



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y  
DE LA SALUD ANIMAL

Obtención *in vitro* de *Anaplasma marginale* a partir de células nucleadas

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Gabriela Sarahí Luna Castro

TUTOR:

Sergio Darío Rodríguez Camarillo

COMITÉ TUTORAL:

Patricia Ramírez Noguera

Carlos Agustín Vega y Murguía

México DF., 2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIA

*A memoria del abuelo Lucino Castro González*

Este trabajo se lo dedico a mis padres, quienes forjaron mi carácter para terminar todos los retos que me proponga en la vida, me enseñaron a no elevar los pies del suelo y me dieron las herramientas necesarias para vivir.

También lo dedico a todas aquellas personas que estuvieron conmigo a lo largo de este proyecto:

A la familia Castro López,

A la familia Escobar Aquino,

A mis asesores,

A mis profesores,

A mis compañeros de laboratorio,

A mis amigos,

A mis compañeros de clase,

A mis mascotas, Mantra y Tugo

## AGRADECIMIENTOS

Becaria CONACyT N° de Registro 201473

Estudios parcialmente financiados por:

- 1.- Proyecto CONACyT – SAGARPA 2004-C01-71: Establecimiento del cultivo *in vitro* de *Anaplasma marginale* en células endoteliales de origen bovino
- 2.- Proyecto CONACyT N° 66872 “Identificación antigénica de *Anaplasma marginale* derivada del cultivo *in vitro*”

Muchas gracias a mis asesores: Dr. Sergio D. Rodríguez Camarillo, Dra. Patricia Ramírez Noguera y Dr. Carlos A. Vega y Murguía, por su tiempo, paciencia y dedicación, apoyándome en todo momento. Asimismo, agradezco a los doctores Miguel A. García Ortíz, J. Francisco Preciado de la Torre, Edmundo Rojas Ramírez Y Juan Joel Mosqueda Gualito (CENID-Pavet), por su ayuda tan valiosa. A mis profesores Francisco Montiel Sosa (FES-Cuautitlán) y Víctor Tenorio Gutiérrez (CENID-Microbiología), quienes fueron pieza clave para mi formación. A la Doctora Carmen Clapp del Instituto de Neurobiología de la UNAM por la donación de la línea celular de cordón umbilical.

A mis compañeros de laboratorio que me ayudaron a comprender cómo se maquila la ciencia en equipo: Carmen Castañeda, René Pérez, Lilia Montañez, Ivette Barrera y Laura Serrano.

A mi amiga Alma, quien ha sabido escucharme en los momentos más difíciles, a lo largo de 10 años. También a mi amigo Omar cuyos comentarios sarcásticos han sido siempre acertados; a Eduardo porque su perseverancia es un ejemplo a seguir y a Paty cuyo sentido de ver la vida es inspirador.

A Guillermo, por su comprensión, aún en los momentos menos agradables.

## DATOS BIOGRÁFICOS

La autora nació el primero de mayo de 1981 en Iztapalapa, DF, México. Su familia está conformada por su hermano Kevin Luna Castro y sus padres, Silvia Castro López y José Manuel Luna Millán.

Egresada del Colegio de Ciencias Humanidades plantel Azcapotzalco, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), ingresó a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ-UNAM) en la generación 1999-2003. El servicio social lo realizó en el laboratorio de Micología del departamento de Microbiología e Inmunología de esta Facultad. La tesis de licenciatura la llevó a cabo en el mismo laboratorio, bajo la línea de investigación de “enfermedades micóticas de los animales domésticos”, el título de la tesis fue: Aislamiento, identificación y conservación de levaduras aisladas de leche de vacas sanas o con mastitis clínica crónica.

Laboró durante 2 años como ayudante de profesor B en la FMVZ, UNAM. Al mismo tiempo, trabajó como Inspector Zoosanitario en el Programa de Movilización de Productos y Subproductos Agropecuarios en el Estado de México durante un periodo de 14 meses.

Ingresó al Programa de Posgrado de la FMVZ-UNAM nivel maestría en el año de 2005, concluyendo en el 2007, bajo el proyecto de “Establecimiento del cultivo *in vitro* de *Anaplasma marginale* en células endoteliales de origen bovino”.

## RESUMEN

La rickettsia *Anaplasma marginale* es el agente causal de la anaplasmosis bovina, enfermedad infecciosa no contagiosa, distribuida en trópico y subtrópico, transmitida por vectores y que se manifiesta con fiebre y anemia sin hemoglobinuria, causando pérdida de peso y ocasionalmente, la muerte. En México no hay vacunas comerciales eficaces, por ello, esta enfermedad origina estragos económicos en la producción pecuaria. Como una alternativa para el desarrollo de nuevas estrategias de prevención y control se plantea el uso de cultivo celular para la obtención *in vitro* de *A. marginale*. El propósito de este estudio fue establecer el cultivo *in vitro* en células nucleadas empleando como hospederos, estirpes celulares de córnea y cordón umbilical de bovino y de retina de mono. En su primera etapa, se determinaron, las características morfológicas y las condiciones óptimas de crecimiento de las líneas celulares, las cuales se inocularon posteriormente con *A. marginale* bajo diferentes metodologías, a partir de eritrocitos infectados obtenidos de bovinos esplenectomizados. Para demostrar la invasión de las células se usaron tinciones, detección genómica e inmunofluorescencia, con resultados negativos en todos los casos, tampoco se apreciaron efectos citopatológicos. Con la metodología de co-cultivo fue contundente el hecho de que *A. marginale* se preservó más tiempo en presencia de las células endoteliales, que únicamente con eritrocitos. Se inocularon bovinos susceptibles con material biológico de los cultivos, para la valoración de las constantes fisiológicas, presencia de parasitemia y cuantificación de inmunoglobulinas contra la rickettsia. No hubieron signos clínicos de anaplasmosis; en un bovino susceptible, inoculado con la línea de córnea co-cultivada con eritrocitos infectados, se incrementó el título de anticuerpos específicos contra *A. marginale*; sin embargo no hubo evidencia de infección en las células hospederas, por ende, no queda clara la participación del endotelio en este estudio *in vitro*.

Palabras clave: *Anaplasma marginale*, cultivo, líneas celulares endoteliales

## ABSTRACT

*Anaplasma marginale* is the causative agent of bovine anaplasmosis, a non contagious infectious disease, transmitted by various vectors and distributed in the tropics and subtropics. It curses with fever and anemia without hemoglobinuria, weight loss and occasionally death. In Mexico there are no effective vaccines commercially available, therefore, this disease causes considerable economic losses in livestock production. As an alternative for development new prevention tools and control strategies, the use of cell culture to obtain *A. marginale in vitro* has been suggested. The purpose of this study was to establish the *in vitro* culture procedure in nucleated cells, such as corneal and umbilical cord bovine cell lines and monkey retina, using them as as hosts. Initially, the morphological characteristics and the optimal conditions for growth of cell lines were identified. Those cell lines were subsequently inoculated under different procedures, with *A. marginale* from infected erythrocytes, which have been obtained from previously inoculated splenectomized cattle. Different staining methodologies, immunofluorescent antibody assays or genome detection tests were used in an attempt to demonstrate the invasion of cells. In all cases, only negative results were obtained and no cytopathic effects were observed; when the co-cultivation methodology was applied, it was blunt the fact that if endothelial cells are present, *A. marginale* can be preserved longer periods than cultivating infected erythrocytes alone. Susceptible cattle were inoculated with culture-derived biological material, and samples taken to monitor physiological variables, rickettsemia and, eventually, traces of immune response by quantifying immunoglobulins against the rickettsia. Animals did not show clinical signs of anaplasmosis. Even though one susceptible calf, inoculated with the cornea cell line co-cultivated with infected erythrocytes, showed an increase in antibody titer against *A. marginale* antigen, no evidence of infection in the cornea cells had been observed. Furthermore, endothelial cell lines involvement in *Anaplasma marginale* infection could not be clearly demonstrated in this *in vitro* study.

**Key words:** *Anaplasma marginale*, culture, endothelial cell lines.

I.

**Este trabajo de tesis fue realizado en el Laboratorio de Cultivos Celulares de la Unidad de Anaplasmosis del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, en Jiutepec, Morelos.**



# ÍNDICE

	<u>Página</u>
<b><u>LISTA DE CUADROS</u></b>	<b>XI</b>
<b><u>LISTA DE FIGURAS</u></b>	<b>XII</b>
<b><u>LISTA DE ABREVIATURAS</u></b>	<b>XIV</b>
<b><u>I. INTRODUCCIÓN</u></b>	<b>2</b>
1. <u>Marco teórico de referencia</u>	2
a. <u>Importancia de la anaplasmosis</u>	2
b. <u>Características de la anaplasmosis</u>	4
<b><u>II. REVISIÓN DE LA LITERATURA</u></b>	<b>9</b>
1. <u>El agente causal</u>	9
2. <u>Del proceso de infección por <i>Anaplasma marginale</i></u>	12
3. <u>Del cultivo celular de <i>Anaplasma marginale</i></u>	14
a. <u>Cultivo de <i>Anaplasma marginale</i> en eritrocitos</u>	16
b. <u>Cultivo de <i>Anaplasma marginale</i> en células de artrópodo</u>	22
c. <u>Cultivo de <i>Anaplasma marginale</i> en otro tipo de células</u>	24
1. <u>Justificación</u>	28
2. <u>Hipótesis</u>	28
a. <u>Objetivo General</u>	28
b. <u>Objetivos particulares</u>	28
<b><u>III. MATERIALES Y MÉTODOS</u></b>	<b>29</b>
1. <u>Animales experimentales</u>	29
2. <u>Cepas de <i>Anaplasma marginale</i></u>	29
3. <u>Líneas celulares</u>	29
4. <u>Cultivos celulares</u>	30
a. <u>Preparación de medios de cultivo</u>	30
b. <u>Condiciones de cultivo y mantenimiento de las líneas celulares</u>	31
c. <u>Proceso de criopreservación</u>	33
5. <u>Eritrocitos infectados</u>	34

a.	<a href="#">Obtención de eritrocitos infectados de bovinos donadores</a>	34
b.	<a href="#">Extracción de cuerpos iniciales de <i>Anaplasma marginale</i></a>	34
i.	<a href="#">Lisis de Ei por choque osmótico</a>	35
ii.	<a href="#">Lisis de Ei por choque osmótico con proteasas</a>	36
iii.	<a href="#">Lisis de Ei por ondas ultrasónicas</a>	36
iv.	<a href="#">Lisis de Ei sometidos a choque térmico</a>	36
v.	<a href="#">Lisis de Ei por tratamiento con saponina</a>	36
6.	<a href="#">Identificación del ácido desoxirribonucleico de <i>Anaplasma marginale</i></a>	37
a.	<a href="#">Extracción de ADN a partir de Ei</a>	37
b.	<a href="#">Extracción de ADN a partir de células nucleadas</a>	38
c.	<a href="#">Reacción en cadena de la polimerasa</a>	38
d.	<a href="#">Revelado del ADN mediante geles de agarosa</a>	39
7.	<a href="#">Ensayos Inmunológicos</a>	40
a.	<a href="#">Elaboración de suero hiperinmune</a>	40
i.	<a href="#">Protocolo de inoculación del bovino donador y colección de suero</a>	40
ii.	<a href="#">Concentración de Inmunoglobulinas</a>	40
iii.	<a href="#">Determinación de proteína</a>	41
iv.	<a href="#">Geles de acrilamida</a>	41
v.	<a href="#">Conjugación de Inmunoglobulinas con Isotiocianato de Fluoresceína</a>	42
b.	<a href="#">Ensayo Inmunoenzimático</a>	42
c.	<a href="#">Ensayos de Inmunofluorescencia</a>	44
i.	<a href="#">Preparación de antígeno a partir de eritrocitos infectados</a>	44
ii.	<a href="#">Preparación de antígeno a partir de células nucleadas</a>	44
iii.	<a href="#">Montaje de los antígenos</a>	44
iv.	<a href="#">Técnica de Inmunofluorescencia Directa</a>	44
v.	<a href="#">Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta</a>	45
8.	<a href="#">Ensayos de adaptación de las líneas celulares nucleadas</a>	45
a.	<a href="#">Ensayo de adaptación de BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub> a diferentes medios de cultivo</a>	45
b.	<a href="#">Cinética y longevidad de las líneas BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub> y BCE C/D-1b</a>	46
9.	<a href="#">Estudios de cultivo <i>in vitro</i> de <i>Anaplasma marginale</i> en líneas celulares nucleadas</a>	48
a.	<a href="#">Ensayo de inoculación de cultivos de células nucleadas con la cepa "Morelos" de <i>Anaplasma marginale</i>.</a>	48
b.	<a href="#">Ensayo de inoculación de cultivos de células nucleadas con la cepa "Tizimín" de <i>Anaplasma marginale</i></a>	48
i.	<a href="#">Tinción de Giemsa</a>	49
ii.	<a href="#">Tinción de Wright</a>	50
iii.	<a href="#">Tinción de naranja de Acridina (NA)</a>	50
iv.	<a href="#">Tinción de carboxi-metil rodamina (CMRA)</a>	50
v.	<a href="#">Extracción de ADN y PCR</a>	51
c.	<a href="#">Ensayo de tinciones de contraste supravital en las líneas celulares endoteliales expuestas a la infección por <i>Anaplasma marginale</i></a>	51
d.	<a href="#">Ensayo de co-cultivo de las líneas endoteliales con eritrocitos</a>	51
i.	<a href="#">Primera variante</a>	52
i.	<a href="#">Segunda variante</a>	52

e. <u>Ensayo de co-cultivo de células endoteliales y la cepa “Morelos” de <i>Anaplasma marginale</i> en matraces de 25cm<sup>2</sup></u>	53
<u>10. Estudios en bovinos inoculados con células endoteliales expuestas a <i>Anaplasma marginale</i> en condiciones <i>in vitro</i></u>	53
a. <u>Ensayo de inoculación con BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub> expuesta a <i>Anaplasma marginale</i></u>	53
b. <u>Ensayo de inoculación con BCE C/D 1-b expuesta a <i>Anaplasma marginale</i></u>	54
<b><u>IV. RESULTADOS</u></b>	<b>56</b>
<u>De la adaptación de las líneas celulares nucleadas</u>	56
a. <u>Adaptación de BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub> a diferentes medios de cultivo</u>	56
b. <u>Cinética y longevidad de las líneas BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub> y BCE C/D-1b</u>	57
<u>Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Anaplasma marginale</i> en líneas celulares nucleadas</u>	63
a. <u>Inoculación de células nucleadas con la cepa “Morelos” de <i>Anaplasma marginale</i>.</u>	63
b. <u>Inoculación de células nucleadas con la cepa “Tizimín” de <i>Anaplasma marginale</i></u>	70
i. <u>Tinción de Giemsa</u>	70
ii. <u>Tinción de Wright</u>	74
iii. <u>Tinción de naranja de Acridina</u>	74
iv. <u>Tinción de carboxi-metil rodamina</u>	74
v. <u>Extracción de ADN y PCR</u>	77
c. <u>Tinciones de contraste supravital en las líneas celulares endoteliales expuestas a la infección por <i>Anaplasma marginale</i></u>	77
d. <u>Co-cultivo de las líneas endoteliales con eritrocitos</u>	81
i. <u>Primera variante</u>	81
ii. <u>Segunda variante</u>	81
e. <u>Co-cultivo de células endoteliales y la cepa “Morelos” de <i>Anaplasma marginale</i> en matraces de 25cm<sup>2</sup></u>	88
<u>Estudios en bovinos inoculados con células endoteliales expuestas a <i>Anaplasma marginale</i> en condiciones <i>in vitro</i></u>	88
a. <u>Inoculación con BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub> expuesta a <i>Anaplasma marginale</i></u>	88
b. <u>Inoculación con BCE C/D 1-b expuesta a <i>Anaplasma marginale</i></u>	88
<b><u>V. DISCUSIÓN GENERAL</u></b>	<b>92</b>
<b><u>VI. CONCLUSIONES</u></b>	<b>96</b>
<b><u>VII. PERSPECTIVAS</u></b>	<b>97</b>
<b><u>VIII. LITERATURA CITADA</u></b>	<b>98</b>
<b><u>IX. APÉNDICES</u></b>	<b>115</b>
<u>1. Composición de los medios de cultivo</u>	115

<u>2.</u>	<u>Composición de reactivos:</u>	117
a.	<u>Solución Tris-Acetato-EDTA (TAE) al 0.5x pH 8.0</u>	117
b.	<u>Solución Amortiguadora "A" pH 6.8</u>	117
c.	<u>Solución Amortiguadora pH 8.8</u>	117
d.	<u>Solución Amortiguadora pH 6.8</u>	117
e.	<u>Solución Amortiguadora de Carbonatos pH 9.5</u>	117
f.	<u>Solución Amortiguadora de Carbonatos pH 9.6</u>	117
g.	<u>Solución de Tween 20 al 0.5% (v/v)</u>	118
h.	<u>Solución Tris -hidroxi metil amino metano (TRIS) 100mM pH 9.5</u>	118
i.	<u>Glicerina fosfatada</u>	118
<u>3.</u>	<u>Monitoreo de los animales experimentales</u>	119

## LISTA DE CUADROS

Nº Cuadro	Título	<u>Página</u> <u>a</u>
1	Variables ensayadas en cultivos estacionarios de suspensiones de eritrocitos infectados con <i>Anaplasma marginale</i> cepa "Texcoco" en placas de cultivo incubados a 37 °C en condiciones microaerofílicas.	25
2	Cambio gradual en cada pase de los porcentajes de los medios de cultivo en el ensayo de adaptación	57
3	Total de células endoteliales no adheridas, recuperadas en el sobrenadante, durante la fase uno	71
4	Total de células endoteliales no adheridas, recuperadas en el sobrenadante, durante la fase dos	71

## LISTA DE FIGURAS

N° Figura	Título	<u>Página</u>
1	<u><i>Anaplasma marginale</i></u> en su hospedero natural, el eritrocito de bovino	13
2	Ciclo de transmisión de <u><i>Anaplasma marginale</i></u>	19
3	Protocolo del ensayo de cinética empleado para las líneas celulares endoteliales BUVEC E <sub>6</sub> E <sub>7</sub> y BCE C/D-1b	57
4	Protocolo del ensayo de longevidad empleado para las líneas celulares endoteliales BUVEC E <sub>6</sub> E <sub>7</sub> y BCE C/D-1b	58
5	Distribución de los grupos experimentales de las líneas BUVEC E <sub>6</sub> E <sub>7</sub> y BCE C/D 1-b co-cultivadas con <u><i>Anaplasma marginale</i></u>	66
6	Rendimiento celular obtenido del ensayo de adaptación de la línea celular endotelial BUVEC E <sub>6</sub> E <sub>7</sub> a diferentes medios de cultivo, expresado en células/ml	69
7	Rendimiento celular a lo largo de 144 horas del estudio de cinética de la línea celular endotelial BUVEC E <sub>6</sub> E <sub>7</sub> , expresado en células/ml	70
8	Rendimiento celular a lo largo de 144 horas del estudio de cinética de la línea celular endotelial BCE C/D-1b, expresado en células/ml	71
9	Rendimiento celular a lo largo de 144 horas del estudio de longevidad de la línea celular endotelial BUVEC E <sub>6</sub> E <sub>7</sub> , expresado en células/ml	72
10	Rendimiento celular a lo largo de 144 horas del estudio de cinética de la línea celular endotelial BCE C/D-1b, expresado en células/ml	73
11	Línea celular nucleada BUVEC E <sub>6</sub> E <sub>7</sub> inoculada con la cepa “Morelos” de <u><i>Anaplasma marginale</i></u>	75
12	Línea celular nucleada RF/6A inoculada con la cepa “Morelos” de <u><i>Anaplasma marginale</i></u>	76
13	Línea celular nucleada BCE C/D 1-b inoculada con la cepa “Morelos” de <u><i>Anaplasma marginale</i></u>	77
14	Rendimiento celular de la línea endotelial BUVEC E <sub>6</sub> E <sub>7</sub> inoculada con la cepa “Morelos” de <u><i>Anaplasma marginale</i></u> , expresado en células/ml	78
15	Rendimiento celular de la línea endotelial RF/6A inoculada con la cepa “Morelos” de <u><i>Anaplasma marginale</i></u> , expresado en células/ml	79
16	Rendimiento celular de la línea endotelial BCE C/D 1-b inoculada con la cepa “Morelos” de <u><i>Anaplasma marginale</i></u> , expresado en células/ml	80
17	Línea celular nucleada BUVEC E <sub>6</sub> E <sub>7</sub> inoculada con la cepa “Tizimín” de <u><i>Anaplasma marginale</i></u>	82
18	Rendimiento celular de la línea endotelial BUVEC E <sub>6</sub> E <sub>7</sub> inoculada con la cepa “Tizimín” de <u><i>Anaplasma marginale</i></u> , expresado en	83

	células/ml	
19	Tinción de Giemsa de la línea celular nucleada BUVEC E <sub>6</sub> E <sub>7</sub> inoculada con la cepa "Tizimín" de <i>Anaplasma marginale</i>	84
20	Tinción de Wright de la línea celular nucleada BUVEC E <sub>6</sub> E <sub>7</sub> inoculada con la cepa "Tizimín" de <i>Anaplasma marginale</i>	86
21	Tinción de Naranja de Acridina (NA) de la línea celular nucleada BUVEC E <sub>6</sub> E <sub>7</sub> inoculada con la cepa "Tizimín" de <i>Anaplasma marginale</i>	87
22	Tinción de carboxi-metil-rodamina (CMRA) de la línea celular nucleada BUVEC E <sub>6</sub> E <sub>7</sub> inoculada con la cepa "Tizimín" de <i>Anaplasma marginale</i>	89
23	Electroforesis en gel de agarosa al 1% del PCR realizado a células endoteliales BUVEC expuestas a <i>Anaplasma marginale</i>	79
24	Tinción de contraste supravital empleando los colorantes carboxi-metil-rodamina (CMRA) y diacetato de carboxi-fluoresceína (CFDA), en la línea celular nucleada BCE C/D 1-b co-cultivada con <i>Anaplasma marginale</i>	90
25	Rickettsemia presente en el co-cultivo de eritrocitos infectados con <i>Anaplasma marginale</i> cepa "Puente de Ixtla" con la línea endotelial BCE C7D 1-b	92
26	Rickettsemia presente en el co-cultivo de eritrocitos infectados con <i>Anaplasma marginale</i> cepa "Tizimín" con la línea endotelial BUVEC E <sub>6</sub> E <sub>7</sub>	93
27	Tinción de Giemsa de las líneas celulares BUVEC E <sub>6</sub> E <sub>7</sub> y BCE C/D 1-b co-cultivadas con eritrocitos	94
28	Rickettsemia presente en el co-cultivo de eritrocitos infectados con <i>Anaplasma marginale</i> aislado "Soto la Marina" con las líneas endoteliales BCE C7D 1-b y BUVEC E <sub>6</sub> E <sub>7</sub>	95
29	Rickettsemia presente en el co-cultivo de eritrocitos infectados con <i>Anaplasma marginale</i> cepa "Tizimín" con las líneas endoteliales BCE C7D 1-b y BUVEC E <sub>6</sub> E <sub>7</sub>	96
30	Técnica de inmunofluorescencia directa e indirecta de los eritrocitos co-cultivados con las líneas celulares endoteliales	97
31	Rickettsemia presente en el co-cultivo de eritrocitos infectados con <i>Anaplasma marginale</i> cepa "Morelos" con la línea endotelial BCE C7D 1-b en matraces de 25cm <sup>2</sup>	99
32	Respuesta de anticuerpos en un bovino inoculado con cultivos celulares de BUVEC E <sub>6</sub> E <sub>7</sub> expuestos a cuerpos iniciales de <i>Anaplasma marginale</i> extraídos con inhibidores de proteasas	100
33	Respuesta de anticuerpos en un bovino inoculado con co-cultivos de eritrocitos infectados con <i>Anaplasma marginale</i> y células de la estirpe BCE C/D 1-b	101

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ACES:** Ácido amino etano sulfónico N-2 acetamido
- ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- ATCC:** American Type Culture Collection
- BES:** Ácido etanosulfónico 2-N-N- bis/2 hidroxietil
- CFDA:** Diacetato de carboxi-fluoresceína
- CI:** Cuerpos iniciales
- CTF:** Caldo triptosa fosfato
- CMRA:** Acetato de carboxi-metil-rodamina
- Da:** Daltons
- DEM:** Medio de Eagle modificado por Dulbecco
- DMSO:** Sulfóxido de dimetilo
- DO:** Densidad óptica
- EDTA:** Ácido etilen-diamino-tetra-acético
- Ei:** Eritrocitos infectados
- ELISA:** Inmunoensayo enzimático
- EN:** Eritrocitos no infectados (sanos).
- F:** Fungizona® (Anfotericina B)
- FITC:** Isotiocianato de fluoresceína
- G:** Gravedades
- G-MEM:** Formulación de Glasgow para MEM
- H:** hora(s)
- HEPES:** Ácido etanosulfónico-2 N-N'-2-hidroxietil piperazina
- IF:** Inmunofluorescencia
- IM:** intramuscular
- L-15:** Medio modificado Leibovitz



**MEM:** Medio mínimo esencial

**MOPS:** Ácido 3-(N-Morpholino) propano-sulfónico

**NA:** Naranja de acridina

**P+E:** Penicilina + estreptomicina

**PAS:** Persulfato de amonio

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PEI:** Porcentaje de eritrocitos infectados

**PI:** Post inoculación

**PMSF:** Fluoruro de fenil-metil-sulfonil

**SAC:** Solución amortiguadora de carbonatos

**SBA:** Suero de bovino adulto

**SBF:** Suero fetal de bovino

**SBH:** Solución balanceada de Hank

**SDS:** Duodecil sulfato de sodio

**SSAF:** Solución salina amortiguadora de fosfatos

**SSB:** Solución salina de Hank

**SSP:** Solución salina de Puck

**SC:** Subcutáneo

**TEMED:** Tetrametilen-etilen-diamina

**TES:** Ácido etanelsulfónico 2 N-N'-tris/hidroximetil

**TRIS:** Tris - hidroximetil amino metano

**VCA:** Volumen celular aglomerado

**VYM:** Solución Vega y Martínez

# INTRODUCCIÓN

## 1. Marco teórico de referencia

### a. Importancia de la anaplasmosis

En México, el desarrollo de la ganadería en el trópico y subtrópico ha sido restringido por la aparición de entidades nosológicas, como resulta ser el complejo formado por las enfermedades causadas por los hemoparásitos y sus vectores. Entre ellas se encuentra la anaplasmosis, enfermedad infecciosa no contagiosa que afecta principalmente al ganado bovino doméstico, caracterizada por anemia progresiva sin hemoglobinuria, pérdida de peso, abortos y depresión (**Rodríguez et al., 2004**). Este padecimiento resulta importante por las enormes pérdidas económicas y gastos que ocasiona además, por la disminución de peso, costo de tratamiento, recuperación de la condición corporal, baja producción de leche y eventualmente, mortalidad (**Rodríguez et al., 1999**), la constante introducción de ganado bovino especializado en la producción de carne y leche sin la debida precaución constituye un riesgo de aparición de grandes brotes en zonas endémicas (**Wagner et al., 1991**) principalmente en las regiones tropicales y subtropicales, desde los 40° de latitud norte hasta 35° de latitud sur (**Vega, 1991**). En 1973 se cuantificaron las pérdidas económicas en algunas regiones del orbe, por ejemplo, en los Estados Unidos, la Asociación Nacional Ganadera calculó las mermas anuales en 1,000 millones de dólares; en 1976 en el estado de California estimó pérdidas de 300 millones de dólares, en Texas durante 1982 informaron de pérdidas por 97,984 dólares (**Wagner et al., 1991**). Otros datos también de Estados Unidos describen una mortalidad anual entre 50,000 a 100,000 animales, con un costo de hasta 300 millones de dólares. Entre 1982 y 1984 en el estado de Louisiana se comunicó una prevalencia de 5.64% para el ganado de carne y 4.27% para el ganado lechero (**Hugh-Jones et al., 1988a**). En otros países se han estimado tasas de infección de hasta el 73% para el ganado de Santa Lucía (**Hugh-Jones et al., 1988b**). Para el Salvador el porcentaje de prevalencia fue del 78.5% (**Payne y Scott, 1982**). En Cuba, durante los primeros

años de la década de 1990, la anaplasmosis bovina se presentaba como una de las primeras causas de mortalidad en el ganado adulto; solamente en el año 1993 se estimó una pérdida superior a los dos millones de dólares, según datos de la Dirección de Medicina Veterinaria de Cuba (**Corona et al., 2004**). En Colombia es considerada de gran importancia, ya que también constituye una restricción para el incremento de la productividad ganadera de ese país (**Benavides et al., 2000**). Además de los datos monetarios, existen datos epidemiológicos de relevancia, como los arrojados en algunas zonas de Argentina, al norte de Salta y sur de Tucumán se reportan seroprevalencias mayores al 70%, al norte de Santa Fe un 17% en ganado de cría y en la cuenca lechera del centro de esta provincia, 7% (**Guglielmone, 1995**); en Paraguay se detectaron prevalencias de anticuerpos del 92%, el 75% del ganado muestreado resultó reactivo (**Payne y Osorno, 1990**). En el Estado Lara, Venezuela, se comunicó de una prevalencia del 100% en becerros con 30 días de edad (**Rey-Valeirón et al., 2003**) y en Paraná, Brasil, se informó de hasta 87.6% de animales positivos en una región donde es endémica (**Vidotto et al., 1998**). Asimismo, esta enfermedad se ha descrito en la India (**Chitravel et al., 1998**), al sur de África se informa de 50 a 75% de prevalencia de infección (**Masika et al., 1997**). Aunque su relevancia en las regiones tropicales y subtropicales es manifiesta, en el 2002 se comunicó de un brote en ganado lechero en Suiza, de los animales muestreados, en el 47% se observaron cuerpos iniciales (CI) de *A. marginale* (**Hofmann-Lehmann et al., 2004**); otro informe del mismo país, indica que mediante una prueba de inmunoensayo enzimático (ELISA) se detectaron porcentajes de entre 2.49% y 1.17% de muestras positivas, entre los años 1998 y 2003 (**Dreher et al., 2005**).

En México, un estudio realizado en el estado de Veracruz, en el municipio de Tamiahua (**Barajas y Rodríguez, 1996**) informó un 35% de seroprevalencia para *A. marginale*; en otro trabajo hecho al norte de Veracruz, se mostró que 69% del ganado estaba infectado (**Cossío et al., 1997**). Datos no publicados en el 2004, obtenidos de seis ranchos en la zona sur del municipio de Tapalpa, Jalisco, indican que en tres de ellos, más del 99% de los bovinos fueron positivos con la prueba de

reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en dos ranchos el porcentaje fue del 40% y en uno del 30% (**Preciado, comunicación personal, 2006**). En Playa San Vicente, Veracruz existe una tasa de prevalencia de 35.43% en bovinos con edades desde los cinco días hasta los ocho años (**López et al., 1983**), y en la zona norte del mismo estado se presentó una prevalencia general del 56% (**García-Tapia, et al., 1996**); en Tamaulipas este porcentaje varía del 42 al 46% (**Pérez y Vega, 1987**); en Nayarit la cifra fue de 82.1% (**López et al., 1983**); en tanto que en Yucatán se registró un 98% en becerros menores de tres meses, 89% en animales de cuatro a cinco meses y 95% en becerros de seis a ocho meses (**Solís y Rodríguez, 1995**). En el estado de Guerrero bovinos de raza criolla de los dos meses hasta los 12 años de edad presentan un 78.9% de prevalencia (**Fragoso y Millán, 1984**).

A fin de valorar la importancia de esta enfermedad, el país se dividió en zonas, según la prevalencia de la anaplasmosis, así, la zona I ó enzoótica tiene prevalencias mayores al 70% e incluye los estados de Tamaulipas, Veracruz, Tabasco y Yucatán; en la zona II la prevalencia es media con rango de 10 al 50% y se extiende por Guerrero, Oaxaca, Michoacán, Jalisco, Colima, sur de Sinaloa, frontera norte de Tamaulipas, Nuevo León y Coahuila; la zona III tiene prevalencia menor al 10% y comprende los estados de Zacatecas, San Luis Potosí, Durango, Chihuahua y Sonora, así como la parte meridional de Baja California Norte y Sur (**SAGARPA, 2007**).

b. Características de la anaplasmosis

Las manifestaciones clínicas pueden apreciarse en la forma moderada, aguda, hiperaguda y crónica. El padecimiento es moderado en becerros menores de 1 año, siendo progresivamente más severo en animales adultos (**Roby et al., 1961; Alonso et al., 1992; Stokka et al., 2000**), la forma hiperaguda es más común en bovinos mayores de 3 años. La severidad del padecimiento depende de la duración de la parasitemia, es decir, el grado de multiplicación de la rickettsia y la inmunidad del paciente. En la anaplasmosis, algunas condiciones fisiológicas se ven alteradas. La temperatura corporal normal del bovino es de 38 ó 39 °C, el volumen

corpúsculo aglomerado (VCA) de 30 al 40%, la frecuencia cardíaca de 60-100/min y la frecuencia respiratoria de 15-60/min; pero durante la enfermedad, la temperatura es de 41 ó 42 °C, el VCA puede reducirse a menos del 10%, debido a la pérdida del 70% o más de los eritrocitos en circulación (**Ristic, 1981**), la frecuencia cardíaca aumenta a 110-140/min y la frecuencia respiratoria se incrementa a 80-90/min. Asimismo puede observarse esplenomegalia e incoordinación. El periodo de incubación es de 15 a 36 días con un promedio de 26, posteriormente sobreviene la infección aguda y los animales pueden morir a los pocos días posteriores a la aparición de la fiebre (**Rodríguez-Vivas et al., 2005**). La anaplasmosis causa anemia normocítica inicial que se torna macrocítica debido a la hiperplasia compensatoria de la médula ósea, granulocitosis y reticulocitosis, la remoción de los eritrocitos infectados (Ei) por parte del bazo impide que haya hemólisis intravascular, hemoglobinuria o hemoglobinemia.

En infecciones persistentes, la rickettsemia se presenta de manera submicroscópica, con una fase de desarrollo logarítmico con duración de tres a siete días, llegando a un punto máximo para después decrecer; estos ciclos se repiten durante semanas. La cantidad de rickettsemia detectable por la técnica de hibridación varía de al menos  $1 \times 10^4$  hasta  $1 \times 10^6$  Ei/ml (**Kieser et al., 1990**). El periodo de convalecencia puede durar hasta dos meses y puede acompañarse de hematopoyesis acelerada caracterizada por reticulocitosis, macrocitemia y granulopoyesis (**Ristic, 1981**). Cuando inicia el periodo febril la parasitemia es del 30 al 50%, la mortalidad puede alcanzar el 80% en ganado vacuno proveniente de zona libre, introducido a una zona enzoótica. El pronóstico es grave en animales maduros que tengan valores inferiores a los  $2 \times 10^6$  eritrocitos/mm<sup>3</sup>. El ganado portador crónico puede experimentar una recaída con rickettsemias cíclicas persistentes (**Aboytes et al., 1994**). La forma hiperaguda caracterizada por fiebre súbita y rickettsemia mayor al 50%, constituye la más grave, con más frecuencia en animales de razas puras o de gran producción lechera (**Rodríguez-Vivas et al., 2005**). El diagnóstico se basa en los signos clínicos, cambios hematológicos y la demostración del organismo en los eritrocitos. En las epizootias bien establecidas,

una tentativa de diagnóstico puede ser a base de la observación de fiebre y anemia sin hemoglobinuria. Para pruebas confirmatorias existe un gran repertorio: frotis sanguíneos teñidos con el colorante de Giemsa o Wright (**Johnson et al., 1980; Aboytes et al., 1986**), Naranja de Acridina (**Ristic, 1981**), con la técnica Diff-Quick (**Donovan-Myhand et al., 1984**) fijación del complemento (**Osorno y Ristic, 1977; González et al., 1978; Ristic, 1981**), fijación del complemento en microplaca (**Aboytes et al., 1986**), aglutinación capilar (**Osorno y Ristic, 1977; Ristic y Watrach, 1963**), aglutinación en placa (**Amerault y Roby, 1968**), aglutinación en tarjeta o PATA (**González et al., 1983; Falcón et al., 1987; Pérez y Vega, 1987**), inmunofluorescencia directa o indirecta (**González et al., 1978; Johnson et al., 1980; Goff et al., 1985**), ELISA (**Tohen et al., 1980; Tello et al., 1986; Ramos et al., 1987; Nielsen et al., 1996; Reyna-Bello et al., 1998**) y la más reciente, PCR. Para esta técnica se han desarrollado sondas de ADN con especificidad y sensibilidad del 100% capaz de identificar 500 a 1,000 Ei/ $\mu$ l de sangre, lo que corresponde a una parasitemia del 0.01% (**Aboytes y Buening, 1990**); en otro trabajo se informó de una sonda derivada de una porción génica que codifica para una proteína con peso molecular de 105,000 daltons (Da), esta sonda puede detectar específicamente Ei con *A. marginale*, y puede reconocer 0.01 mg de DNA genómico y de 500 a 1,000 Ei en 0.5 ml de sangre, lo que equivale a una parasitemia de 0.000025%. (**Ericks et al., 1990**). Aplicando la metodología de PCR en tiempo real es posible detectar una sola copia hasta en tres (3) Ei/ml de sangre (**Carelli et al., 2007**). El diagnóstico diferencial debe hacerse contra babesiosis, leptospirosis, hemoglobinuria bacilar e intoxicaciones por cobre o helecho macho (**Corona et al., 2004**).

Para su transmisión, esta bacteria necesita de vectores biológicos o mecánicos. Dentro de los biológicos se encuentran artrópodos de los géneros *Boophilus*, *Dermacentor* y *Rhipicephalus*; se han establecido aproximadamente 35 especies de garrapatas que potencialmente pueden transmitir a esta rickettsia, estos artrópodos son los únicos vectores biológicos conocidos (**Rodríguez-Vivas et al., 2005**). Como ejemplo de los vectores mecánicos se encuentran los insectos del

orden *Diptera*, dentro de los que se encuentran las moscas hematófagas de los géneros *Chrysops*, *Haematobia* y *Stomoxys* (Ristic, 1981; Yeruham y Braverman, 1981); mosquitos de los géneros *Siphona*, *Psorophora* y *Anopheles* (Ristic, 1981) y moscas de los équidos, *Tabanus lineola*, *T. mularis*, *T. pallidescens* y *T. fuscicostatus* (Wilson y Meyer, 1966; Hawkins et al., 1982). Estos vectores infectan desde algunas horas, hasta 3 días después de picar a un animal enfermo; asimismo las prácticas iatrogénicas como son el uso de material quirúrgico o agujas no estériles funcionan como vectores mecánicos (Yeruham y Braverman, 1981; Potgieter et al., 1993; Zaugg et al., 1986; Palmer et al., 2000). La vía vertical de tipo placenta-feto, es factible en el último tercio de la gestación, una vaca infectada antes de los 190 días de la gestación puede trasmitirla al feto (Zaugg y Kuttler, 1984).

