

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

## *In vitro* culture of *Anaplasma marginale* in endothelial cell lines

G. Sarahí Luna-Castro<sup>a</sup>, Sergio D. Rodríguez-Camarillo<sup>a</sup>, Patricia Ramírez-Noguera<sup>b</sup>, J. Francisco Preciado de la Torre<sup>a</sup>, Edmundo E. Rojas-Ramírez<sup>a</sup>, Juan J. Mosqueda-Gualitoc, Miguel A. García-Ortiz<sup>a</sup>, Carlos A. Vega y Murguía<sup>a</sup>

### RESUMEN

*Anaplasma marginale*, bacteria intracelular obligada, es el agente causal de la anaplasmosis bovina, caracterizada por anemia progresiva, fiebre, pérdida de peso y ocasionalmente, la muerte. Como alternativa para el desarrollo de nuevas estrategias de prevención se plantea el uso de cultivos celulares para la obtención *in vitro* de *A. marginale*. El propósito de este estudio fue ensayar su cultivo *in vitro* en células nucleadas empleando estirpes de células endoteliales de bovino y de mono, mismas que fueron expuestas a eritrocitos infectados con *A. marginale*. Para demostrar la invasión de las células endoteliales se emplearon diferentes opciones: tinciones, detección genómica o inmunofluorescencia, con resultados negativos; adicionalmente, tampoco se apreciaron efectos citopatológicos. Sin embargo, cuando se aplicó la metodología de co-cultivo en presencia de las células endoteliales, *A. marginale* se detectó durante más tiempo que en cultivos con eritrocitos únicamente. Con el supuesto de evidenciar la presencia de la infección, mediante la valoración de las constantes fisiológicas y anticuerpos específicos contra la bacteria, se inocularon bovinos susceptibles con el material biológico de los cultivos. Aún cuando no hubieron signos clínicos de anaplasmosis, en el bovino inoculado con la línea de córnea co-cultivada con eritrocitos infectados, se detectaron anticuerpos específicos contra *A. marginale*; sin embargo, no se logra dilucidar en este estudio la participación de las células endoteliales.

**PALABRAS CLAVE:** *Anaplasma marginale*, Cultivo, Células endoteliales.

### ABSTRACT

*Anaplasma marginale*, intracellular bacteria causes bovine anaplasmosis, characterized by progressive anemia, fever, decrease in body weight and death occasionally. The use of *A. marginale in vitro* cell culture – derived has been suggested as an alternative for development new prevention tools and control strategies. The purpose of this study was to establish the *in vitro* culture procedure in bovine corneal or umbilical cord and monkey retina endothelial cell lines. These were subsequently exposed to *A. marginale* infected erythrocytes. Different staining methodologies, immunofluorescent antibody assays or genome detection tests were used in an attempt to demonstrate the invasion of nucleated cells. In all cases, only negative results were obtained and no cytopathic effects 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 immune response against the bacteria. Animals did not show clinical signs of anaplasmosis. Even though a calf inoculated with the cornea cell line co-cultivated with infected erythrocytes, showed antibody against *A. marginale*; endothelial cell lines involvement in *Anaplasma marginale* infection could not be clearly demonstrated in this study.

**KEY WORDS:** *Anaplasma marginale*, Culture, Endothelial cells.

*Anaplasma marginale*, es una bacteria Gram-negativa redondeada u oval de 0.3 a 0.8 mm de

*Anaplasma marginale* is a round or oval Gram-negative bacterium of 0.3 to 0.8 mm of diameter<sup>(1)</sup>

Recibido el 29 de junio de 2009. Aceptado para su publicación el 28 de junio de 2010.

<sup>a</sup> Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, INIFAP. Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla No. 8534 Colonia Progreso, 62500 Jiutepec, Morelos. [vega.carlos@inifap.gob.mx](mailto:vega.carlos@inifap.gob.mx). Correspondencia al último autor.

<sup>b</sup> Facultad de Estudios Superiores – Cuautitlán, UNAM.

<sup>c</sup> Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro.

diámetro<sup>(1)</sup> que pertenece al orden *Rickettsiales*<sup>(2)</sup>, familia *Anaplasmataceae*, género *Anaplasma*<sup>(3)</sup> y es causante de la Anaplasmosis bovina. Identificada por primera vez en 1893 por Smith y Kilborne<sup>(4)</sup>, la enfermedad fue descrita en 1910 por Theiler<sup>(5)</sup>, diferenciándola de la babesiosis bovina<sup>(6)</sup>. Desde entonces, las tentativas para reproducirlo *in vitro*, han sido numerosas<sup>(7)</sup>. Intentos realizados en México<sup>(8,9)</sup>, arrojaron datos acerca de los requerimientos de las cepas mexicanas. La metodología hasta el momento descrita como exitosa, involucra el establecimiento de una línea celular de garrapata del género *Ixodes*<sup>(10)</sup>, el cultivo de *A. marginale* en esta línea celular y entonces, la transferencia de las bacterias cultivadas a líneas celulares endoteliales de origen bovino y de primate<sup>(11)</sup>. Por lo que el propósito de este trabajo fue ensayar la propagación de la rickettsia *Anaplasma marginale*, en condiciones de laboratorio, directamente en células endoteliales a partir de eritrocitos de bovino infectados.

Para la reproducción de la rickettsia se utilizaron hasta diez bovinos criollos (*Bos taurus*) entre 12 a 18 meses de edad, provenientes de zona libre de garrapatas en Chihuahua, negativos a tuberculosis y brucelosis bovinas, según las normas de las campañas oficiales<sup>(12,13)</sup> e igualmente, negativos para *A. marginale* utilizando la prueba de ELISA<sup>(14)</sup>. Estos se transportaron al CENID PaVet, en Jiutepec, Morelos y mantenidos en estabulación con alimento, heno y concentrado y agua *ad libitum*.

Se utilizaron cinco cepas de *A. marginale* aisladas de casos clínicos en diferentes estados de México

that belongs to the order *Rickettsiales*<sup>(2)</sup>, family *Anaplasmataceae*, genus *Anaplasma*<sup>(3)</sup>, and is the causing agent of bovine Anaplasmosis. It was first identified in 1893 by Smith and Kilborne<sup>(4)</sup>, the disease was described in 1910 by Theiler<sup>(5)</sup>, differentiating it from the bovine babesiosis<sup>(6)</sup>. Since then, the attempts to reproduce it *in vitro* have been numerous<sup>(7)</sup>. Attempts previously conducted in Mexico<sup>(8,9)</sup> provided data regarding the requirements of the Mexican strains. The methodology described so far as successful, includes the establishment of a tick cell line of the *Ixodes*<sup>(10)</sup> genus, the culture of *A. marginale* in this cell line, and then, the transferring of the cultured bacteria to endothelial cell lines of bovine and monkey origin<sup>(11)</sup>. Thus, the purpose of this work was to assay the propagation of the *Anaplasma marginale* rickettsia, in laboratory conditions, directly in endothelial cells from infected bovine erythrocytes.

For rickettsia reproduction, ten mixed breed bovine cattle (*Bos Taurus*) 12 to 18 mo of age were used, coming from a tick free zone in Chihuahua, negative to bovine tuberculosis and brucellosis, according to official campaign regulations<sup>(12,13)</sup> and equally, negative to *A. marginale* by the ELISA<sup>(14)</sup> test. They were transported to the CENID PaVet, in Jiutepec, Morelos and kept in stabling with feed, hay and concentrate and water *ad libitum*.

Five strains of isolated *A. marginale* of clinical cases in different states of Mexico were used (Table 1), some of them partially characterized in relation to their virulence or genome characteristics<sup>(15,16,17,18)</sup>. The strains were kept frozen at -196 °C and to

Cuadro 1. Características genóticas y fenóticas de los microorganismos utilizados

Table 1. Genotype and phenotype of microorganisms used

| Strain (Isolate) | <i>msp1a</i> | Repeats       | Virulence | Ref.    |
|------------------|--------------|---------------|-----------|---------|
| Aguascalientes   | DQ501243     | 4,9,10,11,9   | High      | (15)    |
| México           | AF345868     | α,β,β,Γ       | High      | (16,18) |
| Morelos          | AF345869     | α,β,β,Γ       | High      | (17,18) |
| Yucatán          | AF345871     | T,C,B,B,C,B,π | Low       | (16,18) |
| (Tamaulipas)     | ---          | ---           | High      | NP      |

NP= Unpublished.

(Cuadro 1), algunas de ellas parcialmente caracterizadas con relación a su virulencia o particularidades de su genoma<sup>(15,16,17,18)</sup>. Las cepas se mantuvieron en congelación a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  y para reactivarlas se inocularon en los bovinos previamente esplenectomizados. Para estimar el porcentaje de eritrocitos infectados (Ei), a partir de una muestra se prepararon dos frotis teñidos con colorante de giemsa<sup>(19)</sup>, observándose al microscopio con objetivo de inmersión 100X, tomando el valor promedio de ambos. Cuando los valores de infección fueron mayores al 10 %, asepticamente se tomó sangre infectada mediante punción en la vena yugular, empleando un matraz KITASATO con perlas de vidrio previamente esterilizado, agitándole mediante rotación para evitar la coagulación. La sangre obtenida se lavó con solución VYM estéril<sup>(20)</sup>, cada lavado consistió en centrifugar a 1,500 xg por 15 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , decantando el sobrenadante y resuspendiendo al 50 % (v/v) en VYM, eliminando la capa flogística. Los inóculos consistieron en eritrocitos infectados suspendidos al 50 % en VYM (v/v) o en su caso, cuerpos iniciales (Ci) que corresponden a los cuerpos de inclusión de *A. marginale* liberados para facilitar la invasión de las células huésped, obtenidos mediante la aplicación de protocolos de lisis, purificados con gradiente de Percoll®, en presencia o ausencia de fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF), como inhibidor de proteasas<sup>(21)</sup>.

