

Determinación del tiempo de duplicación *in vitro* de la línea celular BUVEC-E₆E₇ de origen bovino

In vitro doubling time determination of BUVEC-E₆E₇ cell line of bovine origin

Mayra Elizeth Cobaxin Cárdenas^a,

Itzel Amaro Estrada^b,

Rosa Estela Quiroz Castañeda^b,

Jesús Francisco Preciado De la Torre^b,

Sergio Darío Rodríguez Camarillo^b,

Carlos Agustín Vega y Murguía^{b*}

^a Conacyt. México.

^b CENID Parasitología Veterinaria. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. México.

*Autor de correspondencia: vegaymurguia.carlosagustin@gmail.com

● **Resumen:**

Se ha sugerido que la rickettsia *Anaplasma marginale* podría interactuar con células endoteliales en el huésped bovino. La línea celular BUVEC E₆E₇ de origen bovino se utilizó en ensayos previos para intentar reproducirla sin éxito. En parte debido a la carencia de información de sus propiedades de crecimiento *in vitro*. Con este propósito se plantearon experimentos que procuraran información útil en la aplicación del procedimiento. Las células se obtuvieron del Instituto de Neurobiología/UNAM, fueron mantenidas en Medio F-12 (HAM) suplementado con suero fetal bovino y NaHCO₃ e incubadas a 37 °C en atmósfera de 5% CO₂ en aire saturado de humedad. El primer ensayo en placas de 24 pozos, se diseñó para determinar la dosis mínima para empezar un cultivo, resultando el valor de 2,500

células/pozo; en el segundo se identificó la densidad mínima de siembra a partir de cultivos con 1, 3, 9 y 27 células/mm², cosechados con solución Tripsina-EDTA al alcanzar >95 % de confluencia. Los valores promedio alcanzados fueron: 8.0 x 10⁴, 9.3 x 10⁴, 6.3 x 10⁴ y 6.5 x 10⁴ células totales, respectivamente. Para evaluar la cinética del desarrollo celular, se utilizaron por triplicado cajas de *Petri* de 35 mm Ø iniciando con una densidad de 3.0 células/mm² e intervalos de medición cada 8 h; agrupadas en dos series. Una con cambio del medio cada 48 h y la otra sin cambio de medio. El mayor crecimiento observado en ambas fue a las 152 h, con una densidad promedio de 2,505 células/mm² en la primera serie y 1,708 células/mm² en la segunda. El tiempo de duplicación estimado fue de 11.73 y 12.6 h, respectivamente. La línea BUVEC E₆E₇ de origen endotelial expresa un vigor de crecimiento inusual.

● **Palabras clave:** Tiempo de duplicación, BUVEC-E₆E₇, Cultivo *in vitro*.

● **Abstract:**

It has been suggested that rickettsia *Anaplasma marginale* might interact with endothelial cells in the bovine host. BUVEC E₆E₇ endothelial cell line has been utilized to grow *Anaplasma marginale* with no success, partially because *in vitro* growth characteristics were unknown. Therefore, several experiments were assayed in an attempt to retrieve useful information to define them. Growing culture cells were obtained from UNAM's Neurobiology Institute, maintained with fetal calf serum and NaHCO₃ supplemented F-12 (HAM) medium and incubated at 37 °C on 5% CO₂-air humid mixture atmosphere. First two assays used 24 well plates were focused on determination of a minimum initial cell concentration, which was 2,500 cells/well and cell density, whose experiment was set with 1, 3, 9 and 27 cells/mm². Cells were harvested with an EDTA-Trypsin solution when confluence was reached. Average final concentration of 8.0 x 10⁴, 9.3 x 10⁴, 6.3 x 10⁴ & 6.5 x 10⁴ cells/well was respectively found. 35 mm Ø sterile *Petri* dishes were used for kinetics studies. Cultures were set in triplicate with a seed density 3 cell/mm² divided into two series and sampling every 8 h. A 48 h culture media replacement interval applied for the first series and none for the second. Maximum growth was observed in both series at 152 h with 11.73 and 12.6 h doubling time in culture, respectively. It was confirmed that BUVEC E₆E₇ endothelial cell line expresses unusual growth strength.

● **Key words:** Doubling time, BUVEC-E₆E₇, *In vitro* culture.

Recibido el 12/11/2016.

Aceptado el 8/04/2017.

