



Universidad Nacional del Nordeste
Facultad de Ciencias Veterinarias
Corrientes – Argentina

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

OPCIÓN: CLÍNICA DE GRANDES ANIMALES.

TÍTULO: “DESHIDRATACIÓN Y RECONSTITUCIÓN DE ERITROCITOS PARASITADOS CON *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* PARA PERMITIR SU USO COMO INMUNOPROFILÁCTICO”.

TUTOR EXTERNO: Dra. Laura Analía Lozina

TUTOR INTERNO: MV. Florencia Del Río Álvarez

RESIDENTE: José Alberto Solís

e-mail: josesolisk@gmail.com

Año 2022

INDICE

RESUMEN..... 1

INTRODUCCIÓN..... 2

OBJETIVO GENERAL 4

OBJETIVOS PARTICULARES 4

MATERIALES Y MÉTODOS..... 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 7

CONCLUSIÓN..... 13

BIBLIOGRAFÍA..... 14

RESUMEN

El objetivo planteado en el presente trabajo consiste en la búsqueda y puesta a punto de un nuevo método inmunoproláctico frente a la Babesiosis bovina, que implique una vacuna en su versión deshidratada. Para esto, se realizó la comparación de técnicas de deshidratación de glóbulos rojos (GR), como alternativas para la conservación de los hemoparásitos *Babesia bovis* (*B. bovis*) y *Babesia bigemina* (*B. bigemina*), que podrían ser utilizadas con fines inmunoprolácticos. Se iniciaron cultivos *in vitro* a partir de eritrocitos parasitados con *B. bovis* y *B. bigemina*. Los GR obtenidos en fase estacionaria fueron centrifugados y separados del sobrenadante (SN), el cual fue descartado. El paquete globular (PG) fue mezclado en partes iguales con soluciones criopreservadoras: Dimetilsulfóxido (DMSO), Polivinilpirrolidona (PVP), Glicerol y Dextrosa. Las suspensiones preparadas, se dispusieron en crioviales que pasaron a una curva de congelación y fueron sometidas a un proceso de liofilización. Se incluyó, además, el secado por *spray-drying*. Por ambas técnicas se obtuvo un polvo fino, uniforme y adecuadamente deshidratado. A partir de éstos, se realizaron reconstituciones con buffer fosfato (PBS), solución de Vega y Martínez (VYM), solución fisiológica, agua destilada y solución de sacarosa 0,25, 0,50 y 1 M. Fueron evaluados morfología e integridad de membrana a través de microscopía óptica, microscopía de barrido electrónico, técnicas de hemocitometría y tinciones vitales, como Azul de Tripán. Se evidenció entonces, que el crioprotector más adecuado es la PVP y que el mejor reconstituyente, tanto para los glóbulos rojos liofilizados como para los secados por aspersión fue la solución de sacarosa 0,25 M. Se obtuvieron mejores condiciones de recuperación de los eritrocitos reconstituidos en los liofilizados respecto de los obtenidos por pulverización, pudiéndose apreciar un alto número de glóbulos rojos liofilizados y reconstituidos con morfología conservada. De esta manera, se logró la deshidratación y evaluación de los reconstruidos, siendo necesarios estudios posteriores utilizando el inmunógeno en la especie susceptible.

INTRODUCCIÓN

La anaplasmosis y la babesiosis de los bovinos son uno de los mayores problemas sanitarios para la producción ganadera en el Norte de Argentina y vastas regiones tropicales y subtropicales del mundo. Comúnmente se las conoce con el nombre de complejo tristeza bovina, ya que comparten signos clínicos y características epidemiológicas que permiten analizarlas en conjunto, tales como cuadros de anemia y decaimiento, una inmunidad natural de los terneros y la protección persistente conferida por una infección única. Los agentes causales son la rickettsia *Anaplasma marginale* (*A. marginale*) y los protozoos *B. bovis* y *B. bigemina*, transmitidos por la garrapata común del ganado bovino *Rhipicephalus microplus*. La picadura por garrapatas infectadas da lugar a cuadros clínicos en bovinos adultos, pero los terneros menores de 10 meses no desarrollan síntomas, por mecanismos de inmunidad innata. En zonas de desequilibrio enzoótico, con números de garrapatas oscilantes por factores climáticos o de manejo, puede ocurrir que los bovinos lleguen a edad adulta sin haber recibido una inmunización natural con *Babesia spp.*, con el consecuente riesgo de brotes de tristeza bovina al restablecerse la población de garrapatas infectadas. En el caso particular de *A. marginale*, esta se transmite además a través de la picadura de insectos hematófagos (tábanos, mosquitos, etc.) y de forma iatrogénica (castración, descorne, utilización de instrumental contaminado, entre otros).

