermedios (Tuney et al., 2002). Aquellos parásitos que expresaban solo BAG1 se les consideraron bradizoítos puros. La tasa de conversión se calculó en porcentajes de vacuolas positivas a BAG1. Los valores obtenidos se compararon usando ANOVA unifactorial y el test de rangos múltiples de Duncan.

La conversión a bradizoíto y la formación de la pared quística se confirmó mediante microscopía electrónica utilizando células MARC 145 infectadas y estresadas con SNP 70 mM

durante 7 días.

RESULTADOS

Luego de identificar las células MARC-145 como las que mejor soportaban la infección más el estrés del tratamiento, se intentó prolongar el cultivo logrando su mantenimiento hasta el día 7 post-estrés.

La tasa de transformación se incrementó en el tiempo en casi todos los casos, observando conversión desde el día 3 post-estrés, con los mejores porcentajes al día 7 para la mayoría de tratamientos estudiados (Tabla 1). Al día 3 se veían principalmente vacuolas parasitóforas grandes aSAG1-positivas exhibiendo en algunas de ellas una mezcla de taquizoítos y bradizoítos intermedios. Al día 7 post-estrés ya se encontraron vacuolas pequeñas con bradizoítos puros. Se observó que en estadios tempranos de conversión, CC2 reaccionaba con antígenos ubicados intravacuolarmente en muchas vacuolas, con poco reconocimiento de aBAG1, más tar-

Tabla 1. Comparación de tratamientos para la producción in vitro de bradizoítos de *Neospora caninum*

Tratamiento*	Día	Total vacuolas (media)	Vacuolas con bradizoítos intermedios + puros (media % ± ES)	Vacuolas con bradizoítos puros (media % ± ES)
pH 7.2	3	211	2.1 ± 0.7	0.2 ± 0.2
	5	150	3.8 ± 0.9	0.1 ± 0.1
	7	251	10.6 ± 3.2	0.8 ± 0.4
DMSO	3	211	1.8 ± 0.8	0.0 ± 0.0
	5	182	4.4 ± 1.3	0.0 ± 0.0
	7	178	7.2 ± 1.5	0.5 ± 0.3
SNP ₅₀	3	122	25.3 ± 3.7	0.4 ± 0.4
	5	132	39.6 ± 5.1†	1.2 ± 0.2
	7	159	45.7 ± 5.7†	3.2 ± 1.4
SNP ₇₀	3	109	28.4 ± 4.3	0.1 ± 0.1
	5	115	42.7 ± 4.6†	0.6 ± 0.3
	7	84	58.1 ± 10.7†	6.8 ± 2.9
SNP ₁₀₀	3	101	17.1 ± 3.7	0.0 ± 0.0
	5	68	52.0 ± 5.6†	1.5 ± 0.6
	7	19	40.9 ± 13.6†	4.1 ± 1.7
SNP _{100/50}	3	77	31.6 ± 7.9	0.2 ± 0.2
	5	61	57.8 ± 10.6†	0.7 ± 0.4
	7	45	56.8 ± 4.8†	0.0 ± 0.0
BIM	3	117	14.8 ± 3.8	0.0 ± 0.0
	5	220	11.8 ± 2.9	0.0 ± 0.0
	7	121	13.0 ± 4.3	0.0 ± 0.0
pH 8.1	3	73	28.1 ± 8.1	0.0 ± 0.0
	5	51	20.8 ± 5.8	0.6 ± 0.4
	7	108	11.7 ± 4.1	0.1 ± 0.1
Forskolin	3	152	11.0 ± 3.6	0.0 ± 0.0
	5	159	5.8 ± 1.6	0.5 ± 0.5
	7	161	6.1 ± 0.9	0.7 ± 0.4

*SNP₅₀, SNP₇₀ y SNP₁₀₀, 50, 70, y 100 µM SNP, respectivamente; SNP_{100/50}, pre-tratamiento de taquizoítos libres con 100 µM SNP seguido por tratamiento de células MARC-145 infectadas con 50 µM SNP; BIM, 15-hr incubación axénica de taquizoítos antes de infección pH 8.1, medio alcalino, y forskolin (10 µM). pH 7.2 y DMSO se usaron como controles.

† Tratamientos con diferencias significativas ($P < 0.001$).

