

Desarrollo in vitro de *Eimeria ninakohlyakimovae* en células endoteliales primarias procedentes de venas umbilicales caprinas

Pérez, D. (1); Hermosilla, C. (2,3); Taubert, A. (2); Muñoz, M. C. (1); Molina, J. M. (1); Gracia, A. (1); Matos, L. (1); López, A. (1); Guedes, A. (1); Ruiz, A. (1*)

(1) Departamento de Patología Animal, Producción Animal, Bromatología y Tecnología de los alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Gran Canaria, España

(2) Institute of Parasitology, Justus Liebig University Giessen, Giessen, Germany

(3) Department of Pathology and Infectious Diseases, Royal Veterinary College, London, UK

IN VITRO DEVELOPMENT OF *EIMERIA NINAKOHLIYAKIMOVAE* IN PRIMARY ENDOTHELIAL CELLS DERIVED FROM CAPRINE UMBILICAL VEINS

RESUMEN: Las infecciones con *E. ninakohlyakimovae* representan una de las más importantes enfermedades producidas por coccidios en las cabras, afectando severamente a la salud animal y rentabilidad de la industria del caprino. Para el desarrollo de estrategias básicas en vacunación a nivel de investigación, es necesario el establecimiento de cultivos *in vitro* que garanticen la disponibilidad del material parasitario. Con esta finalidad, diferentes cultivos de células endoteliales primarias aisladas de venas umbilicales caprinas se expusieron a infecciones con esporozoítos vivos de *E. ninakohlyakimovae*. Los parásitos invadieron este tipo celular desarrollando macroesquizontes (primera esquizogonia) y generaron merozoítos, que posteriormente fueron liberados al medio de cultivo. El desarrollo completo del ciclo biológico de *E. ninakohlyakimovae*, incluyendo la segunda fase de esquizogonia y la gametogonia - con producción de ooquistes - no fue posible en el sistema *in vitro* utilizado. El establecimiento del sistema *in vitro* para el cultivo y mantenimiento continuado de macroesquizontes de *E. ninakohlyakimovae* conseguido en el presente estudio posibilitaría la producción masiva de merozoítos I para estudios básicos sobre interacciones parásito/hospedador en células endoteliales o para la investigación de dienas terapéuticas que pudieran ser de utilidad en la industria farmacéutica.

Palabras clave: *Eimeria ninakohlyakimovae*. Células endoteliales caprinas. Merozoítos.

SUMMARY: *Eimeria ninakohlyakimovae*-infections represent important coccidian parasitosis of goats severely affecting the animal health and the profitability of goat industry. For the development of suitable vaccination strategies basic research is needed for which one important prerequisite is the establishment of *in vitro* cultures guaranteeing the availability of parasitic material. With this objective, different cultures of primary endothelial cells isolated from caprine umbilical veins were exposed to infections with *E. ninakohlyakimovae* viable sporozoites. The parasites invaded the endothelial cells, developed macromeronts (first schizogony) and produced the subsequent release of viable merozoites I. The complete life-cycle of *E. ninakohlyakimovae* leading to oocyst production was not accomplished in this *in vitro* system. The establishment of a suitable *in vitro* systems for the culture of *E. ninakohlyakimovae* macromeronts achieved in the present study would permit the mass production of merozoites I, e. g. for basic studies on parasite/host endothelial cell interactions or for pharmaceutical screenings.

Key words: *Eimeria ninakohlyakimovae*. Caprine endothelial cells. Merozoites.

(*) Correspondencia

Antonio Ruiz Reyes (Unidad de Parasitología)

Tf. 928 451113

Fax: 928 454341

Email: aruiz@dpat.ulpgc.es

Introducción

Eimeria ninakohlyakimovae es un enteropatógeno Apicomplexa intracelular muy extendido en cabras que origina una grave enterocolitis hemorrágica con más del 30 % de mortalidad en baiños (19). Dependiendo de la región, más del 96% de los baiños de entre 4-10 semanas podrían estar afectados (27). La clínica de la coccidiosis producida por *E. ninakohlyakimovae* está influenciada por diferentes factores como la intensificación de la producción, el estado inmune de los animales, la edad o las condiciones climáticas e higiénicas de las explotaciones (27). Especialmente, en zonas rurales semi-áridas que dependen económicamente de la cría de ganado caprino, como las Islas Canarias (España) u otras zonas de África o el Oriente Medio que presentan condiciones climáticas análogas, la coccidiosis caprina afecta gravemente a la salud animal y a la rentabilidad de la industria caprina. Por tanto, investigaciones básicas que permitan en el futuro el desarrollo de vacunas o nuevas dianas terapéuticas para el control de esta enfermedad parasitaria sería de gran interés.