Las enfermedades hemotrópicas como la anaplasmosis y la babesiosis bovina y sus vectores, se consideran uno de los principales factores limitantes para el desarrollo genético y zootécnico de los sistemas de producción bovina (Álvarez, 1991).

Estas constituyen un gran impacto económico que se corresponden entre otras cosas con una disminución marcada de la producción láctea y de carne, pérdida de animales valiosos desde el punto de vista productivo, abortos, cuantiosos gastos en la aplicación de productos farmacéuticos para el tratamiento y control respectivo (Konigshoefer, 1997). Además, es importante resaltar que estas enfermedades tienen un carácter enzoótico y ocasionalmente se comportan de una manera epizootica (brotes), con amplia distribución geográfica en las regiones ganaderas de nuestro país (Acha, 2003).

El método inmunoproláctico aplicando un inmunógeno a base de microorganismos atenuados, desarrollado por el INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria), de comprobada eficacia para controlar el impacto de la tristeza bovina en los sistemas de producción ganaderos, representa una herramienta importante utilizada en nuestro

país. Las vacunas, confieren protección luego de una sola aplicación, y se recomienda su uso en bovinos menores a un año de edad. Existen disponibles dos presentaciones de estas; fresca, con una duración de siete días y criopreservada, con una duración de dos años desde su elaboración. Ambas presentaciones poseen ciertos inconvenientes, así, en el primer caso, el tiempo, por sus características extemporáneas es el factor limitante; y en el segundo caso, el requerimiento de termos de nitrógeno líquido para su traslado y manipulación (Aguirre *et al.*, 1991). Por todo esto, en el presente trabajo se realizó la comparación de técnicas de deshidratación de glóbulos rojos, como una alternativa en la conservación del hemoparásito que podría ser utilizada con fines inmunoproliféricos.

Por un lado, la liofilización ofrece una deshidratación precedida por el congelado de los glóbulos rojos, lo que implica el uso de adyuvantes. Las cepas de *B. bovis* y *B. bigemina* pueden ser criopreservadas y mantenidas en nitrógeno líquido utilizando el polímero PVP, y son reactivadas adecuadamente en condiciones de microaerofilia (en una atmósfera de CO₂ 5%, O₂ 5% y balance nitrógeno) (Palmer *et al.*, 1982). Las soluciones de PVP e hidratos de carbono, en especial los monosacáridos, proporcionan medios que permiten que los eritrocitos sean sometidos a los esfuerzos de congelación y reconstitución y que formen células de sangre roja que, reconstituídas, sean capaces de funcionar normalmente en el mamífero (Goodrich, R. y Williams, C., 1989). Al ser un criopreservador de elevado peso molecular no puede atravesar la membrana celular, actuando en el medio extracelular promoviendo una rápida deshidratación de la membrana por efecto osmótico (Cossio Bayugaret *et al.*, 2011). Existen antecedentes de la liofilización y reactivación de esporozoitos de *Theileria parva*, utilizados para la inmunización del ganado contra la fiebre de la costa oriental (Marcotty *et al.*, 2003). Asimismo, se ensayó la liofilización para la preservación a largo plazo de células madres mesenquimales derivadas de médula ósea humana cargadas con trehalosa proporcionando una alta tasa de recuperación (Zhang *et al.*, 2010).

Por su parte, el Spray-dry implica la pulverización de los glóbulos rojos, creando una mayor superficie de contacto, a la que se le aplica calor como método de deshidratación. Existen antecedentes donde se ha logrado la puesta a punto de esta técnica para glóbulos rojos humanos con fines de transfusión (Alves-Filho *et al.*, 2006). La deshidratación por pulverización de compuestos utilizados en la industria farmacéutica se encuentra reportado en la memoria descriptiva de la patente de Tarara *et al.*, (2003).

Esta propuesta implica la evaluación de ensayos de liofilización y deshidratación por pulverización de dos de los componentes de la vacuna trivalente para la profilaxis de la

tristeza bovina. El procedimiento tiene en cuenta la deshidratación de eritrocitos parasitados bajo condiciones que mantendrían la estructura de la célula y la actividad biológica como un potencial inmunogénico.

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar morfología y viabilidad de eritrocitos parasitados con *B. bovis* y *B. bigemina*, deshidratados por spray-drying y liofilización.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Puesta a punto de técnicas de cultivo *in vitro* de *B. bovis* y *B. bigemina*, para la formación de un banco de material parasitario “estabilizado”, de propiedades conocidas: inmunogenicidad, atenuación y ausencia de transmisibilidad por garrapatas.
- Puesta a punto de deshidratación por spray-drying y liofilización.
- Utilización de diferentes técnicas microscópicas para la comparación morfológica de los eritrocitos parasitados reconstituidos.
- Reconstitución del paquete globular deshidratado y reactivación de cepas en cultivos *in vitro* en fase estacionaria en condiciones de microaerofilia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de trabajo: Cátedra de Farmacología y Toxicología y Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Nordeste. Calle Sargento Cabral 2139 Corrientes (Capital) CP 3400 Teléfono: 03794-425753 Interno 146.