En lo que respecta al control y prevención se han sugerido medidas como el uso de acaricidas, control de garrapatas con feromonas, desarrollo de vacunas contra garrapatas y desarrollo de vacunas contra *A. marginale*. En este último rubro se han propuesto diversos tipos de vacunas, como las vacunas vivas utilizadas en zonas enzoóticas con la principal desventaja del riesgo de transmitir patógenos (Lawrence y de Vos, 1990); las vacunas con *A. centrale*, especie considerada exótica en México, no ofrecen una protección óptima contra el desafío con *A. marginale* (Kuttler, 1972), cuando se evaluó en Australia bajo condiciones de campo, tampoco funcionó (Payne y Osorio, 1990); las vacunas con cepas de *A. marginale* atenuadas con pases en ovinos o radiaciones (Ristic, 1981); las vacunas muertas que se emplearon por primera vez en África y los Estado Unidos (McHurdy y Simpson, 1973; Brock et al., 1964), con la desventaja de causar anemia isoeritrolítica en neonatos (Dennis et al., 1970). El Laboratorio Fort Dodge de Iowa, EUA, produjo una vacuna comercial denominada Anaplaz<sup>®</sup>, fue la primera en usarse desde 1965 y ofrece un grado medio de protección contra los signos clínicos en animales jóvenes (Osorno y Ristic, 1977; Henry et al., 1983) pero también puede provocar isoeritrolisis neonatal después de consumir calostro de vacas inmunizadas; otra vacuna comercial disponible es del Laboratorio

Schering-Plough de EUA, llamada Plazvax<sup>®</sup> y elaborada a partir de la purificación de CI, fue valorada en México, concluyéndose que no ejerce una protección superior al 50% (**Figueroa et al., 1990**). En 1999 se valoró la capacidad de inducir protección específica de una mezcla de CI inactivados y purificados de modo parcial de tres aislados mexicanos: MEX-17-029-01; MEX-15-099-01 y MEX-31-096-01; al desafío se informó de una protección total contra MEX-17, 60% de protección contra MEX-15 y nula protección en caso de MEX-31 (**Rodríguez et al., 1999**). Como ninguna de las alternativas disponibles es factible para las condiciones del campo mexicano (**Figueroa et al., 1990**), la forma usual de protección está basada en la inoculación de sangre de animales portadores a animales susceptibles, seguido de la aplicación de antibióticos para evitar los signos clínicos (**Medellín, 1998**); sin embargo, en ausencia de supervisión adecuada, se corre el riesgo inducir un cuadro clínico muy severo o dejar a los animales susceptibles, sin descartar la posibilidad de transmisión de otros patógenos presentes en la sangre.

Para eliminar los signos clínicos de la anaplasmosis se administra vía intramuscular (IM), oxitetraciclina de larga duración a dosis de 20 mg/kg de peso vivo, pudiendo además eliminar la infección crónica (**Kuttler, 1980**). Otra opción es emplear amicarbalida vía subcutánea (SC) a dosis de 20mg/kg de peso vivo durante dos días, este tratamiento también es efectivo contra *A. centrale*. La administración de imidocarb [3, 3'-bis (2-imidazol-2-carbanilido-dihidroclorado)] por vía IM o SC a dosis de 3 mg/kg de peso vivo es efectiva, pero con la dosis de 5 mg/kg a intervalo de 14 días suprime en su totalidad al parásito (**Rodríguez-Vivas et al., 2005**). El periodo de recuperación es variable, dependiendo de diversos factores como son la edad o el estado inmunológico. Un estudio *in vitro* demostró que el tratamiento durante 7 días con 0.5 ó 4 µg/ml de enrofloxacin es más efectivo, comparado con el tratamiento de oxitetraciclina o imidocarb (**Coetzee et al., 2006**). En teoría, la exposición inicial del ganado al *Anaplasma* (virulenta o atenuada) presenta suficiente antígeno al sistema reticuloendotelial, estimulando la respuesta inmune celular y humoral primaria, produciendo anticuerpos entre los 5 y 15 días



post-exposición (**Cetrá, 1999**). La continua estimulación por parte del antígeno es resultado de niveles bajos de infección durante mucho tiempo. La respuesta inmune celular sirve como promotor de la fagocitosis de Ei por los macrófagos. Una segunda exposición al *Anaplasma* estimula a los linfocitos T de memoria para multiplicarse y magnificar la protección, incrementando el número de linfocitos sensibilizados capaces de tener una respuesta específica (**Ristic, 1981**), aquí se observa una rápida producción de anticuerpos a los 2 ó 3 días post-exposición (**Cetrá, 1999**). A través del curso de la enfermedad la respuesta inmune contribuye aparentemente al desarrollo de anemia. Los terneros jóvenes pueden recibir una cantidad elevada de anticuerpos a través de la inmunidad pasiva, lo que los protege durante 90 a 270 días (**Fragoso, 1991**). En otros ensayos se han descrito proteínas purificadas a partir de CI, con capacidad inmunoproláctica, diagnóstica o epidemiológica, como son las proteínas 36,000 Da (**Palmer et al., 1985 y 1986**).

## II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

### 1. *El agente causal*

*Anaplasma marginale*, fue descrito por primera vez en América del Norte en 1893 por Smith y Kilborne. Más adelante en África del Sur, Theiler diferenció en 1910 la anaplasmosis de la babesiosis, el agente causal de la anaplasmosis se encontraba a la periferia de los glóbulos rojos de bovinos con un padecimiento aparentemente nuevo y carecía de citoplasma (ver Figura 1). Por estas razones Theiler la denominó inicialmente *Marginal points*, y finalmente, *A. marginale* (Smith y Kilborne 1893; Theiler 1910a y b; Ristic, 1981). Morfológicamente, *A. marginale* es redondeada u oval de 0.3 a 0.8  $\mu\text{m}$  de diámetro (Amerault et al., 1973), carece de organelos y de citoplasma (Ristic, 1981) y se han establecido tres categorías de acuerdo a su talla dentro del eritrocito: el clásico cuerpo de inclusión, una forma intermedia o cuerpo inicial y la de tamaño pequeño conocido como cuerpo poliédrico (Ristic y Watrach, 1963; Simpson et al., 1967). Asimismo, se descubrió que cumple la función de parásito intraeritrocítico obligado (Ristic, 1981). Se ha clasificado dentro del orden *Rickettsiales* (Ristic y Kreier, 1984; Osorno y Ristic, 1977), familia *Anaplasmataceae*, género *Anaplasma* (Dumler et al., 2001), es de naturaleza bacteriana, Gram-negativa (Amerault et al., 1973). Está conformada por una membrana lipídica rica en proteínas y ácidos nucleicos compactados, el genoma tiene un porcentaje de 56% de G+C (Brayton et al., 2005). Su membrana juega un papel preponderante en la supervivencia de este microorganismo, ya que es la encargada de las interacciones parásito-huésped, por ejemplo, de la invasión de los eritrocitos de bovino y la activación del sistema inmune. *A. marginale* se inactiva a 60 °C durante 50 min o por sonicación con una temperatura de 35 °C durante 90 min (Bedell y Dimopoulos, 1963). Puede preservarse durante 4 años en congelación y es capaz de sintetizar proteínas a partir del medio en el que se encuentra. Contiene ocho enzimas propias de la glucólisis y dos de la vía colateral de las pentosas (Ristic, 1981) y se ha detectado actividad de la enzima catalasa (Wallace y Dimopoulos, 1965).



Figura 1: *Anaplasma marginale* en su hospedero natural, el eritrocito de bovino



*Frotis sanguíneo fijado con metanol absoluto durante cinco minutos y teñido con colorante de Giemsa diluido 1:4 en solución tamponada pH 7.6 e incubado durante 45 minutos a temperatura ambiente. El frotis se observó con el objetivo 100x del microscopio óptico, la fotografía fue tomada con una cámara digital Sony cybershot de 5 megapíxeles.*

Recientemente, se ha descrito por completo el genoma de la cepa "St. Maries" de *A. marginale*, destacando su ADN circular con tamaño de 1.2 millones de pb, además se llevó a cabo la determinación de las secuencias codificadas resultantes, con base en la aplicación de los protocolos descritos en el sistema bioinformático BLAST, revelando 949 marcos de lectura abiertos. En este estudio se informa, que de los 62 genes que codifican para las proteínas de superficie, 49 son para las superfamilias: *mSP1* y *mSP2*. Diversas enzimas fueron identificadas para distintas vías metabólicas, sin embargo, las asociadas a la síntesis de aminoácidos fueron escasas o incompletas (Brayton et al., 2005). Otros estudios se han dedicado a las proteínas de superficie, especialmente las denominadas con las siglas MSP (proteínas principales de superficie) y números progresivos del 1 al 5. Cada una de ellas tiene funciones específicas, algunas de las cuales hasta la fecha no son del todo claras. La proteína MSP1 está conformada por dos subunidades, MSP1a y MSP1b, cada subunidad se encuentra codificada por genes distintos, el gen *mSP1 $\alpha$*  codifica para MSP1a, en tanto *mSP1 $\beta$ 1* y *mSP1 $\beta$ 2* para MSP1b (Barbet 1995, Viseshakul et al., 2000). Para el caso de MSP1a, existe variación en el peso molecular entre aislados provenientes de distintas zonas geográficas, esta diferencia se debe a la repetición de "clusters" de péptidos de 28-29 aminoácidos (De la Fuente et al., 2001a y b; 2002c; 2003 y 2007). Su función principal es como adhesina hacia los eritrocitos de bovinos (McGarey et al., 1994) y células de garrapata, en cultivo *in vitro* (De la Fuente, 2001a). Tiene importancia inmunológica pues induce buena protección contra desafíos homólogos (Palmer et al., 1986) y protección parcial contra desafíos heterólogos, debido a que está asociada con la producción de IgG2 y una respuesta celular de linfocitos tipo Th1 cooperadores. En tanto, MSP2, tiene un peso molecular de 36,000 Da y es capaz de inducir una respuesta inmune parcialmente protectora contra aislados homólogos y en menor grado contra aislados heterólogos, pues esta proteína está involucrada con la variabilidad antigénica en los hospederos mamíferos (Palmer et al., 1988). MSP3 tiene un peso molecular de aproximadamente 86,000 Da, codificada por una familia de multigenes, que se expresa en forma cíclica en un

solo huésped, algunas secuencias las comparte con MSP2 y MSP4, por lo que no se descarta la posibilidad de la recombinación génica (Alleman *et al.*, 1996 y 1997). En el caso de MSP4, su peso es de 31,000 Da aproximadamente, codificada por un solo gen; ya que tiene limitada capacidad para inducir una respuesta inmune, ha sido poco estudiada (Oberle *et al.*, 1993, Tebele *et al.*, 1991). Finalmente, MSP5 posee 19,000 Da, está codificada por un solo gen, conservada en todos los aislados sin importar su procedencia, característica que le confiere su uso para el diagnóstico en bovinos y en vectores (Knowles *et al.*, 1996). Además de *A. marginale*, se conocen otras dos especies que afectan al bovino: *A. centrale*, causante de una forma benigna de anaplasmosis y *A. caudatum* (Stokka *et al.*, 2000), en tanto que *A. ovis*, está relacionada con el padecimiento en ovinos y caprinos. *A. phagocitophilum* y *A. platys* se involucran en patologías de humanos y perros, respectivamente (Kocan *et al.*, 2003). Por otra parte, se han descrito infecciones subclínicas en búfalos de agua, ovinos y caprinos (Cossio *et al.*, 1997). En bisontes se observó parasitemia moderada con respuesta a anticuerpos específicos, demostrándose la secuencia de infección bovino-bisonte-bovino (Chitravel *et al.*, 1998). La rickettsia se detectó en la sangre de alces (*Cervus elaphus*) infectados, pero no se notaron signos clínicos de la enfermedad (Zaugg *et al.*, 1996). Estos resultan susceptibles a la infección con *A. marginale* y *A. ovis* y su sangre, infectada con ambas especies es infectiva para bovinos y chivos susceptibles, por lo que lo constituyen un reservorio (Zaugg *et al.*, 1996). La principal fuente de infección para los vectores son los reservorios naturales, como son los animales convalecientes o inmunizados con vacunas vivas (Blood *et al.*, 1983).

## **2. Del proceso de infección por *Anaplasma marginale***

Esta bacteria para lograr su transmisión requiere de vectores biológicos o mecánicos y la existencia de animales susceptibles (Palmer y McElwain, 1995). Todos los bovinos son potencialmente susceptibles a la infección, en condiciones naturales el ganado *Bos indicus* suele afectarse menos que el *Bos taurus*, por la resistencia a la infestación por garrapatas (Otim *et al.*, 1980; Parker *et al.*, 1984).

Guglielmone comunicó una mayor resistencia del ganado *Bos indicus* y sus cruizas, proporcional a la cantidad de genes de origen índico ya que poseen mayor resistencia a la garrapata *Boophilus microplus* (Guglielmone, 1990). En cuanto a la persistencia de la rickettsia en sus huéspedes bovinos, se debe considerar el papel relevante de las proteínas de superficie de los complejos MSP1 y MSP2, ya que su caracterización ha sido vital para conocer su responsabilidad en el mecanismo de adhesión e invasión. El ganado inmunizado con células de *Ixodes scapularis* (estirpe IDE 8) infectadas con *A. marginale* tiene mayor preferencia para reconocer a MSP1b, mientras, que el inmunizado con Ei infectados con *A. marginale* tiene preferencia de reconocimiento para MSP1a (De la Fuente et al., 2002c). Por otro lado, MSP2 sufre variación antigénica y selección en el huésped bovino y sería responsable de la infección persistente en animales susceptibles, ante el eventual escape a la acción del sistema inmune o la incompleta protección contra aislamientos heterólogos (Kocan 1995, Kocan et al., 2004). Esta variabilidad ha orientado a algunos investigadores a postular que la inmunoprolifaxis en el futuro deberá sustentarse en vacunas regionales (Rodríguez et al., 2004). Se ha identificado una proteína inmunodominante, MSP-3 (McGuire et al., 1991), antes conocida como Am86, extraída a partir de CI y la cual es clave para la diversidad morfológica, bioquímica e inmunogenica entre aislados.

A diferencia de los pequeños cuerpos de inclusión que contienen de cuatro a seis rickettsias en los eritrocitos bovinos, en las garrapatas naturalmente infectadas se observan grandes colonias que contienen muchos organismos. Se ha demostrado la presencia de *A. marginale* en garrapatas *Dermacentor andersoni*, tanto adultas como ninfas, en huevos y en glándula salival (Kocan 1995, Kocan et al., 1983, 1992 y 1993). También se describieron colonias de *A. marginale* en glándulas salivales de *D. andersoni*, *D. variabilis* y *D. occidentalis*, en ninfas o adultos. Ribeiro y Lima determinaron dos tipos de agrupaciones diferentes de 6.1 a 10.3  $\mu\text{m}$  de diámetro que contenían organismos con formas circulares, ovoides o irregulares, en epitelio intestinal de hembras de *B. microplus* ingurgitadas (Ribeiro y Lima, 1996). El macho de *D. andersoni* permanece infectado durante toda su vida. *A. marginale*

infecta y se desarrolla en las células musculares del intestino de la garrapata, sin ejercer efecto dañino alguno (Kocan, 1995). El ciclo de desarrollo del microorganismo comienza en las células del intestino medio de las garrapatas, con la subsiguiente infección de las células musculares del intestino. El desarrollo final ocurre en las glándulas salivales, desde donde la rickettsia se transmite al huésped vertebrado. En cada sitio de desarrollo en la garrapata, *A. marginale* se multiplica dentro de inclusiones unidas a las membranas denominadas colonias. Cada ciclo involucra dos estadios, una forma reticulada o vegetativa y la forma densa o infectiva. La forma reticulada que se divide por fisión binaria, se observa primero, dentro de las colonias, que posteriormente se condensan para dar lugar al estado electrodenso capaz de sobrevivir fuera de las células e infectar a otras (Kocan et al., 1996). Algunos aislados de *A. marginale* aparentemente no infectan a las garrapatas (Smith et al., 1986; Wickwire et al., 1987; Zaugg et al., 1996). Se cree que existen diversos factores no identificados que influyen en la transmisión y desarrollo de este patógeno en las garrapatas, por lo que será necesario conocerlos para facilitar el mejoramiento de estrategias para el control de la enfermedad (Walade et al., 1996). La transmisión del microorganismo a través de las diferentes especies de garrapata puede ocurrir de forma intraestadial y transestadial (Kocan et al., 1981; Kocan et al., 1986; Zaugg et al., 1986); como también lo revela un estudio reciente con *B. microplus* y las cepas mexicanas de *A. marginale* "Yucatán" y "Aguascalientes", además se concluye que el macho es muy importante en la conservación y transmisión del agente etiológico en zonas endémicas (Pérez, 2007). Por otra parte, puede ocurrir del estado de larva a adulto sin reexposición en el estadio como ninfa y por adultos machos que se transfieren del ganado infectado a otro susceptible. Con el aislado "Virginia", se ha demostrado que *A. marginale* conserva las propiedades de sus proteínas de superficie, ya sea que provenga de cultivos celulares de la garrapata *Ixodes scapularis* (estirpe IDE 8), de un bovino o de glándula salival de garrapata (Barbet et al., 1999). El organismo penetra por invaginación al eritrocito sin que ocurra lisis celular, se encierra en una vacuola y se multiplica por fisión binaria en forma de CI, pudiéndose observar hasta



3 CI por eritrocito. Los CI son numerosos durante la fase aguda de la infección, pudiendo disminuir drásticamente en los casos crónicos o de portadores asintomáticos (ver Figura 2).

### **3. *Del cultivo celular de Anaplasma marginale***

Desde el descubrimiento de este patógeno, las tentativas para lograr reproducirlo *in vitro*, con fines de investigación o profilácticos, han sido numerosas y muy variadas. Las podemos agrupar en tres metodologías de acuerdo al tipo celular empleado: eritrocitos de bovino, células de artrópodo, ó con otro tipo de células.

Figura 2: Ciclo de transmisión de *Anaplasma marginale*



El vector se alimenta

Bovino enfermo o portador

El bovino infectado es ahora fuente de infección para otros, en presencia de vectores

Multiplicación de la rickettsia *Anaplasma marginale* en el intestino y



Transmisión de la bacteria cuando la garrapata se alimenta en animales sanos



Finalmente, sale mediante excitosis, para invadir los eritrocitos aledaños

Luego, comienza a dividirse por fisión binaria hasta formar

Después del contacto con el eritrocito, se introduce mediante un proceso de

*A. marginale* penetra al torrente sanguíneo e inicia la invasión de los eritrocitos

a. Cultivo de *Anaplasma marginale* en eritrocitos

Davis y colaboradores cultivaron *A. marginale* con eritrocitos de bovino con la finalidad de describir algunas técnicas para el análisis de las características de crecimiento y requerimientos de este microorganismo. La colecta de Ei fue con valores del 30 al 60%, los eritrocitos fueron lavados con una solución balanceada de Hank (SBH). Se empleó una suspensión de cultivo al 25% sembrando en tres medios de cultivo químicamente definidos: HAM F-12, RPMI 1640 y Extra-aminoácidos. Todos los medios fueron complementados con suero bovino fetal (SBF) y glutamina, se distribuyeron en cajas Petri de 60 mm de diámetro, incubándose en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> en aire ó con 7% CO<sub>2</sub>, 83% N<sub>2</sub> y 10% O<sub>2</sub>, a 37 °C durante un periodo de 1 a 5 días. Los cultivos se mantuvieron en agitación a 9 ciclos/min, el cambio de medio fue gradual. En algunos cultivos se adicionó 25% de eritrocitos sanos (EN). El seguimiento del experimento fue con frotis teñidos con Wright o algunos cultivos incubados con <sup>3</sup>H Timidina ó <sup>14</sup>S Metionina para medir la presencia de la bacteria en sus células hospederas. Con el material proveniente del medio RPMI-1640, fueron infectados becerros esplenectomizados. Cuando no se agregaron EN, el número de CI se mantuvo o redujo ligeramente. Los medios HAM F-12 y RPMI 1640, proporcionaron las características óptimas para el mantenimiento de la viabilidad del cultivo y en el medio Extra-aminoácidos, los eritrocitos comenzaron a mostrar signos de lisis a partir del segundo día del inicio del cultivo. Con la tinción de Wright se observó que la pérdida de CI coincidía con el incremento de la rickettsia libre en el medio de cultivo. El nivel máximo de radioactividad fue al primer día, disminuyendo gradualmente a partir del día tres, cuando se adicionaron EN, se observó un repunte en la actividad metabólica. Los animales inoculados desarrollaron un cuadro clínico típico de anaplasmosis (**Davis et al., 1978**).

Otros investigadores optaron por utilizar la estrategia para el cultivo de *Plasmodium* spp. (**Trager y Jensen, 1976**) con algunas modificaciones: los Ei provenientes de un

donador se suspendieron en RPMI-1640 adicionado con ácido etanosulfónico-2 N-N'-2-hidroxiethyl piperazina (HEPES) y suero bovino de adulto (SBA). Posteriormente esta suspensión se distribuyó en cajas Petri de 35 mm de diámetro con 1.5 ml de volumen cada una, en atmósfera microaerofílica de 5% de CO<sub>2</sub> en aire y a 38 °C. El cambio de medio fue diariamente. Al inicio del cultivo se tenía 5% de Ei, con los subcultivos subsecuentes el porcentaje se incrementó a 16.6% a lo largo de ocho días, reduciéndose hasta 3% después de 18 días de cultivo, con este material se realizó un segundo experimento, el cual consistió en tomar los cultivos e inocular a una vaca adulta Holstein Friesian, una vez que en el bovino se alcanzó el 2 % de parasitemia, se tomó una muestra de sangre para cultivarse nuevamente, el bovino experimental desarrolló anaplasmosis al día 13 post inoculación (PI) y los CI fueron visibles al día 20 PI; de este nuevo cultivo *in vitro* después de 33 días se inoculó a un becerro Aberdeen esplenectomizado, cuando la rickettsemia llegó al 4.6% se tomó sangre del becerro para cultivarse *in vitro*. También este bovino desarrolló anaplasmosis clínica. En esta serie de experimentos se valoró el efecto del paso de *A. marginale* a través de las condiciones *in vivo* e *in vitro*, lo cual, según informaron los autores, no influye en el comportamiento de la bacteria bajo condiciones *in vivo* e *in vitro*, pues las fluctuaciones que presentó no fueron significativas y en condiciones naturales en las células hospederas típicas preservó sus características patológicas (Kessler y Ristic, 1979). Este mismo grupo de investigadores determinó la interacción de *A. marginale* con eritrocitos de ovino y bovino. Para iniciar los cultivos se obtuvo sangre infectada de un ovino esplenectomizado infectado con un aislado atenuado de *A. marginale*, las condiciones de cultivo fueron las mismas mencionadas en los experimentos anteriores, exceptuando el porcentaje de Ei, que en esta ocasión fue del 9% y el cambio de medio fue cada 4 días. En un primer ensayo, se emplearon eritrocitos de ovino, EN combinados con Ei a razón de 1:2. El porcentaje de Ei se incrementó durante las primeras 24 h, decreciendo periódicamente. En el segundo ensayo la combinación fue entre Ei de ovino y EN de bovino, el porcentaje de Ei tuvo un comportamiento similar al primer ensayo, no se encontraron diferencias

estadísticas. Ambos experimentos tuvieron una duración de 42 días. Con estos resultados Kessler y colaboradores concluyen que el agente atenuado fue capaz de infectar a eritrocitos, independientemente de la especie **(Kessler et al., 1979)**.

Más adelante, Mazzola y Kuttler infectaron eritrocitos de bovino con *A. marginale* también en condiciones microaerofílicas, a 37 °C, utilizando medio RPMI-1640 adicionado con SBF, como soporte emplearon cajas Petri de 60 mm de diámetro, con 2 ml de medio de cultivo. El cambio de medio se realizó diariamente durante los primeros 7 días, y posteriormente a intervalos de 3 ó 4 días. Para determinar el porcentaje de infección realizaron frotis teñidos con colorante de Giemsa. Estos investigadores mantuvieron 3 grupos de 20 cultivos cada uno; el grupo 1 inició con 1.4% de Ei y al cabo del día 16 fue inoculado a becerros susceptibles, desarrollando la infección a los 30 días PI; el grupo 2 inició con 3.5% de Ei y se conservó durante 42 días; a los días 7, 14, 21, 28, 35, 42 de cultivo se inocularon becerros susceptibles, demostrando la enfermedad a los días 28 y 35 PI; el grupo 3 fungió como control, los eritrocitos se mantuvieron en solución de Alsever durante 14 días, con un porcentaje inicial de 3.5%, a los días 7 y 14 de cultivo, se inocularon a becerros susceptibles, los cuales no presentaron anaplasmosis clínica **(Mazzola y Kuttler, 1980)**.

Más tarde, Orozco evaluó el comportamiento de la rickettsia *in vitro*, para ello, manipuló la cepa Texcoco previamente inoculada a un bovino. Los porcentajes iniciales de rickettsemia variaron desde 0.39% hasta 20%. Durante la realización de este ensayo se analizaron los efectos de diversos tipos de atmósfera, medios de cultivo, volumen de medio de cultivo, procedencia del SBA y concentración, sales amortiguadoras, presencia de un precursor de ácidos nucleicos, frecuencia en el cambio de medio y realización de subcultivos a distintos intervalos. El soporte del cultivo fueron placas de 24 pozos con 16 mm de diámetro. En la primera fase las variables evaluadas fueron los medios de cultivo, la cantidad de medio y las atmósferas de incubación; con el medio MEM, las fluctuaciones decrecieron hasta llegar a cero al día 16, en tanto, los rendimientos en M199 fueron superados por RPMI- 1640, medio en el cual la viabilidad de *A. marginale* se hizo evidente, con

200 µl de medio de cultivo y atmósferas de 2%O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 93%N<sub>2</sub> y, 5% CO<sub>2</sub> en aire. En la segunda fase, las variantes a valorar fueron los porcentajes de SBA y las atmósferas mencionadas en la primera fase; las mejores respuestas se observaron con la atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> en aire y la complementación del medio de cultivo con 40% de SBA. Para la tercera fase las variables analizadas fueron las sales amortiguadoras: ácido amino etano sulfónico N-2 acetamido (ACES), ácido etanosulfónico 2-N-N-bis/2 hidroxietil (BES), HEPES y ácido etanelsulfónico 2 N-N'-tris/hidroximetil (TES). La respuesta biológica más satisfactoria se dio con la sal HEPES. En la cuarta fase se estudió el efecto del cambio de medio a distintos intervalos, el resto de las condiciones fueron las mismas que en la tercera fase, adicionando además HEPES; en los cultivos con cambio de medio diario se detectó a la rickettsia hasta el día 12. Una vez establecidas las condiciones generales óptimas para el cultivo, la quinta fase consistió en valorar distintas concentraciones de Ei para iniciar el cultivo, determinando que las caídas menos drásticas en el porcentaje de Ei se obtienen con la concentración inicial de 20%. En la sexta fase estudió la posible diferencia entre el SBA de animales con hábitos alimenticios diferentes, al mismo tiempo evaluó el efecto de la adición de un precursor de ácidos nucleicos; concluidos los 24 días de duración del cultivo se estableció que los mejores rendimientos fue con la adición con ácido orótico y el SBA del animal alimentado con concentrado. Finalmente, la séptima fase consistió en apreciar las diferencias entre los cultivos sometidos a diversos tiempos de subcultivo; los porcentajes de Ei fueron mayores en los subcultivos más espaciados. El porcentaje de rickettsemia final informado fue de entre 0.05% y 2.11%. En el Cuadro 1, se resumen las condiciones ensayadas.

**Cuadro 1: Variables ensayadas en cultivos estacionarios de suspensiones de eritrocitos infectados con *Anaplasma marginale* cepa "Texcoco" en placas de cultivo incubados a 37 °C en condiciones microaerofílicas.**

Factor	Tratamientos		
Medio de cultivo	I) M-199	II) MEM	III) RPMI-1640

<b>Cantidad del medio</b>	I) 100 $\mu$ l	II) 200 $\mu$ l		
<b>Sal amortiguadora</b>	I) ACES	II) BES	III) HEPES	IV) TES
<b>Adición de precursores</b>	Ácido orótico			
<b>% de Suero*</b>	I) 5 %	II) 10 %	III) 20 %	IV) 40 %
<b>Suspensión (v/v)**</b>	I) 5 %	II) 10 %	III) 20 %	IV) 40 %
<b>Atmósfera</b>	I) 93 %N <sub>2</sub> , 5 % CO <sub>2</sub> ; 2 %O <sub>2</sub>	II) 90 % N <sub>2</sub> , 5 % CO <sub>2</sub> ; 5 %O <sub>2</sub>	III) 5 % CO <sub>2</sub> en aire	
<b>Frecuencia en cambio del medio</b>	I) 24 horas	II) 48 a 72 hrs	III) 168 horas	
<b>Tiempo entre subcultivos</b>	4 días	8 días	16 días	32 días
<b>Alimentación del Bovino donador</b>	I) Concentrado	II) Forraje		

\*SBA  
2007

\*\*Ei

Tomado de Ciencia Veterinaria,

A manera de conclusión, las variables que proporcionan las mejores condiciones de mantenimiento del cultivo *in vitro* fueron: atmósfera de incubación de 5% CO<sub>2</sub>, con cambios de medio diario y subcultivos espaciados, empleando una suspensión de eritrocitos al 20% de infección en medio RPMI 1640 complementado con 25 mM de HEPES, ácido orótico y 40% de SBA proveniente de animales cuya dieta consistía en concentrado. Para determinar la infectividad *in vivo* se tomaron cultivos de 36 días con 0.8% de Ei y se inoculó un bovino esplenectomizado Holstein Friesian de tres años de edad, sin presentar de signos de anaplasmosis ni parasitemia (Orozco, 1990).

En tanto, Blouin y colaboradores utilizaron la cepa Virginia de *A. marginale*, para inocularla en un sustrato de EN, dicha cepa proveniente de un bovino infectado con machos adultos de *D. andersoni*. El medio empleado fue RPMI 1640 con HEPES, L-glutamina y SBF, en placas con pozos de 35 mm de diámetro, con 3.0 ml de medio, incubado a 37 °C en atmósfera microaerofílica y cambios de medio diariamente. En los eritrocitos se observó la rickettsia a partir de los 30 min de iniciado el cultivo, con formación de vacuolas a partir de las membranas del

eritrocito, conservándose hasta el día 6 sin evidencia de división (**Blouin et al., 1992**).

Mientras, Castañeda y colaboradores valoraron el crecimiento y viabilidad de esta rickettsia *in vitro*, a través de dos ensayos. Los aislados mexicanos elegidos fueron procedentes de casos clínicos, uno del Estado de Morelos y otro de Aguascalientes. En ambos ensayos se utilizaron la temperatura de incubación de 37 °C en atmósfera microaerofílica y cambio de medio cada 48. En el primer ensayo, el porcentaje de Ei inicial fue de 46.5% en medio F-12 y SBF, la variante estudiada fue la altura proporcionada de medio de cultivo: 3, 4 y 5 mm, como soporte se emplearon placas con pozos de 35 mm de diámetro. Los CI se observaron con la tinción de Giemsa a partir del día uno hasta el 31, con el máximo nivel de infección al día 14 con un valor de 43.30% de Ei, declinando posteriormente, los mayores rendimientos promedio se obtuvieron en la altura de 5mm de medio. El segundo ensayo se inició con 14.99% de Ei, para la siembra se aplicaron 5mm de altura de medio en placas con 24 pozos de 16 mm de diámetro y diferentes medios: F-12, M-199 y RPMI 1640 con SBF, además del efecto del medio de cultivo se evaluó el efecto de dos diferentes atmósferas: 5% de CO<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> y 90% N<sub>2</sub>. Periódicamente se tomaron muestras para frotis teñidos con Giemsa y para la tinción vital con carboxi-metil rodamina (CMRA) para observarse con el microscopio de luz blanca y de epifluorescencia, respectivamente. La morfología observada a lo largo de este estudio coincidió con el tradicional cuerpo de inclusión sencillo o doble, localizado mayoritariamente en la periferia del eritrocito. Los mayores valores de Ei se observaron en los cultivos en la atmósfera I (5% de CO<sub>2</sub> en aire). Las tinciones con CMRA demostraron formas infectivas clásicas fluorescentes, indicativas de la viabilidad de *A. marginale*, con uno a tres CI en la periferia del eritrocito en todos los casos, sin diferenciar entre medios de cultivo o condiciones de atmósfera, al día 9 de cultivo, en tanto, hacia los días 15 a 20 se observaron diferencias en la cantidad de CI por eritrocito, algunas rickettsias manifestaban formas y tamaños diferentes a la clásica, también la intensidad de luminosidad se redujo. Otro aspecto interesante fue la presencia de formas extracelulares de *A.*



*marginale*. Para los días 21 a 26, se incrementó el número de bacterias fuera de los eritrocitos, incrementándose las formas atípicas y disminuyendo el número de CI intraeritrocíticos (Castañeda *et al.*, 2006).

Otro método de cultivo *in vitro* empleado para esta rickettsia fue el informado por Waghela y colaboradores, quienes cultivaron Ei con células endoteliales de arteria pulmonar de bovino. Los becerros donadores se inocularon con  $1 \times 10^9$  Ei del aislado Texas de *A. marginale*. En un primer experimento, los Ei se mantuvieron en solución salina de Puck (SSP), glucosa y penicilina+estreptomicina (P+E) y al momento de su uso, se enjuagaron en solución salina de Hank (SSH). Se ensayaron los medios RPMI 1640 con HEPES, G-MEM y L-15 con TES, MgCl, glucosa, adenosina e inosina; todos adicionados con NaHCO<sub>3</sub>, caldo triptosa fosfato (CTF), L-glutamina, P+E, F y SBF. Como contenedores se emplearon placas de 24 pozos con 1.5 ml de medio de cultivo, la incubación fue a 37 °C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. En el décimo pase las células fueron inoculadas y diariamente se sustituyó 1.0 ml de medio, semanalmente se adicionaron a cada pozo 25 µl de EN, los subcultivos se realizaron con el material resuspendido, transfiriendo a un nuevo pozo con EN. Antes del cambio de medio se tomó una muestra del fondo del pozo para tinción de Giemsa, periódicamente se tomaron muestras para la técnica de microscopía electrónica e hibridación. Durante la primera semana el mejor rendimiento se logró con el medio G-MEM, aunque a las 2.5 semanas el rendimiento fue muy similar en todos los medios. El porcentaje de infección se mantuvo durante 16 semanas. La infección se diseminó al endotelio, en ausencia de las células endoteliales se observaron cuerpos iniciales degenerados, a los 30 días del cultivo. En un segundo experimento se valoró el impacto de una diferente dosis de Ei respecto al primer experimento utilizando el medio G-MEM. Un tercer experimento tuvo como propósito evaluar el efecto de los subcultivos a distintos tiempos y la aplicación de movimiento a los cultivos, el medio elegido fue G-MEM con cambios de medio diario y graduales. El cultivo se mantuvo en movimiento durante 1 hora a 250 rpm, en los subcultivos de la 1ª y 6ª semana de incubación los Ei se diluyeron con EN 1:3. Los autores concluyen, después de monitorear por

16 semanas los cultivos, que *A. marginale* puede crecer en un sistema de cultivo continuo por un número limitado de pases, las condiciones evaluadas no influyen directamente en el crecimiento de esta bacteria (**Waghela et al., 1997**).

b. Cultivo de *Anaplasma marginale* en células de artrópodo

A la par del inicio del cultivo en eritrocitos, se buscaban otras opciones, como es el caso de Mazzola y colaboradores, quienes informaron de la supervivencia de la rickettsia en células de mosquito *Aedes albopictus*, el medio de cultivo para mosquito se adicionó con SBF, los Ei fueron fagocitados por las células de *A. albopictus*, la presencia de *A. marginale* fue revelada por tinción con el colorante de Giemsa; en un segundo estudio, lograron mantenerla durante 60 días, según observaciones mediante microscopio electrónico, sin embargo estos mismos autores concluyen que aún cuando la ultraestructura e identidad de *A. marginale* es fácilmente determinada, no se aporta evidencia en cuanto a multiplicación o viabilidad de los microorganismos (**Mazzola et al., 1976 y 1979**).

Entre los primeros ensayos para multiplicar *A. marginale* en cultivos de células de garrapata, se encuentran los de Samish y colaboradores, quienes utilizaron la línea celular RML 15 de *D. variabilis*, en confluencia al momento de la infección e incubada en atmósferas de 2.5 ó 5% de CO<sub>2</sub> en aire, a 28 °C y en placas de 12 pozos con 21 mm de diámetro ó matraces de 25 cm<sup>2</sup> de superficie. Emplearon la cepa TA de *A. marginale* con 9 a 11% de Ei en medio L-15 adicionado con MEM y sales de Hank, enriquecido con HEPES, l-prolina y SBF. Las densidades probadas de Ei por mm<sup>2</sup> fueron: 1x10<sup>3</sup>, 1x10<sup>4</sup> y 1x10<sup>5</sup>, en monoestratos de la línea celular. Los cambios de medio se efectuaron una o dos veces por semana. Periódicamente se tomaron muestras que se tiñeron con Giemsa. Sus observaciones concluyen que la actividad fagocítica se alcanza a las 2 h de iniciado el cultivo, pero cuando la densidad de siembra fue de 1x 10<sup>3</sup> Ei, se alcanza 100% de fagocitosis al día uno, al día 4 PI todos los Ei se encontraban lisados dentro de las células, al día 10 se observaron menos de 4 partículas parecidas a *A. marginale* en las células infectadas, para el día 14 se detectaron hasta ocho partículas por célula,

incrementándose hasta el día 20. La identidad de las partículas fue determinada con colorante de Giemsa y verificada mediante ensayos de inmunofluorescencia (IF) (Samish *et al.*, 1988).

Hidalgo y colaboradores dieron a conocer que *A. marginale* fue propagada en un línea celular derivada de embriones de la garrapata *D. variabilis*. La línea celular embrionaria fue infectada con tres inóculos: uno a partir del intestino medio de garrapatas adultas, alimentadas de un becerro infectado con la cepa Mississippi de *A. marginale*; otro constó de intestino de ninfas alimentadas en un becerro infectado con la cepa Virginia de *A. marginale*; y el tercer inóculo con intestinos de garrapatas adultas infectadas durante su estadio de ninfas con el aislado Virginia de *A. marginale*. Los cultivos se incubaron a 28 o 37 °C y los pases realizados a intervalos de 7 a 10 días. Los primeros cultivos positivos se encontraron a 4 días PI, con valores de entre 2 y 5% de células infectadas, aumentando a los 7 ó 10 días. El desarrollo de la rickettsia fue monitoreada mediante microscopía electrónica de transmisión e IF indirecta con anticuerpos monoclonales. La morfología del *A. marginale* cultivada fue muy similar a la observada en los Ei, con estructuras rodeadas por una triple membrana. Aparentemente no se observó ningún efecto citopático en las células, conforme el número de pases se incrementaba, aumentaba el número de células infectadas, mayormente favorecidas con la temperatura de incubación de 28 °C. Se obtuvieron cultivos continuos de *A. marginale*, independientemente del inóculo; con el primero el cultivo perduró 11 meses y con el segundo y tercero sólo 9 meses. Empero, no se hicieron intentos para verificar si la infectividad de la rickettsia en el huésped bovino (Hidalgo *et al.*, 1989).