Las estirpes celulares adquiridas comercialmente fueron, RF/6A (ATCC No. CRL-1780) de retina de mono Rhesus (*Macaca mulatta*) y BCE C/D-1b (ATCC No. CRL-2048) de córnea de bovino. Además se empleó una estirpe transformada de cordón umbilical de bovino denominada BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub> (Donada por la Dra. Carmen Clapp, Instituto de Neurobiología-UNAM)<sup>(22)</sup>. Todas se mantuvieron en criopreservación a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  en nitrógeno líquido, hasta su uso. Para la línea RF/6A se utilizó el medio mínimo esencial (MEM), para BCE/D-1b se empleó el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DEMY para BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub> el medio F-12 HAM modificado (todos de Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo. EE.UU). Los medios, adquiridos comercialmente fueron suplementados con suero bovino fetal, mezcla de penicilina+estreptomina

reactivate them, were inoculated into bovines previously splenectomized. To estimate the percentage of infected erythrocytes (iE), two blood smears dyed with Giemsa stain were prepared from a sample<sup>(19)</sup>, observed through a microscope with an 100X immersion objective, taking the mean value of both. When infection was greater than 10 %, infected blood was aseptically taken by jugular vein puncturing, using a previously sterilized KITASATO flask with glass beads, stirring it to avoid coagulation. The blood was washed with sterile VYM solution<sup>(20)</sup>, each washing consisting of centrifugation at 1,500 xg for 15 min at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , decantation of the supernatant and 50 % (v/v) resuspension in VYM, to eliminate the buffy coat. The inocula consisted of a 50 % infected erythrocytes suspension in VYM (v/v), or if applicable, initial bodies (Ci) corresponding to the released inclusion bodies of *A. marginale* to facilitate the invasion of the host cells, obtained through the application of lysis protocols, purified with Percoll® gradients, in either the presence or absence of phenyl-methyl-sulfonyl fluoride (PMSF), as proteases inhibitor<sup>(21)</sup>.

Commercially acquired cell lines were: RF/6A (ATCC No. CRL-1780) of Rhesus monkey (*Macaca mulatta*) retina and BCE C/D-1b (ATCC No. CRL-2048) of bovine cornea. Additionally, a transformed cell line of bovine umbilical cord named BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub> was used (donated by Dr. Carmen Clapp, Institute of Neurobiology, UNAM)<sup>(22)</sup>. All lines were kept in cryopreservation at  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  in liquid nitrogen, until their use. For the RF/6A line, minimum essential medium was utilized (MEM) (Cat. No. M-0643), for BCE/D1b the Eagle's modified Dulbecco (DEM) medium (Cat. No. D-5648), and for BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub> the modified F-12 HAM medium (Cat. No. N-3520); all from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. The commercially acquired media were supplemented with fetal bovine serum, a mixture of penicillin and streptomycin (100UI + 125  $\mu\text{g/ml}$ ) and amphotericin B (0.25  $\mu\text{g/ml}$ ) (GIBCO, USA. No. Cat. 15290-018). All cultures were performed under strict sterility conditions, in duplicate. The amount of medium used was of 2  $\mu\text{l/mm}^2$ . The seed density was of 1.0 or  $1.2 \times 10^3$  cells/ $\text{mm}^2$  for 16 mm diameter

(100 UI+125 µg/ml) y anfotericina B (0.25 µg/ml) (GIBCO, EEUU. No. Cat.15290-018). Todos los cultivos se realizaron en condiciones estrictas de esterilidad, por duplicado. La cantidad de medio de cultivo fue de 2 µl/mm<sup>2</sup> de superficie. La densidad de siembra fue de 1.0 ó 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. El cambio de medio se realizó cada 48 h y el subcultivo con seis días de intervalo.

Para la detección del microorganismo, adicionalmente a la tradicional tinción de giemsa, como alternativa de confirmación, se aplicó indistintamente una o más de las metodologías que se describen a continuación.

PCR: Para la extracción del ADN de Ei se empleó el paquete comercial Ultra Clean DNA BloodSpin. En el caso de las células nucleadas se utilizó la técnica "Hot Shot"<sup>(23)</sup> y para la técnica de PCR se empleó el paquete comercial Master Mix siguiendo el protocolo "Nested-PCR", descrito por Torioni de Echaide, utilizando fragmentos del gen conservado *msp5* como iniciadores<sup>(24)</sup>:

- (1) sentido 5'→3' GCATAGCCTCCGCGTCTTTC
- (2) contrasentido 5'→3' TCCTCGCCTTGCCCCTCAGA
- (3) interno 5'→3' TACACGTGCCCTACCGACTTA

Los geles de agarosa se prepararon al 1% (p/v) y se observaron en un transiluminador<sup>(25)</sup> de luz UV de 200-300 nm (Ultra-Lum, Modelo UVA-40).

Como antígeno control para inmunofluorescencia, se prepararon laminillas a partir de sangre infectada, conservándose a -70 °C hasta su uso. La preparación de las células nucleadas consistió en su fijación con metanol-acetona y lavados con Nonidet 40<sup>®</sup> al 0.5% (v/v) en solución salina fisiológica (NaCl 0.7% p/v) en agua destilada estéril<sup>(26)</sup>. El Conjugado se elaboró a partir del suero hiperinmune contra *A. marginale*, obtenido de un bovino inoculado con Ci de la cepa Aguascalientes y refuerzos más adelante con Ei de la cepa Morelos; los niveles de anticuerpos medidos periódicamente con la técnica de ELISA<sup>(14)</sup>, determinaron el

wells or of 25 cm<sup>2</sup> flasks, respectively. The change of medium was performed every 48 h and the subculture with 6-d of interval.

For the detection of the micro-organism, in addition to the traditional Giemsa staining, an alternative of confirmation by one or more of the following methodologies was applied.

PCR: For the extraction of the DNA of Ei the Ultra Clean DNA BloodSpin commercial package was utilized. In the case of nucleated cells the "Hot Shot"<sup>(23)</sup> technique was used and for the PCR technique the Master Mix commercial package was utilized following the "Nested-PCR" protocol, described by Torioni de Echaide, using fragments of the *msp5* preserved gene as indicators<sup>(24)</sup>:

- (1) forward 5'→3' GCATAGCCTCCGCGTCTTTC
- (2) reverse 5'→3' TCCTCGCCTTGCCCCTCAGA
- (3) internal 5'→3' TACACGTGCCCTACCGACTTA

The agarose gels were prepared at 1% (w/v) and were observed in a UV transilluminator<sup>(25)</sup> of 200-300 nm (Ultra-Lum, UVA-40 Model).

As control antigen for immunofluorescence, infected blood smears were prepared and kept at -70 °C until their use. The preparation of nucleated cells consisted on their fixation with methanol-acetone and washings with 0.5% Nonidet 40<sup>®</sup> (v/v) in physiological saline solution (0.7% NaCl w/v) in sterile distilled water<sup>(26)</sup>. Conjugate was made from hyperimmune serum against *A. marginale*, obtained from an inoculated bovine with Ci of the Aguascalientes strain and further boosters with Ei from the Morelos strain; antibody levels, periodically measured with the ELISA<sup>(14)</sup> technique determined the optimal time for the collection of the serum. Immunoglobulins were purified, concentrated, and conjugated with Fluorescein isothiocyanate (FITC), according with what was already published<sup>(27)</sup>. For the direct immunodetection, the test was performed in accordance to what has been previously reported and samples observed with an epifluorescence microscope<sup>(28)</sup>. Regarding the indirect immunodetection, previously published

momento óptimo para la colecta del suero. Las inmunoglobulinas se purificaron, concentraron y conjugaron con isotiocianato de fluoresceína (FITC), según lo publicado<sup>(27)</sup>. Para la inmuno detección directa, el ensayo se realizó de acuerdo a lo publicado previamente y las muestras se observaron en un microscopio de epifluorescencia<sup>(28)</sup>. En lo relativo a la inmuno detección indirecta, se empleó la metodología anteriormente publicada<sup>(29,30)</sup>; en el primer paso se utilizaron anticuerpos monoclonales anti- msp1 o msp2, (VMRD Laboratories, Pullman, Washington, EE.UU.) incubándose a 37 °C por 30 min, y después de un enjuague, se agregó el segundo anticuerpo (Alexa Fluor 488; Invitrogene, EE.UU.), incubando, enjuagando y dejándose secar nuevamente, para su posterior observación.