Cultivo y mantenimiento de cepas: eritrocitos parasitados fueron obtenidos a partir de cultivos *in vitro* en fase estacionaria en condiciones de microaerofilia de 48 horas de *B. bovis* y *B. bigemina*, cepas vacunales, según protocolos establecidos por Ristic & Levy (1980). Se iniciaron los cultivos a partir de criviales, proporcionados por el Laboratorio Litoral Biológicos S.R.L. (Puerto Tirol, Chaco), preservados con PVP disuelta en VYM (Vega *et al.*, 1985) en una atmósfera de CO₂ 5%, O₂ 5% y balance de N₂ 90%. Los cultivos *in vitro* contienen un 10% de paquete globular (PG) y medio completo (MC) formulado con 60% de Medio 199 y 40% de suero normal bovino. El

cambio de medio se realizó cada 24 horas, desechando el sobrenadante (SN) que contiene residuos del metabolismo de los eritrocitos y protozoarios, y reemplazándolo con MC nuevo. Cada 48 horas, se realizaron subcultivos para evitar el exceso de hemoparásitos. Una vez logradas parasitemias superiores a 10% y 7% para *B. bovis* y *B. bigemina*, respectivamente, los eritrocitos fueron centrifugados a 2500 rpm durante 10 min a 4°C, se desechó el SN y el PG fue colectado para su deshidratación.

Deshidratación por liofilización: el PG fue fraccionado y mezclado en partes iguales con solución al 10% de PVP disuelta en solución VYM, tampón liofilizante conteniendo una concentración 2 M de dextrosa en solución de PBS a pH 7,2, tampón liofilizante conteniendo una concentración de 1,5 M de glicerol en solución de PBS a pH 7,2 y tampón liofilizante conteniendo 50% DMSO en solución de PBS a pH 7,2.

La suspensión de eritrocitos, con la adición de criopreservadores, se transfirió a crioviales en alícuotas de 5 ml. Posteriormente, fueron expuestos a la fase de vapor del nitrógeno líquido, congelado a una tasa de 20°C/min, en una unidad de congelación programable. Cuando la temperatura alcanzó -80°C los viales se trasladaron rápidamente al termo de nitrógeno líquido. Las muestras congeladas fueron transferidas a un liofilizador de banco superior (L-T8-A-B3T- Fabricado por RITIFICOR) que funciona a menos de 100 mmHg con una temperatura de cámara interior de -56°C. Las muestras fueron dejadas hasta que se deshidraten a fondo (6 - 24 horas). Posteriormente se dejó que los tubos vuelvan a temperatura ambiente. Los liofilizados fueron mantenidos en freezer a -20°C hasta su uso.

Deshidratación por spray-drying: el PG mantenido a 4°C fue fraccionado en alícuotas y secado por aspersión en un Mini Spray Dryer Buchi B-290 (BÜCHI Labortechnik AG.), de la Facultad de Ciencias Químicas (UNC), bajo condiciones controladas, a saber: temperatura de ingreso: 45°C, aspiración: 75%, bomba: 5%, nozzlecleaner: 2 rotámetro: 50 mmHg. Finalizada la deshidratación, el material se mantuvo a 4°C hasta su uso.

Reconstitución de las muestras: el PG se volvió a hidratar a 37°C usando diferentes reconstituyentes: soluciones de sacarosa (0,25, 0,5 y 1 M), solución salina 0,9%, VYM, PBS y agua destilada. Se añadió un volumen de solución rehidratante equivalente al volumen inicial de la muestra antes de la deshidratación.

Microscopía óptica: los rehidratados fueron homogeneizados suavemente en placas de 24 pocillos, asegurando la reconstitución completa del deshidratado. Se realizaron extendidos finos, fijados con Metanol y teñidos con Giemsa al 10% que fueron observados en un microscopio óptico (MO) marca Olympus CX 31 con objetivo de 100x.

Microscopía electrónica de Barrido: se procedió a fijar en una membrana 0,22 μm de Nylon, usando formol al 10%. Las muestras fueron deshidratadas, usando alcohol al 70% y secadas a punto crítico con CO₂ líquido, durante 15 minutos. Posteriormente fueron montadas en papel aluminio y metalizadas con oro paladio. Se realizó la observación en un microscopio electrónico de barrido (MEB) marca JEOL 5800 LV.