El uso de líneas celulares tiene una amplia gama de aplicaciones, de las que se pueden identificar estudios de fisiología celular, desarrollo de microorganismos intracelulares, identificación de vías metabólicas, entre otros. La investigación en la resolución de la enfermedad conocida como anaplasmosis bovina, se ha basado en el uso de animales para reproducir la rickettsia *Anaplasma marginale*. Los eritrocitos son aparentemente la célula huésped de esta rickettsia⁽¹⁾, pero adicionalmente se ha sugerido que células de carácter endotelial puedan jugar un papel en la infección del huésped bovino⁽²⁾.

Por un lado, se han realizado múltiples intentos para tratar de mantener la rickettsia en condiciones de laboratorio en México⁽³⁾. Por otro lado, la línea celular BUVEC E₆E₇ fue desarrollada para estudios de fisiología celular⁽⁴⁾, y con la intención de seguir utilizándola para realizar estudios de invasión por la rickettsia entre otros, se necesita información relativa a su desarrollo en condiciones *in vitro* no clarificadas anteriormente, para su manipulación en el laboratorio. El objetivo consistió en determinar el tiempo de duplicación de la línea celular BUVEC E₆E₇ en las condiciones de laboratorio.

La línea celular BUVEC E₆E₇ se obtuvo del Instituto de Neurobiología de la UNAM. Las condiciones para su mantenimiento en el laboratorio incluyen el uso del medio F-12 (HAM) suplementado con 1.5 g/L NaHCO₃, y 10% de suero bovino fetal (v/v), esterilizado por ultrafiltración, esto es, tamaño del poro de 0.22 µm. Los contenedores utilizados, se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5.0% CO₂ en aire saturado de humedad. Los protocolos de los ensayos se aplicaron siguiendo lo previamente publicado por Machuca *et al*⁽⁵⁾, con ligeras modificaciones. Los valores promedio, el error estándar y los intervalos de confianza al 95%, se determinaron utilizando el programa Microsoft® Office Excel 2007⁽⁶⁾.

El primer experimento consistió en ensayar por cuadruplicado la dosis de siembra mínima en placas de 24 pozos al hacer diluciones dobles, a partir de 2.0 x 10⁴ células totales por pozo, hasta obtener los valores de 1.0 x 10⁴, 5.0 x 10³ y 2.5 x 10³, células totales por pozo suspendidas en 350 µl. El criterio de cosecha fue que cuando alguno de los pozos alcanzara ≥95 % confluencia a la observación microscópica, se cosecharían todos ellos, mediante la aplicación de una solución de tripsina-EDTA para desprender el monoestrato y contar en el hemocitómetro.

En el segundo ensayo, se siguió un procedimiento semejante pero a la inversa; los cultivos se iniciaron con dosis crecientes, partiendo de 1, 3, 9 y 27 células/mm², cosechando cada tratamiento de manera individual, al alcanzar ≥95 % confluencia.

Con base en los resultados del segundo experimento, se eligió una densidad de siembra para el tercer ensayo, llevado al cabo por triplicado en cajas de Petri de 35 mm Ø, con dos series, A y B. En la serie A se hizo cambio de medio cada 48 h, mientras que en la serie B no hubo cambio de medio; cosechando las muestras a intervalos de 8 h en ambas. Con los resultados

de estos ensayos, se aplicó el modelo de tiempo de duplicación, $DT = T \ln 2 / \ln(X_e/X_b)^{(7)}$; donde: T= es el tiempo de incubación= intervalo $[T_{final} - T_{inicial}]$ en horas; X_b = es el valor inicial; X_e = es el valor final del número promedio de células por caja, de la fase de crecimiento logarítmico.

Del experimento 1 se observó el primer pozo con $\geq 95\%$ confluencia a las 120 h de su inicio, realizándose la cosecha en todos ellos. El rendimiento promedio obtenido fue de 2.35×10^5 , 1.92×10^5 , 9.44×10^4 y 5.62×10^4 con una desviación estándar de $\pm 2.17 \times 10^5$, 1.87×10^5 , 8.64×10^4 y 5.21×10^4 . Ello representó un crecimiento promedio de 2.15×10^5 , 1.82×10^5 , 8.94×10^4 y 5.37×10^4 células totales por pozo y un incremento de 10.8, 18.2, 17.9 y 21.5 veces la concentración inicial, respectivamente (Cuadro 1).