La tinción de contraste supravital consistió en la incubación a 37 °C durante 30 min de suspensiones de Ei o células nucleadas, con 50  $\mu$ l de una solución compuesta de 10  $\mu$ M de Di acetato de carboxi-fluoresceína (CFDA) en solución salina amortiguadora de fosfatos (SSAF) pH 7.2 ó 10  $\mu$ M de acetato de carboxi-metil-rodamina (CMRA) en SSAF; concluida la incubación, se adicionaron 500  $\mu$ l de VYM y se enjuagó vigorosamente, incubando nuevamente a 37 °C por 30 min; finalmente se retiró el VYM enjuagando el sustrato durante dos ocasiones<sup>(9)</sup>. La incorporación de colorante se observa bajo el microscopio de fluorescencia al distinguir según el color, verde para CFDA o rojo para CMRA.

**Ensayo 1.** Cuando las líneas celulares BCE, BUVEC y RF/6A presentaron al menos 90 % de confluencia en cultivo, se inocularon por duplicado con la cepa Morelos de *A. marginale*, obtenida de un bovino esplenectomizado. Se prepararon seis tipos inóculo, cada uno a partir de una dosis infectante de  $1 \times 10^9$  cuerpos de inclusión. Los inóculos consistieron en: Ei intactos, Ei sometidos a choque térmico, Ei sonicados, Ei tratados con saponina y Ci extraídos con o sin PMSF como inhibidor de proteasas que los degradaran. Después de la inoculación los cultivos se mantuvieron con cambio de medio cada 48 h y subcultivo cada 6 u 8 días, evaluándose su morfología y rendimiento celular expresado en número de células. El remanente celular entre cada subcultivo se almacenó a 4 °C ó -20 °C.

methodology was used<sup>(29,30)</sup>; in the first step anti- msp1 or msp2 monoclonal antibodies were utilized (VMRD Laboratories, Pullman, Washington, USA), incubated at 37 °C for 30 min, and after the rinsing, the second antibody was added (Alexa Fluor 488; Invitrogene, USA), incubating, rinsing, and letting dry for its later observation.

The supravital contrast stain consisted of the incubation at 37 °C during 30 min of suspensions of Ei or nucleated cells, with 50  $\mu$ l of a solution composed by 10  $\mu$ M of carboxy-fluorescein diacetate (CFDA) in phosphate buffered saline solution (PBS) with pH of 7.2 or 10  $\mu$ M of carboxy-methyl-rhodamine acetate (CMRA) in PBS; after the incubation was concluded, 500  $\mu$ l of VYM was added, rinsed vigorously, and incubated again at 37 °C for 30 min; finally, VYM was removed by rinsing the substrate in two occasions<sup>(9)</sup>. The incorporation of colorant was observed under the fluorescence microscope to distinguish the green color, for CFDA or red for CMRA.

**Assay 1.** When the BCE, BUVEC, and RF/6A cell lines presented at least 90 % of confluence in culture, they were inoculated in duplicate with the Morelos strain of *A. marginale*, obtained from an esplenectomized calf. Six types of inocula were prepared, each from an infecting dose of  $1 \times 10^9$  inclusion bodies. The inoculums consisted of: intact Ei, Ei submitted to thermal shock, sonicated Ei, Ei treated with saponin, and Ci extracted with or without PMSF as protease inhibitor. After the inoculation the cultures were kept with a change of medium every 48 h and subculture every 6 or 8 d, having their morphology and cellular development assessed and expressed in numbers of cells. The remaining cells between subcultures were stored at 4 °C or -20 °C.

**Assay 2.** The BUVEC cell line was inoculated with the Yucatan strain obtained from an esplenectomized bovine. The inocula described in test 1 were used, with the same infecting dose. The change of medium was performed in three or four day intervals and subcultures performed weekly. Cellular morphology was observed and development expressed in number of cells. Unlike

**Ensayo 2.** La línea BUVEC fue inoculada con la cepa Yucatán obtenida de un bovino esplenectomizado. Se emplearon los tipos de inóculo descritos en el ensayo 1, con la misma dosis infectante. El cambio de medio se realizó a intervalos de tres o cuatro días y los subcultivos, semanalmente. Se evaluó morfología y rendimiento celular expresado en número de células. A diferencia del ensayo anterior, después de cada subcultivo se sembraron  $2 \times 10^5$  células en placas de 24 pozos, con un cubreobjetos en el fondo. Estos se extrajeron 24 h más tarde, para su tinción con CMRA, giemsa, wright<sup>(31)</sup> y naranja de acridina<sup>(32)</sup>. Se extrajo el ADN celular y se caracterizaron mediante PCR para el gen específico *msp5*<sup>(24)</sup>. El remanente celular de cada subcultivo se criopreservó con sulfóxido de diMetilo (DMSO) al 8 % (v/v).

**Ensayo 3.** La línea BCE fue previamente inoculada con  $4.1 \times 10^6$  de Ei con la cepa Yucatán, procedente de un bovino esplenectomizado. Las células nucleadas se incubaron con 50  $\mu$ l de solución CFDA 10  $\mu$ M, al momento de la siembra, paralelamente, 25  $\mu$ l de Ei al 50 % en VYM fueron incubados con 50  $\mu$ l de solución CMRA 10  $\mu$ M. 24 h después se co-cultivaron, el cambio de medio se hizo cada 48 h, hasta las 144 h. Se tomaron muestras del co-cultivo a las 24, 72 y 144 h y se observaron con diferentes filtros en el microscopio de epifluorescencia, con rangos de emisión de 490 ó 548 nm y excitación de 520 ó 576, para CFDA o CMRA, respectivamente.

**Ensayo 4.** La metodología de co-cultivo fue similar a la empleada por Waghela y colaboradores<sup>(33)</sup>, con algunas modificaciones. La finalidad de este estudio fue sembrar con Ei intactos, las líneas celulares endoteliales no expuestas, adicionando periódicamente eritrocitos no infectados. Las líneas BUVEC y BCE fueron utilizadas en co-cultivo con las cepas Morelos y Yucatán (primera variante) y con el aislado Tamaulipas (Soto la Marina) y la cepa Yucatán (segunda variante). Estos inóculos se obtuvieron de bovinos esplenectomizados. La siembra se hizo por duplicado en placas de 24 pozos. Cada placa se dividió en tres grupos: testigo, con Ei y con eritrocitos no infectados. En la primera variante, después de la inoculación de los monoestratos

the prior test, after each subculture  $2 \times 10^5$  cells were seeded in 24 well plates, with a coverslip in the bottom. These were recovered 24 h later for its staining with CMRA, Giemsa, Wright<sup>(31)</sup>, and acridine orange (NA). DNA was extracted and characterized by PCR for the *msp5*<sup>(24)</sup> specific gene. Remaining cells after subculture were cryopreserved with 8% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO).

**Assay 3.** BCE cell line was previously inoculated with  $4.1 \times 10^6$  of iE with Yucatan strain, from an esplenectomized bovine. Nucleated cells were incubated with 50  $\mu$ l of 10  $\mu$ M CFDA solution, at seeding moment, and at the same time 25  $\mu$ l of 50 % iE in VYM were incubated with 50  $\mu$ l of 10  $\mu$ M CFDA solution. Twenty four (24) h later they were co-cultured and the change of medium was performed every 48 h until 144 h were reached. Samples of the co-culture were obtained at 24, 72, and 144 h and were observed with different filters in the epifluorescence microscope, with emission ranges of 490 or 548 nm and 520 or 576 nm exciting filters, for CFDA or CMRA, respectively.

**Assay 4.** The co-culture methodology was similar to the one used by Waghela and associates<sup>(33)</sup>, with some modifications. The purpose of this study was to seed with intact iE the non-exposed endothelial cell lines, and periodically adding uninfected erythrocytes to monitor growth. The BUVEC and BCE lines were used in the co-culture with the Morelos and Yucatan strains (first variant) and with the Tamaulipas (Soto la Marina) isolate and the Yucatan strain (second variant). These inocula were obtained from splenectomized bovines. The seeding was performed in duplicate in 24 well plates. Each plate was divided in three groups: Control, with iE and with uninfected erythrocytes. In the first variant, after the inoculation of the cell layer with 1.25 ml of iE, the change of medium was performed subtracting and reconstituting 1.0 ml of culture medium every 24 h. Subculture was performed weekly and 24 h later 25  $\mu$ l of uninfected erythrocytes at 50 % in VYM were added to all wells with the exception of the control group. Before each medium exchange the proportion of the infected erythrocytes was counted in the Giemsa stained smear. For the second variant, a coverslip was placed

celulares con 1.25 ml de Ei, el cambio de medio se realizó sustrayendo y reconstituyendo 1.0 ml del medio de cultivo cada 24 h. El subcultivo, se hizo semanalmente y 24 h después se adicionaron 25  $\mu$ l de eritrocitos no infectados al 50 % en VYM, a todos los pozos exceptuando el grupo testigo. Antes de cada cambio de medio se realizó un conteo de la proporción de eritrocitos infectados, mediante frotis teñidos con giemsa. Para la segunda variante, se colocó un cubreobjetos en el fondo de los pozos de las placas, la inoculación y cambio de medio fue a los mismos intervalos que en la primera variante. Semanalmente se llevaron a cabo los pases, retirando el material suspendido en el medio de cultivo y agregándolo a un nuevo pozo con un monoestrato de células endoteliales previamente sembradas y sin infectar. Se realizó el conteo de ricketsemia con frotis teñidos antes de cada cambio de medio, los cubreobjetos del fondo de los pozos se tiñeron con giemsa o se prepararon para inmunofluorescencia.