Otro ensayo de cultivo *in vitro* utilizando líneas celulares derivadas de garrapatas fue hecho por Munderloh y colaboradores, quienes ocuparon tres líneas celulares de especies de garrapata reconocidas como vectores biológicos: *Rhipicephalus appendiculatus*, *D. variabilis* y *D. albipictus* y una derivada de *Ixodes scapularis*, reconocida como no transmisora; emplearon la cepa Virginia de *A. marginale* (Kocan *et al.*, 1992). La superficie de siembra fueron matraces de cultivo de 25

cm<sup>2</sup> de superficie, con 2 µl de medio/mm<sup>2</sup> e incubados a 34 °C. El medio de cultivo utilizado fue L-15 con SBF, CTF, Lipoproteína bovina concentrada, NaHCO<sub>3</sub> y ácido 3-(N-Morpholino) propano-sulfónico (MOPS) como sal amortiguadora. Para favorecer la interacción entre la bacteria y las células de garrapata, a las 24 h de inicio del cultivo se añadieron más células sin inocular, el cambio de medio fue una vez por semana. El monitoreo se llevó a cabo mediante observación al microscopio óptico de las células teñidas con el colorante de Giemsa. El primer resultado positivo se observó al día 34 del cultivo, alcanzando un 30% del estrato celular, sin provocar ningún efecto citopático, aún cuando el porcentaje de infección llegó al 60%. Se realizaron subcultivos con suspensiones de células no infectadas en diluciones desde 1:3 hasta en 1:20; en este último caso, se obtuvo 100% de infección en las células de garrapata a los 21 días. El cultivo se logró mantener de forma continua por un periodo de 16 meses. *A. marginale* cultivada en la línea IDE 8 (*I. scapularis*) presentó una morfología distinta a la descrita anteriormente para células de garrapata o de ganado bovino. Las células infectadas con porcentajes mayores al 90% se desintegraron, liberando a los microorganismos. Los cultivos con 5 y 9.5 meses de antigüedad, se inocularon a becerros Hereford esplenectomizados. Estos padecieron la infección clínica entre las 2 y 4 semanas PI, asimismo, las garrapatas *D. andersoni* alimentadas en estos animales, fueron capaces de transmitir la infección a otro becerro susceptible (Munderloh et al., 1996).

c. Cultivo de *Anaplasma marginale* en otro tipo de células

Hidalgo en sus estudios de 1974 y 1975, propagó a la bacteria en cultivos de células de ganglios linfáticos de bovino. Los E<sub>i</sub> empleados habían sido mantenidos en nitrógeno líquido con 10% de DMSO en SBH, después de descongelarse se resuspendieron en medio MEM con SBF, P+E y vitamina B12 y se colocaron en contenedores de 75 cm<sup>2</sup> de superficie sobre los monoestratos de células de ganglios linfáticos, incubándose a 37 °C. Se dio seguimiento durante 120 h, los valores de la rickettsia tuvieron un incremento exponencial durante las primeras 24

h, disminuyendo en las 48 h posteriores, alcanzando los mayores rendimientos a las 17.1 h de iniciado el cultivo. Las técnicas para la demostración del microorganismo fueron tinción de Giemsa y naranja de acridina (NA), así como IF directa. Hidalgo estudió el efecto de la adición de oxitetraciclina en el desarrollo de *A. marginale*, encontrando que la adición de este fármaco influye rápida y negativamente en el número de bacterias en cultivo a partir de las 12 h, hasta el término del experimento. Este autor cita a Marble y Hanks, quienes informaron de la propagación de *A. marginale* durante 20 semanas en médula ósea de conejo suspendida en medio M199 adicionado con suero ovino. No se evidenció la replicación del microorganismo, ni tampoco la infectividad al ser inoculado en animales; el propio Hidalgo cita un experimento previo, realizado por él mismo en el cual intentó el cultivo continuo en esta misma estirpe celular, siendo reducido el número de anaplasmas hasta llegar a cero, al cabo de tres pases. **(Hidalgo, 1974 y 1975).**

Orozco cita cuatro experimentos de cultivo *in vitro* en diversas estirpes celulares: Hruska y colaboradores intentaron la multiplicación de la rickettsia, durante ocho semanas en médula ósea, eritrocitos de bovino y células renales suspendidas en medio M199 adicionado con SBF, sin tener evidencia de multiplicación **(Hurska et al., 1968)**; Marble y Hanks trabajaron con  $10^6$  células/ml de médula ósea de conejo diluida en medio M-199 con SBF, vitamina B12,  $\text{NaCO}_3$  y antibiótico, incubadas a 37 °C durante 72 h, la presencia de la bacteria se demostró durante 140 días sin evidencia de multiplicación **(Marble y Hanks, 1972)**; Trueblood utilizó nódulos linfáticos de bovino, en tres modalidades e incubados a 37 °C en una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$  en aire, con medio M-199 con SBF; en la primera modalidad los Ei se descongelaron y se infectaron las células a las 48 h post-siembra, detectando *A. marginale* en el sobrenadante al día 7, 8 y 9, dicho sobrenadante fue inoculado a bovinos susceptibles, los cuales presentaron anaplasmosis al día 28 PI, la segunda modalidad consistió en mantener a los cultivos en agitación constante y en la tercera se adicionaron antibióticos, en conclusión, los resultados obtenidos en todo el estudio no variaron **(Trueblood,**

1973); Dimopoulos y Schrader ocuparon monoestratos de células de corazón, riñón, pulmón, médula ósea e hígado de bovinos sanos y enfermos de anaplasmosis, manteniéndolos hasta 4 semanas sin lograr infectar a animales susceptibles; Summers evaluó líneas celulares renales embrionarias, de piel, músculo, intestino, pulmón y riñón humano y fibroblastos de ratón en medio MEM con SBA, la infección fue evidente en el citoplasma de células renales a las 24 h post-inoculación; Luther empleó médula ósea, ganglios linfáticos de bazo y timo de ganado sano e infectado, después de algunos pases inoculó a bovinos, sin que presentaran signos del padecimiento.

Blouin y sus colaboradores infectaron células nucleadas de origen bovino, con la cepa Virginia de *A. marginale*, a partir de garrapatas macho de *D. andersonii* alimentadas en becerros infectados. La infección se llevó a cabo al día tres de la siembra de las líneas celulares de aorta de bovino y células turbinadas, en contenedores de 5 cm<sup>2</sup> de superficie en medio G-MEM pH de 6.8 a 7, con suero de ternera, CTF y P+E y un volumen de medio de 2.0 ml. El inóculo consistió en glándulas salivales de las garrapatas diseccionadas y mezcladas con medio MEM, después de la centrifugación, el sobrenadante fue inoculado a los monoestratos celulares. Los cultivos se mantuvieron en rotación a 80 rpm durante 30 minutos a 37 °C, 2 h más tarde el medio fue reemplazado. Para el mantenimiento de los cultivos el cambio de medio fue cada 3 días, reemplazando 2/3 partes del medio viejo y sustituyendo con medio fresco. A las 2 ó 4 semanas se realizó el subcultivo. La duración de este sistema de cultivo *in vitro* fue de 9 semanas, se observaron CI mediante la tinción de Wright y se prepararon muestras para microscopía electrónica y para hibridación. Morfológicamente se identificó al *A. marginale* en las células de aorta, observándose adjunta a las membranas de las células hospederas a partir de la primera hora PI, después de 18 h cambiaron las formas reticuladas, a formas electro densas, a las 2 semanas PI pudieron apreciarse inclusiones intracitoplasmáticas cercanas al núcleo de las células turbinadas, el número de inclusiones disminuyó a medida que aumentaba el número de pase. La membrana y la pared celular fueron separadas por una vacuola con numerosos

organismos rickettsiales, identificados hasta las 6 semanas PI. La técnica de hibridación arrojó resultados positivos; en tanto, en las células turbinadas los resultados positivos se presentaron hasta la 7ª semana PI. Para el desafío *in vivo* se inocularon a 5 becerros con células suspendidas en 2.0 ml de MEM, el seguimiento de los animales fue con frotis teñidos con Giemsa, prueba de fijación del complemento y ELISA, ninguno de los becerros presentó anaplasmosis clínica ni presencia de anticuerpos contra *A. marginale*. Adicionalmente, en uno de los becerros inoculado se colocaron 50 hembras *D. andersoni* a las 10 semanas PI, para alimentarse, concluido el periodo de alimentación, las garrapatas se transfirieron a becerros sanos, los cuales tampoco desarrollaron signos de anaplasmosis (Blouin et al., 1993).

En el informe del grupo de investigadores de la doctora Munderloh se describe el cultivo en líneas de células endoteliales de bovino y de mono *Rhesus* (*Maccaca mulata*). En este trabajo también se estudió la interacción de *A. phagocytophilum*, con sus células blanco, todas las líneas celulares utilizadas como soporte, se adquirieron comercialmente. Primero se inoculó la cepa Virginia Am291 de *A. marginale* en la línea ISE 6 (Munderloh et al., 1994 y 1996) y se mantuvo en medio de cultivo L15 con pH de 7.5 a 7.7 adicionado con CTF, SBF, Lipoproteína concentrada bovina, HEPES y NaHCO<sub>3</sub>, a 34 °C en atmósfera microaerofílica, posteriormente estos cultivos se transfirieron a las líneas de retina fetal de mono *Rhesus* (RF/6A), córnea de bovino adulto (BCE C/D-1b), células turbinadas de bovino (BT) y de aorta pulmonar de bovino (CPAE). Para el seguimiento de la infección realizaron tinciones de Giemsa e IF directa. Para el mantenimiento de los cultivos, incrementaron la concentración de SBF y la temperatura, los subcultivos se realizaron semanalmente con una dilución 1:4. Al término del experimento tomaron muestras y las prepararon para microscopía electrónica y extracción de ADN. Con el ADN extraído hicieron la técnica de PCR con varios iniciadores: uno para identificar a los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma*, dos para *msp2* y otro más para la región conservada de *msp1β*. El crecimiento de la bacteria se observó en células endoteliales de retina y córnea, *A. marginale* presentó un patrón de

crecimiento más lento a comparación de *A. phagocytophilum*. El porcentaje de infección en las células endoteliales se comportó fluctuante, al día 30, fue del 70%. En la estirpe de córnea la rickettsia se mantuvo hasta 30 días, en células de aorta pulmonar la infección sólo alcanzó el 30% durante 2 semanas, en la estirpe de retina se formaron grandes CI electrodensos, durante los primeros días. Eventualmente las células presentaban lisis liberando los CI hacia el exterior, expandiéndose por todo el monoestrato. La ubicación de *A. marginale* se presentó a la periferia de las membranas celulares y nucleares. En las estirpes de aorta y células turbinadas no se demostró el desarrollo continuo del microorganismo (Munderloh et al., 2004).



## **1. Justificación**

Hasta el momento no se cuenta con un método de control sencillo y eficaz contra la anaplasmosis, por lo que resulta de gran importancia desarrollar estrategias dirigidas a su control o con fines profilácticos. Por esta razón, el uso de líneas celulares es una herramienta que potencialmente provee de modelos de estudio, especialmente cuando se trata de microorganismos exigentes (**Sultan y Haagsman, 2001**). En el caso de esta rickettsia es factible generar conocimiento acerca de sus interacciones biológicas, con algunas de las células involucradas en su transmisión (**De la Fuente et al., 2002a**), sin descartar la posibilidad de su producción *in vitro*.

## **2. Hipótesis**

Si se inocula *Anaplasma marginale* bajo condiciones de laboratorio controladas, empleando como sustrato células susceptibles típicas y atípicas, es posible su multiplicación.

### **a. Objetivo General**

Establecer el cultivo de *A. marginale*, en al menos una estirpe celular

### **b. Objetivos particulares**

- i) Adaptar a las células hospedadoras atípicas,
- ii) Establecer el cultivo de por lo menos una cepa de *A. marginale* en las células hospedadoras adaptadas,
- iii) Inocular cultivos *in vitro* de *A. marginale* a bovinos susceptibles

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. *Animales experimentales*

Se utilizaron 10 bovinos mayores de 12 meses de edad, provenientes de zona libre de garrapatas, tuberculosis y brucelosis; previamente seleccionados como libres de anticuerpos contra babesiosis y anaplasmosis. Mantenidos en estabulación, con instalaciones de concreto, bebederos automatizados y alimentados con heno y concentrado, *ad libitum*, en condiciones de semi-aislamiento.

#### 2. *Cepas de Anaplasma marginale*

La cepa MEX-01-001-01 se aisló en Aguascalientes, Aguascalientes (Jiménez, 2006); MEX-15-009 de Texcoco, estado de México (García-Ortíz *et al*, 2000); MEX-17-017-01 de Puente de Ixtla, Morelos (Jiménez, 2006); MEX-31-096 de Tizimín, Yucatán (García-Ortíz *et al*, 2000) y el aislado Soto la Marina, del municipio con el mismo nombre, en Tamaulipas. Todas originarias de México, provenientes de casos clínicos, preservadas en congelación a -120 °C e inoculadas ocasionalmente a bovinos esplenectomizados.

#### 3. *Líneas celulares*

Líneas celulares endoteliales, de diversos orígenes anatómicos se ocuparon a lo largo de los experimentos. Las estirpes nativas, RF/6A $\phi$  de retina de mono *Rhesus* (*Macaca mulatta*) y la línea BCE C/D-1b $\gamma$  de córnea de bovino; ambas adquiridas comercialmente. La línea BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub> $\eta$ , de cordón umbilical de bovino es una estirpe celular transformada con una proteína oncogénica (Cajero-Juárez *et al.*, 2002). Las tres líneas se mantuvieron en criopreservación a -196 °C en nitrógeno líquido, hasta su uso.

#### 4. *Cultivos celulares*

Todo el experimento se realizó bajo condiciones estrictas de esterilidad.

a. Preparación de medios de cultivo

Los medios de cultivo se prepararon con agua tridestilada a temperatura ambiente, entre 15 a 20° C, empleando un matraz Erlenmeyer o un vaso de precipitado. Al agua se le fue agregando pausadamente el medio de cultivo en polvo. Se agitó sin calor, hasta disolver por completo, posteriormente se adicionó  $\text{NaHCO}_3^\omega$ , según la formulación para cada medio, con una cantidad determinada. El pH se ajustó a 6.8 con soluciones 3 M de HCl ó NaOH con ayuda de un potenciómetro (VWR Scientific Modelo 8005). Los suplementos se añadieron a la solución base e inmediatamente después se esterilizó por ultrafiltración empleando filtros desechables $^\alpha$  con una membrana con tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$ . Finalmente, el medio de cultivo se distribuyó en envases $^\beta$  de vidrio con tapón de rosca de 250, 500 y 1,000 ml de capacidad, previamente esterilizados y secos. Cada envase fue identificado consecutivamente y conservado entre 2 y 4 °C, hasta su uso.

Para la línea RF/6A se utilizó el medio MEM $^\lambda$ , (presentación 13.4 g/L, 10 frascos), al momento de su preparación se añadieron 2.2 g de  $\text{NaHCO}_3$  por litro; para el caso de la línea BCE/D-1b se empleó el medio DEM $^\iota$ , en este caso, al momento de su preparación se añadieron 3.7 g de  $\text{NaHCO}_3$  por cada litro preparado y para BUVEC E6E7 se utilizó el medio F-12 HAM modificado $^\mu$  (presentación 13.4 g/L, 10 frascos), con 2.5 g de  $\text{NaHCO}_3$  por litro.

Los complementos utilizados fueron:

SBF  $^\chi$  .- A partir de la presentación original del proveedor, se descongeló rápidamente y se distribuyó en alícuotas con volumen de 50.0 ml, en envases de vidrio con tapón de rosca, previamente esterilizados y secos; las alícuotas se identificaron, numeraron progresivamente y se mantuvieron a - 20 °C hasta el momento de su uso.

P+E $^\delta$  .- Esta mezcla de antibióticos se obtuvo en condiciones de congelación por parte del proveedor, se distribuyó en alícuotas con volumen de 5.0 ml, a

concentraciones de 100x, en tubos estériles de plástico; se identificaron, numeraron progresivamente y se mantuvieron a - 20 °C hasta el momento de su uso.

Fungizona® (F).- Con esta solución antimicótica de anfotericina B 1,000x, se formaron alícuotas de 500µl en tubos estériles, se identificaron, numeraron progresivamente y se mantuvieron a - 20 °C hasta el momento de su uso.

La suplementación del medio consistió en la adición de 10% (v/v) de SBF, P+E (100 UI + 125 µg/ml) y 0.25 µg/ml de F.

b. Condiciones de cultivo y mantenimiento de las líneas celulares

Independientemente del contenedor empleado, la cantidad de medio de cultivo por cada mm<sup>2</sup> de superficie fue de 2 µl. Asimismo, la densidad de siembra varió de 1.0 a 1.2 x 10<sup>3</sup> células/mm<sup>2</sup> para pozos de 16 mm de diámetro o matraces de 25 cm<sup>2</sup>, respectivamente.

Para el inicio del cultivo a partir de material criopreservado, cada línea se sembró por duplicado. Primeramente se prepararon dos matraces de cultivoΦ de 25 cm<sup>2</sup> de superficie, estériles y desechables. A cada matraz se le agregaron 5.0 ml de medio complementado, con una pipeta estéril<sup>K</sup>. Cada matraz se identificó con las letras A y B, estirpe celular, número de pase y fecha.

Una vez alistado este material, se retiraron los viales del tanque con nitrógeno líquido con la ayuda de guantes de asbesto y gafas protectoras. Los crioviales se descongelaron rápidamente en baño María (National Modelo 102-02) a 37 °C. Después de descongelar, se transfirió todo el contenido del criovial (1.0 ml aproximadamente) a un tubo de centrifuga estéril de 15.0 ml y se agregó 9.0 ml del medio. El lavado de las células se hizo por centrifugación a 750 G durante 15 min, a 4 °C (Centrífuga Jouan). Con asepsia estricta, se decantó el sobrenadante en un vaso de precipitado estéril, vertiendo manualmente el contenido del tubo. Más adelante, se resuspendió el paquete celular en 1.0 ml de medio y se agitó vigorosamente, empleando el "Vortex Genie® 2". Hecha la suspensión celular

uniforme, se tomaron 500  $\mu\text{l}$  y se depositaron en cada uno de los matraces previamente alistados y se incubaron con las constantes siguientes: temperatura de 37 °C, atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$  en aire, saturada de humedad (Incubadora NuAire). Los matraces no se cerraron por completo, para permitir el intercambio de gas atmosférico.

Antes de cada cambio de medio de cultivo, los medios se retiraron del refrigerador para que alcanzara la temperatura ambiente. Posteriormente, se retiraron los matraces de cultivo de la incubadora y se observaron con el microscopio invertido, con los objetivos 10x y 40x, observando las siguientes características: porcentaje de confluencia, formas celulares, porción de células en el sobrenadante, presencia o ausencia de contaminación. Para el cambio de medio, se colocó el matraz en posición vertical y se retiró con una pipeta estéril todo el medio de cultivo, recolectándolo en un vaso de precipitado estéril. Se reconstituyó con 5.0 ml de medio de cultivo fresco. Nuevamente, se colocó el matraz en la incubadora. El cambio de medio se realizó cada 48 h, aplicado a todas las estirpes.

Con una frecuencia aproximada de 6 días, las estirpes celulares fueron sometidas al proceso de subcultivo, con la finalidad de criopreservar semilla y para generar material suficiente en los experimentos posteriores. Se utilizó el mismo procedimiento que el cambio de medio, excepto que en lugar de añadir medio fresco se agregó a cada matraz Solución Salina Amortiguadora de Fosfatos<sup>v</sup> (SSAF) pH 7.4 estéril, enjuagando la monocapa celular durante 15 segundos, aproximadamente. Después, se colocó nuevamente el matraz en posición vertical y se retiró con pipeta estéril todo la SSAF, recolectándose en un vaso de precipitado.

Más adelante, se adicionó a cada matraz 2.5 ml de solución Tripsina-EDTA<sup>o</sup> 1x (0.25 % de tripsina, 1mg de EDTA), a razón de 1  $\mu\text{l}/\text{mm}^2$  de superficie, se incubó a 37 °C durante 7 a 10 min, con los tapones de los matraces bien cerrados, verificando que las monocapas celulares estuvieran completamente cubiertas por dicha solución. Al término de la incubación los matraces se balancearon, provocando así el desprendimiento de las células, hasta que la superficie aparecía clara y transparente. Cuando las células se desprendieron completamente, se

enderezó el matraz y se agregaron 5.0 ml de medio, resuspendiendo mediante una agitación suave. Hecha la suspensión celular, se recolectó con una pipeta y se trasladó a un tubo estéril de 15.0 ml de fondo cónico, que se centrifugó a 750 G durante 15 minutos a una temperatura entre los 15 y 18 °C. Se decantó el sobrenadante en un vaso de precipitado estéril, vertiendo manualmente el contenido del tubo, evitando hacer más de un movimiento. El paquete celular se resuspendió en 1.5 ml de medio fresco, agitando vigorosamente, con el “Vortex Genie® 2”. Se tomó asépticamente con una micropipeta y su punta estéril una muestra de 10 µl para conteo celular en el hemocitómetro de Neubauer, observando en el microscopio de luz (Leica Modelo DME) con el objetivo 10x ó 40x. El conteo se realizó observando las células ubicadas dentro de las áreas central y de los vértices; la suma de las cinco áreas se multiplicó por 50, dando el número de células/µl (Hansen, 2000). A partir de la concentración celular, se determinó el volumen que contuvo la dosis de siembra.

c. Proceso de criopreservación

Al momento de preservar la línea celular por ultracongelación, se aplicó el protocolo de tripsinización descrito previamente; el paquete celular obtenido se resuspendió en 3.1 ml de medio y se agitó vigorosamente, de esta suspensión se tomó asépticamente con una micropipeta y su punta estéril, una muestra de 10 µl para conteo celular. Nuevamente se centrifugó a 750 G durante 15 minutos, pero ahora a 4 °C, una vez obtenido el paquete, se decantó el sobrenadante en un vaso de precipitado estéril vertiendo manualmente el contenido del tubo, evitando hacer más de un movimiento. Por cada dosis a congelar, equivalente a  $3 \times 10^6$  células, se añadió 1.0 ml de una solución de DMSO $\pi$  al 6% en medio de cultivo, se agitó hasta hacer homogénea la suspensión, distribuyendo en volúmenes de 1.0 ml en viales criogénicos $\theta$  estériles. Cada vial se identificó con el nombre de la línea, sublínea, número de pase, número de viales y dosis congelada. Los crioviales se mantuvieron en un contenedor con alcohol isopropílico en congelación a - 70 °C durante al menos 48 h. Por último estos viales se almacenaron en un tanque contenedor de

nitrógeno líquido.

## 5. *Eritrocitos infectados*

### a. Obtención de eritrocitos infectados de bovinos donadores

Los animales que sirvieron como donadores de Ei fueron esplenectomizados e inoculados con diversas cepas de *A. marginale*. Posteriormente se les dio un seguimiento clínico con la medición periódica de temperatura corporal, VCA y rickettsemia. Cuando los valores de infección fueron mayores al 10%, se tomó sangre infectada mediante punción en la vena yugular, empleando un matraz Kitasato seco de 500 ó 1,000 ml, conteniendo de 50 a 100 ml de perlas de vidrio de 5 mm de diámetro, previamente esterilizado por autoclave a 1.2 Kg/cm<sup>2</sup> de presión de vapor durante 25 minutos. La sangre obtenida se lavó con solución VYM (Vega et al., 1985) estéril adicionada con P+E a razón de 100 UI y 125 µg/ml, respectivamente. Cada lavado consistió en centrifugar a 1,500 G durante 15 min a 4 °C, decantando con asepsia estricta y resuspendiendo al 50% (v/v) en VYM. Para calcular el porcentaje de Ei se preparó en duplicado, un frotis con 4 µl de la muestra y se extendió a lo largo de un portaobjetos, se fijó con metanol por 5 minutos, dejándose secar a temperatura ambiente y una vez seco, se le agregó el colorante de Giemsa en una dilución de 1:5 con agua destilada, incubándose 45 minutos a temperatura ambiente, finalmente se enjuagó y se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez seco se observó con el microscopio óptico con el objetivo 100x y se contaron al menos 1,000 eritrocitos. Para determinar la concentración de Ei de la suspensión, se tomaron en cuenta el conteo de eritrocitos en el hemocitómetro y el porcentaje de Ei observado en los frotis.

### b. Extracción de cuerpos iniciales de *Anaplasma marginale*

Se aplicaron diversos procesos para la liberación de los cuerpos iniciales de *A. marginale*, entre ellos se encuentran los siguientes:

#### i. Lisis de Ei por choque osmótico

Las soluciones empleadas en este protocolo fueron esterilizadas y refrigeradas a 4 °C hasta el momento de su uso. Se inició a partir de una suspensión al 50% de Ei

en VYM (v/v). Se diluyó una (1) parte de Ei más cinco (5) partes de solución compuesta por  $\text{NH}_4\text{Cl}$  al 0.83% en Tris 0.01 M pH 7.5, en baño de hielo y en tubos estériles de 30 ml para ultracentrifugación, dejándose incubar durante 15 minutos, agitando para provocar la lisis celular. Luego, se centrifugó a 15,000 G por 30 minutos a 4 °C, en centrífuga de ángulo fijo, desechando el sobrenadante cuidadosamente y aforando al volumen original con solución de lisis fría. Nuevamente se restituyó la suspensión con otro volumen igual de VYM estéril, en baño de hielo e inmediatamente después se centrifugó a 15,000 G por 30 minutos a 4 °C, aforando en cada ocasión con solución de lisis fría hasta que se eliminó la hemoglobina. El sedimento se reconstituyó en VYM, una (1) parte de estroma más tres (3) partes de VYM, este material se sonicó en volúmenes no mayores de 10 ml en tubos de 50 ml de fondo cónico, en baño de hielo con un sonicador (Fisher Sonic Dis-membrator, Modelo 300) a 50% de potencia durante tres periodos de dos minutos cada uno, con un minuto de descanso entre cada periodo. Al sonicado se le agregaron tres volúmenes más de VYM, después, de esta suspensión se tomaron siete (7) volúmenes y se mezclaron con tres (3) volúmenes del gradiente de Percoll, preparado según las recomendaciones del proveedor: una (1) parte de NaCl 1.5 M más nueve (9) partes de "Percoll<sup>®</sup>". El gradiente se colocó en tubos para ultra centrifugación en volúmenes menores a 30 ml, se centrifugó a 23,000 G durante 30 minutos a 4 °C. Concluida la centrifugación se tomaron los CI con una pipeta Pasteur, descartando las membranas eritrocíticas. Para eliminar el exceso de Percoll<sup>®</sup>, los CI se lavaron 2 veces con una solución de VYM-PMSF 1mM, centrifugando a 15,000 G por 15 minutos a 4 °C y resuspendiendo con dicha solución. Terminado el lavado se agregaron tres (3) volúmenes de VYM-PMSF 1 mM al sedimento (**Montenegro-James et al., 1990**).

ii. Lisis de Ei por choque osmótico con proteasas

Se siguió el mismo protocolo descrito en el inciso anterior, con la diferencia de que es este caso, no se adicionó PMSF, el inhibidor de proteasas.



### iii. Lisis de Ei por ondas ultrasónicas

Se inició con una dilución 1:4, se tomó una (1) parte de Ei al 50% en VYM más cuatro (4) partes de VYM y se dispuso en tubos estériles de 30 ml para ultracentrifugación. Antes de emplear el sonicador (Fisher Sonic Dis-membrator, Modelo 300), se lavó la punta del mismo, con jabón y agua destilada estéril; después se desinfectó con una gasa empapada en etanol al 70% y se flameó por 2 segundos con mechero bunsen. Se sonicó a volumen de 12.0 ml, en baño de hielo. El sonicador se usó a 50% de potencia, durante 3 periodos de 2 minutos con un minuto de descanso entre cada periodo. Terminado este proceso se centrifugó a 10,000 G durante 30 minutos a 4 °C, a manera de lavado, aforando al volumen original en cada ocasión con VYM hasta que se eliminó la hemoglobina. Eliminada la hemoglobina, la suspensión fue conservada a 4 °C hasta el momento de su uso.

### iv. Lisis de Ei sometidos a choque térmico

Los Ei en suspensión al 50% en VYM se congelaron a -70 °C durante 60 minutos, después se sumergieron a -196 °C en nitrógeno líquido durante 60 minutos. Finalmente, se descongeló rápidamente a 37 °C en baño María. El material obtenido se mantuvo a 4 °C hasta el momento de su uso.

### v. Lisis de Ei por tratamiento con saponina

Se diluyó una (1) parte de la suspensión de Ei al 50% en VYM más dos (2) partes de solución estéril de Saponina al 0.015% en SSAF pH 7.4, en tubos estériles de 30 ml para ultracentrifugación, agitando vigorosamente para provocar lisis celular, después esta suspensión se restituyó con otro volumen igual de VYM y se centrifugó varias veces a 10,000 G durante 30 minutos a 4 °C, aforando en cada ocasión con tres (3) partes de la solución de Saponina hasta eliminar la hemoglobina. Después del último lavado se resuspendió al volumen original con VYM y se almacenó a 4 °C hasta el momento de su uso.

## 6. Identificación del ácido desoxirribonucleico de *Anaplasma marginale*

### a. Extracción de ADN a partir de Ei

Se empleó el paquete comercial Ultra Clean DNA BloodSpin<sup>®</sup>. En tubos estériles con capacidad de 1.6 ml se adicionaron: la sangre problema en volúmenes de 200 µl; 20 µl de proteasa K, equivalente a 0.1136 mg y 200 µl de la solución B1, compuesta por guanidina-HCl en Tween, esta mezcla se agitó vigorosamente en el “Vortex Genie<sup>®</sup> 2” durante 15 segundos aproximadamente y se incubó durante 10 minutos a 65 °C en baño María, concluido este periodo, los tubos se centrifugaron (Microcentrífuga Hermle, Modelo Z230MA) a 13,000 G por 5 segundos, acto seguido se agregó 200 µl por cada tubo, de la solución B2 constituida por etanol absoluto, se agitó nuevamente con el “Vortex Genie<sup>®</sup> 2” durante 15 segundos. Nuevamente se centrifugó a 13,000 G por 5 segundos, la mezcla obtenida se trasladó por completo a un tubo con filtro y se centrifugó por 1 minuto a 13,000 G, terminada la centrifugación, se desechó todo el sobrenadante, transfiriendo únicamente el filtro a un tubo nuevo. Posteriormente se agregaron 500 µl de la solución B3, conformada por guanidina-HCl y etanol, centrifugando durante 30 segundos a 13,000 G, terminado este proceso, se removió el filtro y se retiró el sobrenadante, después se adicionó 500 µl de la solución B4, cuya composición es Tris-NaCl-etanol y se centrifugó durante 30 segundos a 13,000 G, descartando el sobrenadante. El filtro se transfirió por segunda ocasión a un tubo nuevo y se agregaron 200 µl de la solución B5, compuesta de 10 mM de Tris-HCl, se incubó durante 5 minutos a 65 °C en baño María y se centrifugó durante 1 minuto a 13,000 G. El filtro se retiró, y el ADN quedó inmerso en el sobrenadante del tubo (Jiménez, 2006). El ADN se mantuvo a 4 °C para evitar su degradación. Como control negativo se empleó ADN de jerbo y como control positivo las cepas Morelos o Tizimín de *A. marginale*.

b. Extracción de ADN a partir de células nucleadas

La técnica empleada fue la denominada “Hot Shot” (Truett et al., 2000). Para esta técnica las células en suspensión se colocaron en tubos estériles de 1.6 ml de capacidad, se centrifugaron a 750G a 18 °C durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante y el paquete celular se expuso a una solución de NaOH 25 mM pH 12, 75 µl durante 15 minutos a 95 °C, inmediatamente después se dejó enfriar a 4 °C y acto seguido, se agregó 75 µl de una solución de Tris-HCl 40 mM pH 5, se mezcló y dejó sedimentar durante 15 minutos, a temperatura ambiente. Al sobrenadante se le adicionó 13.5 µl de Acetato de amonio y 720 µl de isopropanol al 99%, esta mezcla se centrifugó a 2,000 G durante 15 minutos, el paquete obtenido se lavó dos veces con 250 µl de isopropanol al 70% en agua destilada estéril, entre cada lavado se centrifugó a 2,000 G durante 5 minutos, descartando el sobrenadante. Por último, los tubos se dejaron secar por al menos 15 minutos a temperatura ambiente, en la campana de flujo laminar horizontal, luego, se adicionaron 50 µl de agua libre de nucleasas. El ADN contenido en los tubos se conservó a 4 °C.

c. Reacción en cadena de la polimerasa

Se siguió un protocolo de PCR anidado, como iniciadores se emplearon fragmentos del gen conservado de *msp5* (Torioni de Echaide et al., 1998). Los iniciadores usados fueron:

sentido 5' → 3' GCATAGCCTCCGCGTCTTTCY,

contrasentido 5' → 3' TCCTCGCCTTGCCCCTCAGA<sup>99</sup>, e

interno 5' → 3' TACACGTGCCCTACCGACTTA

Para esta técnica se usó un paquete comercial denominado Master Mix, dicho paquete contiene la enzima Taq polimerasa a concentraciones de 50u/ml, 400 µM dNTPs (desoxinucleótidos trifosfatados), 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, amortiguadores de reacción y agua libre de nucleasas. Para la reacción, se utilizaron viales estériles y libres de nucleasas con capacidad de 200 µl, en cada uno se depositaron 12.5 µl

de la solución Master Mix, 1.0 µl de iniciadores y 11.5 µl del ADN problema, en caso de los controles sólo se adicionó 6 µl del ADN control y 5.5 µl de agua estéril libre de nucleasas. Todos los viales se colocaron en el termociclador (Biometra Whatman), durante la primera etapa, el paso de desnaturalización fue a 95 °C por 60 segundos, la alineación a 65 °C por 58 segundos y la extensión a 72 °C por 27 minutos; en la segunda fase, la desnaturalización fue a 95 °C durante 20 minutos, la alineación a 65 °C durante 58 segundos y la extensión a 72 °C durante 30 segundos.

d. Revelado del ADN mediante geles de agarosa

Los geles se prepararon a una concentración del 1% (p/v) [0.5 g agarosa<sup>EE</sup>/50 ml agua destilada estéril] en un matraz Erlenmeyer, se agitó con calor, una vez disuelta se añadió bromuro de etidio<sup>\*\*</sup> a razón de 5mg/ml de agarosa. La solución tampón para la electroforesis fue TAE (Tris-acetato-EDTA) al 0.5x, la fuente de poder (Bio Rad Modelo 1000) se ajustó a 100 voltios y el gel se dejó en la cámara de electroforesis, para el corrimiento, durante 30 minutos. Como referencia se empleó un marcador<sup>∞</sup> de 100 pares de bases, colocado en el primer pozo del gel, en el resto se colocaron controles positivo y negativo, así como los ADN problema. Se empleó 1 µl de una mezcla hecha con azul de bromofenol y xilecianol al 0.25% en glicerol al 30%, por cada 5 µl de ADN. Una vez terminado el tiempo de corrimiento, se observó el contraste entre el brillo de las bandas del ADN en el gel sobre el fondo oscuro en un transiluminador, emisor de luz UV de 200-300nm (Ultra-Lum Modelo UVA-40) (Serwer, 1983; Gerhardt *et al.*, 1994).

## 7. Ensayos Inmunológicos

a. Elaboración de suero hiperinmune

i. Protocolo de inoculación del bovino donador y colección de suero

Se inoculó en dos ocasiones vía SC a un bovino adulto, al día cero y 24, con 80.0 µg de CI diluidos en 1.0 ml de VYM estéril. Los CI se obtuvieron de la cepa de *A. marginale* "Aguascalientes", inoculada a un bovino esplenectomizado; una tercera

inoculación a manera de desafío, se realizó al día 113 con  $9.6 \times 10^9$  de Ei vía intravenosa (IV), con la cepa "Morelos", proveniente de material criopreservado. Al día 19 post-desafío se tomó aproximadamente 500.0 ml de sangre por punción de la vena yugular, en tubos estériles de 50.0 ml. Una vez colectada la sangre se centrifugó a 1,500 G durante 15 minutos a 4 °C, el suero colectado se distribuyó en alícuotas de 2.0 ml, se identificaron y numeraron progresivamente, guardándose a -20°C.

#### ii. Concentración de Inmunoglobulinas

En un vaso de precipitado de 150.0 ml en baño de hielo, se colocaron 15.0 ml de suero hiperinmune y en condiciones de agitación constante se agregaron 15.0 ml de una solución saturada de  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  por un tiempo de 15 minutos. La agitación constante se continuó durante 24 h, a 4 °C, al término del periodo el volumen total se centrifugó a 1,500 G por 10 minutos a 4 °C y se desechó el sobrenadante. El precipitado formado se disolvió en 15.0 ml de agua destilada y se dispuso en un vaso de precipitado en baño de hielo con agitación constante, adicionando 15.0 ml de la solución saturada de  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ , por 15 minutos. Nuevamente se centrifugó a 1,500 G por 10 minutos a 4 °C y se desechó el sobrenadante, el precipitado se continuó disolviendo en 10.0 ml de agua destilada. Esta suspensión fue trasladada a un tubo de diálisis de 25 x 16 mm, de membrana de celulosa con tamaño de poro capaz de retener proteínas con un peso  $>12,000$  Da, se dializó en una solución de NaCl al 0.85 % a 4 °C realizando cambios durante tres ocasiones cada 12 h.

Para corroborar que el dializado se encontraba libre de sulfato de amonio se realizó la siguiente prueba: pasadas tres horas del cambio de la solución NaCl, se tomó 1.0 ml de muestra y se le adicionó un volumen igual de una suspensión saturada de  $\text{BaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Por último, las inmunoglobulinas contenidas en el dializado se retiraron mediante centrifugación a 3500 G durante 15 minutos a 4 °C, desechando el sedimento (Morilla y Bautista, 1986). Terminado las

inmunoglobulinas se dispusieron en tubos estériles de 15.0 ml, almacenándose a - 20 °C.