Reactivación de las cepas deshidratadas en cultivos *in vitro*: se realizó la incubación de GR parasitados con *Babesia spp.* y deshidratados por liofilización y por aspersión en placas de 24 pocillos y botellas de cultivo F25. La reconstitución de los volúmenes fue a partir de 20 ml totales de MC y 5% de GR. Las placas y botellas se mantuvieron en cámara incubadora con una mezcla especial de gases (CO₂: 5%; O₂: 5%; balance de N₂: 90%), y se dejaron cinco días con tres pasajes de gases diarios, dentro de una incubadora de CO₂ a 37°C y humedad del 80%. Cada 24 horas, 800 μl y 10 ml del SN, respectivamente, fueron removidos de los cultivos y reemplazado por la misma cantidad de MC, asimismo, cada 48 horas se realizó el cambio de medio hasta completar los cinco días. Para determinar la parasitemia se procedió a realizar diariamente frotis teñidos con Giemsa al 10%.

Hemocitometría y tinciones vitales: el PG, fresco y deshidratado por ambas técnicas, fue diluido utilizando una pipeta de Thoma para GR. En cada caso, se cargó el PG hasta la marca 0,5 y diluyente hasta enrasar en 101. El diluyente usado para el PG fresco, fue solución salina 0,9%, mientras que para el PG deshidratado, se utilizó la misma solución en la que fueron rehidratados. Se procedió a incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente, con una solución al 4% de Azul de Tripán en PBS. Posteriormente, fue observado utilizando Cámara de Neubauer en MO con objetivo de 40x para realizar el recuento de células vivas y muertas. Se contabilizaron 5 cuadrantes medianos del cuadrante principal, en forma de zigzag, considerando como viables a

aquellos GR que, por presentar una membrana celular intacta, no permiten la penetración del colorante y no se tiñen de azul.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del proceso de liofilización mostraron que las suspensiones de eritrocitos parasitados con *Babesia* spp. utilizando 1,5 M de glicerol en solución de PBS no se deshidrataron adecuadamente, lo cual podría deberse a una posible ebullición del contenido de los crioviales. Similares resultados se obtuvieron con las soluciones de Dextrosa y DMSO. Sin embargo, las muestras que utilizaron PVP como lioprotector dieron como resultado un polvo adecuadamente deshidratado, con aspecto cristalino y quebradizo al tacto.

A partir del proceso de secado por aspersión se obtuvo un polvo fino, homogéneo y adecuadamente deshidratado. El rendimiento de secado del PG fue de 35,8% para *B. bovis* y de 35,6% para *B. bigemina*.

La reconstitución del PG liofilizado con los diferentes disolventes evidenció que la solución de sacarosa 0,25 M y el PBS presentaron un alto porcentaje de recuperación “relativa” determinado por observación bajo MO en objetivo de inmersión, al realizar la comparación entre extendidos de GR frescos y GR rehidratados. Se evidenció que hasta un 50% de los eritrocitos liofilizados presentaron una morfología conservada al utilizar solución de sacarosa 0,25 M en su reconstitución (Fig. 1: C y D), bajando dicha tasa de recuperación a 30% con PBS (Fig. 1: E y F). Los demás reconstituyentes no lograron proveer un medio adecuado para la rehidratación del PG liofilizado, bajo las condiciones ensayadas en el presente trabajo.

Por su parte, el PG pulverizado no logró un porcentaje de recuperación considerable, siendo el mismo menor al 20% al utilizar solución de sacarosa 0,25 M (Fig. 2: A y B) y por debajo del 10% para las demás soluciones rehidratantes (Fig. 2: C y D).

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 (Fig. 3). El tamaño de los eritrocitos osciló entre 3 a 5 μm , pudiéndose apreciar una reducción de entre el 50 a 20% de su tamaño normal.

Respecto a la reactivación de los parásitos contenidos en los eritrocitos deshidratados, luego de 5 días de incubación en cámara de gases, no fue posible lograr un aumento en la parasitemia en los cultivos iniciados a partir del PG deshidratado por las técnicas utilizadas.

