



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable.

Implementación de un Cultivo de Células Embrionarias de Garrapata *Rhipicephalus*
microplus

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestría en Salud animal y Producción sustentable

Presenta:

Argelia Edith Camarillo Rodríguez

Dirigido por:

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Asesores:

Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú

M. en C. Elba Rodríguez Hernández

Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón

Santiago de Querétaro, Qro. Julio de 2015



Universidad Autónoma de Querétaro
Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad De Ciencias Naturales
Maestría En Salud Y Producción Animal
Sustentable



Implementación de un Cultivo de Células Embrionarias de Garrapata *Rhipicephalus microplus*

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestría en Salud animal y Producción sustentable

Presenta:

Argelia Edith Camarillo Rodríguez

Dirigido por:

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Asesores:

Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú

M. en C. Elba Rodríguez Hernández

Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón

Campus Juriquilla
Santiago de Querétaro, Qro.
Julio de 2015



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable.

Implementación de un Cultivo de Células Embrionarias de Garrapata *Rhipicephalus microplus*

Opción de titulación
Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestría en Salud animal y Producción sustentable

Presenta:

Argelia Edith Camarillo Rodríguez

Dirigido por:

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Presidente

Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú

Secretario

M. en C. Elba Rodríguez Hernández

Vocal

Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez

Suplente

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón

Suplente

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca

Director de la Facultad

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña

Director de Investigación y Posgrado

RESUMEN

Los sistemas de cultivo in vitro, en particular los derivados de tejidos de vectores, desempeñan un papel invaluable e irremplazable, ya que permiten conocer la biología básica del vector, así como la de los patógenos transmitidos por estos vectores y la relación vector-patógeno. El potencial de las aplicaciones de las líneas celulares de vectores, por ejemplo líneas celulares de garrapatas, nunca ha sido más amplio. La gama de microorganismos que pueden propagarse en líneas celulares de garrapata se ha ampliado e incluye varios patógenos procariotas y eucariotas de importancia veterinaria y de salud pública en todo el mundo. El objetivo de este trabajo fue implementar un cultivo de células embrionarias de garrapatas *Rhipicephalus microplus*. Para el presente estudio se recolectaron hembras repletas de *Rhipicephalus microplus* de un bovino infestado en el rancho de la Facultad de Medicina Veterinaria Campus Amazcala, se lavaron, desinfectaron e incubaron a 28° C, dos días después las hembras comenzaron a ovopositar, se recolectaron los huevos, se preparó un medio de cultivo compuesto por una mezcla de medio MEM Hanks-LAC, medio L-15 Leibowitz así como Pen/Strepto/Anfotericina B, Caldo Triptosa Fosfato y Suero Fetal Bovino inactivado. Se realizó una maceración mecánica y posteriormente se filtró la suspensión de células después de centrifugar a 200 g se resuspendió el pellet y se agregó medio completo nuevo. La suspensión celular se sembró en placas y se mantuvo en una incubadora a 28°C en cámara húmeda. Después de tres semanas de no cambiar el medio y de monitorear su crecimiento, las células fueron observadas al microscopio invertido, la morfología celular fue variada sugiriendo diferentes tipos celulares, entre las que se encuentran células pequeñas redondas, células grandes redondas y agregados celulares. A la cuarta semana estas células se fueron multiplicando y se observaron agregados celulares en varios puntos localizados, también se observaron células con morfología similar a fibroblastos. El cultivo se mantuvo en condiciones óptimas durante cinco semanas con cambios de medio cada xxx tiempo.

Palabras clave: Células Cultivo, garrapata)

SUMMARY

The *in vitro* culture systems, particularly the ones based on the use of tissues from arthropod vectors, play an invaluable and irreplaceable role, they let us understand the basic biology of a vector, approach the study of the arthropod transmitted pathogens and even to study the vector-pathogen interactions. The use of vector cellular lines, particularly the ones from ticks, has never had this potential. The diversity of microorganisms of veterinary and public health importance that can be spread in tick cellular lines include prokaryotes and eukaryotes from all over the world. The aim of this study was to develop a cellular line based on the use of embryonic tick-cells from *Rhipicephalus microplus*. We collected adult replete female ticks *Rhipicephalus microplus* from an artificially infested bovine in the Veterinary Medicine Faculty, campus Amazcala. The ticks were washed, disinfected and incubated at 28 °C. After two days when the tick oviposition began, the eggs were harvested. A culture medium composed of MEM Hanks-LAC, L-15 **Leibowitz** medium and Pen/Strepto/Anfotericine B, Triptose phosphatum broth and inactivated fetal bovine serum was used. Mechanic maceration was performed and maceration was filtered. After three weeks without changing the medium and to monitor their growth, cells were observed under inverted microscope , the cell morphology was varied suggesting different cell types, including small round cell , large cell panel and cell clusters are. In the fourth week were multiplying these cells and cell aggregates were observed several points located, fibroblast-like cells were also observed morphology . The culture was maintained under optimal conditions for five weeks with medium changes every week.