El desarrollo endógeno del protozoo intracelular obligado comprende dos merogonias, la primera tiene como resultado la formación de macroesquizontes de gran tamaño (hasta 166 x 124 micras) (36). Específicamente, los macroesquizontes se desarrollan en las células endoteliales de los capilares linfáticos centrales en las vellosidades del íleon distal dentro de los 10-12 días postinfección (p.i.), y contienen más de 100.000 merozoítos I (36). Mucho más pequeños son los merontes de segunda generación (17 x 12 micras) que se desarrollan en células epiteliales de las criptas del ciego y colon (36). Ocasionalmente, esquizontes y ooquistes de *E. ninakohlyakimovae* también se han observado en las células epiteliales de los conductos biliares en el hígado, y se ha descrito

como una causa de la coccidiosis hepática en cabras (6, 21).

Las infecciones de *Eimeria* son altamente específicas de cada hospedador y las reacciones inmunológicas que inducen en el animal se aceptan como especie-específicas (25), también a nivel de las células hospedadoras (7). Por tanto, sería esencial que la investigación básica en coccidiosis caprina esté desarrollada en una especie precisa de *Eimeria* y en un determinado tipo de célula hospedadora. Por otro lado, para este tipo de investigación, y para cualquier otra en la que se use material parasitario específico, la adecuación de un sistema *in vitro* representa un requisito previo importante. Este tipo de sistema *in vitro* no existe para ninguna especie de *Eimeria* caprina, aunque sí se han establecido para *Eimeria* spp. aviares (1, 4, 14, 18), *Eimeria* spp. murinas (9) y la especie *E. bovis* (11, 13, 15, 24, 30, 31, 32). Algunos de estos sistemas *in vitro*, sin embargo, utilizan tipos celulares que se diferencian de las células hospedadoras específicas de los esporozoítos *in vivo*, por lo que podrían reflejar sólo en parte el espectro de respuestas. De hecho, la mayoría de las especies patógenas de *Eimeria* en rumiantes (por ejemplo *E. bovis*, *E. zuernii*, *E. bakuensis*, *E. arloingi*, *E. christenseni*, *E. ninakohlyakimovae*) difieren de las infecciones de ratón y aves con respecto a la especificidad del esporozoíto en las células endoteliales hospedadoras *in vivo*, la formación de macroesquizontes y en la extensión del tiempo de replicación.

El objetivo de esta investigación fue crear un sistema *in vitro* para el patógeno caprino *E. ninakohlyakimovae* que permitiese la producción de material parasitario específico. Para ello, se infectaron células primarias endoteliales de vena umbilical caprina (CUVEC) con esporozoítos, evaluándose la formación de macroesquizontes, la duración del desarrollo y la producción de merozoítos viables *in vitro*.

Materiales y métodos

1. Animales

Los cabritos fueron comprados a un granjero local a la edad de 1-7 días y se trataron con Vecoxan® (Labs. Esteve) y Halocur® (Intervet) para minimizar el riesgo de infección con coccidios. Cuando se consideraron libres de coccidios se ubicaron en jaulas de hierro galvanizado esterilizadas por calor en condiciones que previniesen las infecciones por parásitos. Los cabritos se alimentaron con lactoreemplazante (Bacilactol, Capisa) y concentrados comerciales (Capisa). Recibieron agua y heno estéril *ad libitum*.

2. Mantenimiento del parásito

La cepa de *E. ninakohlyakimovae* GC utilizada en el presente estudio fue aislada por primera vez en Gran Canaria a partir de cabras infectadas de forma natural, y es regularmente mantenida por pases en cabritos. Los ooquistes de *E. ninakohlyakimovae* utilizados inicialmente para la obtención de la cepa se aislaron de las heces a partir de flotaciones con CINa mediante el uso de un micromanipulador (Olympus IMT-2). Para la producción de ooquistes, los cabritos donantes se infectaron vía oral a la edad de cuatro semanas con 2×10^5 ooquistes esporulados de *E. ninakohlyakimovae*. Los ooquistes se suspendieron en dicromato potásico al 2 % (p/v) y se mantuvieron a temperatura ambiente para su esporulación durante una semana (15). Los ooquistes esporulados se almacenaron a 4 °C hasta su posterior uso. La exquisitación y la purificación de los esporozoítos se realizó por el método modificado propuesto por Fayer y Hammond (11). En resumen, los ooquistes esporulados se suspendieron en una solución estéril 0,02 M de L-Cisteína HCl/0,2 M NaHCO₃ (Merck), y se incubaron a 37 °C durante 20 minutos en una atmósfera

de CO₂ al 100%. Posteriormente, los ooquistes se suspendieron en solución salina equilibrada de Hank (HBSS; Gibco) con un 0,4% (p/v) de tripsina (Sigma-Aldrich) y un 8% (v/v) de bilis caprina esterilizada por filtración y obtenida del Matadero Insular de Gran Canaria, y se incubaron bajo control microscópico a 37 °C en una atmósfera del 5% CO₂ hasta un máximo de 4 h.

Los esporozoítos exquistados se lavaron tres veces (20 min, 1.100 x g) y se suspendieron en medio de cultivo (1 x 10⁵ esporozoítos /ml) o en medio de cultivo con un 10% de dimetilsulfóxido (Merck) para la criopreservación en nitrógeno líquido y su posterior uso.