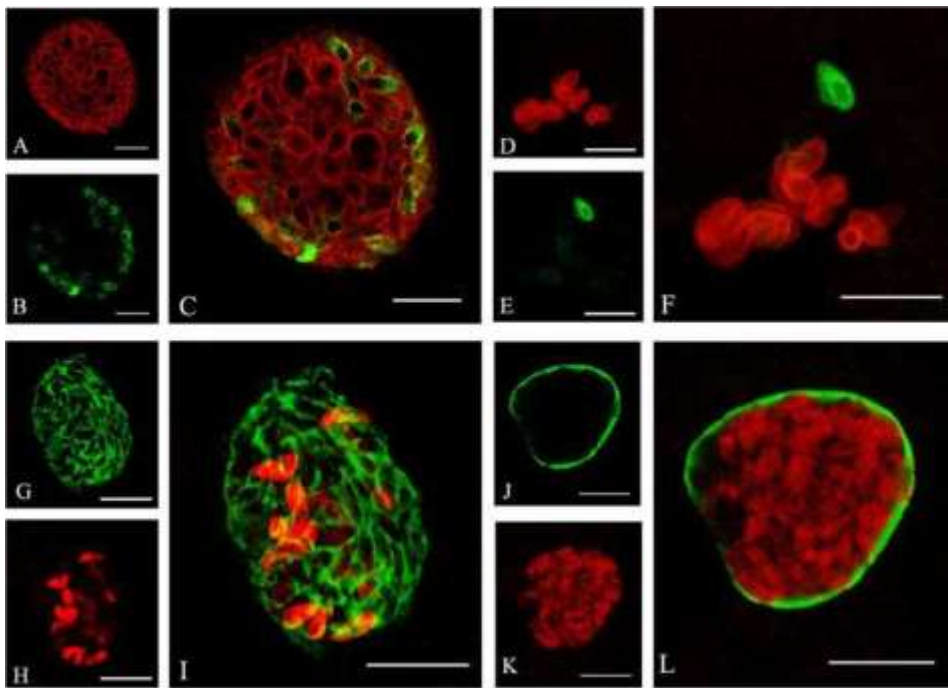


FIGURA 1. Doble inmunofluorescencia en células MARC-145 infectadas con Nc-Liv, estresadas con 70 μ M SNP y fijadas el día 7 post-estrés. Parásitos marcados con α SAG1 son rojos (A,D); aquellos marcados con α BAG1 son verdes (B,E). En (C), vacuolas grandes contienen principalmente taquizoitos, con algunos bradizoitos intermedios que reaccionan con ambos anticuerpos. En (F), vacuolas pequeñas que reaccionan solo con α BAG1 comparten célula hospedadora con parásitos SAG1. Vacuolas que reaccionan con CC2 son verdes (G,J) y parásitos positivos a BAG1 son rojos (H,K). Dependiendo del estado de maduración, algunas vacuolas reaccionan a CC2 en el lumen, con reconocimiento de algunos parásitos positivos aBAG1 (I), mientras otras vacuolas que reaccionan a CC2 en su periferia expresan BAG1 en todos los zoitos (L).

de, la mayoría de vacuolas positivas en su periferia a CC2 contenían parásitos aBAG1-positivos (Figura 1).

Observaciones con microscopía de transmisión, muestran que mientras los cultivos no tratados tienen vacuolas parasitíferas conteniendo desde 4-8 parásitos a más de 30 parásitos con membranas parasitíferas delgadas, cultivos tratados con SNP mostraban vacuolas pequeñas con 1-4 parásitos conteniendo estructuras electrón-lucentes similares a gránulos de amilopectina. Algunas vacuolas contenían abundante material granular y filamentosos electron-denso en su lumen o con depósitos en su periferia, prediciendo la formación de la pared (Figura 2).

SNP obtuvo el porcentaje más alto de conversión ($P < 0.001$) respecto al resto de tratamientos, aunque no hubieron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con SNP. Asimismo, SNP 70 μ M alcanzó el mayor porcentaje de vacuolas con bradizoitos puros (21.15%). No obstante, los tratamientos con SNP 100 μ M y tratamiento pre-infección con SNP llevaron a una ligera disminución de la tasa de conversión además de una disminución del número total de vacuolas.

Los controles con pH7 o DMSO 0.1% revelaron una conversión mínima a bradizoito al día 3 post-estrés. Asimismo, del día 5 hasta el final del experimento la mayoría de los taquizoitos rompieron las células hospedadoras causando un daño masivo a la monocapa celular.