**Ensayo 5.** Se hizo una inoculación con BUVEC expuesta a *A. marginale in vitro*, a partir de material criopreservado en el segundo experimento, del que se obtuvo el inóculo conformado por células expuestas a Ci extraídos con inhibidores de proteasas y su respectivo control negativo. Se inocularon dos bovinos con  $2 \times 10^5$  células cada uno vía intramuscular (IM). A partir del día de la inoculación los bovinos se monitorearon dos veces por semana, durante 60 días, valorando título de anticuerpos y constantes fisiológicas. Otro bovino se inoculó con BCE expuesta a *A. marginale in vitro* obtenido a partir de cultivos de células BCE expuestas a Ei con la cepa Morelos y su control negativo;  $1 \times 10^9$  células de cada uno de estos, fueron administrados IM; a partir del día de la inoculación el monitoreo de los bovinos se desarrolló como ya se mencionó.

Los resultados de la inoculación de cultivos de células nucleadas con la cepa Morelos, indican 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

in the bottom of the wells, the inoculation and change of medium was performed at the same intervals as in the first variant. The screenings were performed weekly, removing the suspended material in the culture medium and adding it to a new well with a monolayer of endothelial cells previously seeded and uninfected. The ricketsemia was counted with stained smears before each change of medium, the coverslips were stained with Giemsa or were prepared for immunofluorescence.

**Assay 5.** An inoculation with BUVEC *in vitro* exposed to *A. marginale* was carried out with cryopreserved material of the second experiment. Inoculum consisted of cells exposed to iB extracted with protease inhibitors and their respective negative control. Two bovines were inoculated with  $2 \times 10^5$  cells each, intramuscularly (IM). From the day of the inoculation the bovines were monitored twice a week, during 60 d, assessing antibody titers and clinical signs. Other bovines were, one inoculated with BCE *in vitro* exposed to *A. marginale* obtained from BCE cell cultures exposed to iE with the Morelos strain and another as their negative control.  $1 \times 10^9$  cells of each of these were administered via IM; from the day of the inoculation, the monitoring of the bovines was carried out as mentioned.

The results of the inoculation of cultures of nucleated cells with the Morelos strain indicated a gradual change in the cellular forms, mainly in the cells exposed to the inoculum conformed by intact iE, these changes were more radical as the passage number increased, it began in passage zero and at least four more passages were performed, depending upon the cell line. These changes consisted in noticeable fine forms with increasing numbers of intracytoplasmic granules or particles, these characteristics were more evident in the RF/6A and BCE lines. In the rest of the inocula the morphological characteristics were kept without any apparent changes throughout the experiment. All the inoculated cultures with the iE subjected to thermal shock presented bacterial contamination, thus they were disposed of, similar to the majority of the cultures of BCE, after the third screening. Meanwhile, the unexposed cells to *A. marginale* with more than 90 % of confluence showed typical

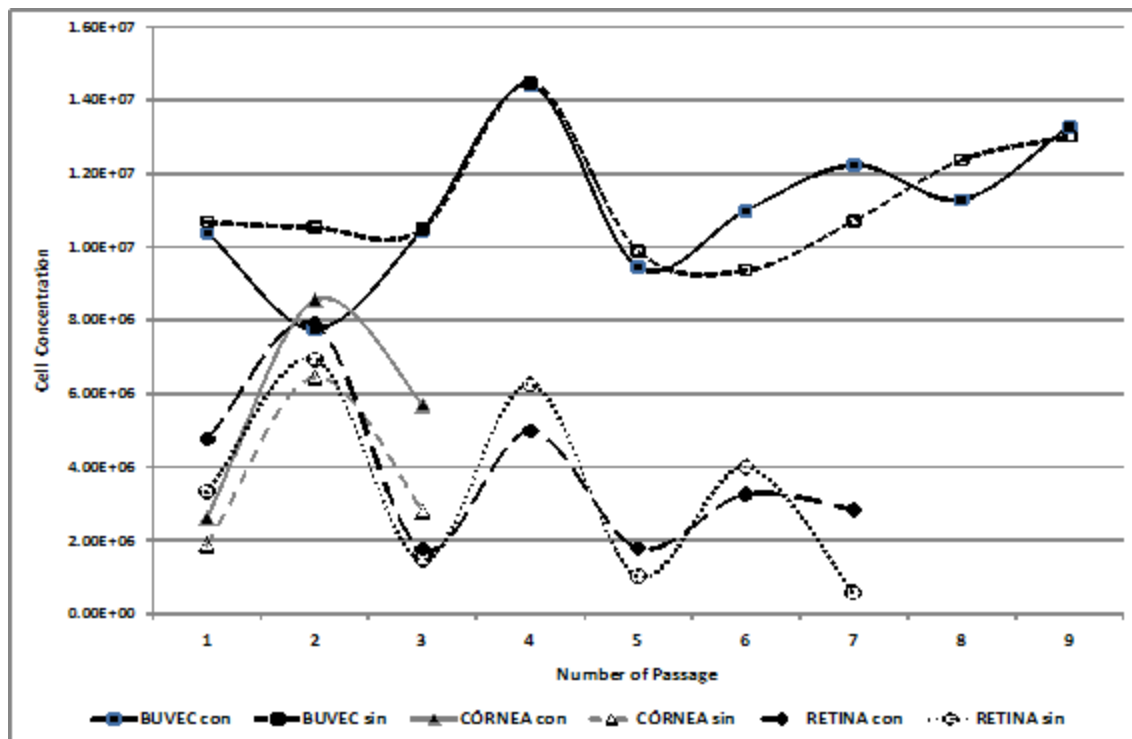
celular. Estos cambios consistieron en formas ahusadas pronunciadamente con incremento en el número de gránulos o partículas intracitoplasmáticas, características más evidentes en las líneas RF/6A y BCE. En el resto de los inóculos se mantuvieron las características morfológicas sin cambios aparentes, a lo largo del ensayo. Todos los cultivos inoculados con los Ei sometidos a choque térmico presentaron contaminación bacteriana, razón por la cual se desecharon, al igual que la mayoría de los cultivos de BCE, después del tercer pase. 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. En cuanto a los rendimientos celulares, en RF/6A se presentó una disminución drástica, conforme el número de

forms of “tile” in the RF/6A and BCE lines. As for cell performances, in RF/6A a drastic decrease appeared, depending on the number of passage, in the cultures exposed to sonicated iE, treated with saponin and iB with and without inhibitors of proteases, while cellular performance of cells cultured with intact iE were kept constant. In BUVEC very little differences in shape, size, and number of cells were observed between passes and inocula, the same occurred with BCE and RF/6A. In Figure 1 the fluctuation in the growth of these cell lines exposed to extracted iB with or without PMSF as inhibitor of proteases is illustrated.

In the second assay, the observed results indicate that no morphological differences caused by inocula

Figura 1. Rendimiento comparativo promedio de las líneas de células endoteliales de bovino y mono, expuestas a cuerpos de inclusión (Ci) de *Anaplasma marginale* cepa Morelos, extraídos, con y sin PMSF como inhibidor de proteasas

Figure 1. Comparison of bovine and monkey endothelial cell lines average growth, exposed to *Anaplasma marginale* Morelos strain inclusion bodies (Ci), extracted with or w/o PMSF protease inhibitor



BUVEC = Transformed bovine umbilical vein endothelial cells, known as BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub>

CÔRNEA = Bovine cornea endothelial cell line (BCE C/D-1b; ATCC No. CRL-2048)

RETINA = Rhesus monkey (*Macaca mulatta*) Retinal endothelial cell line (RF/6A; ATCC No. CRL-1780)



pase, en los cultivos expuestos a Ei sonicados, tratados con saponina 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 número de células, entre pases e inóculos, lo mismo ocurrió con BCE y RF/6A. En la Figura 1 se ejemplifica la fluctuación en el crecimiento de estas líneas celulares expuestas a Ci extraídos con o sin PMSF como inhibidor de proteasas.

En el segundo ensayo, los resultados observados señalan que no se encontraron diferencias morfológicas provocadas por los inóculos, ya que a lo largo del experimento BUVEC mantuvo sus formas ahusadas, independientemente del tipo de inóculo y número de pase. La adhesión celular no se vio afectada y el número de gránulos intracitoplasmáticos no variaron. En el rendimiento celular las diferencias no fueron mayores a un logaritmo. Con la tinción de giemsa se pudo distinguir entre citoplasma y núcleo y comparando el grupo testigo contra cada uno de los inóculos, no hubo indicios de *A. marginale* a través de cada pase; con el colorante de NA se observaron las membranas citoplasmática y nuclear bien definidas, se tiñeron indistintamente citoplasma y núcleo celular, por ello, fue de nula utilidad para distinguir el ADN de la rickettsia, de aquél de la célula huésped nucleada. Este resultado también se obtuvo con la tinción de CMRA. Finalmente, con el colorante de wright el núcleo y citoplasma se tiñeron del mismo color. A partir del ADN extraído de las células endoteliales expuestas a *A. marginale*, se realizó el protocolo de PCR, sin embargo, se consideró negativo al no obtenerse la amplificación del gen específico *msp5* utilizado.