Cuadro 1: Valores obtenidos del ensayo para la determinación de dosis mínima inicial de la línea celular BUVEC E₆E₇

Tratamientos*	1	2	3	4
n	4	4	4	4
Conteo inicial [§]	2.00×10^4	1.00×10^4	5.00×10^3	2.50×10^3
Conteo final [†]	2.35×10^5	1.92×10^5	9.44×10^4	5.62×10^4
Desv. Estándar (\pm)	2.17×10^5	1.87×10^5	8.64×10^4	5.21×10^4
α^{**}	0.05	0.05	0.05	0.05
Error estándar (\pm)	1.09×10^5	9.34×10^4	4.32×10^4	2.61×10^4
Límite superior IC	4.48×10^5	3.75×10^5	1.79×10^5	1.07×10^5
Límite inferior IC	2.25×10^4	9.05×10^3	9.81×10^3	5.12×10^3
Incremento	2.15×10^5	1.82×10^5	8.94×10^4	5.37×10^4
Cociente de crecimiento	10.8	18.2	17.9	21.5
Cosecha ^{§§}	5	NA	NA	NA

*Tratamientos 1, 2, 3 y 4; iniciados con 2.0×10^4 , 1.00×10^4 , 5.0×10^3 y 2.5×10^3 células por pozo, respectivamente.

§Total de células / pozo.

†Valor promedio del total de células / pozo.

**Valor de alfa para intervalo de confianza 95% (IC).

§§Día en llegar a confluencia $\geq 95\%$; NA= no aplica.

Para el experimento 2 los rendimientos celulares observados fueron, 8.0×10^4 , 9.3×10^4 , 6.3×10^4 y 6.5×10^4 células totales promedio por pozo, lo que arrojó índices de crecimiento de 451.7, 171.0, 38.3 y 12.5 veces, al cosechar a las 154.5, 130.5, 106.5 y 82.5 h de iniciado el ensayo, respectivamente (Cuadro 2).

Cuadro 2. Valores obtenidos del ensayo para la determinación de la densidad de siembra de la línea celular BUVEC E₆E₇

Tratamientos*	1	2	3	4
n	4	4	4	4
Conteo inicial [§]	1	3	9	27
Conteo final [†]	452.7	528.2	353.7	365.7
Desviación estándar (±)	34.73	26.20	33.08	15.90
α **	0.05	0.05	0.05	0.05
Error estándar (±)	17.4	13.1	16.5	8.0
Límite superior IC	486.7	553.9	386.1	381.3
Límite inferior IC	418.7	502.5	321.3	350.1
Incremento ^{§§}	451.7	525.2	344.7	338.7
Cociente de crecimiento	451.7	175.1	38.3	12.5
Cosecha ^{††}	6	5	4	3

* Tratamientos 1, 2, 3 y 4; iniciados con 1.77×10^2 , 5.30×10^2 , 1.59×10^3 y 4.77×10^3 células por pozo, respectivamente.

[§]Total de células/mm² por pozo.

[†]Total de células/mm² (promedio por pozo).

**Valor de alfa para Intervalo de confianza 95% (IC).

^{§§} En número de células/mm².

^{††}Día en llegar a confluencia ≥ 95 %.

La morfología sin alteraciones aparentes se muestra en la Figura 1. El máximo crecimiento observado para las series A y B del experimento 3, fue a las 152 h, con valores de 2.41×10^6 y 7.67×10^5 células totales en promedio, respectivamente (Figura 2). La diferencia en promedio fue de 7.67×10^5 células totales. El rendimiento celular de la serie A, con cambio de medio, fue 864 veces; mientras que en la serie B, sin cambio de medio, fue menor, 568.5 veces. En el Cuadro 3 se resume la información numérica utilizada para aplicación de la fórmula de determinación del tiempo de duplicación derivados del tercer experimento, así como sus valores de R^2 con base en su línea de tendencia exponencial en congruencia con la fórmula indicada, mostrando un alto grado de paralelismo.

Figura 1: Micro fotografía de la línea celular BUVEC E₆E₇ de origen bovino. A: morfología típica natural y B: morfología post cosecha con una solución de tripsina-EDTA

