

DESHIDRATACIÓN Y RECONSTITUCIÓN DE ERITROCITOS PARASITADOS CON *Babesia spp.* PARA SU USO COMO INMUNOPROFILÁCTICO

Área del Conocimiento: Agropecuaria
Becario: SOLÍS, José Alberto
Directora: LOZINA, Laura

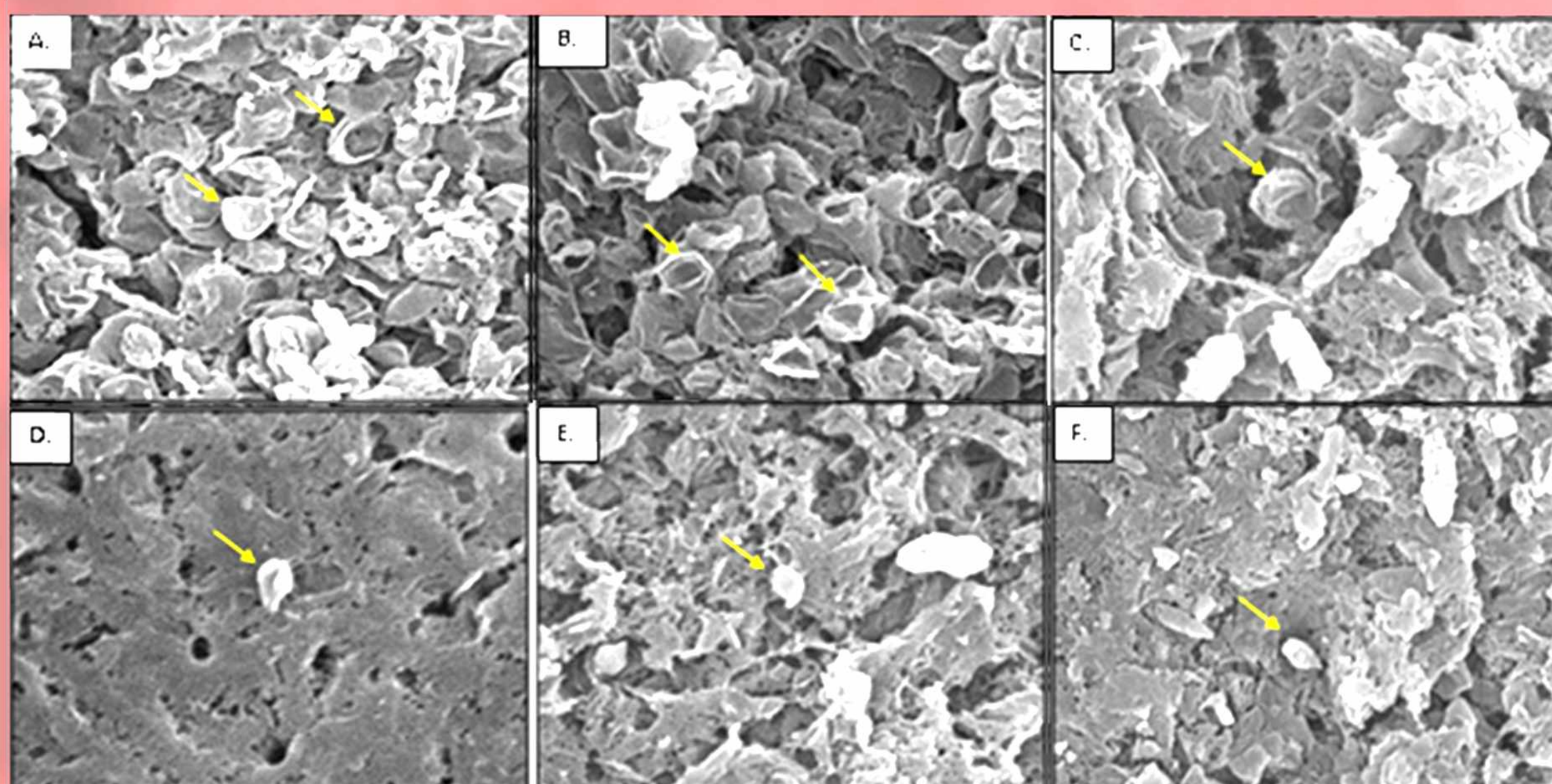
Facultad: Ciencias Veterinarias
E-mail: josesolis@gmail.com

Objetivo

El objetivo del presente trabajo consistió en comparar, por diferentes técnicas microscópicas, la morfología de eritrocitos parasitados con *B. bovis* y *B. bigemina*, deshidratados por *spray-drying* y liofilización para la elaboración de una vacuna para la profilaxis de la tristeza bovina.