Los resultados del tercer ensayo orientado a observar el contraste entre la línea celular BCE y la cepa Yucatán de *A. marginale* con la tinción supravital, 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,

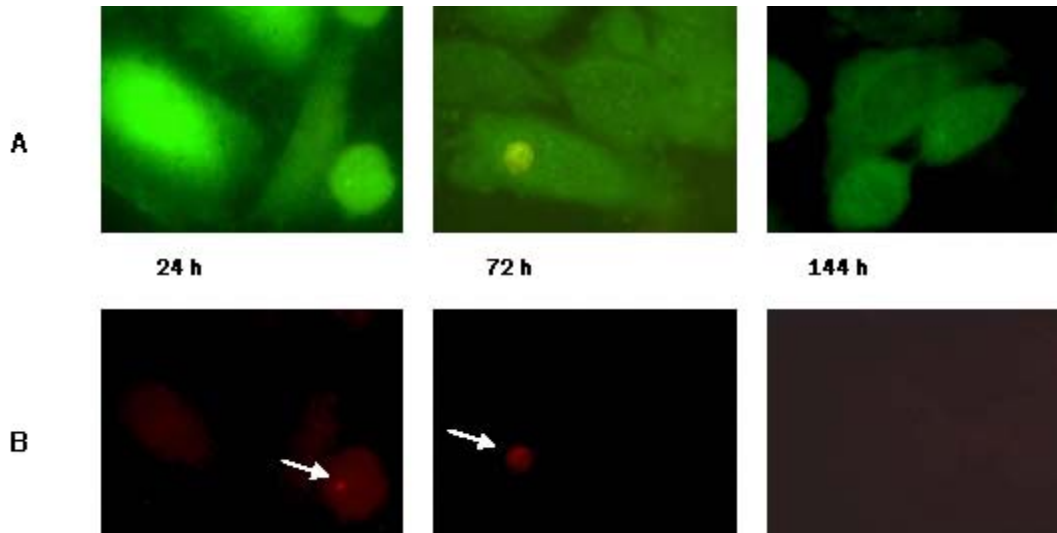
were found because throughout the experiment BUVEC kept its fine shapes, regardless of type of inoculum or passage number. The cellular adhesion was not affected and the number of intracytoplasmatic granules did not vary. Cellular performance was not greater than beyond a logarithm. With the Giemsa stain it was possible to distinguish between the cytoplasm and the nucleus, and comparing the control group against each of the inocula, there were no signs of *A. marginale* through each phase; with the colorant of NA the cytoplasmatic and nuclear membranes were observed, that is why it was of no use to distinguish the DNA of the rickettsia from that of the nucleated host cell. This result was also obtained with the staining of the CMRA. Finally, the nucleus and cytoplasm stained of the same color with Wright colorant. From the extracted DNA of the exposed endothelial cells to *A. marginale*, the PCR protocol was applied, however, it was considered negative because the amplification of the depicted *msp5* specific gene was not obtained.

The results of the third assay oriented to observe the contrast between the BCE cell line and the Yucatan strain of *A. marginale*, with the supravital staining; in the first reading at 24 h, well defined cell shapes could be observed and the erythrocytes contained the *A. marginale* in its interior. When placing the microscope filters, for CFDA and CMRA, the iE were apparently in close contact with the endothelial cells. This same pattern was observed in the second reading at 72 h, however, the intensity of the colorants drastically decreased and made the visualization difficult. In the last reading, at 144 h, both colorants were showing lesser intensity, mainly the CMRA (Figure 2).

In the fourth assay, the results in the first variant, allowed to observe iB as the result of the infection by *A. marginale* during 91 d in the erythrocytes co-cultured with BCE and 87 d with BUVEC. The dynamics of the rickettsemia for both cell lines showed different patterns; the cornea cell line was supportive from the 5<sup>th</sup> d of culture, with rickettsemias of 0.13 % up to 1.1 %. Meanwhile, the umbilical cord line showed fluctuations between

Figura 2. Fotomicrografía de la tinción de contraste supravital empleando los colorantes CMRA\* y CFDA\*\*, en la línea celular nucleada BCE cultivada con *Anaplasma marginale* cepa Yucatán

Figure 2. Photomicrograph of BCE nucleated cell line cultured with Yucatan strain of *Anaplasma marginale*, stained with CMRA\* and CFDA\*\* supravital contrast dyes



100x objective epifluorescence microscope. Readings at 24, 72 and 144 h. White arrows point to CMRA stained rickettsia.

Row A= 490 nm absorption and 520 nm emission filters.

Row B= 548 nm absorption and 576 nm emission filters.

\*CMRA= Carboxi-methyl-rodhamine acetate.

\*\*CFDA= Carboxi-fluorescein di acetate.

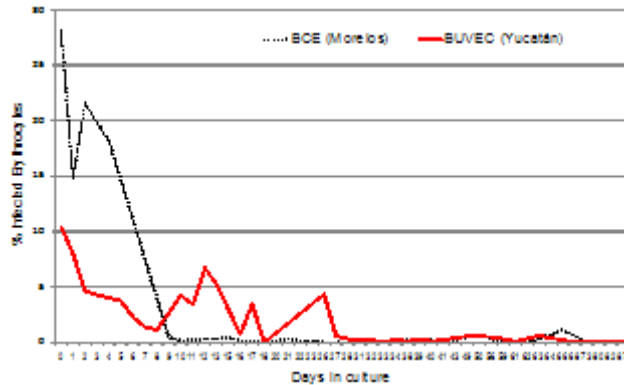
a las 72 h, sin embargo, la intensidad de los colorantes disminuyó drásticamente dificultando la visualización. La última lectura, a las 144 h ambos colorantes mostraban menor intensidad, principalmente CMRA (Figura 2).

En el cuarto ensayo, los resultados en la primera variante de co-cultivo, permitieron observar Ci como resultado de la infección por *A. marginale* durante 91 días en los eritrocitos con BCE y 87 días con BUVEC. La dinámica de la rickettsemia de ambas líneas celulares mostró patrones diferentes, la línea de córnea se mantuvo, a partir del día 5 del cultivo, con rickettsemia del 0.13 % hasta 1.1 %. 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

the 8<sup>th</sup> and the 10<sup>th</sup> d with 1.14 and 4.25 percent infection respectively; between the 16<sup>th</sup> and 17<sup>th</sup> d with of 0.74 and 3.41 percent; on the 18<sup>th</sup> d the cultures appeared as negative and on the 26<sup>th</sup> d observed percent rickettsemia was 4.39 (Figure 3). The results of the second variant allowed us to observe *A. marginale* in the erythrocytes during 145 d in the co-culture with BCE and 149 d with BUVEC, the maximum percent after the culture had initiated was of 17.96 % with BCE and in BUVEC only 2.5 %, which represents a difference of 15.19 % (Figures 4,5). At the beginning of the cultures *A. marginale* presented the typical shape of iB but as the months were passing by it went on decreasing until they became small subunits or marginal bodies, some iB were observed before increase of percent rickettsemia. In certain cells of the BCE line, stained with Giemsa, at the periphery of the main cell nucleus, particles with similar

Figura 3. Rickettsemia promedio encontrado en el co-cultivo de *Ei* con *A. marginale* de las cepas Morelos y Yucatán con las líneas nucleadas BCE y BUVEC (primera variante)

Figure 3. Average rickettsemia found in Morelos strain *A. marginale* infected erythrocytes (*Ei*) co-cultured with BCE or in Yucatán strain *Ei* co-cultivated with BUVEC cell lines (first variant)



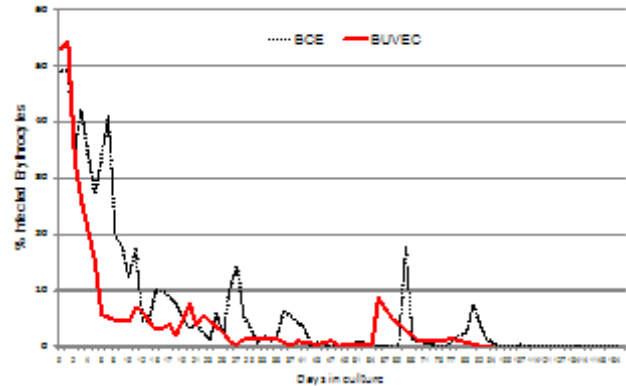
BCE = Bovine cornea endothelial cell line known as BCE C/D-1b (ATCC No. CRL-2048).

BUVEC = Transformed bovine umbilical vein endothelial cells, known as BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub>.

porcentaje de rickettsemia observado fue del 4.39 (Figura 3). Los resultados de la segunda variante nos permitieron observar *A. marginale* en los eritrocitos durante 145 días en el co-cultivo con BCE y 149 días con BUVEC, el porcentaje máximo después de iniciado el cultivo fue de 17.96 con BCE y en BUVEC de 2.5 %, lo que representa una diferencia del 15.19 % (Figuras 4,5). Al inicio del cultivo *A. marginale* presentaba la típica forma de los Ci y con el paso de los meses fue disminuyendo hasta pequeñas subunidades o cuerpos marginales, algunos Ci se observaron antes del incremento en el porcentaje de rickettsemia. En ciertas células de la línea BCE, teñidas con el colorante de giemsa se apreciaron en la periferia del núcleo celular principal partículas teñidas con características similares a los ácidos nucleicos, a la periferia de los núcleos celulares, este hallazgo estuvo ausente en BUVEC (Figura 6). Las características morfológicas de ambas líneas permanecieron sin alteraciones durante todo el experimento. La técnica de inmunofluorescencia confirmó la presencia de

Figura 4. Rickettsemia promedio encontrada en el co-cultivo de *Ei* con *A. marginale* de la cepa Yucatán con dos líneas nucleadas BCE y BUVEC (segunda variante)

Figure 4. Average rickettsemia found with Yucatan strain *A. marginale* infected erythrocytes co-cultivated with BCE and BUVEC nucleated cell lines (second variant)

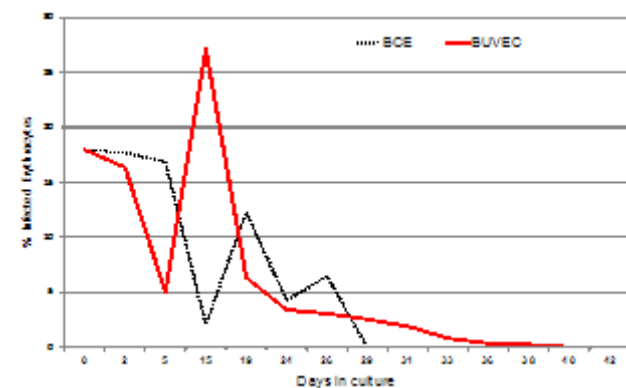


BCE = Bovine cornea endothelial cell line (BCE C/D-1b; ATCC No. CRL-2048).