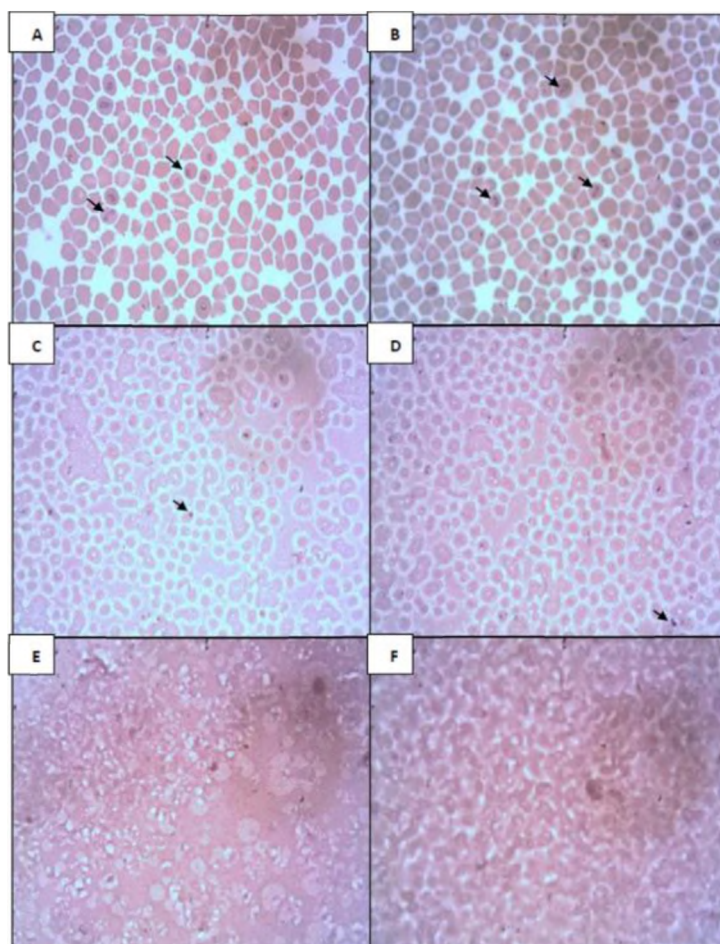


Figura 1: Imágenes de eritrocitos luego del proceso de liofilización. **A.** Frotis de cultivo *in vitro* de *B. bovis* (control). **B.** Frotis de cultivo *in vitro* de *B. bigemina* (control). **C.** Frotis de eritrocitos parasitados con *B. bovis*, liofilizados y reconstituidos con solución de sacarosa 0,25 M. **D.** Frotis de eritrocitos parasitados con *B. bigemina*, liofilizados y reconstituidos con solución de sacarosa 0,25 M. **E.** Frotis de eritrocitos parasitados con *B. bovis*, liofilizados y reconstituidos con buffer fosfato. **F.** Frotis de eritrocitos parasitados con *B. bigemina*, liofilizados y reconstituidos con buffer fosfato. La flecha indica merozoitos de *Babesia* spp. Observado con objetivo 100X.

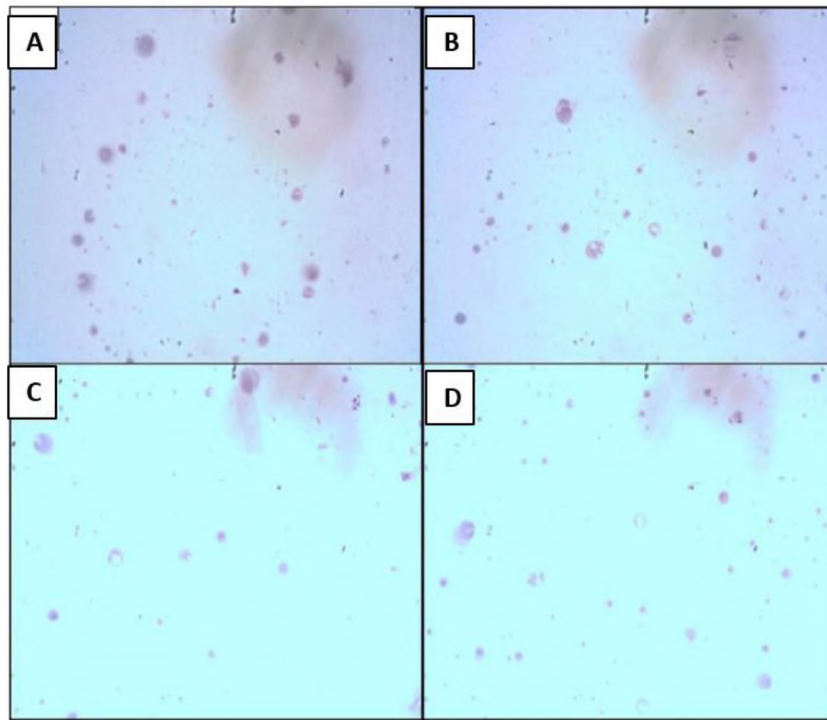


Figura 2: Imágenes de frotis de *Spray-drying*. **A.** Frotis de eritrocitos parasitados con *B. bovis*, deshidratados por aspersión y reconstituidos con solución de sacarosa 0,25 M. **B.** Frotis de eritrocitos parasitados con *B. bigemina*, deshidratados por aspersión y reconstituidos con solución de sacarosa 0,25 M. **C.** Frotis de eritrocitos parasitados con *B. bovis*, deshidratados por aspersión y reconstituidos con buffer fosfato. **D.** Frotis de eritrocitos parasitados con *B. bigemina*, deshidratados por aspersión y reconstituidos con buffer fosfato.