3. Células hospedadoras

Las células endoteliales de las venas umbilicales primarias caprinas (CUVEC) se aislaron de venas de cordón umbilical (12). Los cordones umbilicales se recogieron bajo condiciones asépticas de animales nacidos de parto natural y se mantuvieron a 4 °C en solución tampón HBSS-HEPES al 0,9% (pH 7,4; Gibco) suplementada con un 1% de penicilina (500 U/μl; Sigma-Aldrich) y estreptomycin (50 μl/μg; Sigma) hasta su uso. Para el aislamiento de las células endoteliales, la vena umbilical se ligó, posteriormente se infundió en su luz colagenasa tipo II al 0,025% (Worthington Biochemical Corporation) suspendida en solución salina PSAC (Sigma- Aldrich), y se incubó a 37 °C durante 20 minutos en atmósfera de CO₂ al 5%. Después de un suave masaje de la vena umbilical, la suspensión de células y colagenasa se recogieron y se añadió 1 ml de suero fetal bovino (FCS, Gibco) para inactivar la colagenasa. Después de dos lavados (400 x g, 10 min, 4 °C), las células se suspendieron en medio de crecimiento completo de células endoteliales (ECGM; PromoCell) y se dispensaron en botellas de cultivo de plástico de 25 cm² (Nunc), que se

mantuvieron a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5%. A los diferentes aislados de CUVEC se le añadió nuevo medio completo ECGM (PromoCell) un día después de su aislamiento y, posteriormente, cada 2-3 días. Las células que se utilizaron para la infección fueron monocapas 100% confluentes de no más de 1-2 pases *in vitro*.

Para prevenir la contaminación por *Mycoplasma* spp., que representa un problema común en los cultivos de células primarias de origen caprino, los cultivos CUVEC fueron tratados con Plasmocin (Amaxa Biosystems) desde el momento del aislamiento.

4. Infección de las células hospedadoras

Las capas de células CUVEC confluentes se infectaron con 3 x 10⁵ esporozoítos de *E. ninakohlyakimovae* recién exquistados por botella de 25 cm². El medio de cultivo se cambió 24 horas después de la infección y, posteriormente, cada tres días.

Para controlar el desarrollo a largo plazo de los esquizontes I y la liberación de merozoítos, los cultivos celulares infectados se analizaron diariamente durante un periodo de 22 días posteriores a la infección. Con este fin se utilizó un vídeo-microscopio de contraste de fases (DMIRB, Leica). Para los análisis cuantitativos, se determinó el número total de esquizontes (inmaduros y maduros) desarrollado por botella de cultivo de 25 cm² y los resultados se expresaron como el porcentaje de la cantidad de esporozoítos añadidos inicialmente al cultivo.

Además, se midieron esquizontes seleccionados al azar (n=15/botella), a los 10, 13, 16, 19 y 22 días p.i., usando el software micro-analizador Carl Zeiss 4.7. Los merozoítos I de *E. ninakohlyakimovae* maduros liberados al medio se recogieron a intervalos de dos días (15) y se contaron en cámara de Neubauer. Además, se hicieron intentos para detectar el desarrollo de *E. ninakohlyakimovae* más

allá de la primera generación de esquizontes. Dado que los preparados de esporozoítos siempre estaban contaminados con un pequeño número de ooquistes no esporulados, estas contaminaciones fueron minuciosamente cuantificadas en las botellas de cultivo y posteriormente se tomaron en consideración. Los cultivos de CUVEC se infectaron con merozoítos I viables de *E. ninakohlyakimovae* (1 x 10⁶/ 25 cm² botellas de cultivo), cambiándose el medio de cultivo a las 24 horas después de la exposición y, posteriormente, cada tres días. Para controlar el desarrollo de esquizontes II de *E. ninakohlyakimovae*, el desarrollo de gamontes y la producción de ooquistes, los cultivos celulares infectados se analizaron todos los días durante una semana.

Resultados

1. Motilidad de esporozoítos de *E. ninakohlyakimovae* e invasión de las células hospedadoras

La exquistación de los esporozoítos de los ooquistes esporulados fue exitosa y resultó en esporozoítos viables. Después de la exposición a las células hospedadoras potenciales, los esporozoítos mostraron movimientos típicos y deslizamiento sobre la superficie de las CUVEC. La tasa de infección inicial observada fue del 11,2 %. El tiempo de invasión de las células endoteliales fue variable, no extendiéndose más allá de los 30 minutos desde la aplicación de los esporozoítos.

2. Desarrollo primario intracelular

Después de la invasión, los esporozoítos intracelulares de *E. ninakohlyakimovae* generalmente se encontraron cerca del núcleo (Fig. 1C, D). Se observó que los esporozoítos intracelulares, con relativa frecuencia, abandonaban la célula hospedadora al principio invadida sin perjudicarla visiblemente, para infectar una nueva

dentro de las primeras 48 horas de infección. Un día después de la infección, generalmente, los esporozoítos habían cambiado su forma, volviéndose más cortos y un poco más grandes que los esporozoítos libres.