BUVEC = Transformed bovine umbilical vein endothelial cells, known as BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub>.

Figura 5. Rickettsemia promedio encontrada en el co-cultivo de *Ei* con *A. marginale* del aislado de Soto la Marina, Tamaulipas; con dos líneas celulares endoteliales, BCE y BUVEC (segunda variante)

Figure 5. Mean rickettsemia obtained with Soto la Marina's *A. marginale* isolate infected erythrocytes co-cultured with BCE and BUVEC endothelial cell lines (second variant)



BCE = Bovine cornea endothelial cell line (BCE C/D-1b; ATCC No. CRL-2048).

BUVEC = Transformed bovine umbilical vein endothelial cells, known as BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub>.

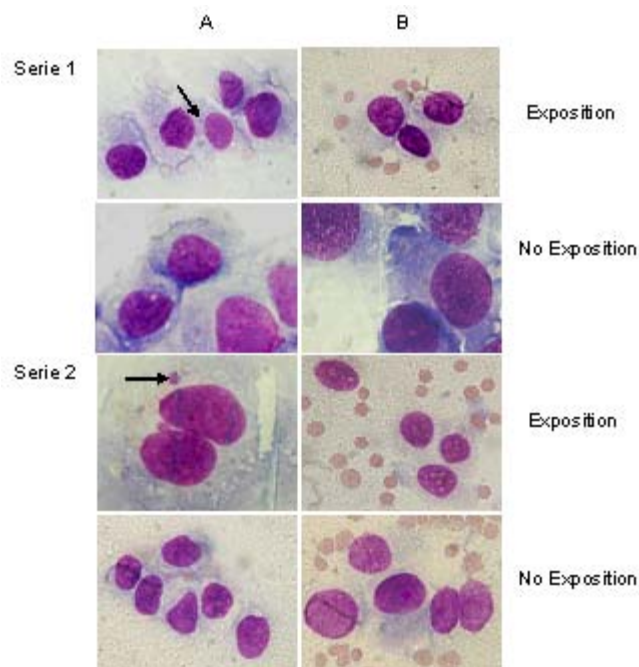
*A. marginale* en los Ei, en cambio, con la técnica directa aplicada a las células nucleadas no pudo distinguirse a la bacteria pues toda la silueta celular se apreció con FITC y con la técnica indirecta no se detectó a la bacteria (Figura 7).

Los resultados de la inoculación del bovino con BUVEC expuesta a *A. marginale in vitro* no arrojaron alteraciones sugestivas en alguna de las constantes fisiológicas medidas, tampoco hubo signos de anaplasmosis, ni variaciones en la respuesta de anticuerpos. En el caso del bovino

characteristics to the nucleic acids were observed at the periphery on the cellular nucleus; this finding was absent in BUVEC (Figure 6). The morphological characteristics of both lines remained without alterations during all the experiment. The technique of immunofluorescence confirmed the presence of *A. marginale* in the iE, in turn, with the direct technique applied to the nucleated cells the bacteria could not be distinguished because the entire cellular profile was observed with FITC and with the indirect technique the bacteria were not detected (Figure 7).

Figura 6. Fotomicrografías de frotis teñidos con el colorante de Giemsa de la líneas celulares BCE y BUVEC co-cultivadas con eritrocitos, infectados o no con las cepas Yucatán (Series 1) y Aislado Soto la Marina (Series 2)

Figure 6. Photomicrograph of Giemsa stained slides of BCE and BUVEC cell lines co-cultured with and w/o infected erythrocytes: Yucatán strain (Series 1) y Soto la Marina Isolate (Series 2)



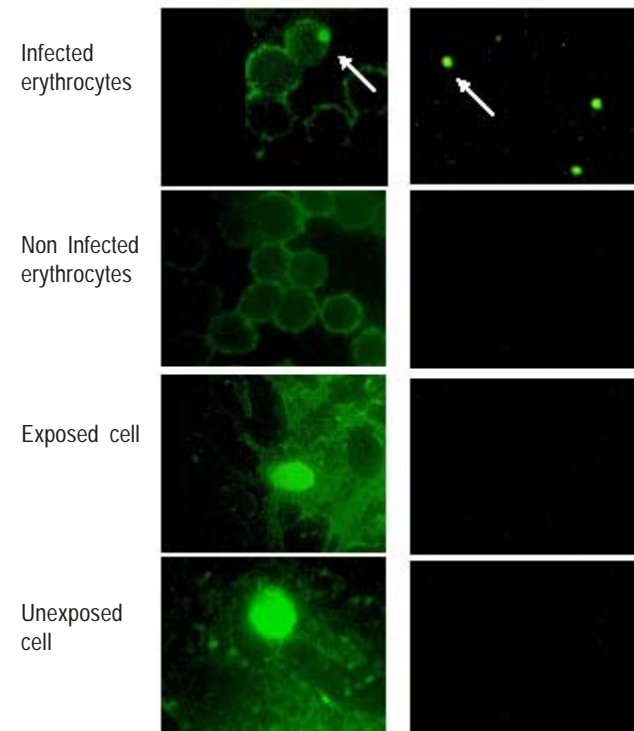
Slides obtained from bottom of well, before medium exchange. Pictures taken with 100x objective white light microscope. Arrows indicate nucleic acid like stained particles, surrounding the nucleus.

Column A = BCE cell line.

Column B = BUVEC cell line.

Figura 7. Fotomicrografías de la técnica de inmunofluorescencia directa e indirecta de los eritrocitos co-cultivados con las líneas celulares endoteliales

Figure 7. Photomicrograph of direct and indirect immunofluorescent procedures on erythrocytes co-cultivated with endothelial cell lines



Pictures taken with 100x objective epifluorescence microscope. Infected *erythrocytes* undergoing direct and indirect immunofluorescent procedures are depicted. Arrows point to Yucatán strain of *A. marginale*. No difference is observed on exposed *versus* non-exposed endothelial cell lines.

inoculado con BCE expuesta *in vitro* con *A. marginale*, tampoco se presentaron alteraciones en las constantes fisiológicas, ni signos de anaplasmosis, pero en un animal hubo una momentánea respuesta de anticuerpos específicos contra la rickettsia a los días 31 y 35 post-inoculación, retornando a negativos al día 38.

La idea de usar diversas presentaciones de *A. marginale*, con el propósito de evaluar qué condiciones permitirían la invasión de la célula huésped y en dado caso, la proliferación de la bacteria en su célula hospedera, pretendía identificar aquéllas que más le favorecieran. Se intentó buscar a este microorganismo mediante la observación de su morfología o por los probables cambios citopatológicos en el hospedero. En la línea celular de retina de mono (RF/6A), las observaciones microscópicas mostraron marcadas diferencias morfológicas, evidentes 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 empleó esta estrategia con la línea celular de cordón umbilical igualmente se buscó a la bacteria mediante los cambios en la morfología, combinando la microscopía óptica con técnicas de tinción mencionadas por otros autores. También se intentó comprobar la presencia de *A. marginale* por la amplificación del gen *msp5* característico de la bacteria, mediante PCR<sup>(34)</sup> y por análisis microscópico en células posiblemente infectadas utilizando la tinción de giemsa<sup>(35)</sup>. En ambos casos los resultados no fueron exitosos aunque existen reportes en los que ha sido posible observarla en las inmediaciones de las membranas nucleares o citoplasmáticas<sup>(36)</sup>, en el presente estudio no se observaron en las células nucleadas.

Los resultados óptimos de contraste con las tinciones supravitales se obtuvieron con la primera lectura, pues permitían diferenciar las estructuras celulares y a los Ei, aunque no pudo ubicarse *A. marginale* dentro de la célula nucleada, ya que no se realizaron apreciaciones sagitales o transversales.

Ante este panorama poco satisfactorio, se implementó otra metodología donde se co-cultivan dos poblaciones

The results from the inoculation of the bovine with BUVEC exposed to *in vitro A. marginale* did not show suggestive alterations in any of the vital signs that were measured and there were neither signs of anaplasmosis nor variations in the antibody response. In the case of the inoculated bovines with *in vitro* exposed BCE with *A. marginale*, there were neither alteration in the vital signs nor signs of anaplasmosis, but within an animal there was a momentary response of specific antibodies against the rickettsia on the 31<sup>st</sup> and 35<sup>th</sup> d after the inoculation, returning to negatives by 38<sup>th</sup> d.