DISCUSIÓN

El principal objetivo de este estudio fue el establecer un sistema in vitro que garantice una fuente estable de bradizoitos de *N. caninum* fáciles de purificar. En nuestro sistema, el trata-

miento diario de células MARC-145 infectadas durante 7 días con SNP 70 mM ofreció los mejores resultados de transformación. Esto es particularmente significativo dado que recientes estudios usando keratinocitos obtuvieron altas tasas de transformación de *N. caninum* (Vonlaufen, Muller et al., 2002); sin embargo, debido a las propiedades adhesivas y a su predisposición a diferenciarse y a la síntesis de queratina, este tipo celular puede afectar la recuperación del parásito (Hennings et al., 1980; Jensen et al., 1990; Hager et al., 1999).

La conversión a bradizoito estaría ligada a un equilibrio entre el cultivo celular seleccionado, la carga parasitaria y el tratamiento utilizado y no solo al tiempo de incubación. Se han probado con mayor o menor éxito diferentes tipos celulares (Bohne et al., 1993; Soete et al., 1994; Weiss et al., 1995; Weiss et al., 1998; Weiss et al., 1999; Yahiaoui et al., 1999; Kirkman et al., 2001; Tunev et al., 2002; Vonlaufen et al., 2002a; Vonlaufen et al., 2002b). Con relación al aislado utilizado, experiencias previas con Nc-Liv han reportado mayor eficiencia para estimular conversión in vitro a pesar de su virulencia (Vonlaufen et al., 2002b).

Mientras que los grupos control confirmaron estudios previos en los que la diferenciación de *N. caninum* no ocurría espontáneamente (Weiss et al., 1999), el mantenimiento alcalino del cultivo infectado (Soete et al., 1994) estimuló la diferenciación a bradizoito durante los primeros días, pero posteriormente dañó el cultivo celular y ocasionó una lisis temprana.

Después de la incubación axénica durante 15 horas de los taquizoitos

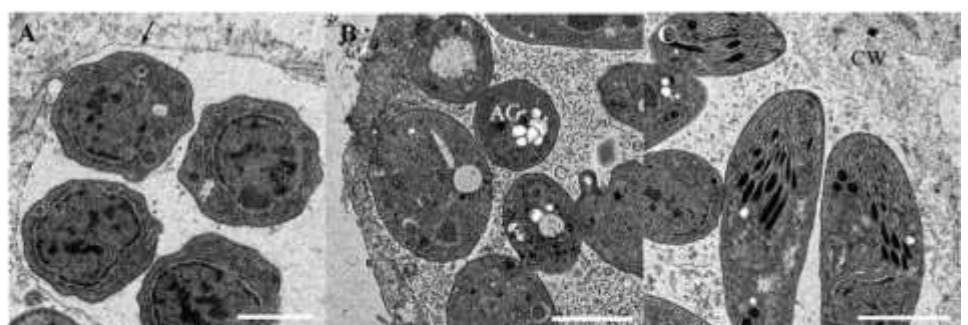


FIGURA 2. Microscopía electrónica de la conversión taquizoito-bradizoito in vitro de *Neospora caninum*. A. Vacuola parasitífera de Nc-Liv en cultivo sin tratar muestra una delgada membrana parasitífera delimitándola (flecha), con escaso material electrodenso en el lumen. Magnificación X20,000. Bar = 1 μ m. B. Después de 5 días con tratamiento de SNP, grandes restos electrodenso se acumulan en la matriz, mientras que algunos parásitos empiezan a mostrar vacuolas electrólucidas interpretadas como gránulos de amilopectina (AG), característicos de bradizoitos. Magnificación X15,000. Bar = 2 μ m. En (C), se observa un quiste tisular en formación. Note el material electrodenso granular y filamentosos acumulándose periféricamente, formando una capa gruesa pegada a la membrana parasitífera, lo que indica la formación de la pared quística (CW). Magnificación X15,000. Bar = 2 μ m.

de Nc-Liv, los parásitos estresados fueron capaces de infectar el cultivo y destruirlo, sugiriendo que el agente estresante debe dirigirse tanto a los parásitos como a las células hospedadoras, para asegurar la activación de las vías de señalización y reforzar la conversión (Weiss et al., 1995; Weiss et al., 1998).