### iii. Determinación de proteína

Las inmunoglobulinas se diluyeron 1:50 (v/v), una (1) parte de inmunoglobulinas + cuarenta y nueve (49) de NaCl al 0.85 % (p/v) y se midió en un espectrofotómetro a 280 nm de absorbancia, empleando como blanco NaCl al 0.85 %. La determinación de la proteína se hizo según la siguiente fórmula:

$$\text{mg de proteína / ml} = (\text{DO} \times \text{factor de dilución})/5 \text{ (Morilla y Bautista, 1986)}$$

### iv. Geles de acrilamida

Los geles de acrilamida se emplearon para la visualización de las inmunoglobulinas purificadas a partir del suero, para someter las proteínas al gel de poli(acrilamida), se mezcló 1.0 mg de inmunoglobulina con 1.0 ml de una solución amortiguadora "A". El gel separador se preparó con 2.5 ml de solución amortiguadora pH 8.8, 3.3 ml de acrilamida $\Omega\Omega$ -bisacrilamida $\Psi\Psi$  al 30 % (v/v), 4.2 ml de H<sub>2</sub>O, 50  $\mu$ l de TEMED $\Phi\Phi$  al 8.4 % (v/v) y 100  $\mu$ l de PSA $\Theta\theta$  (v/v), empleándose al 10%. En tanto, el gel concentrador se preparó con 1.5 ml de solución amortiguadora pH 6.8, 3.5 ml de H<sub>2</sub>O, 1.0 ml de acrilamida-bisacrilamida al 30 %, 40  $\mu$ l de TEMED y 80  $\mu$ l de PSA, empleándose al 4%. Primero se vertió el gel separador en moldes para cámara de electroforesis, una vez polimerizado, se adicionó el gel concentrador y se colocó el peine, dejándose polimerizar nuevamente. Posteriormente los moldes se colocaron dentro de la cámara de electroforesis, se adicionó la solución amortiguadora de corrimiento, retirando a la vez el peine. Después se adicionaron 5  $\mu$ l de marcador de peso molecular $\pi\theta$  en el primer pozo, y en el pozo siguiente, 25  $\mu$ l de la muestra de proteína. Las constantes de la electroforesis fueron: 80 voltios durante 10 minutos para la pre-corrída y 100 voltios durante 90 minutos para la corrida. Terminado el tiempo de exposición, se retiró la solución amortiguadora y el gel se sumergió en azul de Coomassie R250 $\mu\nu$  al 0.25% durante dos horas, más adelante se empleó una solución compuesta por metanol-agua-ácido acético en relación 5:4:1 durante 30 minutos por al menos dos ocasiones, con la finalidad de

desteñir el gel. Una vez desteñado, se rehidrató con ácido acético al 10% (**Laemmli, 1970; Espinosa et al., 2000**).

v. Conjugación de Inmunoglobulinas con Isotiocianato de Fluoresceína

Para este procedimiento se empleó una Solución Amortiguadora de Carbonatos (SAC) pH 9.5 y SSAF pH 7.2. Primeramente la concentración se ajustó a 10 mg de inmunoglobulina/ml, lo que representó 17.0 ml de inmunoglobulina, se adicionó SAC al 10 % (v/v), es decir, 4.0 ml y 19.6 ml SSAF. El FITC<sup>⊗</sup> se empleó a dosis de 0.030 mg por cada mg de proteína a conjugar. La conjugación se llevó a cabo a temperatura ambiente, al FITC se le disolvió con 1.0 ml de SAC en un vaso de precipitado de 80.0 ml, agregando la proteína gota a gota durante 15 minutos, en agitación constante. Finalmente se ajustó el pH de la mezcla a 9.5, se dejó en agitación constante y lenta durante dos horas más, a temperatura ambiente. Al término de este lapso, la mezcla se centrifugó a 2,500 G por 15 minutos a 4 °C para desechar los precipitados. El conjugado, ubicado en el sedimento, se pasó a través de una columna de Sephadex G25<sup>⊕</sup> tamaño de partícula: 100-300 μ, en SSAF pH 7.2, posteriormente se colectó en tubos de ensayo, tomando siempre lo más concentrado, eliminando lo muy diluido. Una vez colectado, el conjugado se trasladó a un tubo de diálisis y se dializó con SSAF pH 7.2 a 4 °C, haciendo dos cambios con intervalo de 24 h cada uno. Ya dializado, se centrifugó a 2,500 G por 15 minutos a 4 °C para eliminar bacterias y grumos. Por último, se hicieron alícuotas de 100 μl y se guardaron a - 20 °C, bajo protección de la luz (**Morilla y Bautista, 1986**).

b. Ensayo Inmunoenzimático (ELISA)

Para esta técnica se empleó un antígeno denominado Méx 31-096-01, obtenido a partir de Cl (**Amerault y Roby, 1967**), dicho antígeno se diluyó 1:200 [100 μl de antígeno y 300 μl de SDS  $\Upsilon$  (C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>O<sub>4</sub>SNa) al 0.1% (p/v)] por 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente la mezcla antígeno-SDS se diluyó 1:200 en SAC pH 9.6. Se homogenizó y se depositaron 100 μl/pozo, para ello se emplearon placas de fondo plano con 96 pozos<sup>3</sup>, las cuales se dejaron incubar toda la noche

en refrigeración a 4 °C. Concluido este periodo el contenido de la placa se descartó en una tarja, con movimientos firmes; cada uno de los cinco lavados consistió en agregar 200 µl por pozo de SSAF pH 7.2 con Tween al 0.5% (v/v), incubando durante 5 minutos a temperatura ambiente, entre cada lavado se descartó el líquido de las placas con movimientos firmes y de una sola intención. Después de los lavados, se depositaron en cada pozo 200 µl de leche descremada en polvo al 7% en SSAF pH 7.2 con Tween al 0.5% y se dejó incubar durante una hora a 37 °C. Pasado este tiempo se realizaron cinco lavados, como se mencionó anteriormente. Posteriormente, los sueros control positivo y negativo, así como los sueros a evaluar, se diluyeron 1:100 en SSAF pH 7.2 con Tween al 0.5% y se depositaron por triplicado 100 µl de cada dilución por pozo y se dejó incubar durante una hora a 37 °C, después se descartaron los sueros en una tarja, con movimientos constantes y se lavó la placa con la metodología ya descrita. El paso siguiente fue la adición de 200 µl por pozo, del conjugado♥ de cabra, compuesto por fragmentos específicos FC anti IgG bovina conjugada con fosfatasa alcalina conjugada, a una dilución 1:1000 en SSAF pH 7.2 con Tween al 0.5%, dejándose incubar por una hora a 37 °C. Al término de la incubación, se descartó el conjugado y se realizaron tres lavados con SSAF pH 7.2 con Tween al 0.5% y dos con una solución TRIS pH 9.5. Como sustrato se emplearon 100 µl por pozo, de una solución de fosfato-p-nitrofenil• al 0.075% en la solución reguladora de TRIS pH 9.5 y se dejó incubar durante 1 hora a 37 °C. Concluido este proceso las placas se ingresaron a un espectrofotómetro (Milton Ray Modelo 601), con absorbancia de 405 nm, para determinar la densidad óptica. Una vez hecha la lectura, los datos se capturaron y a todos los valores se les obtuvo el promedio y la desviación estándar, los sueros considerados como positivos fueron aquellos cuyos valores rebasaron el punto de corte. Para calcular el valor del punto de corte, se tomó el valor del control negativo más tres veces su desviación estándar (Rodríguez *et al.*, 1999; Barigye *et al.*, 2004).



c. Ensayos de Inmunofluorescencia

i. Preparación de antígeno a partir de eritrocitos infectados

Los frotis de EN o Ei se hicieron a partir de una suspensión al 50% en VYM, una vez hechos, se secaron rápidamente al aire y se envolvieron en papel absorbente por pares, luego, se envolvieron en papel aluminio y se colocaron en una bolsa de plástico, conservándose a -70 °C en un congelador vertical (Marca Revco) hasta el momento de su uso **(Morilla y Bautista, 1986)**.

ii. Preparación de antígeno a partir de células nucleadas

Las células nucleadas adheridas a los cubreobjetos de 15 mm de diámetro, después de enjuagarse, se fijaron en metanol-acetona a diferentes concentraciones durante 5 minutos, más adelante, las células ya fijadas se deshidrataron en varios grados de etanol para después, lavarse con Nonidet 40<sup>KQ</sup> al 0.5% en SSAF pH 7.2 durante dos minutos, luego, se enjuagaron dos ocasiones con SSAF pH 7.2 durante cinco minutos y se dejaron secar a temperatura ambiente **(Rojas et al., 1996; Ramírez et al., 1997)**

iii. Montaje de los antígenos

Para descongelar los frotis, se retiraron del congelador y se colocaron en un vaso de precipitado de 1000.00 ml con 150 g aproximadamente de silica gel<sup>V</sup>, el vaso de precipitado se tapó y se dejó incubando a temperatura ambiente durante al menos 15 minutos. Posteriormente, se hicieron un total de 10 círculos por laminilla con un marcador líquido<sup>^</sup> Pan Pen<sup>®</sup>.

Para las células nucleadas previamente preparadas, se adhirieron dos cubreobjetos por laminilla y a cada cubreobjetos se le hicieron tres círculos con el plumón líquido.

iv. Técnica de Inmunofluorescencia Directa

En las laminillas preparadas se colocaron por cada círculo, 5 µl del anticuerpo conjugado, diluido 1:35. Las laminillas se introdujeron en una cámara húmeda para incubarse a 37 °C durante 30 minutos. Terminada la incubación, se enjuagaron tres ocasiones con SSAF pH 7.2 durante 5 minutos cada enjuague. Un último

enjuague se hizo con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente, posteriormente, a cada círculo se le adicionó una gota de glicerina fosfatada y se observó con un microscopio de luz ultravioleta (**Morilla y Bautista, 1986; Lane, 1988**).

#### v. Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta

Para las laminillas preparadas con eritrocitos y las muestras de los cubreobjetos con células nucleadas, se aplicó el mismo protocolo, el cual consistió en colocar 5 µl/pozo, del anticuerpo primario, en este caso, se utilizó un anticuerpo monoclonal para MSP1<sup>u</sup> o MSP2<sup>η</sup> a concentración de 1µg/ml, se incubó a 37 °C durante 30 minutos, luego, se enjuagó dos veces con SSAF pH 7.2 durante cinco minutos, dejándose secar a temperatura ambiente. Después del secado, se agregaron 5 µl por pozo del anticuerpo secundario<sup>γφ</sup> a concentración de 1µg/ml, se incubó a 37 °C durante 30 minutos y se enjuagó dos ocasiones con SSAF pH 7.2 durante cinco minutos, dejándose secar a temperatura ambiente. A cada círculo se le adicionó una gota de glicerina fosfatada y se observó con el microscopio de epifluorescencia (**Marchisio y Trusolino, 1999; Carreño et al., 2007**).

### **8. Ensayos de adaptación de las líneas celulares nucleadas**

#### a. Ensayo de adaptación de BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub> a diferentes medios de cultivo

Para constatar la factibilidad de multiplicación de la línea celular BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub>, empleando medios de cultivo comúnmente utilizados en ensayos de cultivo de *Anaplasma marginale*, se aplicó un ensayo que consistió en el reemplazo gradual del medio de cultivo F12, por otros con distintas formulaciones (**Rosales et al., 1996**). Los cultivos se mantuvieron inicialmente con F12 en el pase cero, a las 24 h de los subsiguientes pases, se cambió el medio de cultivo en forma gradual. Los porcentajes de reemplazo de los medios se muestran en el cuadro 2. La finalidad de este experimento fue conocer el comportamiento de BUVEC con diferentes composiciones químicas de medios de cultivo. El protocolo de adaptación se dividió

en dos fases, en la primera se evaluaron los medios RPMI-1640 y M199; en tanto en la segunda, DEM y MEM, ambas fases con el medio F12 como testigo.

**Cuadro 2: Cambio gradual en cada pase de los porcentajes de los medios de cultivo en el ensayo de adaptación.**

	F12*	F12	M199	R-1640	DEM	MEM
<b>Pase 0</b>	100%	100%	-	-	-	-
<b>Pase 1</b>	100%	75%	25%	25%	25%	25%
<b>Pase 2</b>	100%	50%	50%	50%	50%	50%
<b>Pase 3</b>	100%	25%	75%	75%	75%	75%
<b>Pase 4</b>	100%	-	100%	100%	100%	100%
<b>Pase 5</b>	100%	-	100%	100%	100%	100%

F12= Medio de cultivo F12 HAM modificado por Kaighn; M199= Medio 199 con sales de Earle; R-1640= Medio RPMI-1640; DEM= Medio Mínimo Esencial modificado por Dulbecco; MEM= Medio Mínimo Esencial según la fórmula de Eagle. \* El grupo testigo fue el mantenido en el medio F-12. Todos los tratamientos se hicieron por duplicado, cada uno en un matraz de cultivo de 25cm<sup>2</sup> con una dosis inicial de siembra de 3x10<sup>6</sup> células/mm<sup>2</sup> incubados a 37 °C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

**b. Cinética y longevidad de las líneas BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub> y BCE C/D-1b**

Este experimento se realizó para dilucidar el comportamiento de ambas líneas celulares endoteliales en condiciones de cultivo *in vitro*, al conocer su curva de crecimiento y su respuesta ante la ausencia del cambio de medio. Se emplearon como unidades experimentales cajas Petri<sup>®</sup> de 35 mm de diámetro, con una dosis inicial de siembra de 1x10<sup>3</sup> células/mm<sup>2</sup>, cada unidad experimental se manejó por duplicado. La siembra se realizó a la hora cero, a la hora ocho se reemplazó el medio sobrenadante en todas las unidades experimentales, llevándose a cabo la recolección y conteo celular, a lo largo de 6 días. En la figura 3 se muestra los tratamientos aplicados a las unidades experimentales con el protocolo de cinética, con cambio de medio cada 48 h.

**Figura 3: Protocolo del ensayo de cinética empleado para las líneas celulares endoteliales BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub> y BCE C/D-1b**

Unidad	Horas post-siembra																		
Experimental	0	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96	104	112	120	128	136	144

1	S	X																
2	S	C	X															
3	S	C	N T	X														
4	S	C	N T	N T	X													
5	S	C	N T	N T	N T	X												
6	S	C	N T	N T	N T	N T	X											
7	S	C	N T	N T	N T	N T	N T	X										
8	S	C	N T	N T	N T	N T	N T	N T	X									
9	S	C	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	X								
10	S	C	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	X							
11	S	C	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	X						
12	S	C	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	X					
13	S	C	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	X				
14	S	C	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	X			
15	S	C	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	X		
16	S	C	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	X	
17	S	C	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	X
18	S	C	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	X

Claves: S= siembra X= conteo C= cambio de medio NT= ningún tratamiento

Todas las unidades experimentales se hicieron por duplicado, cada una con una superficie de 962 mm<sup>2</sup> con una dosis inicial de siembra de 1x10<sup>3</sup> células/mm<sup>2</sup> incubadas a 37 °C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. El sobrenadante de la hora ocho fue reemplazado por medio fresco, a todas las unidades experimentales y no hubo más cambios de medio.

En la figura 4 se indica el tratamiento aplicado en el protocolo de longevidad, en el cual, no hubo cambio de medio durante la duración del experimento.

Figura 4: Protocolo del ensayo de longevidad empleado para las líneas celulares endoteliales BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub> y BCE C/D-1b

Unidad	Horas post-siembra																		
	0	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96	104	112	120	128	136	144
1	S	X																	
2	S	C	X																
3	S	C	N T	X															
4	S	C	N T	N T	X														
5	S	C	N T	N T	N T	X													
6	S	C	N T	N T	N T	N T	X												
7	S	C	N T	N T	N T	N T	N T	X											
8	S	C	N T	N T	N T	N T	N T	N T	X										
9	S	C	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	X									
10	S	C	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	X								
11	S	C	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	X							
12	S	C	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	X						
13	S	C	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	X					
14	S	C	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	NT	X				
15	S	C	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	NT	NT	X			
16	S	C	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	NT	NT	NT	X		
17	S	C	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	NT	NT	NT	NT	X	
18	S	C	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	N T	NT	NT	NT	NT	NT	X

Claves: S= siembra X= conteo C= cambio de medio NT= ningún tratamiento

Todas las unidades experimentales se hicieron por duplicado, cada una con una superficie de 962 mm<sup>2</sup> con una dosis inicial de siembra de 1x10<sup>3</sup> células/mm<sup>2</sup> incubadas a 37 °C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. El sobrenadante de la hora ocho fue reemplazado por medio fresco, a todas las unidades experimentales y no hubo más cambios de medio.

## 9. Estudios de cultivo *in vitro* de Anaplasma marginale en líneas celulares nucleadas

a. Ensayo de inoculación de cultivos de células nucleadas con la cepa “Morelos” de *A. marginale*.

En este primer estudio, se intentó probar las líneas BUVEC, RF/6A y BCE. Cultivos que presentaron al menos 90% de confluencia fueron inoculados con la cepa “Morelos” de *A. marginale*, proveniente de un bovino esplenectomizado. Se prepararon seis inóculos con la misma dosis infectante,  $1 \times 10^9$  Ei, cada inóculo consistió en un tratamiento: Ei intactos, Ei sometidos a choque osmótico con o sin proteasas, Ei tratados con ondas ultrasónicas, Ei sometidos a choque térmico y Ei tratados con saponina. Después de la inoculación los cultivos se mantuvieron con cambio de medio cada 48 h y subcultivo cada 6 u 8 días dependiendo de la estirpe celular. El remanente celular entre cada subcultivo se guardó en alícuotas de  $2 \times 10^5$  células en 500  $\mu$ l de VYM, almacenándose a 4 °C ó - 20°C.

Se evaluaron la morfología y rendimiento celular expresado en número de células. Para la morfología, antes de cada subcultivo se realizaron observaciones en el microscopio invertido con los objetivos 10x y 40x, algunas ocasiones con contraste de fases y se tomaron fotografías, cada fotografía fue identificada con el nombre de la línea celular, sublínea, número de pase y número de inóculo.

b. Ensayo de inoculación de células nucleadas con la cepa “Tizimín” de *A. marginale*

Cultivos de la línea BUVEC con 95% de confluencia, fueron inoculados con la cepa “Tizimín”, proveniente de un bovino esplenectomizado. Se emplearon los seis inóculos mencionados en el primer ensayo, con la misma dosis infectante. Después de la inoculación los cultivos se mantuvieron con cambio de medio a intervalos de tres o cuatro días, los subcultivos se realizaron semanalmente. Se evaluaron la morfología y rendimiento celular expresado en número de células. Para la morfología, antes de cada subcultivo se realizaron observaciones en el

microscopio invertido con los objetivos 10x y 40x, algunas ocasiones con contraste de fases y se tomaron fotografías; cada una identificada con el nombre de la línea celular, sublínea, número de pase y número de inóculo. Las variantes realizadas respecto al primer ensayo fueron que,  $2 \times 10^5$  células sobrantes en cada subcultivo se sembraron en placas de 24 pozos. En el fondo de cada pozo se colocó un cubreobjetos de 15 mm de diámetro con la finalidad de obtener la muestra del monoestrato celular. A las 24 h post-siembra, los cubreobjetos se prepararon para las tinciones de CMRA, Giemsa, Wright y NA, además, para esta última tinción se prepararon suspensiones celulares del orden de  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  en 200  $\mu$ l de SSAF. Adicionalmente, el remanente celular de cada subcultivo se criopreservó con DMSO al 8% (v/v) en medio F12 complementado y estéril.

Con el propósito de visualizar las formas de la rickettsia, se emplearon diversas tinciones; para todas ellas, el procedimiento general de preparación de los cubreobjetos fue el siguiente: después de retirar el medio de cultivo de los pozos, los cubreobjetos se enjuagaron dos veces con SSAF pH 7.2, se dejaron secar a temperatura ambiente por al menos 15 minutos.

#### i. Tinción de Giemsa

Una vez preparados, a los cubreobjetos se les fijó con metanol absoluto durante 5 minutos, dejándose secar a temperatura ambiente. Más adelante se expusieron al colorante en concentración del 14% durante 30 minutos, a temperatura ambiente. Se probaron diferentes pH: 7.08, 7.56 y 6.61, de aquí se eligió el pH óptimo, es decir, cuando en las muestras se distinguían los ácidos nucleicos, del citoplasma. Elegido el pH óptimo, se probaron distintas concentraciones del colorante: 4 y 24%, con la finalidad de comparar y elegir la concentración con mejores resultados (Carter y Cole, 1990).

#### ii. Tinción de Wright

Los cubreobjetos se fijaron con metanol absoluto durante 5 minutos, dejándose secar a temperatura ambiente y se sumergieron en el colorante a concentración recomendada por el fabricante, a diversos tiempos de exposición: 3, 5, y 7 minutos,

buscando la mejor definición entre ácidos nucleicos y citoplasma (**Carter y Cole, 1990**).

### iii. Tinción de naranja de Acridina

Los cubreobjetos se fijaron con formalina fosfatada al 10% durante 5 minutos, dejándose secar a temperatura ambiente, posteriormente se preparó el colorante, disolviendo 2mg/ml en agua destilada, más adelante se diluyó 1:100 en una solución tamponada [150 ml H<sub>2</sub>O, 9.92 ml ácido cítrico 0.1M, 5.46 ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2M y 1.7g NaCl]. Antes de teñir las células se les adicionó 0.5 ml de una solución pre-teñidora [40 µl EDTA 0.5M, 26.48 ml ácido cítrico, 0.2 ml de Tritón, 6.85 ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 13.69 g sucrosa], por cada cubreobjetos, luego, se agregó 0.5 ml del colorante previamente preparado y se dejó incubando al menos 15 minutos a temperatura ambiente e inmediatamente después se montaron dos cubreobjetos por cada portaobjetos y se les adicionó una gota de solución de montaje<sup>Λ9</sup> para observarse en el microscopio de epifluorescencia (**Darzynkiewicz Z, 1990; Darzynkiewicz Z et al., 1992**).

### iv. Tinción de carboxi-metil rodamina

A los pozos ya preparados, se le agregó 50 µl de colorante, posteriormente se incubaron a 37 °C durante 30 minutos, terminada la incubación, se adicionaron 500 µl de VYM y se enjuagó vigorosamente, incubando nuevamente a 37 °C por 30 minutos, concluida la incubación, se retiró el VYM enjuagando el monoestrato; este proceso se repitió dos ocasiones (**Castañeda et al., 2006**). Finalmente se extrajeron los cubreobjetos del fondo del pozo y se dejaron secar bajo el flujo laminar de la campana a temperatura ambiente. Una vez secos, se colocaron dos por laminilla y se les adicionó una gota de solución de montaje y se colocó un cubreobjetos para observarse en el microscopio de epifluorescencia.

### v. Extracción de ADN y PCR

La extracción de ADN a partir de las células BUVEC se llevó a cabo después de cada subcultivo, con  $1 \times 10^6$  células, con la técnica de "Hot Shot" (**Truett et al., 2000**).



Una vez obtenido el ADN, se sometió al protocolo de PCR descrito por Torioni de Echaide y colaboradores en 1998, para la detección del gen *msp5*.

c. Ensayo de tinciones de contraste supravital en las líneas celulares endoteliales expuestas a la infección por *A. marginale*

Este estudio fue realizado con las BCE inoculada con  $4.1 \times 10^6$  de Ei con la cepa "Tizimín" procedente de un bovino esplenectomizado. Para este experimento se emplearon los colorantes CMRA y diacetato de carboxi-fluoresceína (CFDA), a manera de coloración de contraste al momento de observarse en el microscopio de epifluorescencia. Las células nucleadas se incubaron con 50  $\mu$ l de CFDA, al momento de la siembra, paralelamente, 25  $\mu$ l de Ei al 50% en VYM fueron incubados con 50  $\mu$ l de CMRA en un tubo estéril. 24 h después se co-cultivaron en cajas Petri de 35 mm de diámetro, con cubreobjetos de 15 mm de diámetro en el fondo. El cambio de medio se hizo cada 48 h, sin llegar al subcultivo pues el ensayo fue de corta duración, de 144 h.

Se tomó el primer cubreobjetos a las 24 h de cultivo, el segundo a las 72 h y el último a las 144 h. Se enjuagaron dos veces con SSAF pH 7.2, dejándose secar a temperatura ambiente. Más adelante se colocaron en una laminilla y se les adicionó una gota de solución de montaje para observarse en el microscopio de epifluorescencia.

d. Ensayo de co-cultivo de las líneas endoteliales con eritrocitos

Nuevamente, las líneas BUVEC y BCE fueron utilizadas en co-cultivo con las cepas "Puente de Ixtla" y "Tizimín" durante la primera variante; y con el aislado "Soto la Marina" y la cepa "Tizimín" durante la segunda variante. Estas cepas fueron obtenidas de bovinos esplenectomizados. La metodología fue similar a la empleada por Waghela y colaboradores (1997), con algunas modificaciones. La finalidad de este estudio fue sembrar Ei intactos en un soporte biológico, en este caso, las líneas celulares endoteliales sin infectar, adicionando con cierta frecuencia EN. Los medios de cultivo se adicionaron con 10% de CTF, 2mM de L-glutamina, 20% de

SBF, P+E [100 UI y 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] y 25  $\mu\text{g}$  de F. La siembra se hizo en placas de 24 pozos.

i. Primera variante

Se llevó a cabo la técnica de subcultivo, conforme a lo descrito en el protocolo de mantenimiento de las estirpes celulares. Después de la inoculación de los monoestratos con Ei, se hizo el cambio de medio diario y gradual. A las 24 h del subcultivo, se adicionaron 25  $\mu\text{l}$  de la suspensión de EN al 50% en VYM, a todos los pozos exceptuando el grupo control. Todos los subcultivos se llevaron a cabo semanalmente, adicionando EN.

Se tiñeron con Giemsa los frotis hechos antes de cada cambio de medio, para visualizar a la rickettsia en los eritrocitos. Cuando los frotis resultaron negativos después de tres días consecutivos, el monitoreo se espació a cada 3 ó 4 días.

i. Segunda variante

En este caso se colocó un cubreobjetos en el fondo de los pozos de las placas para obtener la muestra de monocapa celular, a través de cada pase. Una vez formado el monoestrato celular se agregaron 1.25 ml de Ei, por pozo, exceptuando el grupo control. Antes de cada cambio de medio se tomaron 4 $\mu\text{l}$  para hacer frotis en una laminilla, después se fijaron durante 5 minutos en metanol absoluto y se dejaron secar a temperatura ambiente. El recambio de medio se realizó diariamente, substituyendo con 1.0 ml de medio fresco, semanalmente 25  $\mu\text{l}$  de EN al 50% en VYM se añadieron a cada uno de los pozos, exceptuando el grupo control. Los pases se efectuaron semanalmente, retirando el material suspendido en el medio de cultivo, después, se trasladó un nuevo pozo, con un monoestrato de células endoteliales previamente sembradas y sin infectar. Cada línea se sembró por duplicado y en una sola placa, por cada placa se designaron dos columnas por cada grupo experimental y los pases se hicieron de fila en fila en orden ascendente (ver figura 5). Se tiñeron los frotis hechos antes de cada cambio de medio con colorante de Giemsa, para visualizar a la rickettsia en los eritrocitos. De los cubreobjetos ubicados al fondo de los pozos, unos se fijaron con metanol absoluto, para Giemsa y otros con metanol-acetona a distintas concentraciones para IF

directa o indirecta. Cuando los frotis resultaron negativos después de tres días consecutivos, el monitoreo se espació a cada 3 ó 4 días.

e. Ensayo de co-cultivo de células endoteliales y la cepa “Morelos” de *A. marginale* en matraces de 25cm<sup>2</sup>

En este experimento, se pretendió incrementar el número de células expuestas a *A. marginale*, razón por la cual se siguió el diseño del co-cultivo de la primera variante, con la diferencia de que el soporte del cultivo fueron matraces de 25 cm<sup>2</sup>. Una vez formada la monocapa celular se retiraron 2.0 ml de medio de cultivo y se sustituyeron por 2.0 ml de la suspensión de EN al 50 % en VYM, diariamente se cambió el medio, a razón de 4 ml. Se tiñeron los frotis hechos antes de cada cambio de medio con el colorante de Giemsa, para visualizar a la rickettsia en los eritrocitos. Cuando los frotis resultaron negativos después de tres días consecutivos, el monitoreo se espació a cada 3 ó 4 días.

#### **10. Estudios en bovinos inoculados con células endoteliales expuestas a Anaplasma marginale en condiciones in vitro**

a. Ensayo de inoculación con BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub> expuesta a *A. marginale*

A partir de material criopreservado se obtuvo el inóculo formado por células expuestas a CI de *A. marginale* extraídos con inhibidores de proteasas, y su control negativo. Se inocularon dos bovinos machos, criollos, de 12 meses de edad con 2x10<sup>5</sup> células cada uno vía IM. El resto del material descongelado se sembró nuevamente, 3.37x10<sup>6</sup> de las células expuestas y 1.56x10<sup>6</sup> del control. A partir del día de la inoculación los bovinos se monitorearon 2 veces por semana, durante 60 días, valorando título de anticuerpos para detectar la huella inmunológica y cualquier alteración de las constantes fisiológicas.

b. Ensayo de inoculación con BCE C/D 1-b expuesta a *A. marginale*

Los cultivos provenientes de la línea BCE en los matraces de 25 cm<sup>2</sup> se tripsinizaron y se emplearon para la inoculación de dos bovinos machos criollos

mayores de 12 meses, esplenectomizados. Uno se inoculó con las células expuestas a los eritrocitos infectados con *A. marginale*, y otro con el control negativo. La dosis del inóculo fue de  $1 \times 10^9$  células nucleadas por bovino, vía IM. A partir del día de la inoculación los bovinos se monitorearon 2 veces por semana, durante 60 días, valorando título de anticuerpos para detectar la huella inmunológica y cualquier alteración de las constantes fisiológicas.



**Figura 5: Distribución de los grupos experimentales de las líneas BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub> y BCE C/D 1-b co-cultivadas con *Anaplasma marginale***

	Sub A	Sub B	Sub A	Sub B	Sub A	Sub B	
	1	2	3	4	5	6	Pase
<b>A</b>							4°
<b>B</b>							3°
<b>C</b>							2°
<b>D</b>							1°

Esquema de una placa con 24 pozos, se inició con la fila D y los subsiguientes pases en las filas C, B y A.  
 Las columnas 1 y 2 se designaron para células endoteliales co-cultivadas con eritrocitos infectados,  
 3 y 4 para células endoteliales co-cultivadas con eritrocitos normales,  
 5 y 6 para células endoteliales únicamente.

## IV. RESULTADOS

Para lograr el cultivo *in vitro* de *Anaplasma marginale* en células nucleadas, se desarrollaron varias estrategias planteadas como objetivos particulares en un esquema de acercamiento al propósito principal del presente estudio. Inicialmente se planteó la adaptación de algunas líneas celulares reportadas como susceptibles a la propagación de *A. marginale*, una vez conocidas las características morfológicas de cada una de ellas, el siguiente paso fue el cultivo de la rickettsia, con diferentes condiciones. Finalmente, algunos de los cultivos fueron probados en bovinos susceptibles. En todo momento se buscó la demostración de *A. marginale* tanto en las células nucleadas, como en el hospedero bovino.

### ***De la adaptación de las líneas celulares nucleadas***

#### a. Adaptación de BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub> a diferentes medios de cultivo

Al pase cero, las células endoteliales presentaban una morfología predominantemente ahusada, con núcleos celulares bien definidos. Conforme el avance en el número de pases, hasta llegar al pase cinco, hubo diferencias morfológicas, principalmente con el medio DEM, en donde se observaron células redondeadas, birrefringentes y ocasionalmente aglomeradas. En cuanto el rendimiento expresado en número de células/ml, en la fase uno fue mayor con el medio RPMI 1640, seguido de F12 y finalmente, M199; en contraste, en la segunda fase F12 no fue superado en cantidad de células adheridas y DEM provocó la menor cantidad en el monoestrato, pero, la mayor cantidad de células en el sobrenadante. En cuanto al rendimiento general, de los cuatro medios ensayados, RPMI-1640 produjo un mayor rendimiento de células totales. Comparando los medios ensayados, es evidente la tendencia de la población celular, a la adaptación con los medios RPMI-1640 y MEM pues mostraron un comportamiento similar al medio del grupo testigo (ver figura 6; cuadros 3 y 4). En cambio, las células expuestas a los medios M199 y DEM mostraron disminuido el número de células tanto adheridas, como no adheridas. Las características morfológicas de BUVEC se mantuvieron sin cambios aparentes en el transcurso del

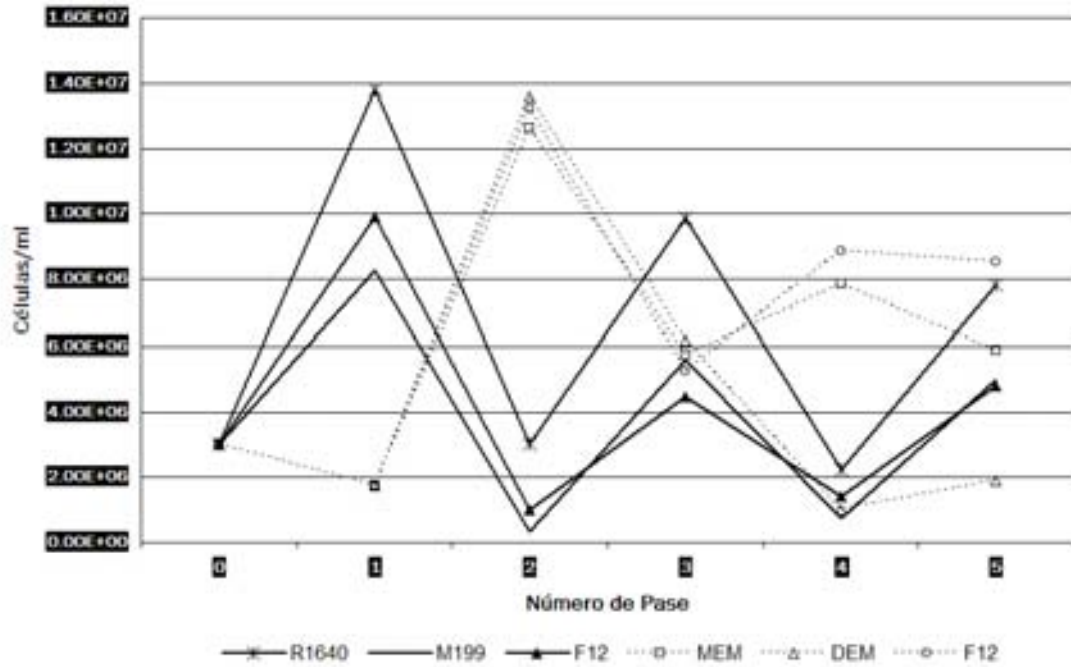
ensayo, indistintamente de la fase experimental, cuando se mantuvo en F12, se observaron formas típicas ahusadas.

b. Cinética y longevidad de las líneas BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub> y BCE C/D-1b

En ambos experimentos no se apreciaron cambios morfológicos aparentes, desde el pase 17 ó inicial, en BUVEC se mantuvo su característica de huso, cuando el porcentaje de confluencia alcanzó al menos el 70%, en tanto, la línea BCE se encontraba en el pase siete y al llegar al 70%, manifestó la formación de estructuras parecidas a un “mosaico”, con células piriformes. Las dos estirpes conservaron la capacidad de adhesión a la superficie, la diferencia explícita fue numérica, tanto en cinética como en longevidad. Cuando se realizó el estudio de cinética los resultados en BCE se vieron afectados en cierta medida, por la contaminación con hongos unicelulares que presentaron algunas unidades experimentales. De la misma manera, en el experimento de longevidad pudo observarse disimilitud entre los rangos de persistencia, aunque las dos estirpes mostraron tolerancia ante la ausencia del cambio de medio hasta por 144 h, siendo lo óptimo 80 h para BUVEC y 120 h para BCE (ver figuras 7, 8, 9 y 10).



Figura 6: Rendimiento celular obtenido del ensayo de adaptación de la línea celular BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub> a diferentes medios de cultivo, expresado en células/ml



Conteos de las células adheridas en los medios de cultivo ensayados. La línea punteada representa a la segunda fase. Todos los tratamientos se hicieron por duplicado, cada uno en un matraz de cultivo de 25cm<sup>2</sup> con una dosis inicial de siembra de 3x10<sup>6</sup> células/mm<sup>2</sup> incubados a 37 °C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.