(**Key words:** Cell, Culture, tick)

DEDICATORIAS

A Romeo y Mateo
A Mis Padres y Hermanos
A mi Bola

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Naturales

Al Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

A mis asesores, la Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú y M. en C. Elba Rodríguez

Hernández, Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez y al Dr. Germinal Jorge Cantó

Alarcón

A Conacyt, por apoyar mis estudios de maestría

Al Laboratorio de Patología Animal de Calamanda al Esp. MVZ Alejandro Enríquez y a todo el equipo de trabajo, por las facilidades y apoyo.

A mis compañeros de la maestría y al equipo de trabajo del laboratorio de inmunología.

A Cristina, te estoy muy agradecida

ÍNDICE

RESUMEN	i
SUMMARY	ii
DEDICATORIAS.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	2
A. Cultivo celular	2
2.14 Generalidades	2
2.15 Historia del Cultivo Celular	2
2.16 Tipos de cultivo celular	4
2.17 Medios de cultivo	6
2.18 Condiciones del Cultivo Celular.....	8
2.19 Cultivos Primarios	10
2.20 Cultivos de Células Embrionarias de Artrópodos.....	12
2.21 Ventajas y desventajas de los cultivos celulares.....	13
B. <i>Rhipicephalus microplus</i>	16
2.22 Agente etiológico.....	16
2.23 Características anatómicas y fisiológicas de la garrapata <i>Rhipicephalus microplus</i>	16
2.24 Taxonomía de <i>Rhipicephalus microplus</i>	19
2.25 Distribución geográfica	19
2.26 Ciclo de Vida de la Garrapata <i>Rhipicephalus microplus</i>	20
III. OBJETIVO GENERAL.....	26
IV. METODOLOGÍA	27
VI. DISCUSIÓN	32
VII. BIBLIOGRAFÍA	35

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 HEMBRA DE <i>R. MICROPLUS</i> (TOMADO DE ALPHIS-USDA, 1976)	17
FIGURA 2 HEMBRA DE <i>R. MICROPLUS</i> DONDE SE MUESTRAN LAS ÁREAS POROSAS(TOMADO DE WALKER A R, 2003).	18
FIGURA 3 MACHO DE <i>R. MICROPLUS</i> (TOMADO DE ALPHIS-USDA, 1976).....	18
FIGURA 4 CAPÍTULO DE <i>R. MICROPLUS</i> (WALKER, 2003).....	18
FIGURA 5 MAPA DE MÉXICO DONDE SE ESQUEMATIZA LA SITUACIÓN ACTUAL DE <i>R. MICROPLUS</i> EN LA DONDE EXISTEN ÁREAS LIBRES, EN CONTROL Y EN PROCESO DE ERRADICACIÓN (TOMADO DE SAGARPA, 2015).	20
FIGURA 6 ESTADIOS DEL CICLO DE VIDA DE LA GARRAPATA <i>R. MICROPLUS</i>	23
FIGURA 7 IMAGEN DEL CULTIVO EL DÍA DE LA SIEMBRA. SE OBSERVA GRAN CANTIDAD DE RESTOS DEL MACERADO Y AGLOMERADOS DE CÉLULAS PEQUEÑAS Y REDONDAS 400 ×.	29
FIGURA 8 IMAGEN DEL CULTIVO A LA PRIMERA SEMANA, SE PUEDE OBSERVAN RESTOS DE CASCARÓN Y ALGUNAS CÉLULAS REDONDAS Y UNA CÉLULA GRANDE (400 ×).	30
FIGURA 9 (A) SEGUNDA SEMANA, SE OBSERVAN CÉLULAS REDONDAS AGLOMERADAS. (B) TERCERA SEMANA, ALGUNOS AGREGADOS CELULARES (C) CUARTA SEMANA, AGREGADOS CELULARES (D) IMAGEN DEL CULTIVO A LA QUINTA SEMANA (2000 ×). CÉLULAS REDONDAS Y GRUPOS DE CÉLULAS SIMILARES A FIBROBLASTOS. EXCEPTO D, TODAS LAS IMÁGENES FUERON TOMADAS A 400 ×.	31

I. INTRODUCCIÓN

La garrapata, *Rhipicephalus microplus* ejerce una fuerte acción parasitaria sobre sus diversos hospedadores (Klober, 2001), los cuales son atacados en forma directa (picaduras, extracción de sangre, daños a las pieles) e indirecta (inoculación de agentes patógenos y toxinas), lo que incide negativamente en el rendimiento productivo de las especies de interés económico. Al ganado bovino le ocasionan detrimento en la producción de carne, leche y pieles, situación que se agrava en el caso de *R. microplus*, por su participación como vector transmisor de parásitos protozoarios como *Babesia* spp. (Rivera, 1996) agente causal de la babesiosis bovina (Drummond et al., 1973).