Forskolin estimula temporalmente los niveles de adenilato ciclasa (cAMP) dentro de la célula hospedadora, guiando la transcripción de genes específicos de bradizoíto y favoreciendo su diferenciación (Kirkman et al., 2001). Lamentablemente, en este trabajo forskolin no estimuló la conversión de Nc-Liv. Nuestros resultados remarcan la necesidad de determinar si el cAMP de *N. caninum* no se ve afectado por el forskolin, como ocurre en *Plasmodium falciparum* (Read et al., 1991).

Como donador de óxido nítrico (NO), el SNP induce fuertemente la transformación a bradizoíto en *T. gondii* (Bohne et al., 1994; Kirkman et al., 2001). Ya que la estimulación celular prolongada con SNP puede ocasionar apoptosis, ensayamos varios tratamientos para determinar cuál protocolo inducía la mayor conversión con el menor daño celular; esto incluyó tres tratamientos dirigidos a la monocapa

celular infectada y uno usado frente a los parásitos libres antes de la infección. El tratamiento con SNP 70 μ M mostró tanto el más alto porcentaje medio de bradizoítos como un mayor número de vacuolas parasitóforas, a los 7 días post-estrés con SNP 70 μ M (Table I).

Con este tratamiento, se han observado varias vacuolas pequeñas conteniendo taquizoítos y bradizoítos en diferente grado de maduración dentro de la misma célula hospedadora. Además, a partir del 5º día se observaron vacuolas α SAG1-positivas conteniendo bradizoítos intermedios y puros, e inclusive vacuolas pequeñas con un bradizoíto puro y el otro intermedio. Esta conversión asincrónica dentro de la misma vacuola, aunque no fue vista por Vonlaufen et al. (2002b), si ha sido observada con anterioridad en *N. caninum* (Weiss et al., 1995) y *T. gondii* (Soete et al., 1993) y parece obedecer una expresión jerárquica de diferentes antígenos específicos de bradizoíto en parásitos en proceso de conversión (Lyons et al., 2002).

Las observaciones hechas en microscopio de transmisión coinciden con estudios previos que describen que el desarrollo de la pared quística empieza alternadamente con la expresión

de proteínas de bradizoíto (Gross et al., 1995) y sugiere que un nivel de SNP apropiado durante el tiempo suficiente induciría la transformación a bradizoíto. Del mismo modo, observaciones adicionales confirman los resultados obtenidos por inmunofluorescencia con CC2 y α BAG1, asociando el desarrollo de la pared quística con la producción de algunas proteínas -como GRA5 en *T. gondii*- por los Nc-Liv que se transforman en bradizoítos, acumulándose inicialmente en el lumen de la vacuola y migrando posteriormente a la periferia para acumularse en esta región (Lane et al., 1996).

AGRADECIMIENTO

Agradecemos al Centro de Asistencia a la Investigación de la Universidad Complutense de Madrid (CAI) por facilitarnos el uso de los microscopios confocal y de microscopía electrónica, así como la asesoría en el análisis estadístico; y a Vanesa Navarro y Ana Vicente por su excelente apoyo técnico. Este trabajo fue financiado a través de una beca de la Unión Europea (QLRT-2000-01050), y es parte del proyecto de colaboración europeo COST 854.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anderson, M.L., Andrianarivo, A.G., Conrad, P.A. 2000. Neosporosis in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61, 417-431.
2. Antony, A., Williamson, N.B. 2001. Recent advances in understanding the epidemiology of *Neospora caninum* in cattle. *N. Z. Vet. J.* 49, 42-47.
3. Barber, J.S., Holmdahl, O.J., Owen, M.R., Guy, F., Uggla, A., Trees, A.J. 1995. Characterization of the first European isolate of *Neospora caninum* (Dubey, Carpenter, Speer, Topper and Uggla). *Parasitology.* 111, 563-568.
4. Bohne, W., Heesemann, J., Gross, U. 1993. Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon-treated mouse macrophages. *Infect. Immun.* 61, 1141-1145.
5. Bohne, W., Heesemann, J., Gross, U. 1994. Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. *Infect. Immun.* 62, 1761-1767.
6. Buxton, D., McAllister, M., Dubey, J.P. 2002. The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends Parasitol.* 18, 546-552.
7. Gross, U., Bormuth, H., Gaissmaier, C., Dittrich, C., Krenn, V., Bohne, W., Ferguson, D.J. 1995. Monoclonal rat antibodies directed against *Toxoplasma gondii* suitable for assessing tachyzoite-bradyzoite interconversion in vivo. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2, 542-548.
8. Kim, H.S., Kwang, J., Yoon, I.J., Joo, H.S., Frey, M.L. 1993. Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch. Virol.* 133, 477-483.