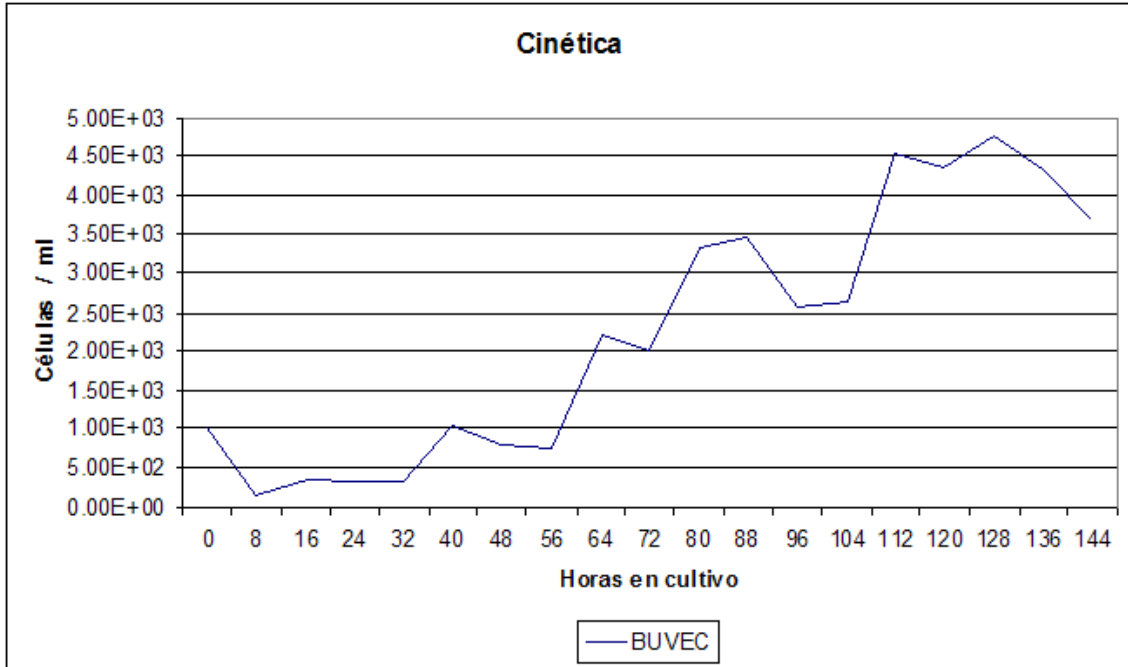
**Cuadro 3: Total de células endoteliales no adheridas, recuperadas en el sobrenadante, durante la fase uno**

#Pase	Medio ensayado		
	<u>F12</u>	<u>M199</u>	<u>R1640</u>
<b>0</b>	5.65 x 10 <sup>6</sup>	6.75 x 10 <sup>6</sup>	3.2 x 10 <sup>6</sup>
<b>1</b>	4.25 x 10 <sup>6</sup>	3.75 x 10 <sup>6</sup>	5.95 x 10 <sup>6</sup>
<b>2</b>	4.43 x 10 <sup>6</sup>	3.65 x 10 <sup>6</sup>	4.38 x 10 <sup>6</sup>
<b>3</b>	5.3 x 10 <sup>6</sup>	2.65 x 10 <sup>6</sup>	6.2 x 10 <sup>6</sup>
<b>4</b>	5.65 x 10 <sup>6</sup>	3.0 x 10 <sup>6</sup>	6.3 x 10 <sup>6</sup>
<b>5</b>	6.15 x 10 <sup>6</sup>	1.50 x 10 <sup>6</sup>	4.35 x 10 <sup>6</sup>
<b>media</b>	5.23 x 10 <sup>6</sup>	3.55 x 10 <sup>6</sup>	5.06 x 10 <sup>6</sup>

**Cuadro 4: Total de células endoteliales no adheridas, recuperadas en el sobrenadante, durante la fase dos**

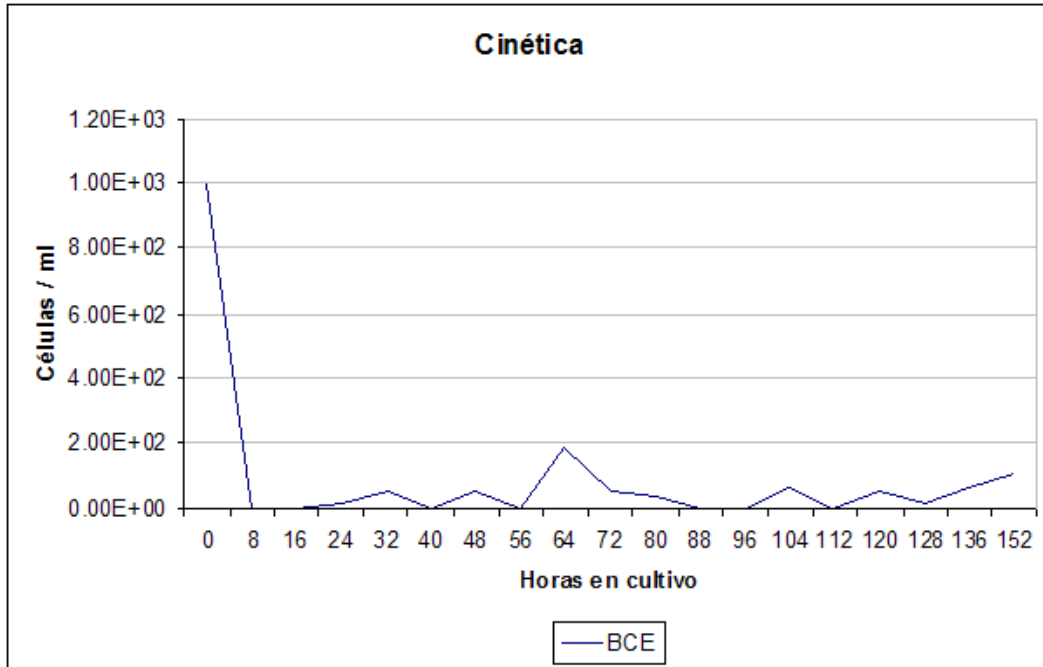
# Pase	Medio ensayado		
	<u>F12</u>	<u>DEM</u>	<u>MEM</u>
<b>0</b>	ND	ND	ND
<b>1</b>	ND	ND	ND
<b>2</b>	1.65 x 10 <sup>6</sup>	2.9 x 10 <sup>6</sup>	1.2 x 10 <sup>6</sup>
<b>3</b>	1.2 x 10 <sup>6</sup>	2.2 x 10 <sup>5</sup>	4.5 x 10 <sup>4</sup>
<b>4</b>	3.37 x 10 <sup>4</sup>	1.5 x 10 <sup>5</sup>	0
<b>5</b>	1.5 x 10 <sup>5</sup>	7.4 x 10 <sup>4</sup>	0
<b>media</b>	7.4 x 10 <sup>5</sup>	8.4 x 10 <sup>5</sup>	6.23 x 10 <sup>5</sup>

Figura 7: Rendimiento celular a lo largo de 144 horas del estudio de cinética de la línea celular endotelial BUVEC E6E7 expresado en células/mm<sup>2</sup>



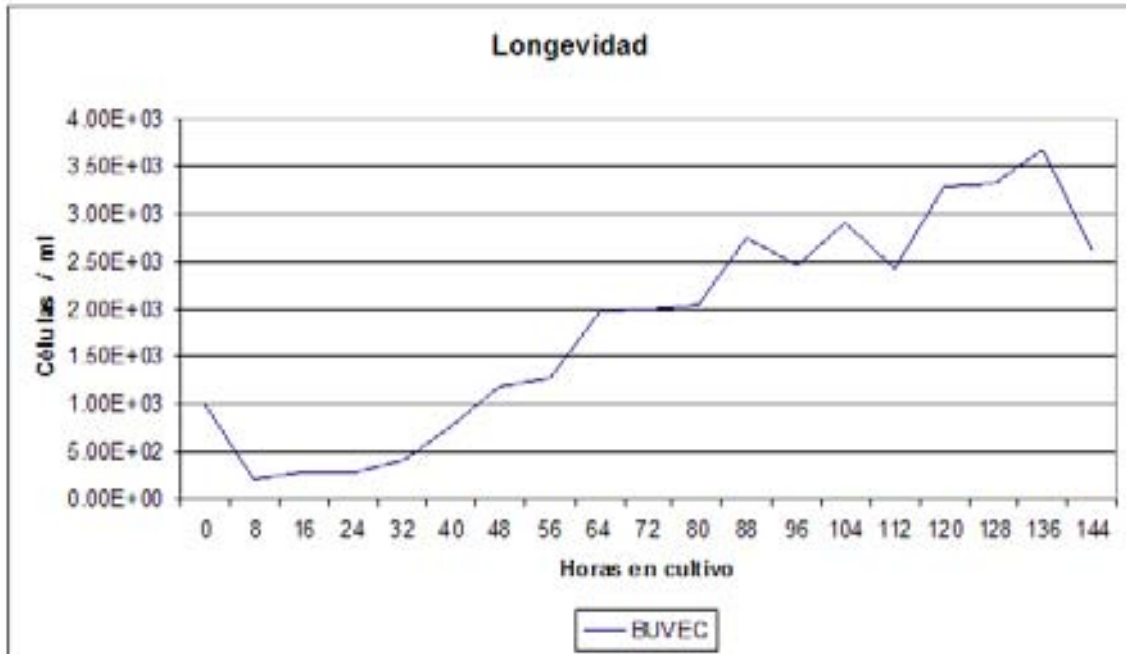
Los resultados de las unidades experimentales se expresan en promedio, cada unidad experimental con una dosis inicial de siembra de  $1 \times 10^3$  células/mm<sup>2</sup> y una superficie de 962 mm<sup>2</sup>, incubadas a 37 °C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. La hora cero indica la hora de siembra, a la hora ocho el sobrenadante fue reemplazado por medio fresco, a todas las unidades experimentales y los cambios de medio posteriores fueron periódicos, cada 48 horas.

**Figura 8: Rendimiento celular a lo largo de 144 horas del estudio de cinética de la línea celular endotelial BCE C/D-1b, expresado en células/ml**



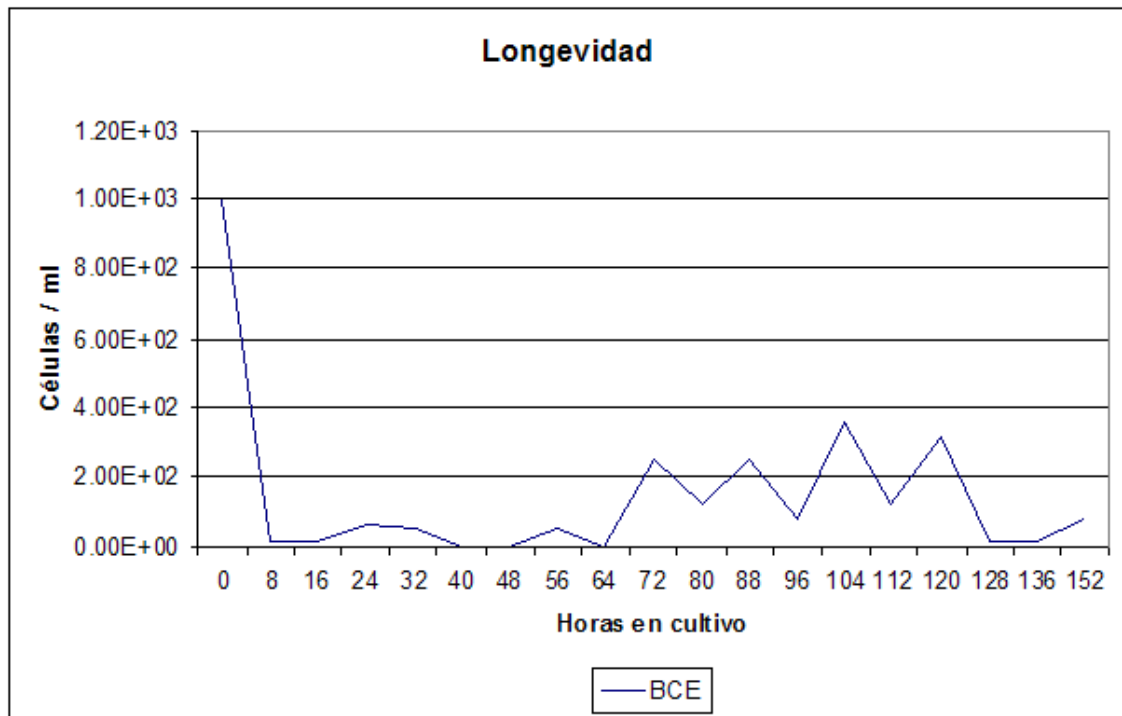
Los resultados de las unidades experimentales se expresan en promedio, cada unidad experimental con una dosis inicial de siembra de  $1 \times 10^3$  células/mm<sup>2</sup> y una superficie de 962 mm<sup>2</sup>, incubadas a 37 °C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. La hora cero indica la hora de siembra, a la hora ocho el sobrenadante fue reemplazado por medio fresco, a todas las unidades experimentales y los cambios de medio posteriores fueron periódicos, cada 48 horas.

Figura 9: Rendimiento celular a lo largo de 144 horas del estudio de longevidad de la línea celular endotelial BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub>, expresado en células/ml



Los resultados de las unidades experimentales se expresan en promedio, cada unidad experimental con una dosis inicial de siembra de  $1 \times 10^3$  células/mm<sup>2</sup> y una superficie de 962 mm<sup>2</sup>, incubadas a 37 °C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. La hora cero indica la hora de siembra, a la hora ocho el sobrenadante fue reemplazado por medio fresco, a todas las unidades experimentales y no hubo cambios de medio posteriores.

Figura 10: Rendimiento celular a lo largo de 144 horas del estudio de cinética de la línea celular endotelial BCE C/D-1b, expresado en células/ml



Los resultados de las unidades experimentales se expresan en promedio, cada unidad experimental con una dosis inicial de siembra de  $1 \times 10^3$  células/mm<sup>2</sup> y una superficie de 962 mm<sup>2</sup>, incubadas a 37 °C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. La hora cero indica la hora de siembra, a la hora ocho el sobrenadante fue reemplazado por medio fresco, a todas las unidades experimentales y no hubo cambios de medio posteriores.

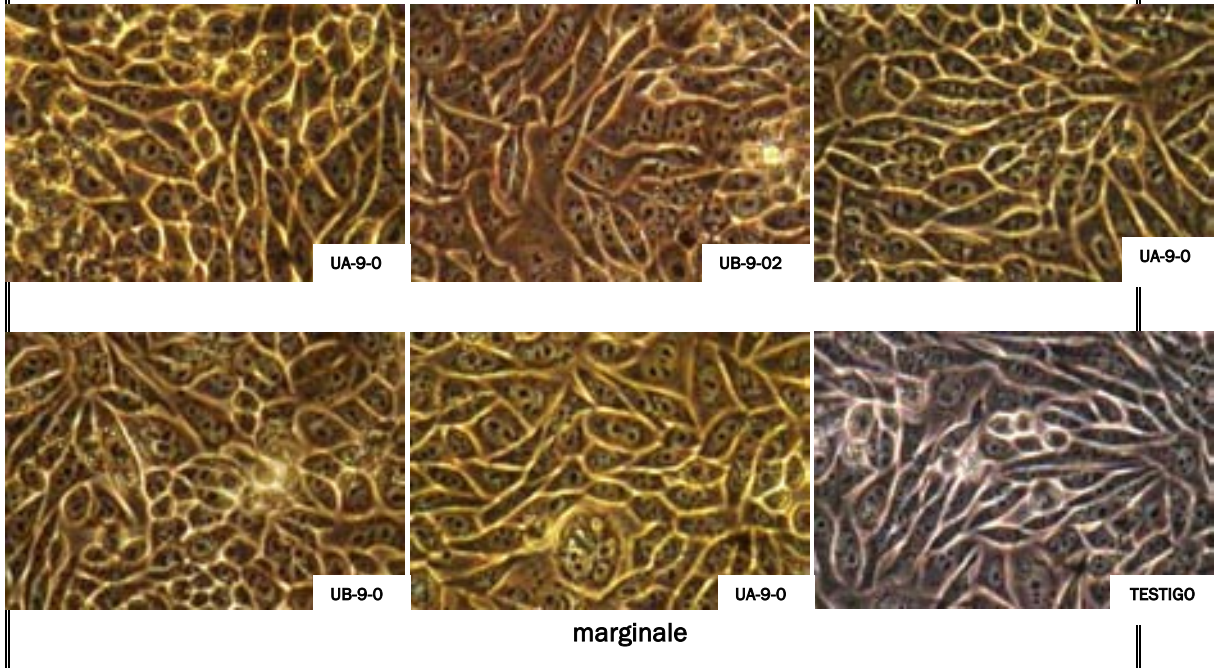
## ***Cultivo in vitro de Anaplasma marginale en líneas celulares nucleadas***

a. inoculación de células nucleadas con la cepa “Morelos” de *A. marginale*.

Se observó un cambio gradual en las formas celulares, principalmente en las células expuestas al inóculo conformado por Ei intactos, estos cambios fueron más radicales conforme se incrementaba el número de pases, se inició en el pase cero y se realizaron al menos cuatro pases, dependiendo de la estirpe celular. Estos cambios constaron en formas pronunciadamente ahusadas con incremento en el número de gránulos o partículas intracitoplasmáticas, estas singularidades fueron más evidentes en las líneas RF/6A y BCE. En el resto de los inóculos, se mantuvieron las características morfológicas sin cambios aparentes, a lo largo del ensayo. Todos los cultivos inoculados con los Ei sometidos a choque térmico presentaron contaminación bacteriana, a las 48h PI, razón por la cual se desecharon, asimismo, en la línea BCE se contaminaron la mayor parte de los cultivos, por lo que se descartaron. En tanto, las células no expuestas a *A. marginale* con más de 90% de confluencia mostraron formas típicas de “mosaico” en las líneas RF/6A y BCE (figuras 11, 12 y 13).

En cuanto a los rendimientos celulares valorados, en RF/6A se presentó una disminución drástica, conforme en número de pase, en los cultivos expuestos a Ei sonicados, tratados con saponina, con choque térmico y CI con y sin inhibidores de proteasas, siendo constante el rendimiento de las células cultivadas con Ei intactos. En BUVEC se apreciaron diferencias mínimas en forma, tamaño y configuración, entre pases e inóculos, lo mismo ocurrió con BCE, aunque en este caso los datos son poco precisos debido al desecho de algunos cultivos (ver figuras 14, 15 y 16).

Figura 11: Línea celular nucleada BUVEC E6E7 inoculada con la cepa "Morelos" de Anaplasma



Fotografías tomadas en el microscopio óptico invertido con el objetivo 40x de la línea BUVEC, del ensayo de cultivo *in vitro* de *Anaplasma marginale* cepa "Morelos" en células nucleadas. El cultivo se realizó en matraces de cultivo de 25cm<sup>2</sup> con una dosis inicial de siembra de 3x10<sup>6</sup> células/mm<sup>2</sup> incubados a 37 °C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

U= Línea celular BUVEC E6E7

A o B= Sublínea

9= Número de

pase 01= Células expuestas a eritrocitos infectados intactos 02= Células expuestas a eritrocitos infectados

sonicados 04= Células expuestas a eritrocitos infectados tratados con saponina 05= Células expuestas a

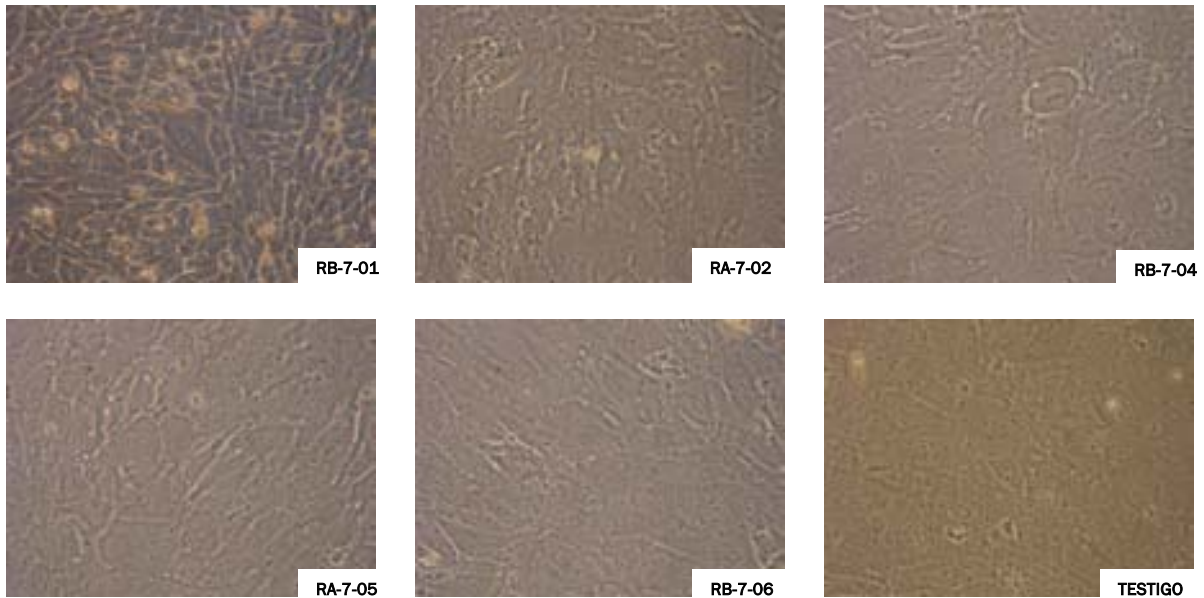
cuerpos iniciales extraídos con inhibidores de proteasas 06= Células expuestas a cuerpos iniciales extraídos sin

inhibidores de proteasas

TESTIGO= Células

no expuestas

**Figura 12: Línea celular nucleada RF/6A inoculada con la cepa "Morelos" de *Anaplasma marginale***



Fotografías tomadas en el microscopio óptico invertido con el objetivo 40x de la línea RF/6A, del ensayo de cultivo *in vitro* de *Anaplasma marginale* cepa "Morelos" en células nucleadas. El cultivo se realizó en matraces de cultivo de 25cm<sup>2</sup> con una dosis inicial de siembra de 3x10<sup>6</sup> células/mm<sup>2</sup> incubados a 37 °C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

R= Línea celular RF/6A

A o B= Sublínea

7= Número de

pase 01= Células expuestas a eritrocitos infectados intactos

02= Células expuestas a eritrocitos

infectados sonicados

04= Células expuestas a eritrocitos infectados tratados con saponina

05= Células

expuestas a cuerpos iniciales extraídos con inhibidores de proteasas

06= Células expuestas a cuerpos iniciales

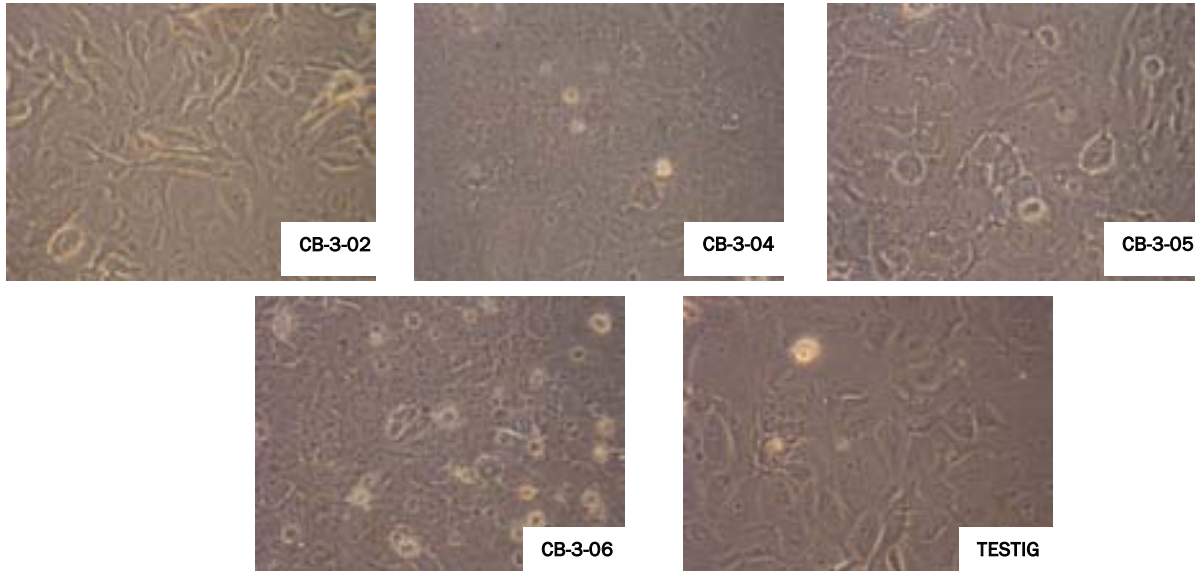
extraídos sin inhibidores de proteasas

TESTIGO= Células no

expuestas



Figura 13: Línea celular nucleada BCE C/D 1-b inoculada con la cepa "Morelos" de *Anaplasma marginale*



Fotografías tomadas en el microscopio óptico invertido con el objetivo 40x de la línea BCE, del ensayo de cultivo *in vitro* de *Anaplasma marginale* cepa "Morelos" en células nucleadas. El cultivo se realizó en matraces de cultivo de 25cm<sup>2</sup> con una dosis inicial de siembra de 3x10<sup>6</sup> células/mm<sup>2</sup> incubados a 37 °C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

C= Línea celular BCE C/D 1-b

B= Sublínea

3= Número de

pase

02= Células expuestas a eritrocitos infectados sonicados

04= Células expuestas a eritrocitos

infectados tratados con saponina

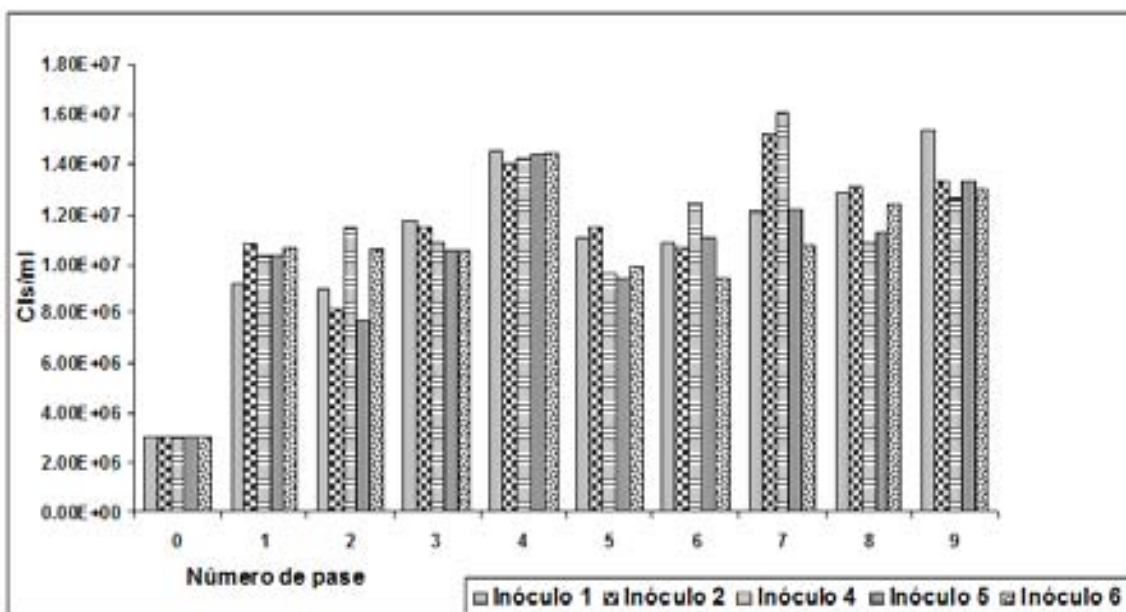
05= Células expuestas a cuerpos iniciales extraídos con inhibidores

de proteasas

06= Células expuestas a cuerpos iniciales extraídos sin inhibidores de proteasas

TESTIGO= Células no expuestas

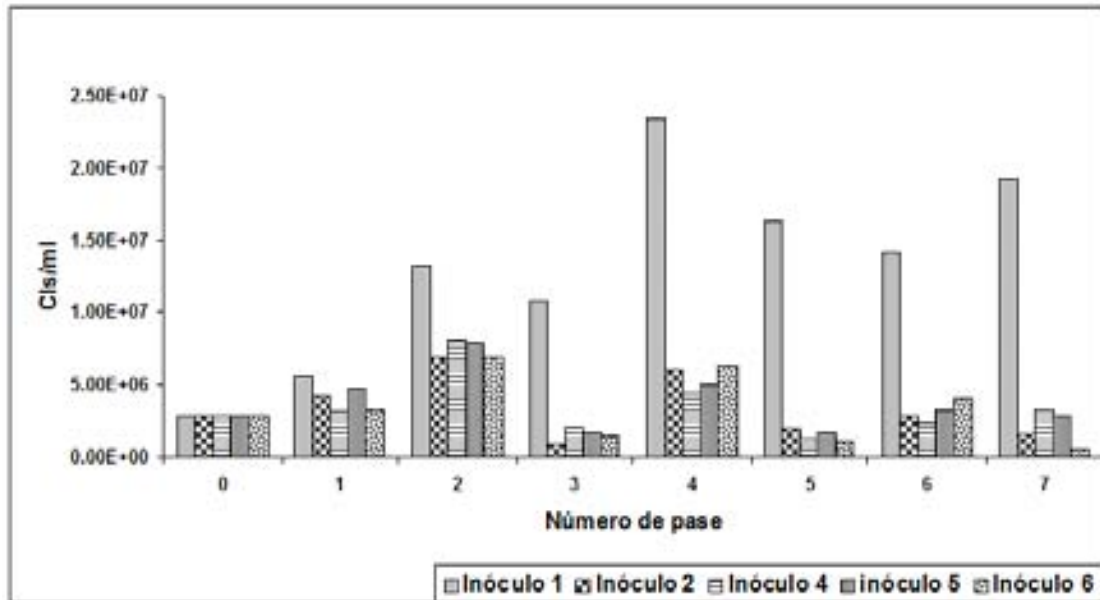
Figura 14: Rendimiento celular de la línea endotelial BUVEC E6E7 inoculada con la cepa "Morelos" de *Anaplasma marginale*, expresado en células/ml



Conteos celulares en promedio, del ensayo de cultivo *in vitro* de *Anaplasma marginale* cepa "Morelos" en células nucleadas. Todos los inóculos se manejaron por duplicado, cada uno en un matraz de cultivo de 25cm<sup>2</sup> con una dosis inicial de siembra de 3x10<sup>6</sup> células/mm<sup>2</sup> incubados a 37 °C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

Inóculo 1= Eritrocitos infectados intactos    Inóculo 2= Eritrocitos infectados sonificados    Inóculo 3= Eritrocitos infectados sometidos a choque térmico    Inóculo 4= Eritrocitos infectados tratados con saponina    Inóculo 5= CI con inhibidores de proteasas    Inóculo 6= CI sin inhibidores de proteasas

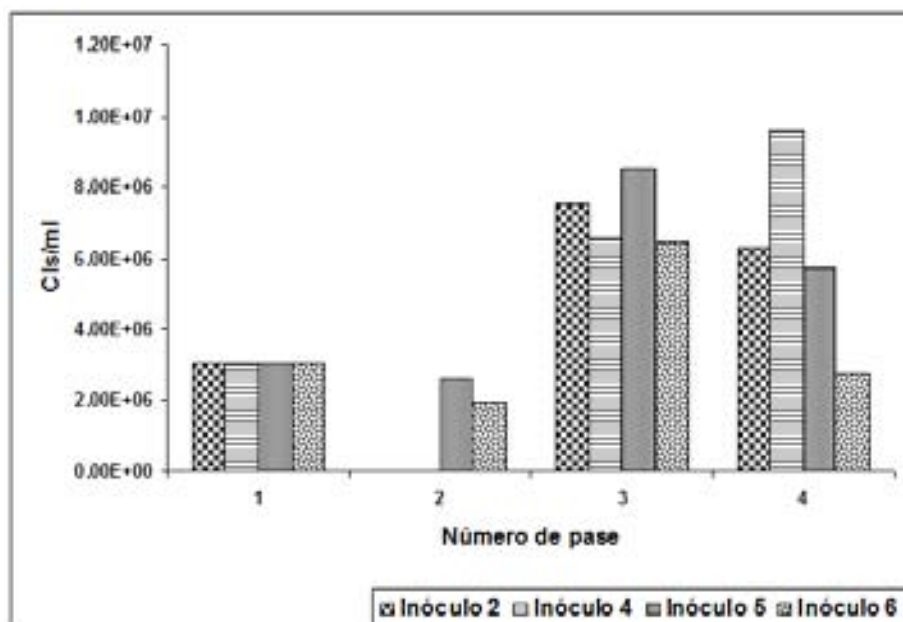
Figura 15: Rendimiento celular de la línea endotelial RF/6A inoculada con la cepa "Morelos" de *Anaplasma marginale*, expresado en células/ml



Conteos celulares en promedio, del ensayo de cultivo *in vitro* de *Anaplasma marginale* cepa "Morelos" en células nucleadas. Todos los inóculos se manejaron por duplicado, cada uno en un matraz de cultivo de 25cm<sup>2</sup> con una dosis inicial de siembra de 3x10<sup>6</sup> células/mm<sup>2</sup> incubados a 37 °C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

Inóculo 1= El intactos    Inóculo 2= El sonicados    Inóculo 3= El sometidos a choque térmico    Inóculo 4= El tratados con saponina    Inóculo 5= CI con inhibidores de proteasas    Inóculo 6= CI sin inhibidores de proteasas

Figura 16: Rendimiento celular de la línea endotelial BCE C/D 1-b inoculada con la cepa "Morelos" de *Anaplasma marginale*, expresado en células/ml



Conteos celulares en promedio, del ensayo de cultivo *in vitro* de *Anaplasma marginale* cepa "Morelos" en células nucleadas. Todos los inóculos se manejaron por duplicado, cada uno en un matraz de cultivo de 25cm<sup>2</sup> con una dosis inicial de siembra de 3x10<sup>6</sup> células/mm<sup>2</sup> incubados a 37 °C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

Inóculo 2= El sonicados      Inóculo 4= El tratados con saponina      Inóculo 5= CI con inhibidores de proteasas  
Inóculo 6= CI sin inhibidores de proteasas.

b. Inoculación de células nucleadas con la cepa “Tizimín” de *A. marginale*

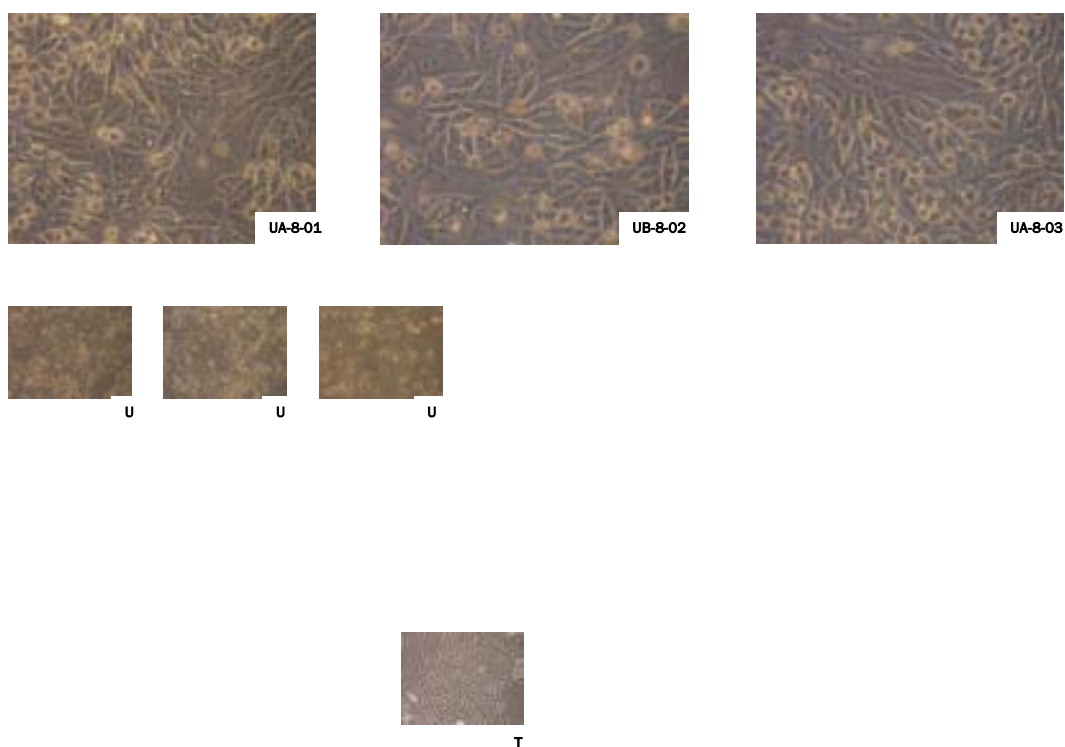
Morfológicamente no se encontraron diferencias entre los inóculos, a lo largo del experimento, BUVEC mantuvo sus formas ahusadas, independientemente del tipo de inóculo y número de pase (ver figura 17). La adhesión celular no se vio afectada, asimismo, el número de gránulos intracitoplasmáticos no variaron. En el rendimiento celular hubo diferencias, pero no mayores de un logaritmo (ver figura 18).

i. Tinción de Giemsa

Con este colorante se pudo distinguir entre citoplasma y núcleo. Las condiciones óptimas fueron con las constantes de: pH 7.56 y una concentración del colorante de 14%. Bajo estas condiciones no se apreciaron precipitados, y las siluetas celulares se definieron acertadamente. No hubo indicios de *A. marginale*, a través de cada pase, comparando el grupo control con cada uno de los inóculos (ver figura 19).