The idea of using different presentations of *A. marginale*, with the purpose of assessing the conditions that would allow the invasion of the host cell and eventually, the proliferation of the bacterium within the cell, could pretend identify those that favor it the most. Efforts were made to find this micro-organism through the observation of its morphology or by the probable cytopathologic changes in the hosting cell. In the monkey retina cell line (RF/6A), the microscopic observations showed marked morphological differences, evident among the inocula of intact iE in relation to the rest. These same differences coincided with the observed numeric discrepancies, determined with the cell count, during the duration of the experiment through each subculture. When this strategy was used with the cell line of the umbilical cord, the bacterium was looked for through the changes in the morphology, combining the optical microscope with staining techniques mentioned by other authors. The presence of *A. marginale* was also tested through the attempts to amplify the characteristic *msp5* gene of the bacterium, through PCR<sup>(34)</sup>, and by microscopic analysis in cells possibly infected using the Giemsa stain<sup>(35)</sup>. In both cases the results were not successful, although there are reports in which it has been possible to observe it in the surrounding areas of the nuclear or cytoplasmic membranes<sup>(36)</sup>, in the present study the nucleated cells were not observed.

The optimum results with the supravital contrast stains were obtained with the first reading, because they allowed to differentiate the cellular structures and the iE; while it was not possible to locate *A.*

celulares, una célula hospedera típica y otra atípica. El resultado más halagüeño fue el obtenido con la metodología de co-cultivo, ya que se logró el mantenimiento de la bacteria en los eritrocitos por más de 84 días, superior a lo descrito en estudios anteriores<sup>(35)</sup>. Respecto al trabajo de co-cultivo informado por Waghela<sup>(33)</sup>, en el presente estudio se emplearon diferentes líneas celulares, medios y manejo de los cultivos; se rebasó el número de días en cultivo, hasta los 149 días, periodo mayor al máximo de 112 días (16 semanas) y uno de los animales experimentales presentó respuesta de inmunoglobulinas G 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 *et al*<sup>(37)</sup> quienes utilizaron como soporte células turbinadas y de aorta de bovino, inoculadas con *A. marginale* proveniente de células de glándula salival de garrapata; ese material biológico cultivado fue administrado a bovinos susceptibles, que tampoco desarrollaron signos clínicos de anaplasmosis o produjeron inmunoglobulinas específicas en respuesta al estímulo de la presencia del antígeno. En este estudio, el hallazgo de las inclusiones se apreció sólo en la estirpe celular de córnea, sin embargo, éstas no llegaron a carácter de colonia, formación mencionada por Munderloh *et al*<sup>(11)</sup> cuando se cultivó con la misma estirpe, probablemente porque en dicho estudio el inóculo de *A. marginale* provenía de un cultivo en células de garrapata *Ixodes scapularis*, previamente establecido. En cuanto a la viabilidad de *A. marginale* en eritrocitos, empleando un modelo de extinción por diluciones, en el que diariamente se reemplazó gran parte del volumen del medio de cultivo y tomando en cuenta la adición de eritrocitos normales, observamos que los eritrocitos infectados inoculados originalmente (día cero), debieron haber desaparecido para el día 13 del cultivo; por lo que en teoría, tomando en cuenta el factor de dilución y su número, los Ei apreciados a partir del día 14 posiblemente 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 evidenciaron los cuerpos inclusión, mientras que

*marginale* inside the nucleated cell, since neither sagittal nor cross-section observations were made.

Faced with this unsatisfactory panorama, another methodology was implemented, where two cell populations were co-cultured, one is the typical host cell and another one non-typical. The most promising result was obtained with the co-culture methodology, because sustaining the bacterium within the erythrocytes for more than 84 d was accomplished, superior to what has been described in prior studies<sup>(35)</sup>. Regarding the co-culture procedure informed by Wanghela<sup>(33)</sup>, in the present study different cell lines, media and culture handling were used; the number of days in culture was surpassed, up to 149 d, a greater period than the maximum of 112 d (16 wk) already reported. Additionally, one of the experimental animals showed response of specific total G immunoglobulins against *A. marginale*; however, the presence of the bacterium in the nucleated cells was not convincing, the inclusions could be observed only at the periphery of the cellular nucleus, which was a similar situation to that published by Blouin *et al*<sup>(37)</sup>, who used the turbinated cells as support and of aorta of bovine inoculated with *A. marginale* coming from cells of the salivary gland of the tick; that cultured biological material was administered to susceptible bovines that neither developed clinical signs of anaplasmosis nor produced specific immunoglobulins in response to the stimulus of the presence of the antigen. In the present study, the finding of the inclusions was observed only in the cell line of the cornea, however, these did not reach the character of a colony, formation mentioned by Munderloh *et al*<sup>(11)</sup> when it was cultivated with the same line, probably because in such study the inoculum of *A. marginale* came from a culture of *Ixodes scapularis* tick cells, previously established. Regarding the viability of *A. marginale* in erythrocytes, using an dilutions extinction model, in which a large part of the volume of the growth medium was daily replaced and considering the addition of normal erythrocytes, we observed that the originally inoculated infected erythrocytes (on day zero), must have been disappeared by the 13<sup>th</sup> d of the culture; which in theory, taking into account the dilution factor and its number, the

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, indicando que el microorganismo se encontraba viable conservando su capacidad invasiva, independientemente de la cepa o aislado y tipo de línea celular. Con la aplicación de las diversas metodologías diseñadas para la detección de *A. marginale* inicialmente se pretendió distinguir a la rickettsia en un entorno diferente de su célula huésped y eventualmente esclarecer el papel de la célula endotelial en el desarrollo de la bacteria, si es que interviene, como se ha planteado por otros autores<sup>(30)</sup>. En definitiva, la célula endotelial contribuyó favorablemente en el 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 las proteínas de superficie de *A. marginale*, posiblemente porque durante el cultivo hubo cambios de conformación en algunas de ellas que interactuaban con los eritrocitos y las células nucleadas. De hecho existen evidencias que muestran que presentan alteraciones en las características infectivas de esta rickettsia<sup>(37)</sup>. Pese a que se logra la demostración de la bacteria en las células hospederas al momento de inocularse en bovinos susceptibles, no se presenta anaplasmosis clínica o diferencias en la respuesta de anticuerpos específicos<sup>(38)</sup>, cuando se comparan con los testigos inoculados con células no expuestas a la rickettsia. Otros estudios han demostrado que 10  $\mu$ l de sangre infectada podrían ser suficientes para infectar a un animal adulto susceptible e inclusive causarle la muerte<sup>(39)</sup> y que no ocurrió en este trabajo.

La pérdida, modificación o ausencia en los cultivos celulares de algunas propiedades bacterianas determinantes en el proceso de infección *in vivo*, ponen en riesgo la capacidad infectiva de *A. marginale* hacia bovinos susceptibles. Las interacciones célula-célula durante un proceso infectivo son muy importantes. Estas regulan diversas vías de señalización importantes *in vitro* e *in vivo*. La adaptación *in vitro* de *A. marginale* en cada uno de los modelos experimentales en este

observed iE from d 14<sup>th</sup> possibly do not correspond to the inoculated on the day zero of the culture. Another aspect to consider is that before the increase in rickettsemia, with the smears taken from the bottom of the wells, the inclusion bodies were evident, whereas during the decreasing curve, these shapes were absent. The rickettsemia graphs of the co-culture tests presented cyclic of increments and decrements, indicating that the micro-organism was viable at conserving its invasive capacity, regardless of the strain or isolated and type of cell line. It was pretended with this implementation of the diverse methodologies designed for the detection of *A. marginale* that the rickettsia in an environment different of its host cell, would eventually clarify the role of the endothelial cell in the development of the bacterium, if it happens to intervene, as it has been proposed by other authors<sup>(30)</sup>. As a conclusion, the endothelial cell contributed favorably in the vital cycle of *A. marginale*.

The indirect IF technique applied to the co-cultured endothelial cells with infected erythrocytes provided unsatisfactory results since the monoclonal antibodies did not recognized the surface proteins of *A. marginale*, possibly because during the culture there were changes of conformation in some of them that interacted with the erythrocytes and the nucleated cells. In fact, there is evidence that show that they present alterations in the infective characteristics of this rickettsia<sup>(37)</sup>. Even though the demonstration of the bacteria in the host cells at the moment of inoculating them into susceptible bovines is obtained, the clinical anaplasmosis or differences in the response of specific antibodies<sup>(38)</sup> is not present when they are compared with the controls inoculated with unexposed cells to the rickettsia. Other studies have shown that as low as 10  $\mu$ l of infected blood would be enough to infect a susceptible adult animal and even to cause its death<sup>(39)</sup>, which did not occurred while conducting this study.

The loss, modification, or absence in the cell cultures of some determining bacterial properties in the process of *in vivo* infection set at risk the infective capacity of *A. marginale* towards susceptible bovines. The cell-to-cell interactions

trabajo pudieron generar en las formas infectivas de la bacteria; cambios moleculares de membrana, modificándose la señalización proteína-proteína entre los microorganismos y células huésped.