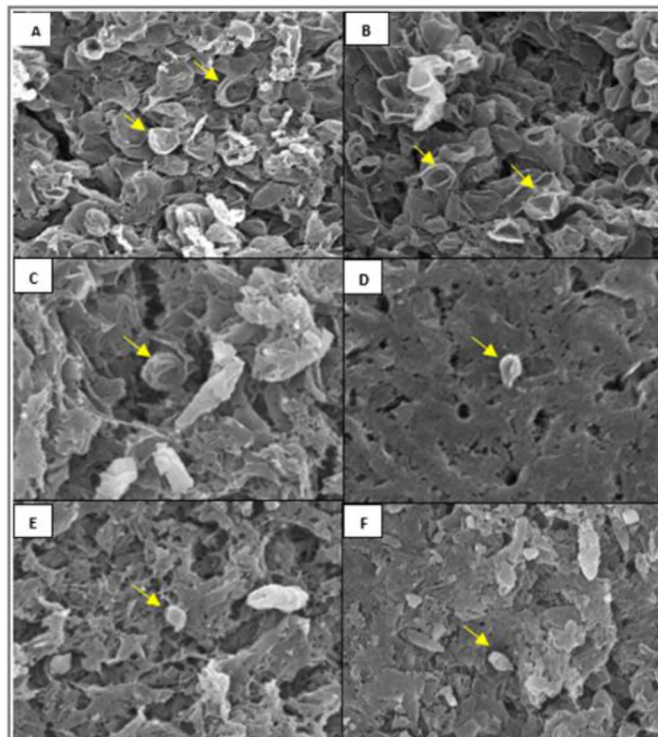


Figura 3: Imágenes de eritrocitos obtenidas con microscopio electrónico de barrido. **A.** Eritrocitos parasitados con *B. bovis*, liofilizados y reconstituidos con buffer fosfato. **B.** Eritrocitos parasitados con *B. bigemina*, deshidratados por aspersión y reconstituidos con buffer fosfato. **C.** 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.

Como se mencionara previamente, los resultados del proceso de liofilización mostraron que las suspensiones de eritrocitos parasitados con *Babesia* spp. utilizando 1,5 M de glicerol en solución de PBS no se deshidrataron de forma adecuada, similares resultados se obtuvieron con las soluciones de dextrosa y DMSO. Sin embargo, bajo las condiciones del presente trabajo, la PVP fue el crioprotector más adecuado, dando como resultado un polvo adecuadamente deshidratado, con aspecto cristalino y quebradizo al tacto. Las soluciones de alto peso molecular proveen eritrocitos capaces de resistir a los esfuerzos de congelación y reconstitución. Su propiedad de no atravesar la membrana, facilita significativamente su eliminación después de la descongelación, proporcionando células de sangre roja deshidratadas por congelación que pueden ser reconstituidas (Cossio Bayugar *et al.*, 2011). Por su parte, los criopreservadores constituidos por compuestos de bajo peso molecular, como lo son el DMSO y glicerol, son permeables a la membrana y actúan desplazando el agua del interior de la célula evitando así la formación de cristales de hielo intracelulares. Estas sustancias llamadas penetrantes, se utilizan en congelaciones a velocidad muy lenta. Con la curva de liofilización utilizada aquí, se observó una incompleta deshidratación de las muestras cuando se utilizaron estas sustancias. Esto puede explicarse por la temperatura eutéctica de la mezcla de altas concentraciones de glicerol y PG. Según lo demostrado por Day & Stacey (2007), si bien es posible lograr la liofilización utilizando glicerol y/o DMSO como lioprotector, la curva de fases a la que debe someterse es incompatible con la curva ya estandarizada con el liofilizador disponible en nuestro laboratorio.

A partir del proceso de secado por aspersión se obtuvo un polvo fino, homogéneo y adecuadamente deshidratado. El rendimiento de secado del PG fue de 35,8% para *B. bovis* y de 35,6% para *B. bigemina*. Sin embargo, no se logró un porcentaje de recuperación considerable, siendo el mismo menor al 20% al utilizar solución de

sacarosa 0,25 M y por debajo del 10% para las demás soluciones rehidratantes (no mostrado). Existen antecedentes de esta técnica donde los eritrocitos no solo mantienen su viabilidad, sino que también logran ser funcionales en un nuevo hospedador (Alves-Filho *et al.* 2006). Dichos autores elaboraron una patente de secado por aspersión de GR humanos, y reportaron condiciones de trabajo donde los eritrocitos fueron sometidos a temperaturas que no superaban la fisiológica para la especie, 37°C, manteniéndose preferiblemente en un rango de 1 a 10°C; condiciones que no fueron logradas en el presente trabajo, donde la temperatura de entrada fue de 45°C. Asimismo, en el presente trabajo, no se incorporaron adyuvantes de secado, en discrepancia con Alves-Filho *et al.*, (2006), quienes recomiendan un material protector macromolecular, soluble en agua y de peso molecular de entre 1000 a 2000 Da o una mezcla de dichas sustancias, conteniendo macromoléculas endógenas de la especie de la que deriva la sangre, como polisacáridos, proteínas y lípidos.