Figura 17: Línea celular nucleada BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub> inoculada con la cepa "Tizimín" de *Anaplasma marginale*



Fotografías tomadas en el microscopio óptico invertido con el objetivo 40x de la línea BUVEC, del ensayo de cultivo *in vitro* de *Anaplasma marginale* cepa "Tizimín" en células nucleadas. El cultivo se realizó en matraces de cultivo de 25cm<sup>2</sup> con una dosis inicial de siembra de 3x10<sup>6</sup> células/mm<sup>2</sup> incubados a 37 °C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

U= Línea celular BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub>

A o B= Sublínea

8= Número de

pase 01= Células expuestas a eritrocitos infectados intactos 02= Células expuestas a eritrocitos infectados

sonicados 04= Células expuestas a eritrocitos infectados tratados con saponina 05= Células expuestas a

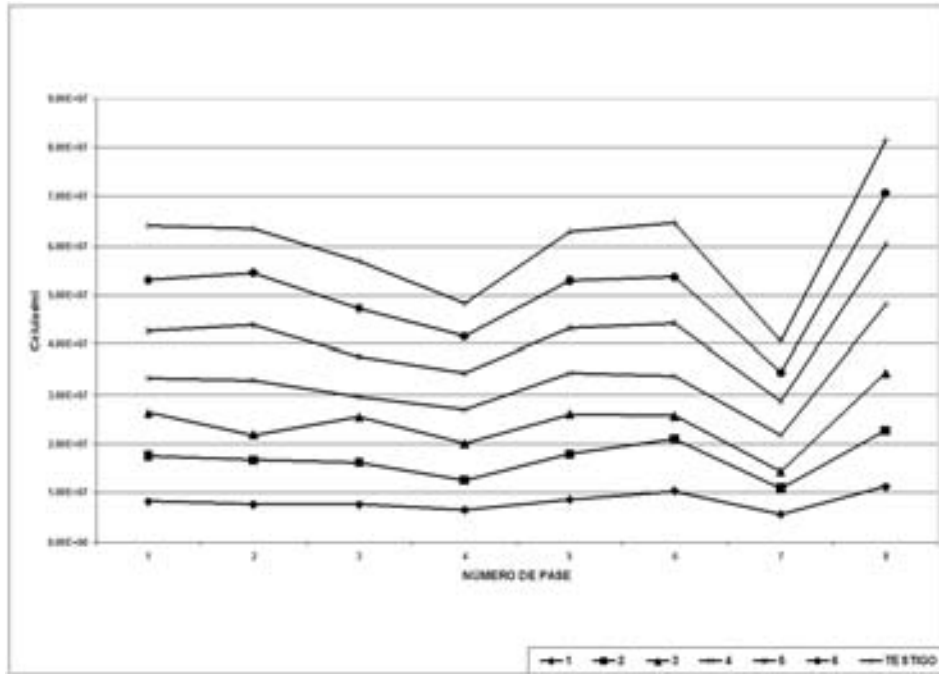
cuerpos iniciales extraídos con inhibidores de proteasas 06= Células expuestas a cuerpos iniciales extraídos sin

inhibidores de proteasas

TESTIGO= Células

no expuestas

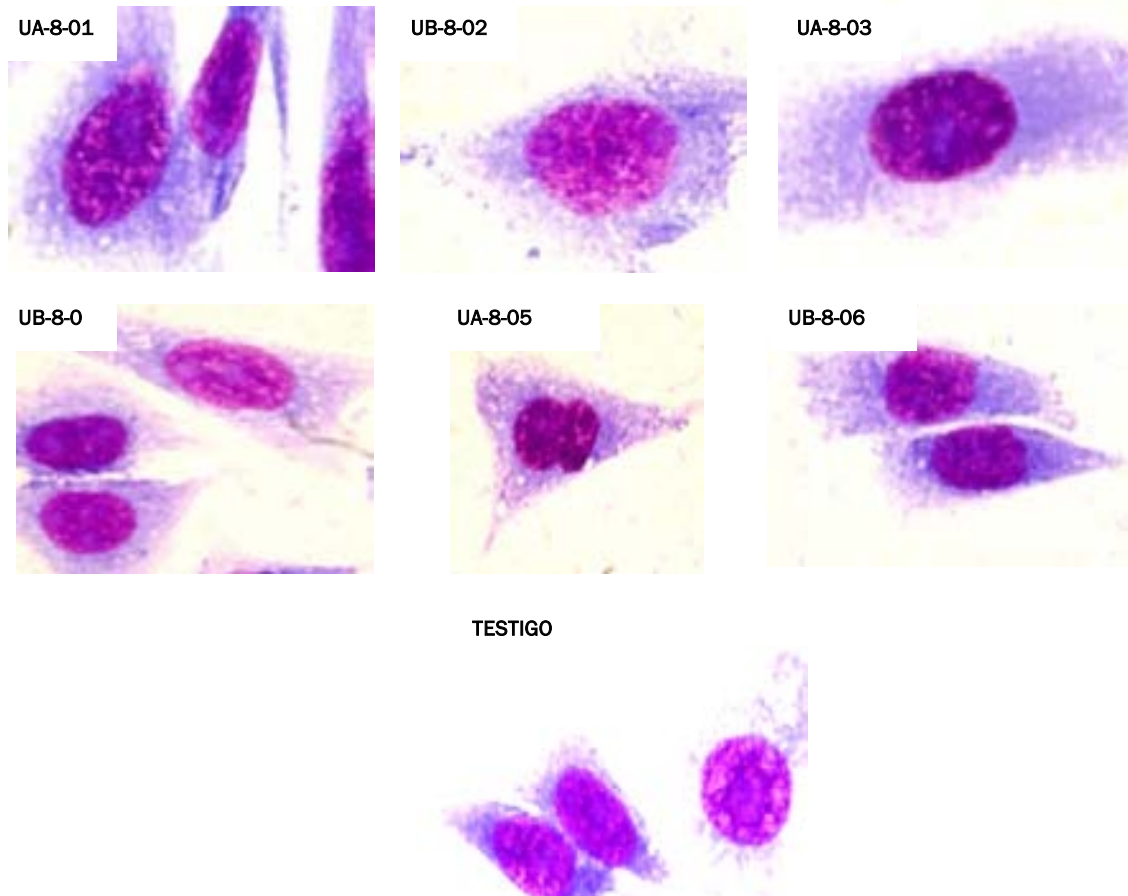
Figura 18: Rendimiento celular de la línea endotelial BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub> inoculada con la cepa "Tizimín" de *Anaplasma marginale*, expresado en células/ml



Conteos celulares en promedio, del ensayo de cultivo *in vitro* de *Anaplasma marginale* cepa "Tizimín" en células nucleadas. Todos los inóculos se manejaron por duplicado, cada uno en un matraz de cultivo de 25cm<sup>2</sup> con una dosis inicial de siembra de 3x10<sup>6</sup> células/mm<sup>2</sup> incubados a 37 °C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

Inóculo 1= El intactos    Inóculo 2= El sonicados    Inóculo 3= El sometidos a choque térmico    Inóculo 4= El tratados con saponina    Inóculo 5= CI con inhibidores de proteasas    Inóculo 6= CI sin inhibidores de proteasas TESTIGO= Células no expuestas.

**Figura 19: Tinción de Giemsa de la línea celular nucleada BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub> inoculada con la cepa "Tizimín" de *Anaplasma marginale***



Fotografías tomadas en el microscopio óptico con el objetivo 100x de la línea BUVEC, del ensayo de cultivo *in vitro* de *Anaplasma marginale* cepa "Tizimín" en células nucleadas. Las células nucleadas fueron sembradas después de la exposición a *A. marginale*, en placas de 24 pozos con un cubreobjetos de 15 mm de diámetro en el fondo, con una dosis de siembra de  $2 \times 10^5$  células/mm<sup>2</sup>, incubadas a 37 °C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, a las 24 horas, las células adheridas a los cubreobjetos fueron fijados en metanol absoluto y fueron teñidas con el colorante de Giemsa al 14% con pH 7.56 y 30 minutos de exposición al colorante, a temperatura ambiente.

U= Línea celular BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub>

A o B= Sublínea

8= Número de

pase      01= Células expuestas a eritrocitos infectados intactos      02= Células expuestas a eritrocitos infectados sonificados  
 04= Células expuestas a eritrocitos infectados tratados con saponina      05= Células expuestas a cuerpos iniciales extraídos con inhibidores de proteasas  
 06= Células expuestas a cuerpos iniciales extraídos sin inhibidores de proteasas      TESTIGO= Células no expuestas



#### ii. Tinción de Wright

Con esta tinción los resultados obtenidos fueron insatisfactorios, pues a pesar de probar diferentes tiempos de exposición al colorante, en todos los casos se observaron precipitados, o en su defecto, toda la célula se apreció del mismo color o tono (ver figura 20).

#### iii. Tinción de naranja de Acridina

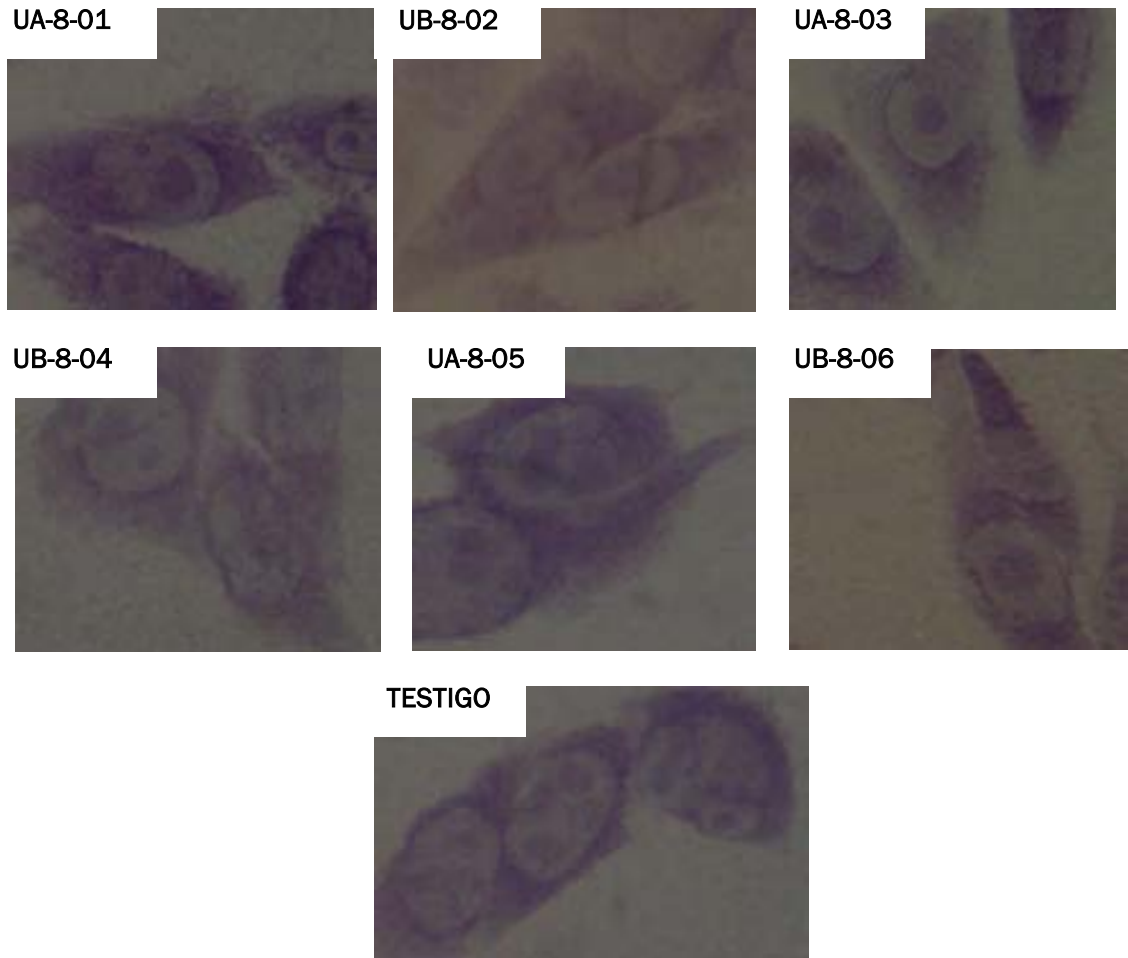
Al visualizar en el microscopio de epifluorescencia a las células teñidas *in extenso*, se observaron las membranas citoplasmática y nuclear bien definidas. Se tiñeron indistintamente citoplasma y núcleo celular (ver figura 21), por esta razón, el resultado también fue de nula utilidad para distinguir fracciones de posible ácido nucleico de origen rickettsial, en el citoplasma celular.

#### iv. Tinción de carboxi-metil rodamina

Al momento de observar las células, se apreciaron de color rojo fluorescente, con el citoplasma y núcleo teñido sin distinción. Tampoco se logró distinguir vacuolas o membranas cuyo origen pudiera asociarse a la presencia de la rickettsia *A. marginale*. En el espacio entre las células no hubo coloración (ver figura 22).



Figura 20: Tinción de Wright de la línea celular nucleada BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub> inoculada con I  
a cepa "Tizimín" de *Anaplasma marginale*



Fotografías tomadas en el microscopio óptico con el objetivo 100x de la línea BUVEC, del ensayo de cultivo *in vitro* de *Anaplasma marginale* cepa "Tizimín" en células nucleadas. Las células nucleadas fueron sembradas después de la exposición a *A. marginale*, en placas de 24 pozos con un cubreobjetos de 15 mm de diámetro en el fondo, con una dosis de siembra de  $2 \times 10^5$  células/mm<sup>2</sup>, incubadas a 37 °C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, a las 24 horas, las células adheridas a los cubreobjetos fueron fijados en metanol absoluto y fueron teñidas con el colorante de Wright durante 5 minutos a temperatura ambiente.

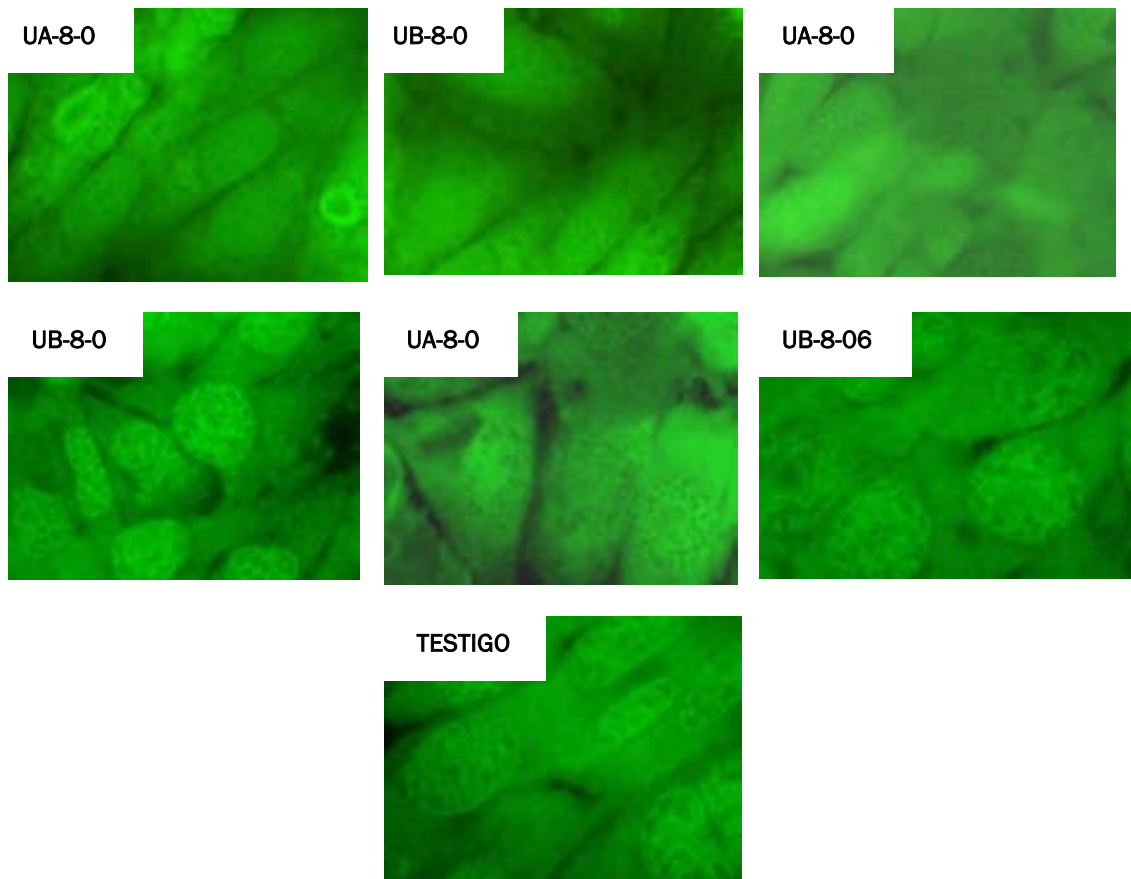
U= Línea celular BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub>

A o B= Sublínea

8= Número de

pase      01= Células expuestas a eritrocitos infectados intactos      02= Células expuestas a eritrocitos infectados  
sonicados      04= Células expuestas a eritrocitos infectados tratados con saponina      05= Células expuestas a  
cuerpos iniciales extraídos con inhibidores de proteasas      06= Células expuestas a cuerpos iniciales extraídos sin  
inhibidores de proteasas      TESTIGO= Células no expuestas

**Figura 21: Tinción de Naranja de Acridina de la línea celular nucleada BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub> inoculada con la cepa "Tizimín" de *Anaplasma marginale***



Fotografías tomadas en el microscopio de epifluorescencia con el filtro de absorción de 548nm y emisión de 576nm y el objetivo 100x de la línea BUVEC, del ensayo de cultivo *in vitro* de *Anaplasma marginale* cepa "Tizimín" en células nucleadas. Las células nucleadas fueron sembradas después de la exposición a *A. marginale*, en placas de 24 pozos con un cubreobjetos de 15 mm de diámetro en el fondo, con una dosis de siembra de  $2 \times 10^5$  células/mm<sup>2</sup>, incubadas a 37 °C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, a las 24 horas, las células adheridas a los cubreobjetos fueron fijados en formalina al 10% y fueron teñidas con el colorante NA durante al menos 15 minutos a temperatura ambiente.

U= Línea celular BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub>

A o B= Sublínea

8= Número de

pase 01= Células expuestas a eritrocitos infectados intactos

02= Células expuestas a eritrocitos infectados

sonicados

04= Células expuestas a eritrocitos infectados tratados con saponina

05= Células expuestas a

cuerpos iniciales extraídos con inhibidores de proteasas

06= Células expuestas a cuerpos iniciales extraídos sin

inhibidores de proteasas

TESTIGO= Células no expuestas

v. Extracción de ADN y PCR

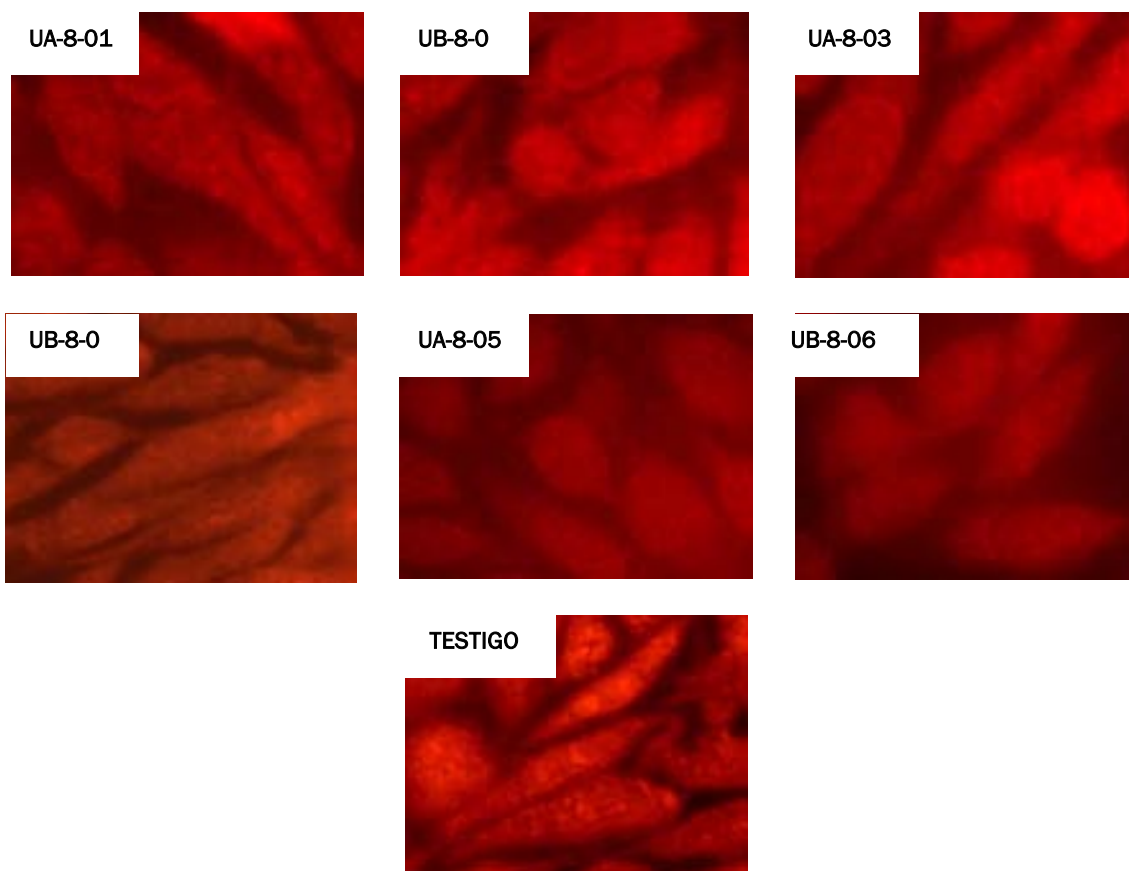
A partir del ADN extraído de las células endoteliales expuestas a *A. marginale*, se realizó el protocolo de PCR, sin embargo, no se detectó a esta bacteria en las células endoteliales (ver figura 23).

c. Tinciones de contraste supravital en las líneas celulares endoteliales expuestas a la infección por *A. marginale*

En la primera lectura, a las 24 h, se pudieron apreciar las formas celulares bien definidas, los eritrocitos contenían al *A. marginale* en su interior. Al sobreponer los filtros del microscopio, para CFDA y CMRA, los Ei aparentemente se encontraban en contacto cercano con las células endoteliales. Este mismo patrón se observó en la segunda la lectura, a las 72 h, sin embargo la intensidad de los colorantes disminuyó drásticamente, dificultando la visualización. Para la última lectura, a las 144 h la intensidad de ambos colorantes se vio mermada, principalmente el colorante CMRA. Los resultados óptimos se obtuvieron con la primera lectura, pues los colorantes permitían diferenciar las estructuras celulares y a los Ei, empero, no puede aseverarse que *A. marginale* estuviese dentro de la célula nucleada, pues no se hicieron apreciaciones sagitales o transversales. En las subsiguientes lecturas se puso de manifiesto la disminución en la intensidad del colorante, debido a que en cada ciclo celular se diluye, la coloración de contraste desapareció a las 144 h (ver figura 24).



Figura 22: Tinción de carboxi-metil-rodamina (CMRA) de la línea celular nucleada BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub> inoculada con la cepa "Tizimín" de *Anaplasma marginale*



Fotografías tomadas en el microscopio de epifluorescencia con el filtro de absorción de 548nm y emisión de 576nm y el objetivo 100x de la línea BUVEC, del ensayo de cultivo *in vitro* de *Anaplasma marginale* cepa "Tizimín" en células nucleadas. Las células nucleadas fueron sembradas después de la exposición a *A. marginale*, en placas de 24 pozos con un cubreobjetos de 15 mm de diámetro en el fondo, con una dosis de siembra de  $2 \times 10^5$  células/mm<sup>2</sup>, incubadas a 37 °C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, a las 24 horas, las células adheridas a los cubreobjetos fueron fijados en formalina al 10% y fueron teñidas con el colorante CMRA durante 15 minutos a 37 °C.

U= Línea celular BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub>

A o B= Sublínea

8= Número de

pase 01= Células expuestas a eritrocitos infectados intactos

02= Células expuestas a eritrocitos infectados

sonicados

04= Células expuestas a eritrocitos infectados tratados con saponina

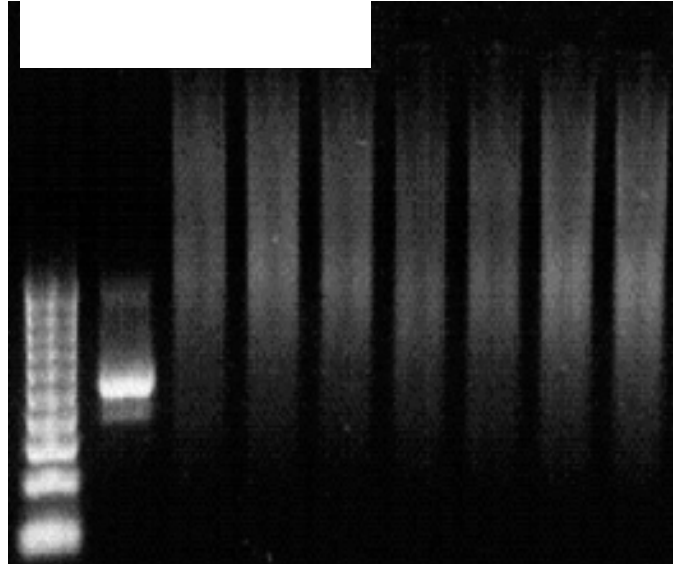
05= Células expuestas a

cuerpos iniciales extraídos con inhibidores de proteasas

06= Células expuestas a cuerpos iniciales extraídos sin

inhibidores de proteasas TESTIGO= Células no expuestas

Figura 23: Electroforesis en gel de agarosa al 1% del PCR realizado a células endoteliales BUVEC expuestas a *Anaplasma marginale*

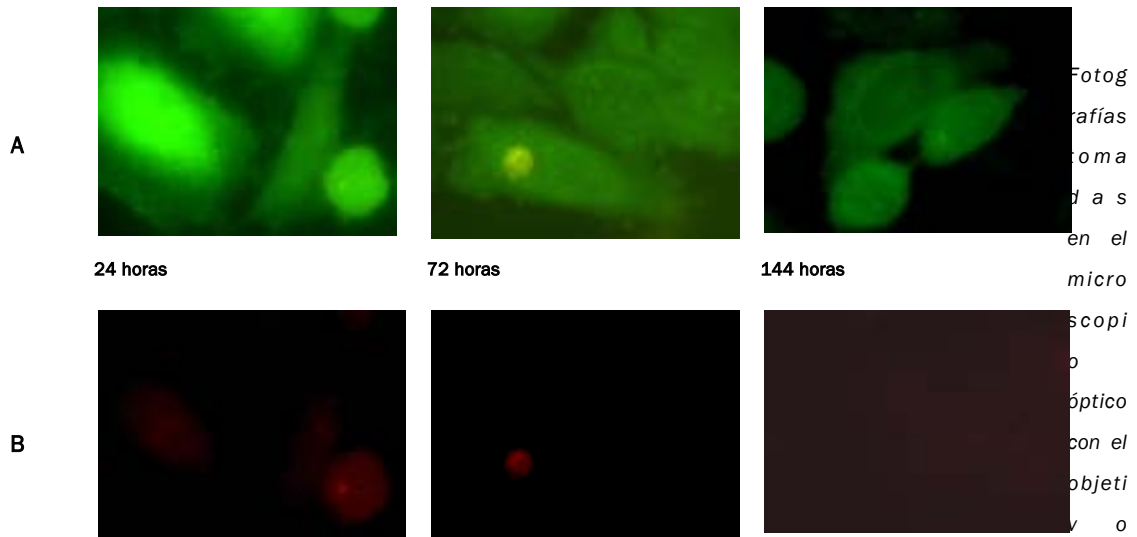


Fotografía tomada en un transiluminador emisor de luz UV de 200-300nm del gel de agarosa al 1% del PCR realizado a células BUVEC expuestas a *Anaplasma marginale* cepa "Tizimín" en cultivo *in vitro*. El monoestrato de células nucleadas expuestas a *A. marginale*, fue tripsinizado y sometido al proceso de extracción de ADN mediante la técnica de "Hot Shot", posteriormente se empleó el protocolo de PCR anidado, para la amplificación de un fragmento de 458pb del gen conservado *msp5*, característico del género *Anaplasma*.

En el carril 1 se aprecia el marcador de pares de bases (de 100 a 1000 en orden ascendente); en el carril 2 el control positivo, la cepa Yucatán; el carril 3 es el control negativo; los carriles 4 a 9 representan a las células nucleadas en diferentes pases, sembradas con *A. marginale* en matraces de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> de superficie, con una dosis de siembra de  $3 \times 10^3$  células/mm<sup>2</sup>, incubadas a 37 °C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.



Figura 24: Tinción de contraste supravital empleando los colorantes carboxi-metil-rodamina (CMRA) y diacetato de carboxi-fluoresceína (CFDA), en la línea celular nucleada BCE C/D 1-b co-cultivada con *Anaplasma marginale*



100x de la línea BCE, del ensayo de co-cultivo *in vitro* con *Anaplasma marginale* empleando coloración supravital de contraste. Las células endoteliales fueron sembradas en placas de 24 pozos con un cubreobjetos de 15 mm de diámetro en el fondo, con una dosis de siembra de  $2 \times 10^5$  células/mm<sup>2</sup>, incubadas a 37 °C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Al momento de la siembra, se incubaron con 50 µl de CFDA, paralelamente, 25 µl de eritrocitos infectados al 50% en VYM fueron incubados con 50 µl de CMRA en un tubo estéril, 24 horas después se inocularon las células nucleadas. Se representa la lectura hecha a las 24 horas, 72 y 144 horas. Las flechas blancas indican a la rickettsia teñida con CMRA.

Fila A= Con el filtro de absorción de 490nm y emisión de 520nm

Fila B= Con el filtro de absorción de 548nm y emisión de 576nm



#### d. Co-cultivo de las líneas endoteliales con eritrocitos

##### i. Primera variante

En las lecturas hechas a los frotis teñidos con Giemsa, fue posible observar CI resultantes de la infección por *A. marginale* en los eritrocitos durante 91 días en el co-cultivo con BCE y 87 días con BUVEC. La dinámica de la rickettsemia entre ambas líneas celulares mostró patrones diferentes; así, la línea de córnea se mantuvo, a partir del día 5 del cultivo, con rickettsemia del 0.13% hasta 1.1%, hasta el final del experimento. En tanto, la línea de cordón umbilical mostró fluctuaciones entre los días 8 y 10 con porcentajes de 1.14% y 4.25% respectivamente; entre los días 16 y 17 con porcentajes de 0.74% y 3.41%; al día 18 los cultivos aparecieron negativos y al día 26 el porcentaje de rickettsemia observado fue del 4.39% (figuras 25 y 26).

##### ii. Segunda variante

En las lecturas hechas a los frotis teñidos con Giemsa, pudo observarse *A. marginale* en los eritrocitos durante 145 días en el co-cultivo con BCE y 149 días con BUVEC. Al inicio del cultivo *A. marginale* presentaba la típica forma de los CI y con el paso de los meses fue disminuyendo hasta pequeños cuerpos marginales, algunos CI se observaron antes de presentarse los incrementos en el número de rickettsemia. En ciertas células de la línea BCE teñidas con el colorante de Giemsa se apreciaron partículas teñidas como ácidos nucleicos, a la periferia de los núcleos celulares, este hallazgo estuvo ausente en BUVEC (figura 27). Con BCE el porcentaje máximo después de iniciado el cultivo fue del 17.96% y en BUVEC de 2.5%, lo que representa una diferencia del 15.19% (figuras 28 y 29). Las características morfológicas de ambas líneas perpetuaron durante todo el experimento. Con la técnica de IF directa e indirecta se confirmó la presencia de *A. marginale* en los eritrocitos infectados (figura 29), en cambio, con la técnica directa aplicada a las células nucleadas no pudo distinguirse a la bacteria pues toda la silueta celular se apreció con FITC (figura 31).

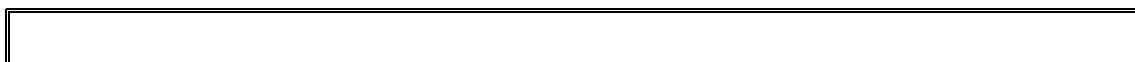
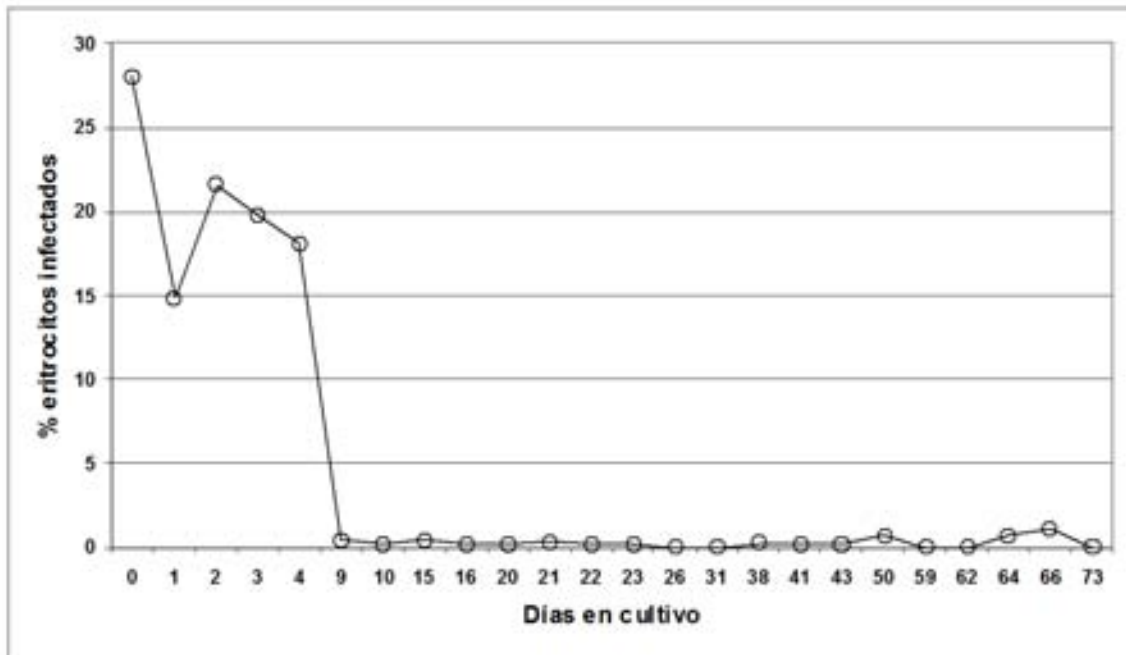
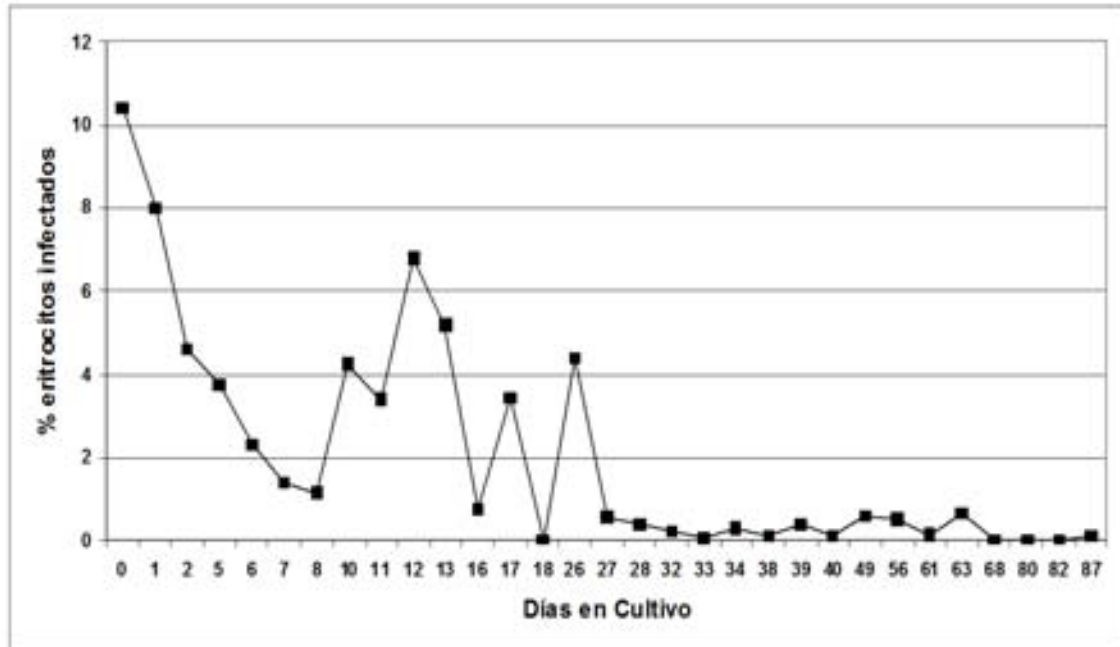


Figura 25: Rickettsemia presente en el co-cultivo de eritrocitos infectados con *Anaplasma marginale* cepa "Puente de Ixtla" con la línea endotelial BCE C7D 1-b



Comportamiento de los eritrocitos infectados con la cepa "Puente de Ixtla" de *Anaplasma marginale* co-cultivados con la línea nucleada BCE, durante la primera variante, incubados en placas de 24 pozos e incubados a 37 °C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

Figura 26: Rickettsemia presente en el co-cultivo de eritrocitos infectados con *Anaplasma marginale* cepa "Tizimín" con la línea endotelial BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub>



Comportamiento de los eritrocitos infectados con la cepa "Tizimín" de *Anaplasma marginale* co-cultivados con la línea nucleada BUVEC, durante la primera variante, incubados en placas de 24 pozos e incubados a 37 °C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

**Figura 27: Tinción de Giemsa de la líneas celulares BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub> y BCE C/D 1-b co-cultivadas con eritrocitos**

**Serie 1**

Fotografías microscopio 100x de frotis fijados en teñidos con al 14% pH minutos a del ensayo las líneas eritrocitos.

**Grupo**

**Grupo no**

B U V E C

representa a

la cepa

marginale,

representa a

aislado "Soto

expuesto son

c o n

el grupo no

co-cultivadas

( n o

i n d i c a n

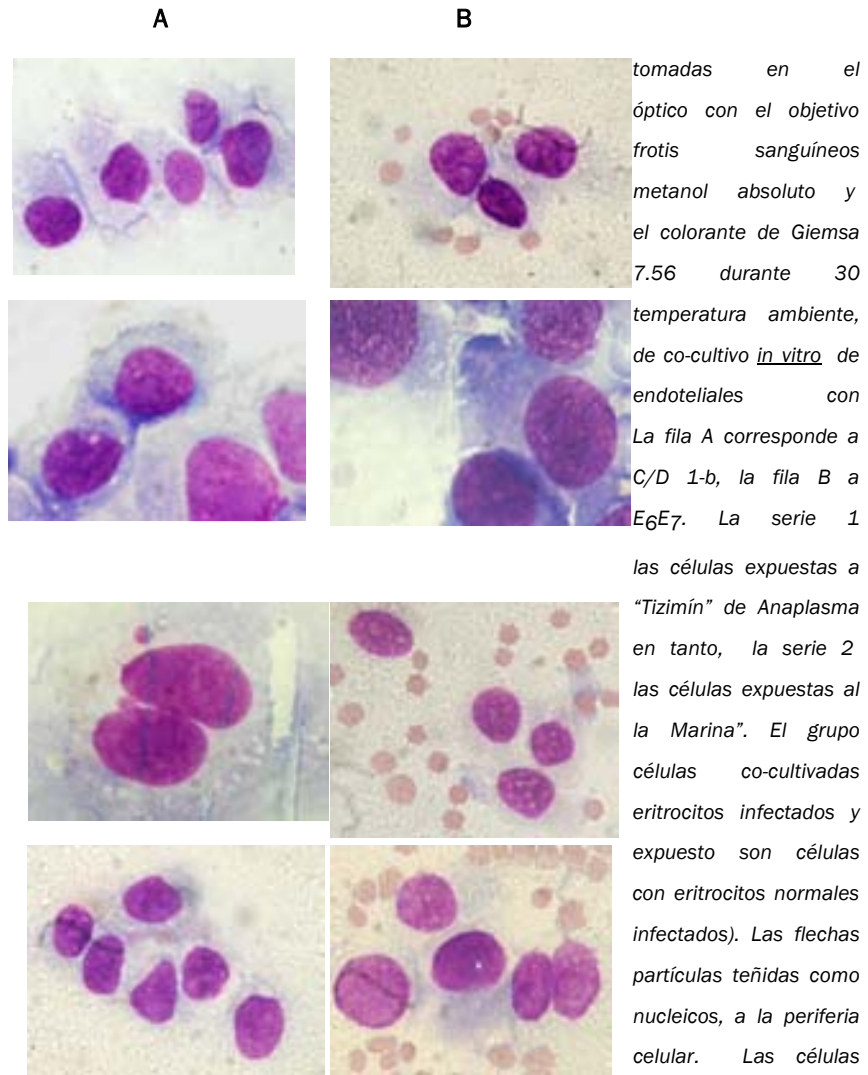
á c i d o s

del núcleo

**Grupo**

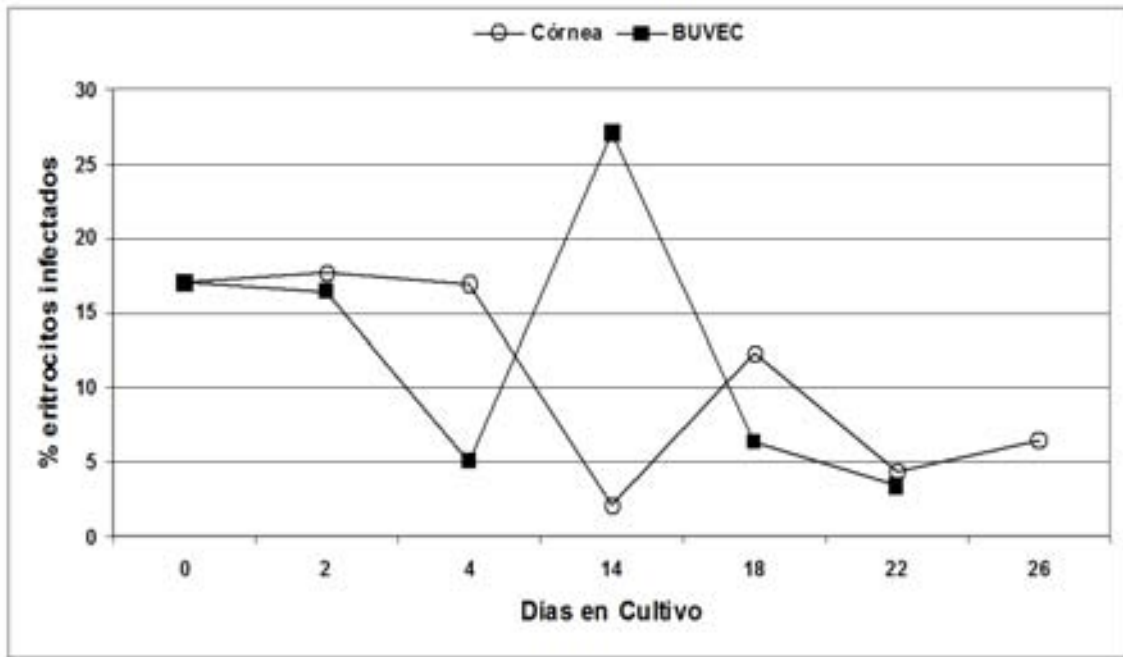
**Grupo no**

nucleadas fueron sembradas en placas de 24 pozos, con una dosis de siembra de  $2 \times 10^5$  células/mm<sup>2</sup>, incubadas a 37 °C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se adicionaron eritrocitos infectados o normales y diariamente se cambió 1 ml del medio de cultivo, estos frotis se tomaron del fondo del pozo antes del cambio de medio.