Cabe recordar que no fue posible encontrar la expresión evidente del gen *msp5* por PCR. Los cambios adaptativos se han explicado, en el caso de microorganismos parásitos intracelulares, como un proceso de evolución reductora<sup>(40,41)</sup>, 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<sup>(20,42)</sup>.

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. Por otro lado, ha sido demostrado el desarrollo de *A. marginale* en intestino y glándula salival de garrapatas, por ejemplo, del género *Dermacentor*<sup>(43,44)</sup> e *Ixodes*<sup>(45)</sup>. Los informes exitosos del cultivo *in vitro* de *A. marginale* involucran formas cultivadas obtenidas en células de garrapata. Las células infectadas son re-cultivadas en un soporte biológico de células endoteliales. Esa metodología, pretende simular lo que sucedería en la naturaleza: la rickettsia proveniente de un animal infectado se desarrolla en la garrapata y luego infecta al momento de alimentarse en otro animal. Es importante continuar con el estudio de la relación *in vitro* entre el eritrocito, células de garrapata y células endoteliales durante el establecimiento y preservación de *A. marginale* en cultivos viables. De esta forma y considerando en ciclo de infección característico de la rickettsias, se podrán mantener microorganismos con capacidad infectiva hacia bovinos susceptibles. 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 *A. marginale* únicamente con células endoteliales, no proporciona evidencia de la división de esta rickettsia en este huésped atípico. En conclusión, el cultivo *in vitro* de *Anaplasma marginale* debe replantearse empleando condiciones experimentales diferentes a las de este estudio, como

during the infection process are very important. These regulate several *in vitro* and *in vivo* ways of important signaling. The *in vitro* adaptation of *A. marginale* in each of the experimental models of this work could generate molecular changes of membrane in the infective forms of the bacterium, modifying the signaling of protein-protein among micro-organisms and host cells.

It is important to remember that it was not possible to find the evident expression of the *msp5* gene by PCR. The adaptive changes have been explained, in the case of intracellular parasitic micro-organisms, as a process of reductive evolution<sup>(40,41)</sup>, perhaps for this reason do not exist uniform patterns or standard protocols for the culture of this rickettsia, in comparison with culturing systems for other hemoparasites<sup>(20,42)</sup>.

The first studies of *in vitro* culture were performed in nucleated cell lines, for example, in bone marrow, kidney, or lymph nodes, without satisfactory results. On the other hand, the development of *A. marginale* in the intestine and the salivary gland of ticks, for example, of the *Dermacentor*<sup>(43,44)</sup> and *Ixodes*<sup>(45)</sup> genus, has already been demonstrated. The successful reports of the *in vitro* culture of *A. marginale* include cultured forms obtained in tick cells. The infected cells are re-cultured in a biological support of endothelial cells. That methodology pretends to simulate what would occur in nature: the rickettsia that comes from an infected animal develops in the tick and then infects at the moment of feeding at another animal. It is important to continue with the study of the *in vitro* relation among the erythrocyte, tick cells, and endothelial cells during the establishment and preservation of *A. marginale* in viable cultures. In this way, and considering the characteristic infection cycle of the rickettsia, it will be possible to maintain micro-organisms with infective capability towards susceptible bovines. It was convincing that *A. marginale* was preserved for more time in the presence of endothelial cells than with only erythrocytes. However, the *in vitro* culture of infected erythrocytes with *A. marginale* with only endothelial cells does not provide evidence of the division of this rickettsia in this atypical host. As a conclusion, the *in vitro*



podría ser el uso de inóculos con orígenes diversos a los utilizados. El cultivo bien podría iniciarse a partir de líneas celulares que hayan demostrado ser permisibles para el crecimiento de la rickettsia, como las de origen embrionario de garrapata y entonces, explorar la posibilidad de crecimiento en otras líneas celulares.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Carmen Clapp del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México por la donación de la línea celular endotelial BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub>.

Estudios parcialmente financiados por Proyecto CONACyT- SAGARPA 2004-C01-71 y Proyecto CONACyT N° 66872. Igualmente se agradece al CONACyT por la beca otorgada a G. Sarahí Luna-Castro para realizar sus estudios de Maestría.

## LITERATURA CITADA

1. Amerault TE, Mazola V, Roby TO. Gram-Staining characteristics of *Anaplasma marginale*. Am J Vet Res 1973;34(4):552-555.
2. Ristic M, Kreier JP. Bergey's Manual of systematic bacteriology. Krieg NR, Holt JG editors. Baltimore. Williams & Wilkins 1984;719-729.
3. 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.
4. 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.
5. Theiler A. Gall sickness of South Africa (Anaplasmosis in cattle). J Comp Pathol Therap 1910;23:98-115.
6. Theiler A. *Anaplasma marginale*. The marginal points in the blood of cattle suffering from a specific disease. Rept Govt Bacteriol. Transvaal So. Africa 1910;7:1908-1909.
7. Luna CGS, Orozco VLE, Vega y MCA, Rodríguez CSD, Ramírez NP. El cultivo *in vitro* de *Anaplasma marginale*: ¿evolución ó involución? En: Moreno CR editor. UNAM: Ciencia Veterinaria; 2007(10):174-208.

culture of *Anaplasma marginale* must be reconsidered using different experimental conditions than the ones presented in this study, as it could be with the use of inocula with diverse origins than the ones utilized here. The culture could be initiated from the cell lines that have had demonstrated to be permissible for the growth of the rickettsia, as the ones of tick embryonic origin, and then explore the possibility of growth in other cell lines.

## ACKNOWLEDGEMENTS

To Dr. Carmen Clapp from the Institute of Neurobiology of the National Autonomous University of Mexico for the donation of the BUVEC E<sub>6</sub>E<sub>7</sub> endothelial cell line. Studies partially financed by CONACyT- SAGARPA 2004-C01-71 Project and CONACyT Project No. 66872. Thanks are given to CONACyT for the scholarship granted to G. Sarahí Luna-Castro to pursue studies at the Master's level.

*End of english version*

- 
8. Orozco VL. Comportamiento de *Anaplasma marginale* en condiciones de laboratorio [tesis maestría]. México, DF: Universidad Nacional Autónoma de México; 1990.
  9. Castañeda JM, Mosqueda GJ, Rojas RE, Rodríguez CS, Vega y MC. Evaluación de la supervivencia de *Anaplasma marginale* en cultivo estacionario microaerofílico [resumen]. XXX Congreso Nacional de Buiatría. Acapulco, Guerrero. 2006:145.
  10. 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.
  11. 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.
  12. SAGARPA: NOM-031-ZOO-1995 Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). Publicada el 8 de marzo de 1996 y modificada el 27 de agosto de 1998.
  13. SAGARPA: NOM-041-ZOO-1995 Campaña Nacional contra la Brucelosis de los Animales. Publicada el 20 de agosto de 1996 y modificada el 20 de enero de 1997.
  14. Tello RM, Álvarez MJA, Ramos AJA, Aboytes TR, Cantó AGJ. La prueba de ELISA en el diagnóstico de la anaplasmosis. Téc Pecu Méx 1986;(52):45-50.

15. Jiménez OR, Rodríguez CS, Rosario CR, Orozco VL, De la Fuente J. *Anaplasma marginale*: análisis de las secuencias del fragmento variable del gen *msp1a* y del gen *msp4* de cuatro nuevas cepas mexicanas. *Téc Pecu Méx* 2008;46(1):69-78.
16. 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.
17. García OMA, Angeles OLE, Hernández SG, García TD, Aboytes TR, Rodríguez CSD. Caracterización de la virulencia de un aislado mexicano de *Anaplasma marginale*. *Téc Pecu Méx* 1998;36:197-202.
18. De la Fuente J, García-García J, Blouin EF, Rodríguez SD, García MA, Kocan KM. Evolution and function of repeats in the major surface protein 1a of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Anim Health Res Rev* 2001;2:163-173.
19. 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.
20. Vega CA, Buening GM, Green TJ, Carson CA. *In vitro* cultivation of *Babesia bigemina*. *Am J Vet Res* 1985;46:416-420.
21. 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.
22. 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. *Eur J Cell Biol* 2002;81:1-8.
23. 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.
24. 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.
25. Serwer P. Agarose gels: Properties and use for electrophoresis. *Electrophoresis* 1983;4:375-382.
26. 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.
27. Morilla AG, Bautista CG. Manual de Inmunología. México DF: Diana, 1986:111-114.
28. Lane D. Antibodies. A laboratory manual. Ed. Harlow. 1988.
29. Marchisio PC, Trusolino L. Immunofluorescence in cell culture. In: *Methods in molecular biology. Adhesion protein protocols.* Dejana E, Corada M editors. USA: Human Press; 1999(96):85-92.
30. 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.
31. Carter GR, Cole JR. Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology. 5° ed. USA: Academic Press; 1990:524-525.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. Blouin EF, Kocan KM, Murphy GL, Ge N. Persistence of tick-derived *Anaplasma marginale* in cultured bovine turbinate and endothelial cells. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 1993;46:49-56.
39. 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.
40. Andersson SG, Kurland CG. Reductive evolution of resident genomes. *Trends Microbiol* 1998;6(7):263-268.
41. Wren BW. Microbial genome analysis: insights into virulence, host adaptation and evolution. *Nat Rev Gen* 2000;1:30-39.
42. Trager W, Jensen J. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 1976;193:673-675.
43. 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.
44. 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.
45. 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.