El tamaño promedio de los esporozoítos libres fue de 12,5 x 3,0 micras (n=20), mientras que los esporozoítos intracelulares presentaron un tamaño promedio de 10,3 x 4,1 micras (n=20) (Fig. 1A). Se observaron infecciones múltiples en algunas células, en las cuales pudieron encontrarse hasta cuatro esporozoítos al mismo tiempo. No todos los esporozoítos llegaron a desarrollarse; una proporción bastante alta de esporozoítos intracelulares se mantuvo invariable en forma y tamaño dentro de la célula huésped, algunos de los cuales salieron y volvieron a invadir otras células huésped más adelante.

En el día 3-4 p.i., los esporozoítos que mostraron un mayor desarrollo se habían reducido en longitud y se habían redondeado para formar trofozoítos (Fig. 1B). Todas las formas evolutivas intracelulares del parásito estaban rodeadas por una vacuola parasitófora, una estructura que muchas veces era apenas perceptible.

3. Formación de macroesquizontes

Desde los primeros 5-6 días en adelante, las formas intracelulares del parásito fueron aumentando continuamente su tamaño, desarrollándose en esquizontes inmaduros (Fig. 1 C-D) y maduros I (Fig. 1 E-H). El porcentaje de macroesquizontes desarrollado fue del 2 %, y el diámetro medio fue de $155,5 \pm 10,8$ micras (Fig. 2).

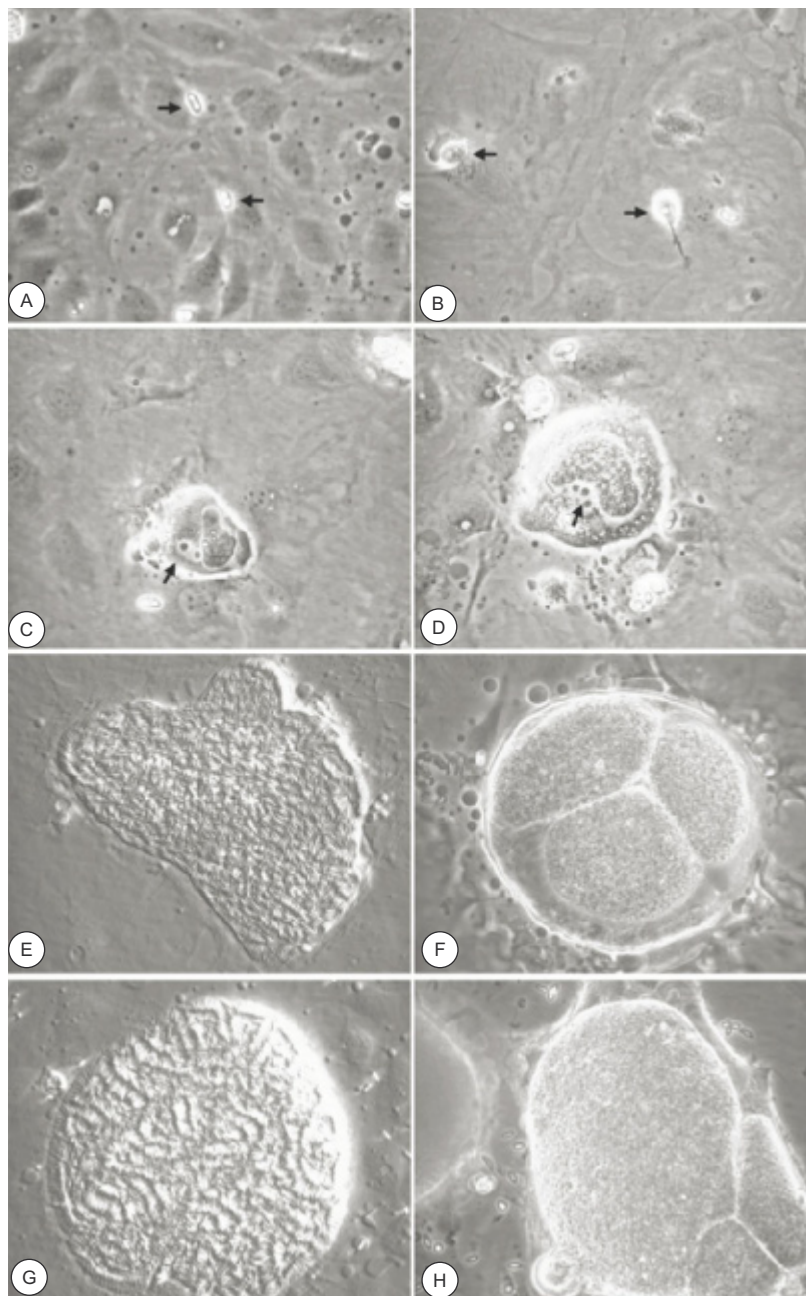
Se observó que en los macroesquizontes maduros los merozoítos se situaban principalmente en la periferia (Fig. 3A), agrupados en forma de roseta (Fig. 3B) o de forma irregular (Fig. 3C). Además, los esquizontes podían estar septados o no (Fig. 3D). En general, las células hospedadoras infectadas mostraron un cambio en la morfología del núcleo en el curso de la infección. A partir de los siete días

se observó una constante hipertrofia del núcleo, el cual adquiría la forma de un “huevo frito”, en el que era manifiesto un gran punto negro central que representa el nucleolo y una brillante y amplia proporción de cromatina alrededor (ver Fig. 1C, 1D); por el contrario, el núcleo de las células no infectadas mostró la eucromatina bastante marcada. Normalmente

se observó sólo un núcleo por célula infectada, pero también hubo CUVEC parasitadas con varios núcleos.