Un factor más a tener en cuenta, consiste en el almacenamiento de ambos deshidratados. En el presente trabajo, el PG secado por aspersión fue almacenado a 4°C y el liofilizado en freezer a -20°C. Según lo reportado por Zamora *et al.* (2006) quienes compararon estas técnicas de deshidratación sobre colonias de bacterias ácido lácticas, el daño celular debido al liofilizado se observó inmediatamente después del secado, mientras que el daño celular debido al secado por aspersión no se hizo evidente hasta la fase de almacenamiento.

La reconstitución del PG liofilizado con los diferentes disolventes evidenció que la solución de sacarosa 0,25 M y el PBS presentaron un alto porcentaje de recuperación “relativa” determinado por observación bajo MO, al realizar la comparación entre extendidos de GR frescos y GR rehidratados. Se evidenció que hasta un 50% de los eritrocitos liofilizados presentaron una morfología conservada al utilizar solución de sacarosa 0,25 M en su reconstitución, bajando dicha tasa de recuperación a 30% con PBS. Los demás reconstituyentes no lograron proveer un medio adecuado para la rehidratación del PG liofilizado, bajo las condiciones ensayadas en el presente trabajo. Estos resultados coinciden con los arrojados por Huang *et al.* (2017), quienes reportan que la liofilización sigue siendo la técnica preferida para preservar las bacterias probióticas, pero es un proceso costoso y que requiere mucho tiempo. Por su parte, en el secado por aspersión, el aumento en el área de la interfaz aire-líquido posterior a la pulverización aumenta drásticamente la cinética de secado, y generalmente se admite que el secado ocurre en unos pocos segundos. El PG pulverizado no logró un porcentaje

de recuperación considerable, siendo el mismo menor al 20% al utilizar solución de sacarosa 0,25 M y por debajo del 10% para las demás soluciones rehidratantes. En comparación con la liofilización, el secado por aspersión representa un menor costo energético específico y una mayor productividad. Pese a esto, sigue habiendo desafíos asociados con el uso del secado por atomización para producir cultivos viables, especialmente con cepas probióticas "sensibles" (Broeckx et al., 2016).

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 μ m, pudiéndose apreciar una reducción de entre el 50 a 20% de su tamaño normal. En el presente trabajo, se observaron discrepancias entre los resultados obtenidos con MO y MEB, donde la recuperación celular fue muy baja en el segundo método, independientemente de la técnica de deshidratación o reconstituyente empleado. Estos resultados podrían explicarse por el estrés celular agregado en los procedimientos de fijado y secado a punto crítico (SPC) que los GR, previamente deshidratados y reconstituidos, reciben al someterse al MEB, no logrando mantener la viabilidad de la membrana. Reportes de Inoue & Osatake (1988) indican que, a pesar de que el método de SPC se usa ampliamente para secar materiales biológicos para MEB, existen problemas de artefactos inherentes con el mismo. Por otro lado, el método de liofilización es otra técnica para secar muestras biológicas que contienen agua, considerado inclusive superior al de SPC debido a la contracción menos visible de la muestra. Sus estudios, recomiendan para muestras biológicas frágiles, como finas estructuras de tejidos y células, el uso de otros métodos de secado, distintos al de SPC.

CONCLUSIÓN

En conclusión, este trabajo muestra un procedimiento para la deshidratación de dos de los componentes de la vacuna trivalente para la profilaxis de la tristeza bovina. El procedimiento de liofilización probado aquí está de acuerdo con la regulación para consentir su uso en un nivel profiláctico, ya que se pudo lograr una reconstitución del 50% de eritrocitos parasitados con estructura conservada. En estudios posteriores sería necesario probar su inoculación en la especie susceptible, para evaluar la eficacia inmunoproláctica de los hemoparásitos contenidos en los eritrocitos. Este resultado ya es promisorio para la producción de una vacuna liofilizada, aunque las condiciones deben ponerse a punto.