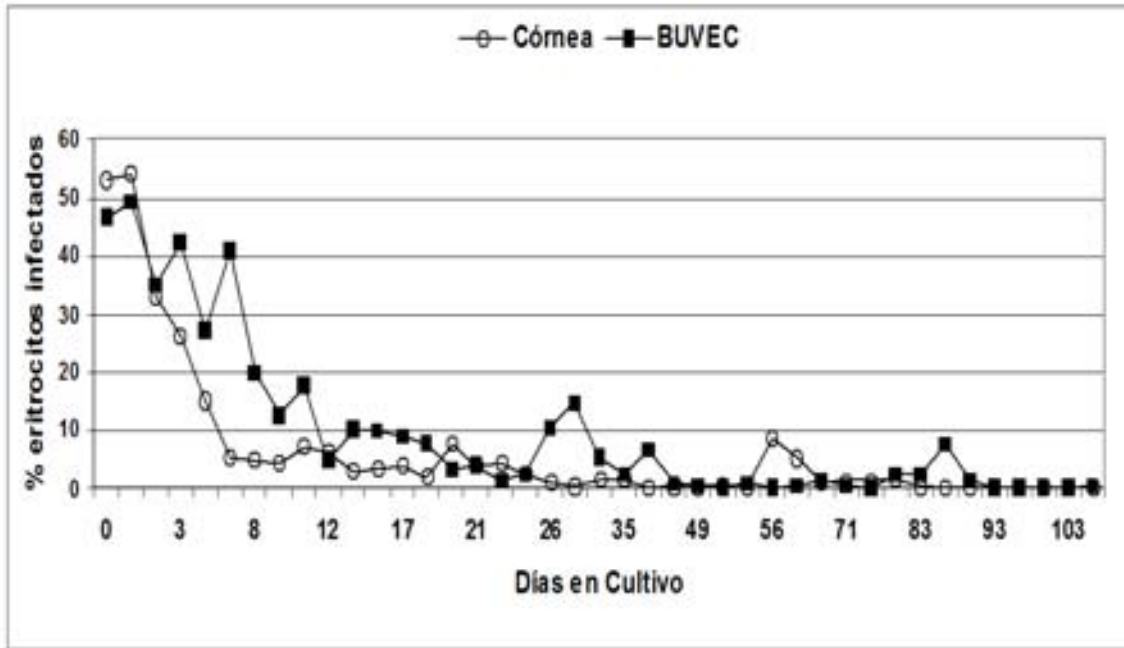
tomadas en el óptico con el objetivo frotis sanguíneos metanol absoluto y el colorante de Giemsa 7.56 durante 30 temperatura ambiente, de co-cultivo *in vitro* de endoteliales con La fila A corresponde a C/D 1-b, la fila B a E<sub>6</sub>E<sub>7</sub>. La serie 1 las células expuestas a "Tizimín" de Anaplasma en tanto, la serie 2 las células expuestas al la Marina". El grupo células co-cultivadas eritrocitos infectados y expuesto son células con eritrocitos normales infectados). Las flechas partículas teñidas como nucleicos, a la periferia celular. Las células

Figura 28: Rickettsemia presente en el co-cultivo de eritrocitos infectados con *Anaplasma marginale* aislado "Soto la Marina" con las líneas endoteliales BCE C7D 1-b y BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub>



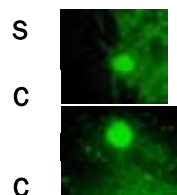
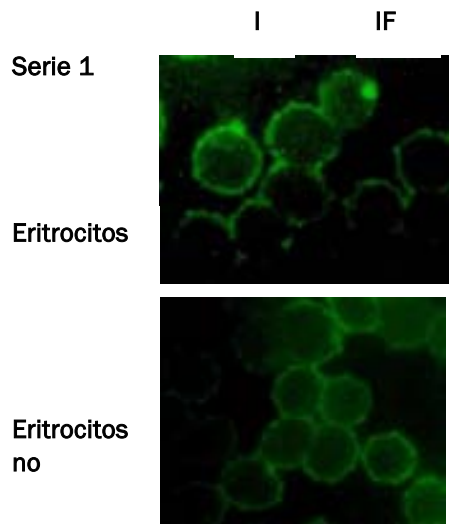
Comportamiento de los eritrocitos infectados con el aislado "Soto la Marina" de *Anaplasma marginale* co-cultivados con las líneas nucleadas BCE y BUVEC, en la segunda variante, incubados en placas de 24 pozos e incubados a 37 °C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

Figura 29: Rickettsemia presente en el co-cultivo de eritrocitos infectados con *Anaplasma marginale* cepa "Tizimín" con las líneas endoteliales BCE C7D 1-b y BUVEC E6E7



Comportamiento de los eritrocitos infectados con la cepa "Tizimín" de *Anaplasma marginale* co-cultivados con las líneas nucleadas BCE y BUVEC, en la segunda variante, incubados en placas de 24 pozos e incubados a 37 °C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

**Figura 30: Técnica de inmunofluorescencia directa e indirecta de los eritrocitos co-cultivados con las líneas celulares endoteliales**



Fotografías tomadas en el microscopio de epifluorescencia con el objetivo 100x del ensayo de co-cultivo *in vitro* de las líneas endoteliales con eritrocitos. En la serie 1 se aprecian los eritrocitos infectados con las técnicas de inmunofluorescencia directa o indirecta, las flechas indican a *Anaplasma marginale*, en la serie 2 las células endoteliales sometidas a inmunofluorescencia directa. Las células nucleadas fueron sembradas en placas de 24 pozos, con una dosis de siembra de  $2 \times 10^5$  células/mm<sup>2</sup>, incubadas a 37 °C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se adicionaron eritrocitos infectados o normales y diariamente se cambió 1 ml del medio de cultivo, estos frotis se tomaron del fondo del pozo antes del cambio de medio.

e. Co-cultivo de células endoteliales y la cepa

“Morelos” de *A. marginale* en matraces de 25cm<sup>2</sup>

En las lecturas hechas a los frotis teñidos con Giemsa, pudo observarse *A. marginale* en los eritrocitos desde el inicio del cultivo, hasta el día 43 (figura 31).

***Estudios en bovinos inoculados con células endoteliales expuestas a Anaplasma marginale en condiciones in vitro***

a. Inoculación con BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub> expuesta a *A. marginale*

Al bovino control no pudo dársele seguimiento, en cuanto al bovino inoculado con BUVEC no presentó alteraciones en ninguna de las constantes fisiológicas medidas, tampoco hubo signos de anaplasmosis, ni respuesta de anticuerpos (figura 32).

b. Inoculación con BCE C/D 1-b expuesta a *A. marginale*

Durante el seguimiento a los bovinos, no se presentaron alteraciones en las constantes fisiológicas medidas, tampoco hubo signos de anaplasmosis y en uno de los animales inoculados hubo respuesta de anticuerpos (figura 33).

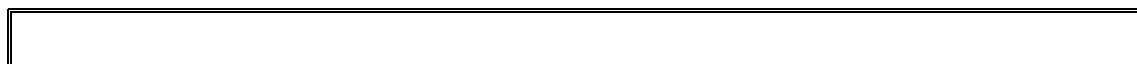
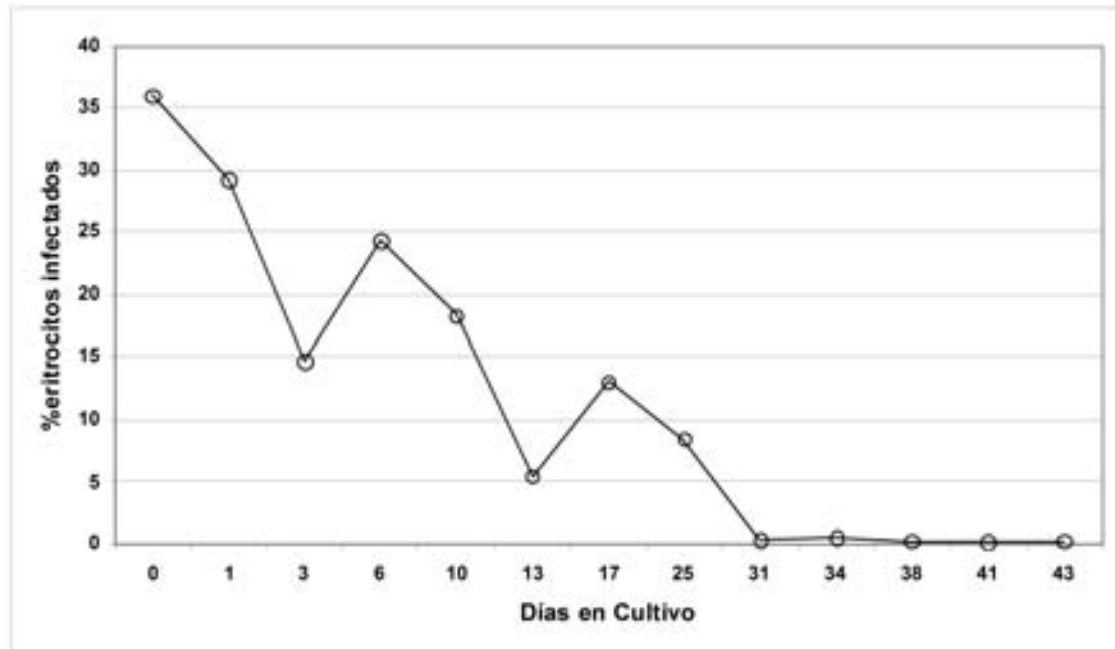


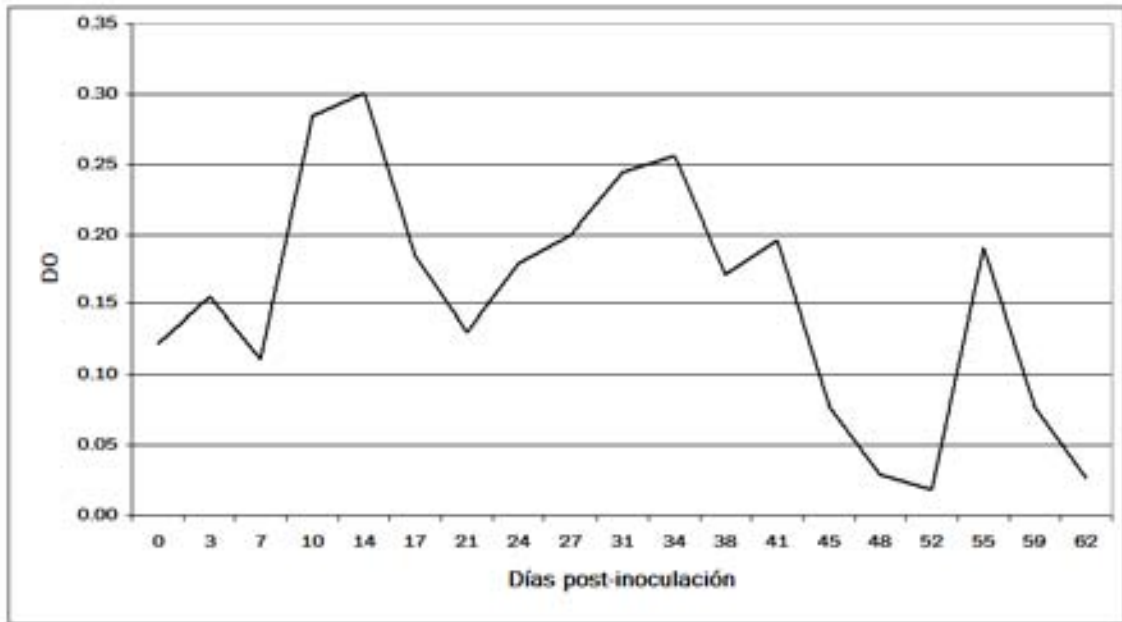


Figura 31: Rickettsemia presente en el co-cultivo de eritrocitos infectados con *Anaplasma marginale* cepa "Morelos" con la línea endotelial BCE C7D 1-b en matraces de 25cm<sup>2</sup>



Comportamiento de los eritrocitos infectados con la cepa "Morelos" de *Anaplasma marginale* co-cultivados con la línea nucleada BCE, incubados en matraces de 25cm<sup>2</sup> e incubados a 37 °C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

Figura 32: Respuesta de anticuerpos en un bovino inoculado con cultivos celulares de BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub> expuestos a cuerpos iniciales de *Anaplasma marginale* extraídos con inhibidores de proteasas



Valores de la densidad óptica (DO) obtenidos de la prueba de ELISA aplicada al suero de bovino, inoculado con la línea celular BUVEC expuesta a cuerpos iniciales de *A. marginale*. Los valores superiores a 0.47 se interpretan como presencia de inmunoglobulinas IgG totales contra esta rickettsia.

**Figura 33: Respuesta de anticuerpos en bovinos inoculados con co-cultivos de eritrocitos infectados con *Anaplasma marginale* y células de la estirpe BCE C/D 1-b**

Valores de la densidad óptica (DO) obtenidos de la prueba de ELISA aplicada a los sueros de bovinos, inoculados con cultivos ciegos de la línea celular BCE expuesta a eritrocitos infectados con *A. marginale*. Los valores superiores a 1.0, señalados con un círculo, se interpretan como presencia de inmunoglobulinas IgG totales contra esta rickettsia.

## V. DISCUSIÓN GENERAL

El protocolo de adaptación de la línea celular de cordón umbilical se planteó para valorar la respuesta de esta estirpe celular hacia medios de cultivo, mismos que se han utilizado en el cultivo *in vitro* de *A. marginale* en eritrocitos. Con el medio RPMI 1640 tuvo un mejor comportamiento, superando inclusive al desarrollo en el medio de referencia reportado por los investigadores que transformaron esta línea celular (Cajero-Juárez *et al*, 2002), esta capacidad adaptativa podría atribuirse a sus características de perpetuación e invasividad, de esta estirpe celular.

Los estudios de cinética y longevidad arrojaron datos que permitieron conocer más acerca del comportamiento de las líneas celulares, confirmando las diferencias entre células nativas y transformadas, con los resultados obtenidos se pudo cambiar la regularidad del mantenimiento, como el cambio de medio, pudiendo espaciarse para hacer más eficiente y menos riesgoso el manejo de los cultivos. Las células nativas, de córnea de bovino resisten mejor la ausencia de cambio de medio pues su cinética es más lenta respecto a la línea de cordón umbilical. A pesar de las desigualdades numéricas, BCE se mantuvo e incluso su rango de tolerancia rebasó al de BUVEC.

En el primer ensayo se planteó la idea de usar diversas presentaciones de *A. marginale*, con el propósito de evaluar qué condición permitiría la invasión y en dado caso, la proliferación de la bacteria en su célula hospedera. Se pretendió buscar a este microorganismo mediante morfología o cambios citopatológicos, en la línea celular de retina de mono se observaron marcadamente diferencias morfológicas entre el inóculo de Ei intactos, respecto al resto; estas mismas diferencias coincidieron con las distancias numéricas apreciadas determinadas con los conteos celulares, durante la duración del experimento a través de cada subcultivo. Cuando se repitió esta metodología sólo con la línea celular de cordón umbilical se buscó a la bacteria mediante morfología, combinando la microscopía óptica con técnicas de tinción mencionadas por otros autores (Blouin *et al.*, 1993; Kessler *et al.*, 1979; Orozco, 1992; Mazzola y Kuttler, 1980; Munderloh *et al.*, 2004; Waghela *et al.*, 1997) y con identificación genómica por PCR (Munderloh

**et al., 2004**). Después de aplicar las técnicas correspondientes no se encontraron resultados positivos, a lo largo del experimento. No fue posible visualizar *A. marginale* en el citoplasma o núcleo celular; según estudios anteriores, con la tinción de Giemsa es posible diferenciar a esta rickettsia, en las inmediaciones de las membranas nucleares o citoplasmáticas (**Blouin et al., 1993; Munderloh et al., 2004**), en el presente estudio no se observaron las rickettsias en las células nucleadas. Más adelante se inocularon a bovinos susceptibles pero no se obtuvo respuesta de anticuerpos o signos clínicos de la enfermedad.

Ante este panorama poco satisfactorio, se implementó otra metodología donde se co-cultivan dos poblaciones celulares, una célula hospedera típica y otra atípica. El resultado más óptimo fue el obtenido con la metodología de co-cultivo, ya que se logró la perpetuación de la bacteria en los eritrocitos hasta por 151 días, dato mayor a lo reportado en estudios anteriores (**Davis et al., 1978; Kessler y Ristic, 1979; Kessler et al., 1979; Mazzola y Kuttler, 1980; Orozco, 1990; Blouin et al., 1992; Castañeda et al, 2006**). Respecto al trabajo de co-cultivo informado por Waghela (**1997**), en el presente estudio se emplearon diferentes líneas celulares, medios y manejo de los cultivos; se rebasó el número de días en cultivo y uno de los animales experimentales presentó respuesta de inmunoglobulinas IgG totales específicas contra *A. marginale*. Sin embargo, la presencia de la bacteria en las células nucleadas, no fue contundente, sólo se apreciaron inclusiones a la periferia del núcleo celular, situación similar a la comunicada por Blouin y colaboradores (**1993**) quienes utilizaron como soporte células turbinadas y de aorta de bovino, inoculadas con *A. marginale* proveniente de células de glándula salival de garrapata, este material biológico cultivado fue administrado a bovinos susceptibles, sin presentar signos clínicos de anaplasmosis o producción de inmunoglobulinas específicas, como respuesta ante el estímulo de la presencia de un antígeno dado. En este estudio, el hallazgo de las inclusiones se apreció sólo en la estirpe celular de córnea. Sin embargo, estas inclusiones no llegaron a carácter de colonia, formación reportada por Munderloh y colaboradores (**2004**), en su experimento de cultivo con la misma estirpe, probablemente porque en este

estudio el inóculo de *A. marginale* provenía de un cultivo en células de garrapata *I. scapularis*, previamente establecido. En cuanto a la duración en eritrocitos, empleando un modelo de diluciones donde se tomó en cuenta el cambio diario del medio de cultivo y la adición de eritrocitos normales, se determinó que los eritrocitos infectados inoculados originalmente (día cero), al día 13 del cultivo se diluyeron por completo, por lo que en teoría, tomando en cuenta el factor de dilución y el número de diluciones, los Ei apreciados a partir del día 14 no corresponden a los inoculados al día cero del cultivo. Otro aspecto a considerar es que antes de los incrementos en la rickettsemia, con los frotis tomados del fondo de los pozos, se expusieron cuerpos iniciales y durante la curva de disminución estas formas estuvieron ausentes. Las gráficas de la rickettsemia de los ensayos de co-cultivo presentaron ciclos de aumento y descenso, lo que indica que este microorganismo se encontraba viable conservando su capacidad invasiva, independientemente de la cepa o aislado y tipo de línea celular.

Con la metodología diseñada para la detección se pretendió esclarecer el papel de la célula endotelial en el desarrollo de la bacteria, si es que interviene, como se ha planteado por otros autores. En definitiva, la célula endotelial como hospedero de esta rickettsia, interviene favorablemente a ciclo vital de *A. marginale*.

La técnica de IF indirecta aplicada a las células endoteliales co-cultivadas con eritrocitos infectados arrojó resultados insatisfactorios, los anticuerpos monoclonales no reconocieron a estas proteínas de superficie de *A. marginale*, posiblemente porque durante el cultivo hubo cambios de conformación en algunas de las proteínas de superficie que interactuaban con los eritrocitos y las células nucleadas. De hecho se conoce que durante el procedimiento de cultivo *in vitro* se presentan alteraciones en las características infectivas de esta rickettsia (**Blouin et al., 1993**), pues se ha informado que en algunas ocasiones pese a que se logra la demostración de la bacteria en las células hospederas al momento de inocularse en bovinos susceptibles no se presenta la anaplasmosis clínica o respuesta de anticuerpos específicos.

La pérdida de ciertas propiedades puede ser un proceso de adaptación a las

condiciones del cultivo, al no tener un sistema inmunológico que pueda dañarle y además tener acceso *ad libitum* a las células hospederas naturales. Los cambios adaptativos se han explicado, en el caso de microorganismos parásitos intracelulares, como un proceso de evolución reductora (Andersson y Kurland, 1998; Wren, 2000). Quizá por esta razón no existen patrones uniformes ni protocolos estándar para el cultivo de esta rickettsia, comparando con los sistemas de cultivo de otros hemoparásitos (Trager y Jensen, 1976; Vega et al., 1985).

Los primeros estudios de cultivo *in vitro* se realizaron en estirpes celulares nucleadas, por ejemplo, en médula ósea, riñón o nódulos linfáticos, sin resultados satisfactorios. Otra estrategia fue utilizar células de garrapata para buscar la multiplicación de la rickettsia *in vitro*, dicha estrategia es lógica, pues se ha demostrado el desarrollo de *A. marginale* en intestino y glándula salival de garrapatas, por ejemplo, del género *Dermacentor* (Kocan et al., 1981, 1986, 1993; Oberst et al., 1981) e *Ixodes* (Munderloh et al., 1996; Blouin et al., 1998; De la Fuente et al., 2002a).

Los informes exitosos del cultivo *in vitro* de *A. marginale* involucra formas cultivadas obtenidas en células de garrapata, que luego son re-cultivadas en un soporte biológico de células endoteliales; con esta metodología, se mimetiza lo que sucede en la naturaleza, la rickettsia proveniente de un animal infectado, se desarrolla en la garrapata y luego infecta, mediante la alimentación de la garrapata, a otro animal. Queda pendiente encontrar la manera de establecer la vinculación entre los tres tipos de células en los que están, aparentemente, involucradas en el ciclo de infección y transmisión de la rickettsia: el eritrocito, las células de garrapata y las células endoteliales.

## VI.

## CONCLUSIONES

- Con la metodología de co-cultivo fue contundente el hecho de que *A. marginale* se preservó más tiempo en presencia de las células endoteliales, que únicamente con eritrocitos.
- Sin embargo, el cultivo *in vitro* de eritrocitos infectados con *Anaplasma marginale* únicamente con células endoteliales, no proporciona evidencia de la división de esta rickettsia en este hospedero atípico.

VII.



## PERSPECTIVAS

1. El cultivo *in vitro* de *Anaplasma marginale* debe replantearse, empleando condiciones diferentes a las empleadas en este estudio y con inóculos de diversos orígenes.
2. Posiblemente deberá explorarse la posibilidad de iniciar los cultivos a partir de líneas celulares que hayan demostrado ser permisibles para el crecimiento de la rickettsia, como las de origen embrionario de garrapata; y a partir de esas estirpes adaptadas a las condiciones *in vitro*, explorar la posibilidad de crecimiento en otras líneas celulares.

## VIII. LITERATURA CITADA

1. **Aboytes TR, Buening G.** Development of a recombinant *Anaplasma marginale* DNA probe. *Vet Microbiol* 1990; 24: 391-408.
2. **Aboyes TR, Fernández RM, Reza LG, García de la Peña J, Cantó GJA.** Estudio serológico para la detección de anticuerpos contra *Anaplasma marginale* en ganado de Lidia mediante la prueba de fijación de complemento en microplaca. *Téc Pec Méx* 1986; 52: 105-109.
3. **Aboytes TR, Rodríguez SD, Vega MCA.** Molecular epidemiology of bovine anaplasmosis. *Arch Med Res* 1994; 25 (2): 247-252. Citado por **Rodríguez-Vivas RI, Quiñónez-Ávila FJ, Fragoso-Sánchez H.** Enfermedades de importancia económica en producción animal. Mc Graw Hill. México, 2005. 227-247.
4. **Alleman AR, Barbet AF.** Evaluation of *Anaplasma marginale* major surface protein 3 (MSP3) as a diagnostic test antigen. *J Clin Microbiol* 1996; 34(2):270-276.
5. **Alleman AR, Palmer GH, McGuire TC, McElwain TF, Perryman LE, Barbet AF.** *Anaplasma marginale* major surface protein 3 is encoded by a polymorphic, multigene family. *Infect Immun* 1997; 65:156-163.
6. **Alonso M, Arellano SC, Cereser VH.** Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Latin America and the Caribbean. *Rev Scie Tech Off Inter Epiz* 1992; 11: 713-733. Citado por **Rodríguez-Vivas RI, Quiñónez-Ávila FJ, Fragoso-Sánchez H.** Enfermedades de importancia económica en producción animal. Mc Graw Hill. México, 2005. 227-247.
7. **Amerault TE, Mazola V, Roby TO.** Gram-Staining characteristics of *Anaplasma marginale*. *Am J Vet Res* 1973; 34 (4): 552-555.
8. **Amerault TE, Roby TO.** Preparation and characterization of a soluble *Anaplasma marginale* antigen. *Am J Vet Res* 1967; 28 (125): 1067-1073.
9. **Amerault TE, Roby TO.** A rapid agglutination test for bovine anaplasmosis. *JAVMA* 1968; 153: 1828-1834.

10. **Andersson SG, Kurland CG.** Reductive evolution of resident genomes. Trends Microbiol 1998; 6 (7): 263-268.
11. **Barajas RJ, Rodríguez RD.** Seroepidemiología de enfermedades infecciosas en ganado bovino del municipio de Tamiahua, estado de Veracruz, México. Memorias del XX Congreso Nacional de Buiatría; 1996 agosto 14-17; Acapulco (Guerrero) México.
12. **Barbet AF, Blentlinger R, Jooyoung Y, Lundgren AM, Blouin EF, Kocan KM.** Comparasion of surface proteins of *Anaplasma marginale* grown in tick cell culture, tick salivary glands, and cattle. Infect Immun 1999; 67 (1): 102-107.
13. **Barbet AF.** Recent developments in the molecular biology of anaplasmosis. Vet Parasitol 1995; 57: 43-49.
14. **Barigye R, García-Ortíz MA, Rojas-Ramírez EE, Rodríguez-Camarillo SD.** Identificación de antígenos IgG2 específicos en tres cepas mexicanas de *Anaplasma marginale*. Téc Pecu Méx 2004; 42 (1): 219-236.
15. **Bedell DM, Dimopoulos GT.** Biologic properties and characteristics of *Anaplasma marginale* II. The effects of sonic energy on the infectivity of whole blood preparations. Am J Vet Res 1963; 24 (99): 278-282.
16. **Benavides E, Vizcaíno O, Britto CM, Romero A, Rubio A.** Attenuated trivalent vaccine against babesiosis and anaplasmosis in Colombia. Ann N Y Acad Sci 2000; 916: 613- 616.
17. **Blood DC, Radostis DM, Hennderson JA.** Veterinary Medicine, 6<sup>a</sup> ed. Bailliere-Tindal. Gran Betaña. 1983.
18. **Blouin EF, Kocan KM.** Morphology and development of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in cultured *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) cells. J Med Entomol 1998; 35 (5): 788-797.
19. **Blouin EF, Kocan KM, Murphy GL, Ge N.** Persistence of tick-derived *Anaplasma marginale* in cultured bovine turbinata and endothelial cells. Rev Elev Med Vet Pays Trop 1993; 46: 49-56.

20. **Blouin EF, Kocan KM, Ewing SA.** Preliminary attempts to infect bovine erythrocytes *in vitro* with a tick-derived stage of *Anaplasma marginale*. Ann. NY Acad Sci 1992; 653: 72-77.
21. **Brayton KA, Kappmeyer LS, Herndon DR, Dark MJ, Tibbals DL, Palmer GH, McGuire TC, Knowles DP.** Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. PNAS 2005; 102 (3): 844-849.
22. **Brock WE, Kliwer IO, Pearson CC.** A vaccine for anaplasmosis. JAVMA 1964; 147: 948-951.
23. **Cajero-Juárez M, Ávila B, Ochoa A, Garrido-Guerrero E, Varela-Echavarría A, Martínez de la Escalera G, Clapp C.** Immortalization of bovine umbilical vein endothelial cells: a model for the study of vascular endothelium. EJC B 2002; 81: 1-8.
24. **Carelli G, Decaro N, Lorusso A, Elia G, Lorusso E, Mari V, Ceci L, Buonavoglia C.** Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. Vet. Microbiol 2007; 124:107-114.
25. **Carreño AD, Alleman AR, Barbet AF, Palmer GH, Noh SM, Johnson CM.** In vivo Endothelial Cell Infection by *Anaplasma marginale*. Vet Pathol 2007; 44: 116-118.
26. **Carter GR, Cole JR.** Diagnostic Procedures in veterinary bacteriology and mycology. 5° ed. Academic Press USA 1990. 524-525.
27. **Castañeda JM, Mosqueda GJ, Rojas RE, Rodríguez CS, Vega y MC.** Evaluación de la supervivencia de *Anaplasma marginale* en cultivo estacionario microaerófilico. Memorias de XXX Congreso Nacional de Buiatría; 2006 agosto 10-14; Acapulco (Guerrero) México.
28. **Cetrá B.** Babesiosis y anaplasmosis bovina. Algunos conceptos sobre inmunidad. INTA 1999; 330: 1-3.
29. **Chitravel V, Lourdsamy M, Ravindranath TK, Prabhakaran V,**

- Kokilaprabhakaran A.** A report on the incidence of anaplasmosis in Jersey bulls. *Indian Vet J* 1998; 75: 256-257.
30. **Coetzee JF, Apley MD, Kocan KM, Jones DE.** Flow cytometric evaluation of selected antimicrobial efficacy for clearance of *Anaplasma marginale* in short-term erythrocytes cultures. *J Vet Pharmacol Therap* 2006; 29: 173-183.
  31. **Corona B, Rodríguez M, Martínez S.** Anaplasmosis bovina. *REDVET* 2004; VI (4): 1-27.
  32. **Cossio BR, Rodríguez CS, García OM, García TD, Aboytes-Torres R.** Bovine anaplasmosis prevalence in northern Veracruz state, México. *Prev Vet Med* 1997; 32: 164-170.
  33. **Darzynkiewicz Z.** Differential staining of DNA and RNA in intact cells and isolated cell nuclei with acridine orange. *Methods in Cell Biology* 1990; 33: 285-298.
  34. **Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F.** Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 1992; 13 (8): 795-808.
  35. **Davis WC, Talmadge JE, Parish SM, Johnson MI, Vibber SD.** Synthesis of DNA and protein by *Anaplasma marginale* in bovine erythrocytes during short-term culture. *Infect Immun* 1978; 22 (2):597- 602.
  36. **De Jesús R., Moreno N., Martínez JA.** Ensayo de dos métodos de extracción de ADN de ratón para ser usada en el control genético de ratones consanguíneos mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR). *Revista Científica. FCV-LUZ.* 2005; 15(2): 134-140.
  37. **De la Fuente J, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, Kocan KM.** Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen to bovine erythrocytes and tick cells. *Int J Parasitol* 2001a; 31: 145-153.
  38. **De la Fuente J, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, Kocan KM.** Characterization of

the functional domain of major surface protein 1a involved in adhesion of the rickettsia *Anaplasma marginale* to host cells. *Vet Microbiol* 2003; 91: 265-283.

39. **De la Fuente J, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, Rodríguez CS, García OM, Kocan KM.** Evolution and function of tandem repeats in the major surface protein 1a of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Anim Health Res Rev* 2001b; 2 (2): 163-173.
40. **De la Fuente J, Garcia-Garcia JC, Sauer JR, Saliki JT, Kocan KM.** Applications of a cell culture system for studying the interaction of *Anaplasma marginale* with tick cells. *Anim Health Res Rev* 2002a; 3: 57-68.
41. **De la Fuente J, Kocan KM, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, Claypool PI, Saliki JT.** Vaccination of cattle with *Anaplasma marginale* derived from tick cell culture and bovine erythrocytes followed by challenge-exposure with infected ticks. *Vet Microbiol* 2002b; 89: 239-251.
42. **De la Fuente J, Ruybal p, Mtshali MS, Naranjo V, Shuqing L, mangold AJ, Rodríguez SD, Jiménez R, Vicente J, Moretta R, Torina A, Almazán C, Mbatí PM, Torioni de Echaide S, Farber M, Rosario-Cruz R, Gortazar C, Kocan KM.** Analysis of world strains of *Anaplasma marginale* using major surface protein 1a repeat sequences. *Vet Microbiol* 2007; 119: 382-390.
43. **De la Fuente J, Van Den Bussche RA, García-García JC, Rodríguez SD, García MA, Guglielmone AA, Mangold AJ, Friche-Passos LM, Barbosa-Ribero MF, Blouin EF, Kocan KM.** Phylogeography of new world isolates of *Anaplasma marginale* based on major surface protein sequences. *Vet Microbiol* 2002c; 88: 275-285.
44. **Dennis RA, O'Hara PJ, Young MF, Dorris KD.** Neonatal isoerythrolytic anemia and icterus of calves. *JAVMA* 1970; 156: 1861-1869.
45. **Donovan-Myhand J, Hart IT, Liu C, Ohrberg C, Seger C.** A rapid staining procedure for *Anaplasma marginale* in bovine erythrocytes. *Am J Vet Res* 1984; 45: 2143-2144.

46. Dreher UM, Hofmann-Lehmann R, Meli ML, Regula G, Cagienard AY, Stärk KD, Doherr MG, Filli F, Hässig M, Braun U, Kocan KM, Lutz H. Seroprevalence of anaplasmosis among cattle in Switzerland in 1998 and 2003: No evidence of an emerging disease. *Vet Microbiol* 2005; 107 (1-2): 71-79.
47. Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa, Rurangirwa FR. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: Unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia*, and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, description of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51: 2145-2165.
48. Ericks IS, Stiller D, Barbet AF. Polimerase chain reaction detection of low level infection in carriers of *Anaplasma marginale*. In: 71 th Conference of Research Workers in Animal Diseases. Chicago 1990: 6. Citado por Rodríguez-Vivas RI, Quiñónez-Ávila FJ, Fragoso-Sánchez H. Enfermedades de importancia económica en producción animal. Mc Graw Hill. México, 2005. 227-247.
49. Espinosa I, Álvarez E, Amaral C, Alonso M, Lorenzo M. Obtención de un conjugado látex inmunoglobulina para el diagnóstico de *Gardnerella vaginalis*. *Rev Cub Med Trop* 2000; 52 (2): 101-105.
50. Falcón MR, Aranda E, Sánchez QC. Desarrollo de la prueba de tarjeta (PATA) en México para el diagnóstico serológico de anaplasmosis. Reporte Técnico CENAPA, SARH. 1987.
51. Figueroa MJ, Cantó AG, Ramos AJ, Rojas RE, Santiago VC, Granjero CG, García OM, Parrodi F. Evaluación en condiciones de campo de la vacuna de *Anaplasma marginale* denominada Plazvax. *Vet Mex* 1990; 30: 221-225.
52. Fragoso SH, Millán E. Prevalencia de anticuerpos contra *Anaplasma marginale* y *Babesia* spp. en la zona centro del estado de Guerrero. *Tec Pec*

Méx 1984; 47: 133-136.

53. **Fragoso SH.** Diagnóstico y control de parásitos de animales y el hombre. En: Quiroz RH, editor. México DF: FMVZ-UNAM-SUA, 1991: 160-171.
54. **García-Ortíz MA, Aboytes-Torres R, Hernández-Salgado G, Cantó-Alarcón GJ, Rodríguez-Camarillo SD.** *Anaplasma marginale*: diferentes grados de virulencia en dos aislados mexicanos. Vet Méx 2000; 31 (2): 157-160.
55. **García-Tapia D, López-Rojas M, Cossío-Bayúgar R, García-Vázquez Z, García-Ortíz MA, Domínguez-Jalil P, Aboytes-Torres R.** Seroprevalencia de anaplasmosis en explotaciones bovinas de 18 municipios de la zona norte de Veracruz. Tec Pec Méx 1996; 34 (1): 38-45.
56. **Goff WL, Johnson WC, Kuttler KL.** Development of an indirect fluorescent antibody test, using microfluorometry as a diagnostic test for bovine anaplasmosis. Am J Vet Res 1985; 46 (5): 1080-1084.
57. **González AI, Vega y MCA, Rodríguez CSD, Juárez FJ., Fernández RM y López SF:** Experiencias con la prueba de aglutinación en tarjeta para el diagnóstico serológico de Anaplasmosis (PATA). Téc. Pecu. Méx. 1983 (44):35-40.
58. **Gonzalez EF, Long RF, Todorovic RA.** Comparisons of the complement fixation, indirect fluorescent antibody, and card agglutination test for the diagnosis of bovine anaplasmosis. Am J Vet Res 1978; 39: 1538-1541.
59. **Guglielmone AA.** Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. Vet Parasitol 1995; 57: 109-119.
60. **Guglielmone AA, Mangold AJ, Aguirre DH, Gaido AB.** Ecological aspects of four species of ticks found on cattle in Salta, Northwest Argentina. Vet Parasitol 1990; 35: 93-101.
61. **Hansen PJ.** <http://www.animal.ufl.edu/hansen>. 2000.
62. **Hawkins JA, Love JN, Hidalgo RJ.** Mechanical transmission of anaplasmosis by tabanids (Diptera: *Tabanidae*). Am J Vet Res 1982; 43: 732-733.
63. **Henry ET, Normasn BB, Fly DE, Wichmann RW, York SM.** Effects and use of a modified live *Anaplasma marginale* vaccine in beef heifers in California.