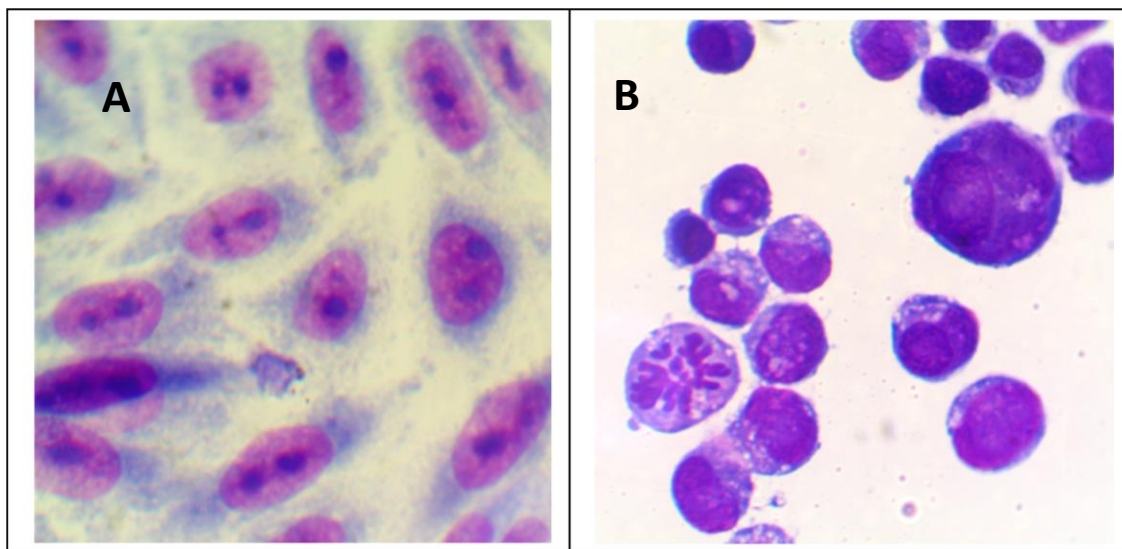
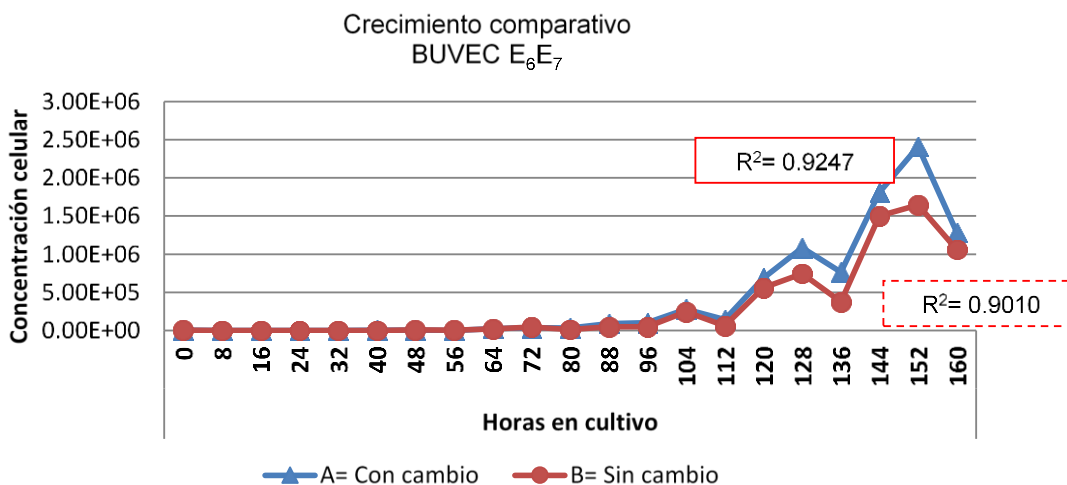


Figura 2. Crecimiento comparativo de la línea celular BUVEC E₆E₇ de origen bovino, con (A) o sin (B) cambio de medio de cultivo, habiendo iniciado el día 0*



*Cultivos iniciados con una densidad de 3 células /mm². Mantenedos en Medio F-12 (HAM), suplementado con 1.5 g/l de NaHCO₃ y 10 % (v/v) suero fetal bovino inactivado a 56 °C. A: con cambio de medio cada 48 h, B: sin cambio de medio. El intervalo del crecimiento logarítmico ocurre entre las 80 y las 152 h en cultivo, para la serie A y entre las 88 y 152 h, para la serie B.

Cuadro 3. Valores del desarrollo celular de la línea celular BUVEC E₆E₇*, empleados para la determinación del intervalo de duplicación (DT)[§] [6] dentro del tercer experimento

Serie **	Tiempo (h)			Concentración celular [†]		DT	Tiempo real
	inicial ^{§§}	final ^{††}	T total	Inicial (X _b)	Final (X _e)		
A	80	152	72	3.42 x10 ⁴	2.41 x10 ⁶	11.73 h	11:43'48''
B	88	152	64	4.80 x10 ⁴	1.64 x10 ⁶	12.56 h	12:33'36''

* Línea celular derivada del endotelio del cordón umbilical de un bovino, transformada con el oncogene E₆E₇ del virus del papiloma humano⁽⁴⁾.

[§]DT = T ln2/ln(X_e/X_b).

[†] = Valor promedio de células por caja.

** = A: con cambio de medio c/48 h; B: sin cambio de medio.

^{§§} = horas en cultivo cuando inició la fase de crecimiento logarítmico.

^{††} = horas en cultivo, cuando terminó la fase de crecimiento logarítmico.