4. Lanzamiento de la primera generación de merozoítos

Los merozoítos libres de primera generación en el sobrenadante de las

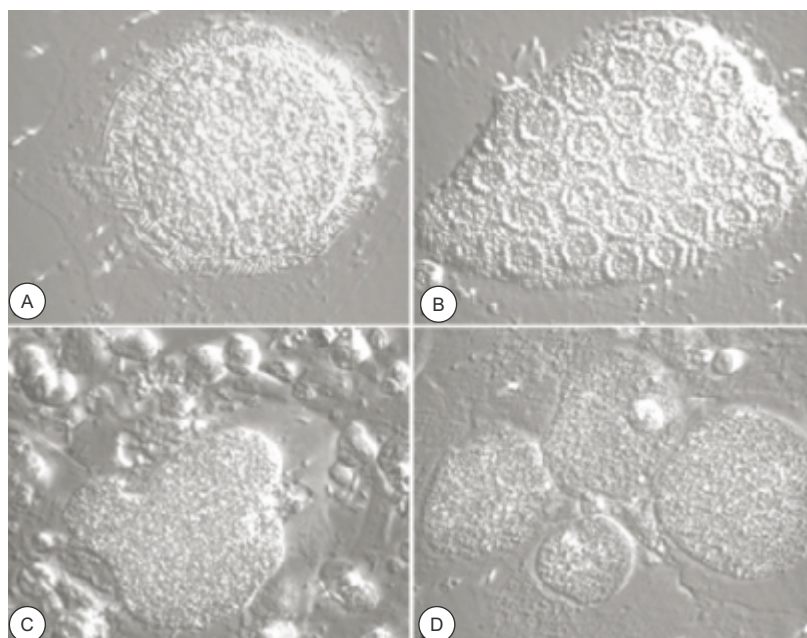
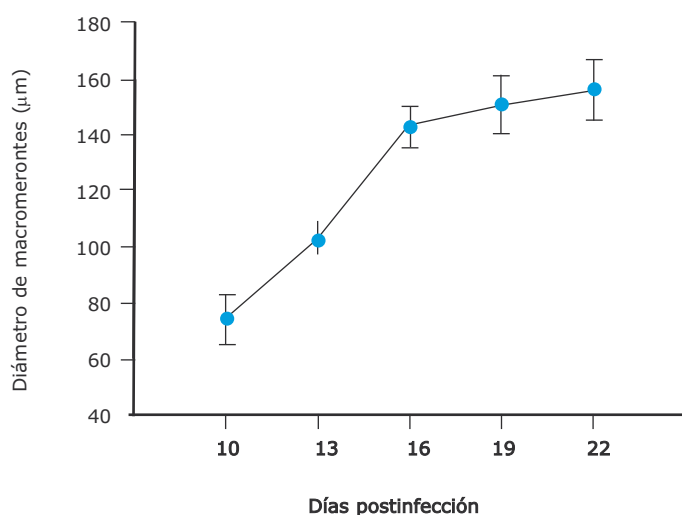


▲ **Figura 1. Infección y desarrollo de *Eimeria ninakohlyakimovae* en CUVEC.** Las CUVEC crecieron hasta ser confluentes y se infectaron con esporozoítos recién aislados de *E. ninakohlyakimovae*. La infección y el desarrollo fueron monitorizados diariamente hasta los 22 días post-infección (p.i.). (A) Día 1 p.i., los esporozoítos intracelulares se indican con flechas; (B) día 4 p.i., los trofozoítos se indican con flechas; (C) día 7 p.i.; (D) día 10 p.i.; (E) día 13 p.i.; (F) día 16 p.i.; (G) día 19 p.i., esquizontes maduros e inmaduros; (H) día 22 p.i., liberación de merozoítos I.

células fueron detectados a los 13 días post-infección. El número de merozoítos liberado (ver Fig. 1G-H y Fig. 3) se incrementó el día después de su pri-

mera aparición. El rendimiento total de merozoítos, a una dosis de infección de 3×10^5 esporozoítos, durante el día 22 de muestreo fue de $1,4 \times 10^6$.

Figura 2. Tamaño de merontes I de *Eimeria ninakohlyakimovae* en CUVEC. Las CUVEC crecieron hasta ser confluentes y se infectaron con esporozoítos recién aislados de *E. ninakohlyakimovae* ($3 \times 10^5/25\text{cm}^2$ flask). Los diámetros de los merontes I durante la infección *in vitro* se estimaron utilizando el software micro-analizador Carl Zeiss 4.7.