- JAVMA 1983; 183: 66-69.
64. **Hidalgo RJ.** Culture of *Anaplasma marginale* in lymph node cells. Proc Ann Meet U S Anim Health Assoc 1974; (78): 77-85.
  65. **Hidalgo RJ.** Propagation of *Anaplasma marginale* in bovine lymph node cell culture. Am J Vet Res 1975; 36 (5): 635-640.
  66. **Hidalgo RJ, Jones EW, Brown JE, Ainsworth AJ.** *Anaplasma marginale* in tick cell culture. Am J Vet Res 1989; 50: 2028-2032.
  67. **Hofmann-LEimann R, Meli ML, Dreher UM, Gońnczi E, Deplazes P, Braun U, Engels M, Schuńpbach J, Jońrger K, Thoma R, Griot C, Stańrk KDC, Willi B, Schmidt J, Kocan KM, Lutz H.** Concurrent infection with vector-borne pathogens associated with fatal hemolytic anemia in a cattle herd in Switzerland. J Clin Microbiol 2004; 42: 3775-3780.
  68. **Hung-Jones ME, Busch D, Raby C, Jones F.** Seroprevalence Survey for Anaplasma Card-test Reactors in Louisiana, USA, Cattle. Prev Vet Med 1988a; 6: 143-153.
  69. **Hung-Jones ME, Scotland K, Appewhaiti LM, Alexander FM.** Seroprevalence of anaplasmosis and babesiosis in livestock on St. Lucía. Trop Anim Health Prod 1988b; 20: 137-139.
  70. **Hurska JC, KrEier OI, Block WE.** Studies in tissue culture of *Anaplasma marginale*. Proc 5° Natl Res Conf on anaplasmosis 1968; 21-24. Citado por: **Orozco VL.** Comportamiento de *Anaplasma marginale* en condiciones de laboratorio. Tesis de Maestría. UNAM, México D.F. 1990.
  71. **Jiménez OR.** Secuenciación de la región variable del gen msp1 $\alpha$  de los aislados MEX-17-017-01(Puente de Ixtla, Morelos), MEX-01-001-01 (Aguascalientes, Aguascalientes) y MEX-07-068-01 (Pichucalco, Chiapas) de *Anaplasma marginale*. Tesis de Licenciatura. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 2006.
  72. **Johnson LAY, Trueman KF, Leatch G, Wilson AJ.** A comparison of direct fluorescent antibody and Giemsa staining for the post-mortem diagnosis o

- anaplasmosis. *Aus Vet J* 1980; 56: 116-118.
73. **Kessler RH, Ristic M.** *In vitro* cultivation of *Anaplasma marginale*: invasion of and development in non infected erythrocytes. *Am J Vet Res* 1979; 40: 1774-1776.
  74. **Kessler RH, Ristic M, Sells DM, Carson CA.** *In vitro* cultivation of *Anaplasma marginale*: growth pattern and morphologic appearance. *Am J Vet Res* 1979; 40: 1767-1773.
  75. **Kieser ST, Eriks IS, Palmer GH.** Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle. *Infect Immun* 1990; 58 (4): 1117-1119.
  76. **Knowles D, Torioni de Echaide S, Palmer GH, McGuire TC, Stiller D, McElwain T.** Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2225-2230.
  77. **Kocan KM, Hair JA, Edwing SA, Stralton LG.** Transmission of *Anaplasma marginale* Theiler by *Dermacentor andersoni* Stiler and *Dermacentor variabilis* (say). *Am J Vet Res* 1981; 42: 15-18.
  78. **Kocan KM, Hoberst RD, Edwing SA.** Demonstration of *Anaplasma marginale* in hemolymph of *Dermacentor andersoni* by animal inoculation and by fluorescent- antibody technique. *Am J Vet Res* 1983; 44: 798-801.
  79. **Kocan KM, Holbert D, Edwards W, Ewing SA, Barron SJ, Hair JA.** Longevity of colonies of *Anaplasma marginale* in midgut epithelial cells of *Dermacentor andersoni*. *Am J Vet Res* 1986; 47: 1657-1661.
  80. **Kocan KM, Goff WL, Stiller D, Claypool PL, Edwards W, Ewing SA, Hair JA, Barron SJ.** Persistence of *Anaplasma marginale* (*Rickettsiales:Anaplasmataceae*) in male *Dermacentor andersoni* (Acari: *Ixodidae*) transferred successively from infected to susceptible cattle. *J Med Entomol* 1992; 29: 657-666.
  81. **Kocan KM, Stiller D, Edwards W.** Development of *Anaplasma marginale* in

- salivary glands of *Dermacentor andersoni* male. Am J Vet Res 1993; 54: 107-112.
82. **Kocan KM.** Targeting ticks for control of selected hemoparasitic diseases of cattle. Vet Parasitol 1995; 57: 121-151.
  83. **Kocan KM, Blouin EF, Palmer GH, Eriks IS, Edwards WL.** Strategies to interrupt the development of *Anaplasma marginale* in its tick vector. The effect of bovine derived antibodies. Ann NY Acad Sci 1996; 791: 157-165.
  84. **Kocan KM, De la Fuente J, Guglielmono AA, Meléndez RD.** Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. Clin Microbiol Rev 2003; 16 (4): 698-712.
  85. **Kocan KM, De la Fuente J, Blouin EF, Garcia-Garcia JC.** *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptation of a tick-borne rickettsia. Parasitology 2004; 129: 285-300.
  86. **Kuttler KL.** Comparative response to remission using attenuated *Anaplasma marginale*, virulent *A. marginale* and *A. centrale* in different age groups. Trop Anim Health Prod 1972; 4: 197-203.
  87. **Kuttler KL.** Pharmacotherapeutics of drugs used in treatment of anaplasmosis and babesiosis. JAVMA 1980; 176 (10): 1103-1108.
  88. **Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. Nature 1970; 227: 680-685.
  89. **Lane D.** Antibodies. A laboratory manual. Ed. Harlow. 1988.
  90. **López S, Fajardo J, Cantó A.** Prevalencia de anticuerpos contra anaplasmosis y babesiosis e incidencia de infección diaria de babesiosis del municipio de Playa Vicente, Veracruz. Tec Pec Méx 1983; 44: 82-85.
  91. **Luna CGS, Orozco VLE, Vega y MCA, Rodríguez CSD, Ramírez NP.** "El cultivo *in vitro* de *Anaplasma marginale*: ¿evolución ó involución?". En: **Moreno CR** (Ed). Ciencia Veterinaria, UNAM, México DF. Vol. 10 pp. 173-208, 2007.

92. **Marble DW, Hanks MA.** *Anaplasma marginale* grown in stable rabbit bone marrow cells. Proc 6° Natl Res Conf on anaplasmosis. 53-54. 1972. Citado por: **Orozco VL.** Comportamiento de *Anaplasma marginale* en condiciones de laboratorio. Tesis de Maestría. UNAM, México D.F. 1990.
93. **Marchisio PC, Trusolino L.** Immunofluorescence in cell culture. In: Methods in Molecular Biology vol. 96 Adhesion Protein Protocols. Ed: Dejana E, Corada M. Human Press USA. 1999: 85-92.
94. **Masika PJ, Sonandi A, Van-Averbeke W.** Perceived causes, diagnosis and treatment of babesiosis and anaplasmosis in cattle by livestock farmers in communal areas of the Central Eastern Cape Providence, South Africa. J S Afr Vet Assoc 1997; 68: 40-44.
95. **Mazzola V, Amerault TE, Roby T.** Survival of *Anaplasma marginale* in *Aedes albopictus* cells. Am J Vet Res 1976; 37: 987-989.
96. **Mazzola V, Amerault TE, Roby T.** Electron microscope studies of *Anaplasma marginale* in *Aedes albopictus* culture system. Am J Vet Res 1979; 40 (12): 1812-1815.
97. **Mazzola V, Kuttler KL.** *Anaplasma marginale* in bovine erythrocyte cultures. Am J Vet Res 1980; 41 (12): 2087-2088.
98. **McGarey DJ, Barbet AF, Palmer GH, McGuire TC, Allred DR.** Putative adhesins of *Anaplasma marginale*: major surface polypeptides 1a and 1b. Infect Immun 1994; 62: 4594-4601.
99. **McGuire TC, Davis WC, Brassfield AL.** Identification of *Anaplasma marginale* long-term carrier cattle by detection of serum antibody to isolated MSP-3. J Clin Microbiol 1991; 29: 788-793.
100. **McHurdy N, Simpson RM.** Attempts at immunizing cattle against anaplasmosis using a killed vaccine. Trop Anim Health Prod 1973; 5: 166-173.
101. **Medellín LJ.** Anaplasmosis y Babesiosis en Tamaulipas. México, Tamaulipas: FMVZ- UAT, 1998.

102. **Montenegro-James S, Toro-Benítez M, León-Arenas E, Baek BK, Guillén AT, López BA.** Inducción de inmunidad protectora contra la anaplasmosis bovina usando un inmunógeno corpuscular purificado de *Anaplasma marginale*. *Vet Trop* 1990; 15: 57-76.
103. **Morilla AG, Bautista CG.** Manual de Inmunología. México DF: Diana, 1986: 111-114.
104. **Munderloh UG, Blouin EF, Kocan KM, Ge NL, Edwards W, Kurtii TJ.** Establishment of the tick (*Acari:Ixodidae*)-borne cattle pathogen *Anaplasma marginale* (*Rickettsiales: Anaplasmataceae*) in tick cell culture. *J Med Entomol* 1996; 33: 656-664.
105. **Munderloh UG, Liu Y, Wang M, Chen C, Kurtii TJ.** Establishment, maintenance and description of cell lines from the tick *Ixodes scapularis*. *J Parasitol* 1994; 80: 533-543.
106. **Munderloh UG, Lynch MJ, Herron MJ, Palmer AT, Kurtii TJ, Nelson RD, Goodman JL.** Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum*. *Vet Microbiol* 2004; 101: 53-64.
107. **Nielsen K, Smith P, Gall D, de Eshaide ST, Wagner G, Dajer A.** Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of antibody to *Anaplasma marginale* in bovine sera. *Vet Parasitol* 1996; 67: 133-142.
108. **Oberle SM, Palmer GH, Barbet AF.** Expression and immune recognition of the conserved MSP-4 outer membrane protein of *Anaplasma marginale*. *Infect Immun* 1993; 61: 5245-5251.
109. **Oberst RD, Kocan KM, Hair JA, Ewing SA.** Staining characteristics of colonies of *Anaplasma marginale* Theiler in *Dermacentor andersoni* Stiles. *Am J Vet Res* 1981; 42 (11): 2006-2009.
110. **Orozco VL.** Comportamiento de *Anaplasma marginale* en condiciones de laboratorio. Tesis de Maestría. UNAM, México D.F. 1990.
111. **Osorno BM, Ristic M.** Anaplasmosis bovina con énfasis en control, diagnóstico, distribución de la enfermedad en México y uso de una vacuna

atenuada de *Anaplasma marginale*. Vet Méx 1977; 8: 85-98.

112. **Otim C, Wilson AJ, Campbell RS.** A comparative study of experimental anaplasmosis in *Bos indicus* and *Bos Taurus* cattle. Austr Vet J 1980; 56: 262-566.
113. **Palmer GH, Kocan KM, Barrón SJ, Hair JA, Barbet AF, Davis WC, McGuire TC.** Presence of common antigens, including major surface protein epitopes, between the cattle (intraerythrocytic) and tick stages of *Anaplasma marginale*. Infect Immun 1985; 50 (3): 881-886.
114. **Palmer GH, Barbet AF, Davis WC, McGuire TC.** Immunization with an isolate-common surface protein protects cattle against anaplasmosis. Science 1986; 231: 1299-1302.
115. **Palmer GH, Barbet AF, Musoke AJ, Katende, Rurangirwa FR, Shkap V, Pipano E, Davis WC, McGuire TC.** Recognition of conserved surface protein epitopes on *Anaplasma marginale* isolates from Israel, Kenya and the United States. Int J Parasitol 1998; 18: 33-38.
116. **Palmer GH, McElwain TF.** Molecular basis for vaccine development against anaplasmosis and babesiosis. Vet Parasitol 1995; 57: 233-253.
117. **Palmer GH, Brown WC, Rurangirwa FR.** Antigenic variation in the persistence and transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. Microb and Infec 2000; 2: 167.
118. **Parker RJ, Shepherd RK, Trueman KF.** Susceptibility of *Bos indicus* and *Bos Taurus* to *Anaplasma marginale* and *Babesia bigemina* infections. Vet Parasitol 1984; 17: 205-213.
119. **Payne RC, Scott JM.** Anaplasmosis y babesiosis in El Salvador. Trop Anim Health Prod 1982; 14: 75-80.
120. **Payne RC, Osorno O.** Tick-borne diseases of cattle in Paraguay. Trop Anim Health Prod 1990; 22: 53-60.
121. **Pérez MR.** Evaluación de la adquisición de *Anaplasma marginale* en la garrapata *Boophilus microplus*, mediante dos cepas mexicanas de distinta

virulencia. Tesis de Licenciatura. BUAP. Tecamachalco, Puebla. 2007.

122. **Pérez VF, Vega PCA.** Prevalencia de anticuerpos contra *Anaplasma marginale* en bovinos sacrificados en rastro, mediante la prueba de aglutinación en tarjeta. En: Memorias de la VIII Reunión Anual de Parasitología Veterinaria, AC. Morelos, México. 1987: 10.
123. **Potgieter FT, Kocan KM, McNew RW, Ewing SA.** Demonstration of colonies of *Anaplasma marginale* in the midgut of *Rhipicephalus simus*. Am J Vet Res 1993; 44: 2256-2261.
124. **Preciado TF.** Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, módulo Anaplasma. Instituto Nacional de Investigación Forestal, Agrícola y Pecuaria. Jiutepec, Morelos, México. Citado por: **Luna CGS, Orozco VLE, Vega y MCA, Rodríguez CSD, Ramírez NP.** "El cultivo *in vitro* de *Anaplasma marginale*: ¿evolución ó involución?". En: **Moreno CR** (Ed). Ciencia Veterinaria, UNAM, México DF. Vol. 10 pp. 173-208, 2007.
125. **Ramírez P, Eastmond DA, Laclette JP, Ostrosky-Wegman P.** Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. Mut Res 1997; 386: 291-298.
126. **Ramos AJA, Álvarez MJA, Cantó AGJ.** Detección de anticuerpos en contra de *Anaplasma marginale* mediante el uso de dos técnicas serológicas. En: Memorias de la VIII Reunión Anual de Parasitología Veterinaria, AC. Morelos, México. 1987: 9.
127. **Reyna-Bello A, Cloeckert A, Vizcaíno N, Gonzatti MI, Aso PM, Dubray G, Zygmunt MS.** Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5 for serological diagnosis of bovine anaplasmosis in Venezuela. Clin Diagn Lab Immun 1998; 5 (2): 259-262.
128. **Rey-Valeirón C, María Aso P, Coronado A.** Prevalencia de *Anaplasma marginale* y anticuerpos específicos en becerros neonatos. Acta Científica Venezolana 2003; 54 (2): 121-126.

129. **Ristic M.** Anaplasmosis in diseases of cattle in the tropics. Ristic M, McIntyre I (ed). London. Martinus Nijhoff Publishers 1981. 327-345.
130. **Ristic M, Kreier JP.** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Krieg NR, Holt JG (ed). Baltimore. Williams & Wilkins 1984. 719-729.
131. **Ristic M, Watrach AM.** Anaplasmosis VI. Studies and hypothesis concerning the cycle of development of the causative agent. Am J Vet Res 1963; 24: 267-277.
132. **Roby TO, Gates DW, Mott LO.** The comparative susceptibility of calves and adult cattle to bovine anaplasmosis. Am J Vet Res 1961; 22: 982-985.
133. **Rodríguez CS, García OM, Cantó AG, Hernández SG, Santos N, Abortes TR.** Ensayo de un inmunógeno experimental inactivado contra *Anaplasma marginale*. Téc Pecu Méx 1999; 37 (1): 1-12.
134. **Rodríguez CS, García OM, Abortes TR, Cantó AG, Barigye R.** Inmunología e inmunoprofilaxis de la anaplasmosis bovina. En: **Moreno CR** (Ed). Ciencia Veterinaria, UNAM, México DF. Vol. 9 pp. 123-164, 2004.
135. **Rodríguez – Vivas RI, Quiñónez-Ávila FJ, Fragoso-Sánchez H.** Enfermedades de importancia económica en producción animal. Mc Graw Hill. México, 2005. 227-247.
136. **Rojas E, Valverde M, Vega L, Salvador A, Ramírez P, Herrera LA, Watters D, Lavin MF, Ostrosky-Wegman P.** Genotoxic effects of bistratene A on human lymphocytes. Mut Res 1996; 367: 169-175.
137. **Rosales BNA, Luna CGS, Rodríguez CSD, Vega y MCA.** Adaptación *in vitro* de una línea celular endotelial de origen bovino, a diferentes medios de cultivo. Memorias de XXX Congreso Nacional de Buiatría; 2006 agosto 10-14; Acapulco (Guerrero) México.
138. **SAGARPA** <http://www.sagarpa.gob.mx/dlg/guerrero/ganaderia> 2007.
139. **Simpson CF, Kling JM, Love JN.** Morphologic and histochemical nature of *Anaplasma marginale*. Am J Vet Res 1967; 28 (125): 1055-1065.
140. **Samish M, Pipano E, Hana B.** Cultivation of *Anaplasma marginale* from



- cattle in a *Dermacentor* cell line. Am J Vet Res 1988; 49 (2): 254-256.
141. **Serwer P.** Agarose gels: Properties and use for electrophoresis. Electrophoresis 1983; 4: 375-382
  142. **Smith RD, Levy MG, Kuhleschmitdt MS, Adams JH, Rzechula DG, Hardt TA, Kocan KM.** Isolate of *Anaplasma marginale* not transmitted by ticks. Am J Vet Res 1986; 47: 127-129.
  143. **Smith T, Kilborne FL.** Investigations into the nature, causation and prevention of Texas or Southern Cattle fever. USDA Bureau of Anim Bull 1893; I: 1-301.
  144. **Solís CJ, Rodríguez VR.** Presencia de anticuerpos contra *Anaplasma marginale* en becerros de tres ranchos del oriente de Yucatán, México. En: Memorias de la Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Vet Méx 1995; 26: 24.
  145. **Stokka GL, Falkner R, Van-Boening J.** Anaplasmosis. Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service 2000; 1-3.
  146. **Sultan KR, Haagsman HP.** Species-specific primary cell cultures: a research tool in veterinary science. Vet Sci Tomorrow 2001; 1: 1-7.
  147. **Summers WA.** Personal communications. Dept. Microbiol. School of Medicine, Indiana University, Indianapolis, IN. EU. Citado por: **Orozco VL.** Comportamiento de *Anaplasma marginale* en condiciones de laboratorio. Tesis de Maestría. UNAM, México D.F. 1990.
  148. **Tebele N, McGuire TC, Palmer GH.** Induction of protective immunity using *Anaplasma marginale* initial bodies membranes. Infect Immun 1991; 59: 3199-3204.
  149. **Tello RM, Álvarez MJA, Ramos AJA, Aboytes TR, Cantó AGJ.** La prueba de ELISA en el diagnóstico de la anaplasmosis. Téc Pec Méx 1986; 52: 45-50.
  150. **Theiler A.** Gall sickness of South Africa (Anaplasmosis in cattle). J Comp Pathol Therap 1910a; 23: 98-115.

151. **Theiler A.** *Anaplasma marginale*. The marginal points in the blood of cattle suffering from a specific disease. Rept. Govt. Bacteriol. Transvaal So. Africa 1910b; 7: 1908-1909. Citado por: **Orozco VL.** Comportamiento de *Anaplasma marginale* en condiciones de laboratorio. Tesis de Maestría. UNAM, México DF. 1990.
152. **Thoen C, Blackburn B, Mills K, Lomme J, Hopkins MP.** Enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies in cattle in a herd in which anaplasmosis was diagnosed. J Clin Microbiol 1980; 11 (5): 499-502.
153. **Torioni de Echaide S, Knowles DP, McGuire TC, Palmer GH, Suárez CE, McElwain TF.** Detection of Cattle Naturally Infected with *Anaplasma marginale* in a Region of Endemicity by Nested PCR and a Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Recombinant Major Surface Protein 5. J Clin Microbiol 1998; 36 (3): 777-782.
154. **Trager W, Jensen J.** Human malaria parasites in continuous culture. Science 1976; 193: 673-675.
155. **Trueblood MA.** Cultivations of *Anaplasma marginale*. Proc. 6<sup>th</sup>. Natl. Anaplasmosis Conf. Las Vegas, Nevada. Pp. 54-58. 1973. Citado por: **Orozco VL.** Comportamiento de *Anaplasma marginale* en condiciones de laboratorio. Tesis de Maestría. UNAM, México DF. 1990.
156. **Truett GE., Heeger P., Mynatt RL., Truett AA., Walker ZA., Warman ML.** Preparation of PCR Quality mouse genomic DNA with Hot Sodium Hydroxide and Tris (Hot Shot). Biotech. 2000; 29: 52-54. Citado por: **De Jesús R., Moreno N., Martínez JA.** Ensayo de dos métodos de extracción de ADN de ratón para ser usada en el control genético de ratones consanguíneos mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR). Revista Científica. FCV-LUZ. 2005; 15(2): 134-140.
157. **Vega y M CA.** Actualidad e importancia de las enfermedades de ganado causadas por hemoparásitos. En: Memorias del II Seminario Internacional de Parasitología Animal. Garrapatas y enfermedades que transmiten.

- Morelos, México. 1991: 144-150. Citado por **Rodríguez-Vivas RI, Quiñónez-Ávila FJ, Fragoso-Sánchez H.** Enfermedades de importancia económica en producción animal. Mc Graw Hill. México, 2005. 227-247.
158. **Vega CA, Buening GM, Green TJ, Carson CA.** *In vitro* cultivation of *Babesia bigemina*. Am J Vet Res 1985; 46: 416-420.
159. **Vidotto MC, Andrade GM, Palmer GH, McElwain TF, Knowles DP.** Seroprevalence of *Anaplasma marginale* on cattle in Parana state, Brazil, by major surface protein 5 competitive enzyme linked immunosorbent assay. Ann NY Acad Sci 1998; 849: 424-426.
160. **Viseshakul N, Kamper S, Bowie MV, Barbet AF.** Sequence and expression analysis of a surface antigen gene family of the rickettsia *Anaplasma marginale*. Gene 2000; 253 (1): 45-53.
161. **Waghela SD, Cruz D, Droleskey RE, DeLoach JR, Wagner GG.** *In vitro* cultivation of *Anaplasma marginale* in bovine erythrocytes co-cultured with endothelial cells. Vet Parasitol 1997; 73: 43-52.
162. **Wagner G, Cruz D, Holman J.** Epidemiology, diagnosis and control alternatives for anaplasmosis. En: Memorias del II Seminario Internacional de Parasitología Animal, Garrapatas y enfermedades que transmiten. Morelos, México 1991: 161-171. Citado por **Rodríguez - Vivas RI, Quiñónez-Ávila FJ, Fragoso-Sánchez H.** Enfermedades de importancia económica en producción animal. Mc Graw Hill. México, 2005. 227-247.
163. **Walade SM, Young AS, Morzaria SP.** Artificial feeding of Ixodid ticks. Parasitol Today 1996; 12: 272-278.
164. **Wallace WR, Dimopoulos GT.** Catalase activity in *Anaplasma marginale*. J Bacteriol 1965; 90 (2): 309-311.
165. **Wren BW.** Microbial genome analysis: insights into virulence, host adaptation and evolution. Nat Rev Gen 2000; 1: 30-39.
166. **Wickwire KB, Kocan KM, Barron SJ.** Infectivity of three *Anaplasma marginale* isolates for *Dermacentor andersoni*. Am J Vet Res 1987; 48:

96-99.

167. **Wilson BH, Meyer RB.** Transmission studies of bovine anaplasmosis with the horseflies, *Tabanus fuscicostatus* and *Tabanus nigrovittatus*. J Vet Res 1966; 27: 116.
168. **Yeruham J, Braverman Y.** The transmission of *Anaplasma marginale* to cattle by blood-sucking arthropods. Refuah Vet 1981; 38: 37-44.
169. **Zaugg JL, Kuttler KL.** Bovine anaplasmosis: *in utero* transmission and immunologic significance of ingested colostral antibodies. JAVMA 1984; 45: 440-443.
170. **Zaugg JL, Goff WL, Foreyt W, Hunter DL.** Susceptibility of elk (*Cervus elaphus*) to experimental infection with *Anaplasma marginale* and *Anaplasma ovis*. J Wildl Dis 1996; 32: 62-66.
171. **Zaugg JL, Stiller D, Coan ME, Lincoln SD.** Transmission of *Anaplasma marginale* (Theiler) by males of *Dermacentor andersoni* (Stiles) fed on an Idaho field infected chronic carrier cow. Am J Vet Res 1986; 47: 2269-2271.

## IX. APÉNDICES

### 1. Composición de los medios de cultivo

Ingrediente*\ Medio	DEM	F-12	M-199	MEM	RPMI-16 40
<b>Aminoácidos</b>					
Ácido L- glutámico	-	0,02942	0,1336	0,0147	0,02
Ácido L- aspártico	-	0,02662	0,06	0,0133	0,02
L-Alanina	-	0,01782	0,5	0,0089	
L-Arginina HCl	0,084	0,42140	0,07	0,1264	0,20000
L-Asparginina HCl	-	0,03020	-	0,015	0,05682
L-Cisteina HCl	-	-	0,00011	-	-
L-Cistina HCl	0,0626	0,07024	0,026	0,0312	0,06520
L-Glutamina	0,584	0,29220	0,1	0,292	0,30000
Glicina	0,03	0,01501	0,05	0,0075	0,01000
L-Hidroxi-prolina	-	-	0,01	-	0,02000
L-Histidina HCl	0,042	0,04192	0,02188	0,0419	0,01500
L-Isoleucina	0,105	0,00782	0,04	0,0525	0,05000
L-Leucina	0,105	0,02624	0,12	0,0525	0,05000
L-Lisina HCl	0,146	0,07304	0,07	0,0725	0,04000
L-Metionina	0,03	0,00895	0,03	0,015	0,01500
L-Fenilalanina	0,066	0,00991	0,05	0,0325	0,01500
L-Prolina	-	0,06906	0,04	0,0115	0,02000
L-Serina	0,042	0,02102	0,05	0,0105	0,03000
L-Tirosina	0,10379	0,01087	0,05766	0,0519	0,02883
L-Treonina	0,095	0,02382	0,06	0,0476	0,02000
L-Triptófano	0,016	0,00408	0,02	0,01	0,00500
L-Valina	0,094	0,02342	0,05	0,0468	0,02000
<b>Vitaminas</b>					
Acetato de retinol	-	-	0,00014	-	-
Ácido ascórbico	-	-	0,000056	-	-
			6		
Ácido fólico	0,004	0,00132	0,00001	0,00100	0,00100
Ácido D-Pantoténico	0,004	0,000477	0,00001	0,00100	0,00025
Ácido nicotínico	-	-	0,000025	-	-
Ácido p-amino benzoico	-	-	0,00005	-	0,00100
Bisulfito de sodio menadiona	-	-	0,000016	-	-
Calciferol	-	-	0,00001	-	-
Cloruro de colina	0,004	0,01396	0,0005	0,00100	0,00300
D-Biotina	-	0,000073	0,00001	-	0,00020
		3			
Fosfato de tocoferol	-	-	0,00001	-	-
Hipoxantina	-	0,00408	0,0003	-	-
Mio-inositol	0,0072	0,01802	0,00005	0,00200	0,03500
Niacinamida	0,004	-	0,000025	-	-
Nicotinamida	-	0,000036	-	0,00100	0,00100
		6			
Piridoxal HCl	0,004	-	0,000025	-	-
Piridoxina HCl	-	0,000061	0,000025	0,00100	0,00100
		7			
Putresina	-	0,000322	-	-	-

Riboflavina	0,0004	0,000037 6	0,00001	0,00100	0,00020
Tiamina HCl	0,004	0,000337	0,00001	0,00100	0,00100
Timidina	-	0,000727	-	-	-
Vitamina B-12	-	0,001355	-	-	0,000005

### Sales

Bicarbonato de sodio	-	1,50000	2,2	1,50000	1,50000
Cloruro de calcio	0,2	0,13524	0,265	0,20000	-
Cloruro de potasio	0,4	0,28329	0,4	0,40000	0,40000
Cloruro de sodio	6,4	7,59720	6,8	6,80000	6,00000
Cloruro de magnesio	-	0,10572	-	-	-
Fosfato de sodio	0,109	0,11502	0,122	0,14000	0,80000
Fosfato de potasio	-	0,05852	-	-	-
Nitrato férrico	0,0001	-	0,00072	-	-
Nitrato de calcio	-	-	-	-	0,10000
Sulfato de cobre	-	0,000002 5	-	-	-
Sulfato de hierro	-	0,000834	-	-	-
Sulfato de magnesio	0,09767	0,19264	0,09767	0,09767	0,04884
Sulfato de zinc	-	0,000144	-	-	-

### Otros

Acetato de sodio	-	-	0,05	-	-
Ácido lipóico	-	0,00021	-	-	-
AMP	-	-	0,000238 5	-	-
ATP	-	-	0,001	-	-
Colesterol	-	-	0,0002	-	-
Desoxirribosa	-	-	0,0005	-	-
Glucosa	4,5	1,26000	1,00	1,00000	4,50000
Glutación	-	-	0,00005	-	0,00100
Guanina	-	-	0,0003	-	-
HEPES	-	-	-	-	2,38300
Piruvato de sódio	-	0,22000	-	0,11000	0,11000
Ribosa	-	-	0,0005	-	-
Rojo fenol	0,0159	0,00332	0,0213	0,01000	0,00500
Sulfato de adenina	-	-	0,01	-	-
Timina	-	-	0,0003	-	-
Tween 80	-	-	0,02	-	-
Uracilo	-	-	0,0003	-	-
Xantina	-	-	0,000344	-	-

\*= Gramos/litro de medio preparado

**2.**

## Composición de Reactivos:

### a. Solución TAE al 0.5x pH 8.0

Tris	40.0 mM,
Ácido acético	20.0 mM
EDTA	1.0 mM

### b. Solución Amortiguadora "A" pH 6.8

Tris-HCl	62.5 mM en H <sub>2</sub> O
mercaptoetanol $f$	10% (v/v)
azul de Bromofenol $\rho$ $\rho$	0.25% (p/v)
glicerol	5% (v/v)
SDS	2% (p/v)

### c. Solución Amortiguadora pH 8.8

Tris	302.0 g
glicina $\blacklozenge$ $\blacklozenge$	144.1 g
SDS	10.0 g
H <sub>2</sub> O	1,000.0 ml (ajustar pH a 8.8)

### d. Solución Amortiguadora pH 6.8

Tris	302.0 g
glicina $\blacklozenge$ $\blacklozenge$	144.1 g
SDS	10.0 g
H <sub>2</sub> O	1,000.0 ml (ajustar pH a 6.8)

### e. Solución Amortiguadora de Carbonatos pH 9.5

NaHCO <sub>3</sub>	2.10 g
Na <sub>2</sub> HCO <sub>3</sub>	2.65 g
H <sub>2</sub> O	100.00 ml (ajustar pH a 9.5)

### f. Solución Amortiguadora de Carbonatos pH 9.6

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> $f$	3.18 g
NaHCO <sub>3</sub>	5.88 g
H <sub>2</sub> O	100.00 ml (ajustar pH a 9.6)

### g.

**Solución de Tween 20 al 0.5% (v/v)**

NaCl	8.75 g
Tween 20 ♦ (Polioxietileno-sorbitan-monolaurato)	500.0 µl
H <sub>2</sub> O	1,000.00 ml
+ 100.0 ml de la siguiente solución 10x:	
NaHPO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	2.62 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ♣	11.5 g
H <sub>2</sub> O	1,000.00 ml

**h. Solución TRIS 100mM pH 9.5**

Trizma base (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	12.100 g
MgCl <sub>2</sub> ♠	10.165 g
NaC	2.920 g
H <sub>2</sub> O	1,000.00 ml

**i. Glicerina fosfatada**

Glicerina	9.0 ml
SSAF pH 7.2	1.0 ml

**3.**



## **Monitoreo de los animales experimentales**

Donación de suero hiperinmune					
Número identificación: 135				Edad: Mayor de 24 meses	
Raza: Criollo				Sexo: Hembra	
Fecha	Día post-inoculación	Temperatura °C	PCV %	Frotis	Suero*
23/11/2006	0	38.6	37.2	0	0.09
27/11/2006	4	38.0	39.8	0	0.26
30/11/2006	7	39.0	31.2	0	0.69
06/12/2006	13	38.7	35.0	0	0.75
07/12/2006	14	38.4	34.9	0	0.87
11/12/2006	18	38.9	36.7	0	0.98
18/12/2006	25	37.9	36.6	0	1.024
21/12/2006	28	38.0	35.8	0	1.426
25/12/2006	32	38.6	33.0	0	1.32
28/12/2006	35	38.0	32.0	0	1.209
01/01/2007	39	38.8	35.0	0	1.391
04/01/2007	42	38.9	36.6	0	1.34
08/01/2007	46	38.3	38.0	0	0.612
11/01/2007	49	39.0	40.0	0	1.409
15/01/2007	53	38.7	39.0	0	0.559
18/01/2007	56	39.0	39.3	0	0.632
22/01/2007	60	38.6	38.0	0	1.02
25/01/2007	63	38.0	38.5	0	1.506
29/01/2007	67	38.2	39.0	0	1.38
01/02/2007	70	38.4	37.4	0	1.45
05/02/2007	74	38.1	33.3	0	1.2
08/02/2007	77	38.5	31.3	0	0.927
12/02/2007	81	38.7	32.6	0	0.99
15/02/2007	84	38.3	35.6	0	0.769
20/02/2007	89	38.5	39.5	0	0.89
22/02/2007	91	38.1	33.4	0	1.082
16/03/2007	113	38.5	31.4	0	1.00
19/03/2007	116	39.0	32.3	0	1.36
23/03/2007	120	38.5	31.0	0	2.52
26/03/2007	123	39.0	33.2	0	2.56
30/03/2007	127	39.3	36.8	0	2.4
02/04/2007	130	38.7	36.4	0	2.31
12/04/2007	140	37.5	37.5	0	1.04
26/04/2007	154	38.0	31.6	0	0.79
03/05/2007	161	38.6	31.6	0	0.89
10/05/2007	168	38.0	31.5	0	0.78

### Validación de la infección de células BUVEC expuestas a *A. marginale*

Número identificación: 27

Edad: 12 meses

Raza: Criollo

Sexo:

Macho					
Fecha	Día post-inoculación	Temperatur		Frotis	Suero *
		a °C	PCV %		
08/12/2006	0	38.1	30.9	0	0.09
11/12/2006	3	38.9	31.6	0	0.12
15/12/2006	7	38.3	33.3	0	0.08

Validación de la infección de células BUVEC expuestas a <i>A. marginale</i>					
Número identificación: 31			Edad: 12 meses		
Raza: Criollo			Sexo: Macho		
Fecha	Día post-inoculación	Temperatur		Frotis	Suer o
		a °C	PCV %		
08/12/2006	0	38.5	32.8	0	0.12
11/12/2006	3	39	34.5	0	0.16
15/12/2006	7	38.6	36.9	0	0.11
18/12/2006	10	39	33.3	0	0.28
22/12/2006	14	38.8	34.9	0	0.30
25/12/2006	17	39.1	37.4	0	0.19
29/12/2006	21	38.7	31.5	0	0.13
01/01/2007	24	38.5	32.2	0	0.18
04/01/2007	27	38.6	37.7 3	0	0.20
08/01/2007	31	39.3	36	0	0.24
11/01/2007	34	39	35.5	0	0.26
15/01/2007	38	39.2	35.1	0	0.17
18/01/2007	41	38.2	34.3	0	0.20
22/01/2007	45	39	35.6	0	0.08
25/01/2007	48	39.1	33.6	0	0.03
29/01/2007	52	39.5	35	0	0.02
01/02/2007	55	39.4	34.2	0	0.19
05/02/2007	59	39.1	40	0	0.08
08/02/2007	62	39.1	34.2	0	0.03

Validación de la infección de células BCE expuestas a <i>A. marginale</i>	
Número identificación: 001	Edad: mayor de 12

meses					
Raza: Criollo			Sexo: Macho		
Fecha	Día post-inoculación	Temperatura °C	PCV %	Frotis	Suero *
03/07/2007	0	37.7	33.33	0	0.37
06/07/2007	3	38.3	36.9	0	0.45
10/07/2007	7	38.6	13.79	0	0.84
13/07/2007	10	38.8	29.4	0	0.92
17/07/2007	14	38.6	29.4	0	0.76
20/07/2007	17	38.4	28.1	0	0.38
24/07/2007	21	38.4	35.98	0	0.54
27/07/2007	24	37.9	27.5	0	0.63
31/07/2007	27	38.1	30.76	0	0.45
03/08/2007	31	38	28	0	0.24
07/08/2007	34	38.5	32.5	0	0.30
10/08/2007	38	38.1	28.5	0	0.55
14/08/2007	41	38.2	29.5	0	0.08
17/08/2007	45	38.1	30	0	0.19
21/08/2007	48	38.5	31.4	0	0.52
24/08/2007	52	38.7	30	0	0.25
28/08/2007	55	38.5	31.4	0	0.22
31/08/2007	59	38.2	30.3	0	0.40
04/09/2007	62	38.8	30.6	0	0.48

Validación de la infección de células BCE expuestas a *A. marginale*

Número identificación: 007

Edad: mayor de 12 meses

Raza: Criollo

Sexo: Macho

Fecha	Día post-inoculación	Temperatura °C	PCV %	Frotis	Suero *
03/07/2007	0	38.7	29.4	0	0.27
06/07/2007	3	38.5	39	0	0.25
10/07/2007	7	38.5	33.33	0	0.33
13/07/2007	10	39.2	33.33	0	0.47
17/07/2007	14	38.4	33.3	0	0.28
20/07/2007	17	37	32.07	0	0.46
24/07/2007	21	38.4	28.57	0	0.71
27/07/2007	24	37.2	27.27	0	0.80
31/07/2007	27	38.3	29.41	0	0.83
03/08/2007	31	37.8	32.7	0	<b>2.54</b>
07/08/2007	34	38.6	35.1	0	<b>1.38</b>
10/08/2007	38	38.1	26.1	0	0.38
14/08/2007	41	38.2	28.5	0	0.49
17/08/2007	45	38.3	30.2	0	0.02
21/08/2007	48	38.3	29.4	0	0.06
24/08/2007	52	37.8	28.8	0	0.12
28/08/2007	55	38.3	30.5	0	0.10
31/08/2007	59	38.6	31	0	0.18
04/09/2007	62	38.4	31.3	0	0.22