Los experimentos en conjunto permiten aseverar que la línea celular se comporta con un vigor de crecimiento inusual, y que aun cuando su característica sea de una célula epitelial, aparentemente no requiere la cercanía o contacto con otras células para proliferar o formar el monoestrato. El rendimiento obtenido en tan corto plazo, representa una gran velocidad de crecimiento que posiblemente no sea compatible en un co-cultivo con la rickettsia *A. marginale*, cuyo desarrollo podría ser aparentemente más lento, y ello en parte explicaría los magros resultados obtenidos en ensayos anteriores⁽⁸⁾. En contraste, en células embrionarias de garrapata *Ixodes scapularis*, cuya velocidad de crecimiento es más lenta, se ha logrado el cultivo de esta rickettsia con aislados de Estados Unidos y Brasil⁽⁹⁾. Por otra parte, en otros estudios en los que utilizaron muestras purificadas del microorganismo proveniente de células endoteliales infectadas con *A. marginale*, no fueron capaces de infectar bovinos susceptibles, ni inducir una respuesta inmune detectable⁽¹⁰⁾, concluyendo que aparentemente las células endoteliales no participan en el ciclo de infección en el mamífero; en oposición a lo previamente descrito por Carreño *et al*⁽²⁾.

La línea celular BUVEC E₆E₇ puede proliferar de manera continua hasta formar el monoestrato sin adición de medio fresco, hasta por 152 h, equivalente a 6.3 días en cultivo, bajo condiciones estables de atmósfera y temperatura ambiente, lo que la hace candidata para eventuales estudios comparativos de metabolismo de nutrientes para otras especies del género *Anaplasma* de importancia también en la salud pública⁽¹¹⁾.

▮ Agradecimientos ▮

Se agradece a la Dra. Carmen Clapp, del Instituto de Neurobiología de la UNAM, Juriquilla, Querétaro; por la donación de la línea BUVEC-E₆E₇. Proyecto parcialmente financiado mediante el Convenio INIFAP-CONACyT No.MODORD-27PCI-187-11-15.

● Literatura citada

1. Ristic M, Watrach AM. Anaplasmosis. VI. Studies and hypothesis concerning the cycle of development of the causative agent. *Am J Vet Res* 1963;24:267-277.
2. Carreño AD, Alleman AR, Barbet AF, Palmer GH, Noh SM, Johnson CM. *In vivo* endothelial cell infection by *Anaplasma marginale*. *Vet Pathol* 2007;44(1):116-118. DOI: 10.1354/vp.44-1-116.
3. Luna-Castro GS, Orozco-Vega LE, Vega YMCA, Rodríguez-Camarillo SD, Ramírez-Noguera P. El cultivo *in vitro* de *Anaplasma marginale*: ¿evolución ó involución? En: Moreno-Chan R, editor. *Ciencia Veterinaria Vol. 10 UNAM*. 2007:174-208.
4. Cajero-Juárez M, Ávila B, Ochoa A, Garrido-Guerrero E, Varela-Echavarría A, Martínez DLEG, 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.
5. Machuca-Figueroa S, Granjeno-Colín G, Rodríguez-Camarillo SD, Vega y Murguía CA. Propiedades de crecimiento de las líneas celulares DH82 y RF/6A bajo condiciones normales de laboratorio. *Rev Mex Cienc Pecu* 2016;7(1):85-104.
6. Microsoft® Office Excel 2007: Funciones estadísticas.
7. ATCC. ATCC® Animal Cell Culture Guide, tips and techniques for continuous cell lines. https://www.atcc.org/~//media/PDFs/CultureGuides/AnimCellCulture_Guide.pdf Consultado 29 Ene, 2014.
8. Luna CGS, Rodríguez CSD, Ramírez NP, Preciado DLTJF, Rojas REE, Mosqueda GJJ, Vega YMCA. Cultivo *in vitro* de *Anaplasma marginale* en líneas celulares endoteliales. *Rev Mex Cienc Pecu* 2010;1(4):373-390.

9. Katarzyna L, Fernandez DMIG, Popara M, Cabezas-Cruz A, Ayllon N, Zweygarth E, *et al.* Molecular and immunological characterization of three strains of *Anaplasma marginale* grown in cultured tick cells. *Tick-borne Dis* 2015;6(4):522-529.
10. Wamsley HI, Alleman AR, Johnson CM, Barbet AF, Abbot JR. Investigation of endothelial cells as an *in vivo nidus* of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Vet Micro* 2011;153:264-273.
11. Atif FA. *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*: Rickettsiales pathogens of veterinary and public health significance. *Parasitol Res* 2015; 114(11):3941-3957.