9. Kirkman, L.A., Weiss, L.M., Kim, K. 2001. Cyclic nucleotide signaling in *Toxoplasma gondii* bradyzoite differentiation. *Infect. Immun.* 69, 148-153.
10. Lane, A., Soete, M., Dubremetz, J.F., Smith, J.E. 1996. *Toxoplasma gondii*: appearance of specific markers during the development of tissue cysts in vitro. *Parasitol. Res.* 82, 340-346.
11. Lindsay, D.S., Dubey, J.P. 1989. In vitro development of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) from dogs. *J. Parasitol.* 75, 163-165.
12. Lyons, R.E., McLeod, R., Roberts, C.W. 2002. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. *Trends Parasitol.* 18, 198-201.
13. McAllister, M.M., Parmley, S.F., Weiss, L.M., Welch, V.J., McGuire, A.M. 1996. An immunohistochemical method for detecting bradyzoite antigen (BAG5) in *Toxoplasma gondii*-infected tissues cross-reacts with a *Neospora caninum* bradyzoite antigen. *J. Parasitol.* 82, 354-355.
14. McAllister, D., Latham, S. 2002. *Neospora* 2001. *Trends Parasitol.* 18, 4-5.
15. Read, L.K., Mikkelsen, R.B. 1991. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes contain an adenylate cyclase with properties which differ from those of the host enzyme. *Mol. Biochem. Parasitol.* 45, 109-119.
16. Soete, M., Fortier, B., Camus, D., Dubremetz, J.F. 1993. *Toxoplasma gondii*: kinetics of bradyzoites-tachyzoite interconversion in vitro. *Exp. Parasitol.* 76, 259-264.
17. Soete, M., Camus, D., Dubremetz, J.F. 1994. Experimental induction of bradyzoite-specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii* in vitro. *Exp. Parasitol.* 78, 361-370.
18. Tunev, S.S., McAllister, M.M., Anderson-Sprecher, R.C., Weiss, L.M. 2002. *Neospora caninum* in vitro: evidence that the destiny of a parasitophorous vacuole depends on the phenotype of the progenitor zoite. *J. Parasitol.* 88, 1095-1099.
19. Vonlaufen, N., Gianinazzi, C., Müller, N., Simon, F., Bjorkman, C., Jungi, T.W., Leib, S.L., Hemphill, A. 2002a. Infection of organotypic slice cultures from rat central nervous tissue with *Neospora caninum*: an alternative approach to study host-parasite interactions. *Int. J. Parasitol.* 32, 533-542.
20. Vonlaufen, N., Müller, N., Keller, N., Naguleswaran, A., Bohne, W., McAllister, M.M., Bjorkman, C., Muller, E., Caldelari, R., Hemphill, A. 2002b. Exogenous nitric oxide triggers *Neospora caninum* tachyzoite-to-bradyzoite stage conversion in murine epidermal keratinocyte cell cultures. *Int. J. Parasitol.* 32, 1253-1265.
21. Weiss, L.M., Laplace, D., Takvorian, P.M., Tanowitz, H.B., Cali, A., Wittner, M. 1995. A cell culture system for study of the development of *Toxoplasma gondii* bradyzoites. *J. Eukaryot. Microbiol.* 42, 150-157.
22. Weiss, L.M., Ma, Y.F., Takvorian, P.M., Tanowitz, H.B., Wittner, M. 1998. Bradyzoite development in *Toxoplasma gondii* and the hsp70 stress response. *Infect. Immun.* 66, 3295-3302.
23. Weiss, L.M., Ma, Y.F., Halonen, S., McAllister, M.M., Zhang, Y.W. 1999. The in vitro development of *Neospora caninum* bradyzoites. *Int. J. Parasitol.* 29, 1713-1723.
24. Yahiaoui, B., Dzierszynski, F., Bernigaud, A., Slomianny, C., Camus, D., Tomavo, S. 1999. Isolation and characterization of a subtractive library enriched for developmentally regulated transcripts expressed during encystation of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 30, 223-235.