▲ **Figura 3.** Diferencias morfológicas entre los macromerontes de *Eimeria ninakohlyakimovae*. Las células hospedadoras crecieron hasta ser confluentes y se infectaron con esporozoítos recién aislados de *E. ninakohlyakimovae*. Se observaron diferencias en la morfología de los macromerontes maduros: (A) merontes con merozoítos I dispuestos en la periferia; (B) merontes con merozoítos I agrupados en varias rosetas; (C) merontes no estructurados con merozoítos I distribuidos de forma difusa; (D) merontes con una clara compartimentación en su interior.

5. Desarrollo de esquizontes de segunda generación, gamontes y ooquistes

En el periodo de investigación no se observó en las células hospedadoras el desarrollo de esquizontes de segunda generación, gamontes ni ooquistes.

Discusión

En esta investigación hemos establecido con éxito un sistema de cultivo *in vitro* para la resolución de la generación de merozoítos I de *E. ninakohlyakimovae*. *In vivo*, la fase de esporozoítos de este protozoo se desarrolla de forma selectiva en las células endoteliales, principalmente de los vasos linfáticos centrales del íleon. En los experimentos realizados se observó que los esporozoítos de *E. ninakohlyakimovae* salían de las células hospedadoras infectadas y producían una nueva invasión con relativa frecuencia en las primeras 48 horas. Teniendo en cuenta que la capacidad de salida de las células hospedadoras infectadas ha sido publicada en esporozoítos de otras especies de *Eimeria* (8, 2, 3, 15) y que los esporozoítos intracelulares con frecuencia se han encontrado sin una vacuola parasitófora en el citoplasma, poco después de la invasión, tanto *in vivo* como *in vitro* (5, 8), esta capacidad de atravesar las células se podría considerar como una característica común en Coccidios. Microscópicamente, se observó que este tipo de salida no se asocia con graves daños en la célula hospedadora que es abandonada, un dato que previamente había sido publicado para la salida dependiente de Ca^{++} de *Toxoplasma gondii* (10, 33). Más bien, se asemeja al proceso de invasión alternativa publicada en *Plasmodium falaparum* (22, 23) y esporozoítos de *E. bovis* (2), que se basa en la rotura, invasión y salida de las células hospedadoras, seguida de una reparación rápida de la membrana plasmática de la célula.

Podría especularse que este modo de migración a través de las células

reflejaría la necesidad de atravesar las barreras de los tejidos para llegar a la célula hospedadora final. De hecho, todavía no se sabe cómo los esporozoítos de *E. ninakohlyakimovae* cruzan la capa epitelial para invadir el endotelio central del íleon. Esta característica podría explicar la no especificidad de la invasión de la célula hospedadora y que pudieran verse afectadas ocasionalmente células epiteliales de los conductos biliares (6, 21).

Los macroesquizontes de *E. ninakohlyakimovae* muestran morfologías diferentes incluso dentro de la misma capa de células. Además de distintos tamaños, también se describen diferentes tipos morfológicos, incluyendo macroesquizontes con merozoítos dispuestos en la periferia, en roseta y de forma no estructurada. Idéntico fenómeno se observa en cultivos *in vitro* de *E. bovis*, pero la base celular de este fenómeno no se conoce en este momento.

Posiblemente, los primeros 7 días p.i. son los que marcan el inicio de la proliferación; los cambios en la morfología del núcleo pasan a ser más evidentes, tomando un fenotipo que se denomina "tipo huevo frito", es decir, se produce un aumento de la proporción de la eucromatina, que se expande en casi la totalidad del núcleo, mientras que los nucleolos crecen y se unen para formar bien nucleolos grandes simples o múltiples.

El nucleolo es el sitio para el procesamiento de ARNr y el montaje en subunidades del ribosoma, por lo que los cambios morfológicos de los nucleolos indican que las células producen grandes cantidades de proteína. Además, el aumento de la transición de la heterocromatina a eucromatina indica una transcripción activa de la célula hospedadora. Dado que nunca se observó la división celular en las células hospedadoras infectadas con *E. ninakohlyakimovae*, es probable que estas características sean inducidas por los parásitos. Observaciones similares han sido

descritas en las células que albergan macroesquizontes de *E. bovis*, fenómeno acompañado por la activa transcripción de estas células como demuestra la creciente cantidad de ARNm medida por microarrays (35).

La disponibilidad de macroesquizontes de *E. ninakohlyakimovae in vitro* es de especial interés científico por varias razones: 1) La larga maduración de los macroesquizontes de *E. ninakohlyakimovae* dentro de las células endoteliales, consideradas muy inmuno-reactivas, sugiere que el parásito debe desarrollar diversos procesos de regulación con el fin de garantizar la replicación masiva. De acuerdo con esto, se ha demostrado que *E. bovis* parece capaz de modular activamente el citoesqueleto de la célula hospedadora (17), inhibe la apoptosis de las células hospedadoras (20) y regula negativamente reacciones tipo pro-inflamatorio en dichas células (16). 2) Existen evidencias de que las etapas de merozoítos de primera generación constituyen un objetivo importante para la protección de animales inmunes a *Eimeria* spp. (26, 28, 29, 34). 3) Los merozoítos I producidos por los cultivos *in vitro* podrían ser útiles para estudios farmacéuticos. 4) El sistema ofrece la garantía de accesibilidad a merozoítos I, que pueden ser necesarios para diferentes aplicaciones, tales como la preparación de diversos antígenos específicos del parásito.