BIBLIOGRAFÍA

Básica

- Álvarez MJA, Figueroa JV. 2007. Reseña del desarrollo de una vacuna contra la Babesiosis bovina en México. XXX Congreso Nacional de Buiatría: 10:138-148.
- Bock RE, Jackson L, De Vos AJ, Jorgensen W. 2004. Babesiosis del ganado. *Parasitología*; 129: S247- 20 69.
- Broeckx G, Vandenheuvel D, Claes IJ, Lebeer S, Kiekens F. 2016. Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *International Journal of Pharmaceutics*, 505 (1e2), 303e318.
- Cossio Bayugar R, Rojas Martinez C, Miranda E, Alvarez Martinez JA, Figueroa Millan JV, Vega y Murguía CA. 2011. Cultivo in vitro de *Babesia spp.* En: Cultivo in vitro de células animales y sus aplicaciones., INIFAP, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación- Jiutepec, 2 Morelos, México. Dic.2011, p.131-36.
- Day JG, Stacey GN. 2007. The Principles of Freeze-Drying. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. 2nd ed., Humana Press- XI, p.15-38. 5 10.
- De Waal DT, Combrink MP. 2006. Live vaccines against bovine babesiosis. *Veterinary Parasitology* 6 138, 88–96.
- Ristic M, Levy MG. 1980. *Babesia bovis*: continuous cultivation in a microaerophilous stationary phase culture. *Science* 207, 1218–1220.
- Vega CA, Buening GM, Green TJ, Carson CA. 1985. In vitro cultivation of *Babesia bigemina*. *Am J 9 Vet Res* 1985; 46:416–420.

Complementaria

- Aguirre DH, Mangold AJ, Ríos LG, Guglielmone AA. 1991. Respuesta clínica y Evolución del peso corporal en terneras (*Bos Taurus*) vacunadas simultáneamente contra babesiosis y anaplasmosis con inmunógenos vivos. *Med. Vet.* Vol 8, p. 95-101.

- Alves-Filho O, Bergslien O, Bjorkn P, Magne Eikevik T, Strommen I. 2006. Reconstitutible Dried Blood Products. United States Patent.
- Ananta E, Volkert M, Knorr D. 2005. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. Elsevier. International Dairy Journal 15- 399–409.
- Barbosa J, Borges S, Amorim M, Pereira MJ, Oliveira A, Pintado ME, Teixeira P. 2015. Comparison of spray drying, freeze drying and convective hot air drying for the production of a probiotic orange powder. Elsevier: Journal of Functional Foods 17 (2015) 340–351.
- Fu N, Chen XD. 2011. Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. Food Research International, 44(5), 1127.
- Gerber P, Xiao CT, Chen Q, Zhang J, Halbur PG, Opriessnig T. 2014. Veterinary Microbiology 174, 86–92.
- Goodrich RP, Williams CM, Franco RS, Weiner M. 1989. Lyophilization of red blood cells. United States Patent.
- Huang S, Vignolles ML, Chen DX, Le Loir Y, Jan G, Schuck P, Jeantet R. 2017. Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. Elsevier: Trends in Food Science & Technology 63 (2017).
- Inoue T, Osatake H. 1988. A New Drying Method of Biological Specimens for Scanning Electron Microscopy: The t-Butyl Alcohol Freeze-drying Method. Arch. Histol. Cytol., Vol. 51, No. 1- p. 53-59.
- Marcotty T, Berkvens D, Besa RK, Losson B, Dolan TT, Madder M, Chaka G, Van den Bossche, P, Brandt J. 2003. Lyophilisation and resuscitation of sporozoites of *Theileria parva*: preliminary experiments, Vaccine. Dec 12;22 (2):213-6.
- Martínez I, Jacobo R, Cipolini F, Martínez D, Storani C, Ragazzi A, Echaide I, Torioni De Echaide S. 22 2014. Estudio prospectivo de las primo infecciones por *Babesia bovis* en terneros Brahman y Brangus de un área enzoótica de Corrientes, Argentina. Revista FAVE - Ciencias Veterinarias. 13, 41-47.
- Mujumdar AS. 2007. Handbook of industrial drying. CRC Press. p. 710. ISBN 978-1-57444-668-5.

- Peighambardoust SH, Golshan Tafti A, Hesari J. 2011. Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 22(5).
- Schuck P, Jeantet R, Bhandari B, Chen XD, Perrone IT, Carvalho AF. 2016. Recent advances in spray drying relevant to the dairy industry: A comprehensive critical review. *Drying Technology*, 34(15).
- Tarara TE, Weers JG, Kabalnov A, Schutt EG, Dellamary LA. 2003. *Methods of Spray Drying Pharmaceutical Compositions*. United States Patent.
- Zamora LM, Carretero C, Parés D. 2006. Comparative Survival Rates of Lactic Acid Bacteria Isolated from Blood, Following Spray-drying and Freeze-drying. *Food Sci Tech Int* 2006; 12(1):77–84. SAGE 12 Publications.