Materiales y Métodos

Se iniciaron cultivos *in vitro* a partir de eritrocitos parasitados con *Babesia bovis* R1A y *Babesia bigemina* S1A, cepas vacunales, criopreservadas. Mediante centrifugación, se descartó el sobrenadante (SN), y el paquete globular (PG) fue fraccionado. Diferentes alícuotas fueron mezcladas en partes iguales con soluciones criopreservadoras: Dimetilsulfóxido (DMSO), Polivinilpirrolidona (PVP), Glicerol y Dextrosa, respectivamente. Las suspensiones así obtenidas fueron sometidas al proceso de deshidratación por liofilización. Por otro lado, otra fracción del PG, fue deshidratada por *spray-drying*, sin la utilización de adyuvantes de secado. Mediante ambos procesos, se obtuvo un polvo fino y uniforme. Posteriormente, dicho material fue rehidratado con solución buffer fosfato (PBP) (Fig. A y B), solución Vega y Martínez (VYM), agua destilada, solución de sacarosa 0,25 (Fig. C y D), 0,50 y 1 M y solución fisiológica (Fig. E y F). Los GR así reconstituidos, fueron evaluados respecto a morfología e integridad de membrana mediante microscopía óptica (MO) por extendidos teñidos con Giemsa y microscopía de barrido electrónico (MEB).



Imágenes de eritrocitos obtenidas con microscopio electrónico de barrido.

A. Eritrocitos parasitados con *B. bovis*, liofilizados y reconstituidos con buffer fosfato. B. Eritrocitos parasitados con *B. bigemina*, deshidratados por aspersión y reconstituidos con buffer fosfato. C. Eritrocitos parasitados con *B. bovis*, liofilizados y reconstituidos con solución de sacarosa 0,25 M. D. Eritrocitos parasitados con *B. bigemina*, deshidratados por aspersión y reconstituidos con solución de sacarosa 0,25 M. E. Eritrocitos parasitados con *B. bovis*, liofilizados y reconstituidos con solución fisiológica. F. Eritrocitos parasitados con *B. bigemina*, deshidratados por aspersión y reconstituidos con solución fisiológica. La flecha indica GR deshidratado y reconstituido. Observado en 5000X.

Resultados y Discusión

En las condiciones de trabajo, el crioprotector más adecuado para el proceso de liofilización fue la PVP, que permitió una correcta deshidratación del material, no logrando resultados favorables al usar glicerol, DMSO y dextrosa. La reconstitución del PG liofilizado dejó en evidencia que la solución de sacarosa 0,25 M y el PBS presentaron un alto porcentaje de recuperación relativa, determinado por MO, logrando observar hasta un 50% de eritrocitos liofilizados con morfología conservada al utilizar el primero, bajando dicha tasa de recuperación a 30% con PBS. Por su parte, los demás reconstituyentes no lograron proveer un medio adecuado para la rehidratación del PG. Mediante la técnica de *spray-drying* se logró una adecuada deshidratación de las distintas suspensiones, sin embargo, no se logró un porcentaje de recuperación celular considerable con ninguna de las soluciones de rehidratantes. Por otro lado, la observación del reconstituido utilizando MEB evidenció eritrocitos aislados con una morfología relativamente conservada al usar PBS como disolvente, siendo en segundo lugar la solución de sacarosa 0,25 M y posteriormente la solución salina los mejores reconstituyentes para ambos deshidratados. El tamaño de los eritrocitos osciló entre 3 a 5 micras, pudiéndose apreciar una reducción entre el 20 a 50% de su tamaño normal. Estos resultados, alientan a la continuar con la puesta a punto de las técnicas de conservación propuestas, ya que, si los GR son capaces de mantener su morfología, un comportamiento similar podría esperarse para los hemoparásitos.

Bibliografía

- Aguirre D, Mangold A, Ríos L, Guglielmone A. Respuesta clínica y Evolución del peso corporal en terneras (*Bos Taurus*) vacunadas simultáneamente contra babesiosis y anaplasmosis con inmunógenos vivos. Med. Vet. 1991; 8:95-101.
- Alves-Filho O, Bergslien O, Bjork P, Magne Eikevik T, Strommen I. Reconstitutable Dried Blood Products. 2006. United States Patent.
- Ristic M & Levy M. *Babesia bovis*: continuous cultivation in a microaerophilous stationary phase culture. Science. 1980; 207:1218-20.
- Vega C, Buening G, Green T, Carson C. In vitro cultivation of *Babesia bigemina*. Am J Vet Res 1985; 46:416-420.