En general, la cabra es un animal a menudo descuidado en lo que respecta a la fuente de investigación básica y clínica, aunque en determinadas zonas climáticas representa la única fuente económicamente viable de carne y leche. En consecuencia, el establecimiento de cultivos de *E. ninakohlyakimovae in vitro* constituye una valiosa herramienta básica para la investigación futura sobre la coccidiosis caprina.

Agradecimientos

Agradecemos a la Unidad de Reproducción de la Facultad de

Veterinaria de Las Palmas por ceder nos para este estudio sus instalaciones ubicadas en el IUSA, y a la Unidad de Producción (especialmente al Dr. Argüello y a la Dra. Castro) por facilitarnos la recogida de cordones umbilicales.

El presente trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología de España (MEC, proyecto nº AGL2007-63415) y los Fondos FEDER, así como por la ACIISI (SolSubC200801000244).

Bibliografía

1. Agustín, P. C. (1994) Establishment of a turkey caecal cell line and development of turkey coccidia withing the cells. Proc soc Exp Biol Med 206: 152-156.
2. Behrendt, J. H.; Clauss, W.; Zahner, H.; Hermosilla, C. (2004) Alternative mechanism of *Eimeria bovis* sporozoites to invade cells in vitro by breaching the plasma membrane. J Paasitol 90:1163-1165.
3. Behrendt, J. H.; Taubert, A.; Zahner, H.; Hermosilla, C. (2008) Studies on synchronous egress of coccidian parasites (*Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, *Eimeria bovis*) from bovine endothelial host cells mediated by calcium ionophore A23187. Vet Res Commun 32:325-332.
4. Bumstead, J. M.; Topham, S. J.; Tomley, F. M. (1998) Inhibition of the development of *Eimeria tenella* on cultured bovine kidney cells by a soluble factor produced by peripheral blood lymphocytes from immune chickens. Parasitology 117 (Pt 1): 39-47.
5. Chobotar, B.; Danforth, H. D.; Entzeroth, R. (1993) Ultrastructural observations of host-cell invasion by sporozoites of *Eimeria papillata in vivo*. Parasitol Res 79: 15-23.
6. Dai, Y. B.; Lin, M. C.; Zhang, S. X.; Fu, A. Q. (1991) Hepatic coccidiosis in the goat. Int J Parasitol 21: 381-382.

7. Dalloul, R. A.; Bliss, T. W.; Hong, Y. H.; Ben-Chovikha, I.; Park, D. W.; Keeler, C. L.; Lilleloj, H. S. (2007) Unique responses of the avian macrophage to different species of *Eimeria*. *Mol Immunol* 44:558-556.
8. Danforth, H. D.; Entzeroth, R.; Chobotar, B. (1992) Scanning and transmission electron microscopy of host cell pathology associated with penetration by *Eimeria papillata* sporozoites. *Parasitol Res* 78: 570-573.
9. Danforth, H. D.; Chobotar, B.; Entzeroth, R. (1984) Cellular pathology in mouse embryonic brain cells following in vitro penetration by sporozoites of *Eimeria papillata*. *Z Parasitenkd* 70: 165-171.
10. Endo, T.; Sethi, K. K.; Piekarski, G. (1982) *Toxoplasma gondii*: calcium ionophore A23187-mediated exit of trophozoites from infected murine macrophages. *Exp Parasitol* 53: 179-188.
11. Fayer, R.; Hammond, D. M. (1967) Development of first-generation schizonts of *Eimeria bovis* in cultured bovine cells. *J Protozool* 14: 764-772.
12. Jaffe, E. A.; Nachman, R. L.; Becker, C. G.; Minick, C. R. (1973) Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52: 2745-2756.
13. Hammond, D. M.; Fayer, R.; Miner, M. L. (1967) Further studies on *in vitro* development of *Eimeria bovis* and attempts to obtain second-generation schizonts. *J Protozool* 16: 298-302.
14. Heriveau, C.; Mier-Poisson, I.; Lowenthal, J.; Naciri, M.; Quere, P. (2000) Inhibition of *Eimeria tenella* replication after recombinant IFN-gamma activation in chicken macrophages, fibroblasts and epithelial cells. *Vet Parasitol* 92: 37-49.
15. Hermosilla, C.; Barbish, B.; Heise, A.; Kowalik, S.; Zahner, H. (2002) Development of *Eimeria bovis in vitro*: suitability of several bovine, human and porcine endothelial cell lines, bovine fetal gastrointestinal, Madin-Darby bovine kidney (MDBK) and African green monkey kidney (VERO) cells. *Parasitol Res* 88: 301-307.
16. Hermosilla, C.; Schröpfer, L.; Stowasser, M.; Eckstein-Ludwing, U.; Behrendt, J. H.; Zahner, H. (2008) Cytoskeletal changes in *Eimeria bovis*-infected host endothelial cells during first merogony. *Vet Res Commun*. 32: 521-531.
17. Hermosilla, C.; Zahner, H.; Taubert, A. (2006) *Eimeria bovis* modulates adhesion molecule gene transcription in and PMN adhesion to infected bovine endothelial cells. *Int J Parasitol* 36: 423-431.
18. Hofmann, J.; Raether, W. (1990) Improved techniques for the *in vitro* cultivation of *Eimeria tenella* in primary chick kidney cells. *Parasitol Res* 76: 479-486.
19. Koudela, B.; Bokova, A. (1998) Coccidiosis in goats in the Czech Republic. *Vet Parasitol* 76: 261-267.
20. Lang, M.; Kann, M.; Zahner, H.; Taubert, A.; Hermosilla, C. (2009) Inhibition of host cell apoptosis by *Eimeria bovis* sporozoites. *Vet Parasitol* 160: 25-33.
21. Mahmoud, O. M.; Haroun, E. M.; Sulman, A. (1994) Hepato-biliary coccidiosis in a dairy goat. *Vet Parasitol* 53: 15-21.
22. Mota, M. M.; Pradel, G.; Vanderberg, J. P.; Hafalla, J. C.; Frevort, U.; Nussenzweig, R. S.; Nussenzweig, V.; Rodriguez, A. (2001) Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science* 291: 141-144.
23. Mota, M. M.; Rodriguez, A. (2001) Migration through host cells by apicomplexan parasites. *Microbes Infect* 3: 1123-1128.
24. Reduker, D. Q.; Speer, C. A. (1986) Antigens of *in vitro*-produced first-generation merozoites of *Eimeria bovis* (Apicomplexa). *J Parasitol* 72: 782-785.
25. Rose, M. E. (1987) Immunity to *Eimeria* infections. *Vet Immunol Immunopathol* 17: 333-343.
26. Rose, M. E.; Hesketh, P.; Wakelin, D. (1992) Immune control of murine coccidiosis: CD4+ and CD8+ T lymphocytes contribute differentially in resistance to primary and secondary infections. *Parasitology* 105 (Pt 3): 349-354.
27. Ruiz, A.; Gonzalez, J. F.; Rodriguez, E.; Martin, S.; Hernandez, Y. I.; Almeida, R.; Molina, J. M. (2006) Influence of climatic and Management factor on *Eimeria* infections in goats from semi-arid zones. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 53: 399-402.
28. Shi, M.; Hurther, S.; Burkhardt, E.; Zahner, H. (2001) Lymphocyte subpopulations in the caecum mucosa of rats after infections with *Eimeria separata*: early responses in naive and immune animals to primary and challenge infections. *Int J Parasitol* 31:49-55.
29. Shi, M. Q.; Hurther, S.; Burkhardt, E.; Zahner, H. (2000) Immunity in rats against *Eimeria separata*: oocyst excretion, effects on endogenous stages and local tissue response after primary and challenge infections. *Parasitol Res* 86: 891-898.
30. Speer, C. A.; Hammond, D. M. (1973) Development of second-generation schizonts, gamonts and oocysts of *Eimeria bovis* in bovine kidney cells. *Z Parasitenkd* 42: 105-113.
31. Speer, C. A.; Reduker, D. W.; Burgess, D. E.; Whitmire, W. M.; Splitter, G. A. (1985) Lymphokine-induced inhibition of growth of *Eimeria bovis* and *Eimeria papillata* (Apicomplexa) in cultured bovine monocytes. *Infect Immun* 50: 566-571.
32. Speer, C. A.; Whitmire, W. M. (1989) Shedding of the immunodominant P20 surface antigen of

- Eimeria bovis* sporozoites. Infect Immun 57: 999-1001.
33. Stommel, E. W.; Ely, K. H.; Schwartzman, J. D.; Kasper, L. H. (1997) *Toxoplasma gondii*. Dithiol-induced Ca²⁺ flux causes egress of parasites from the parasitophorous vacuole. Exp Parasitol 87: 88-97.
34. Taubert, A.; Hermosilla, C.; Sühwold, A.; Zahner H (2008) Antigen-induced cytokine production in lymphocytes of *Eimeria bovis* primary and challenge infected calves. Vet Immunol Immunopathol 126: 309-320.
35. Taubert, A.; Wimmers, K.; Ponsuksili, S.; Jimenez, C. A.; Zahner, H.; Hermosilla, C. Microarray-based transcriptional profiling of *Eimeria bovis*-infected bovine endothelial host cells. Vet Res 2010, 41: 70.
36. Viera, L. S.; Lima, J. D.; Rosa, J. S. (1997) Development of *Eimeria ninakohlyakimovae* Yakimoff & Rastegaieff, 1930 emend. Levine, 1916 in experimentally infected goats (*Capra hircus*). J Parasitol 83: 1015-1018.