Atendiendo las condiciones climáticas que favorecen su sobrevivencia, *R. microplus* es una garrapata que habita zonas ecológicas con clima tropical y subtropical. El conocimiento ecológico es una herramienta que permite analizar la dinámica poblacional de las garrapatas para usarla en el diseño más eficiente de programas para su manejo integral (Coronado et al., 1997).

Las líneas celulares han sido utilizadas en muchas áreas de investigación y permiten estudiar in vitro el comportamiento de células que son difíciles de mantener en sistemas biológicos vivos; también permiten mantener a los patógenos que necesitan de células específicas para su desarrollo. Los intentos de cultivar células de garrapatas se realizaron desde hace más de 50 años. Los primeros estudios dieron como resultado cultivos primarios de células capaces de sobrevivir hasta por un período de seis meses. (Alberts, 2003).

Desde que se establecieron las primeras líneas celulares de garrapatas *Ixodidae*, el alcance de su uso se ha ampliado desde la propagación de agentes patógenos transmitidos por garrapatas hasta incluir estudios sobre, genómica, proteómica y manipulación genética. El potencial de aplicaciones para líneas celulares de la garrapata y en la investigación de enfermedades transmitidas por estas nunca ha sido más amplio. La gama de microorganismos que pueden propagarse en líneas celulares de garrapata se ha ampliado e

incluye varios patógenos procariotas y eucariotas de consideración médica e importancia veterinaria en todo el mundo (Lesley Bell-Saikyi, 2007).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

A. Cultivo celular

2.1 Generalidades

El cultivo de tejidos es un término, que se refiere al cultivo de órganos, tejidos y células dispersas, mantenidas en un medio estéril con los nutrientes necesarios con una gran aproximación a sus propiedades y funciones in vivo. La extensión de la vida de un cultivo celular in vitro, procedente de tejidos, órganos y líneas celulares, se logró gracias al uso de múltiples medios de cultivo, enriquecidos con sueros y suplementos, que al almacenarse en incubadoras, simula el micro ambiente de un organismo vivo. Muchos laboratorios emplean los cultivos celulares para validar sus métodos de análisis y experimentos cruciales (Freshney, 1987; Alberts, 2003).

Los cultivos celulares desempeñan un papel sobresaliente, lo que ha provocado que hoy en día, muchas firmas comerciales implementen estos bioensayos en sus protocolos para evaluar rápida, reproducible y confiablemente la actividad biológica de productos desarrollados por ellos, solo basta con mirar en la hoja técnica de un producto para reconocer que se utilizó un cultivo celular para medir la actividad biológica de su molécula (Alberts, 2003).

2.2 Historia del Cultivo Celular

Los cultivos celulares son huéspedes experimentales que vienen progresivamente reemplazando a los animales de laboratorio y son utilizados en prácticamente todos los campos de la biomedicina (Alberts, 2003). El cultivo de tejidos se desarrolló como una continuación de las técnicas de la embriología, a partir de los últimos años del siglo XIX (ATCC® 2012).

En 1885 Wilhem Roux demostró que las células embrionarias de pollo pueden mantenerse vivas en una solución salina (Freshney, 1987).

En 1907 Harrison cultivó médula espinal de anfibio, demostrando así que los axones se producen como prolongaciones de células nerviosas (Freshney, 1987).

En 1910 Rous indujo un tumor utilizando un extracto filtrado de célula tumoral de pollo, que más tarde se demostró que contenían un virus de RNA (virus del sarcoma de Rous) (Rous, 1910).

En 1913 Carrel demostró que las células podían crecer en cultivo durante mucho tiempo, siempre que fueran alimentadas regularmente en condiciones asépticas (Carrel, 1913).

En 1948 Earle y colaboradores aislaron células de la línea celular L y demostraron que en cultivo tisular formaban clones (Freshney, 1987).

En 1952 Gey y colaboradores establecieron una línea continua de células derivada del carcinoma cervical humano, que más tarde se convirtió en la conocida línea celular HeLa (Gey, 1951).

En 1954 Levi-Montalcini y sus colaboradores demostraron que el factor de crecimiento nervioso (NGF) estimula el crecimiento de los axones en cultivo (Cohen et al., 1954).

En 1955 Eagle desarrolló la primera investigación sistemática sobre los requerimientos nutricionales esenciales de las células en cultivo y encontró que las células animales se pueden propagar en una mezcla definida de pequeñas moléculas suplementada con una reducida proporción de proteínas séricas (Eagle, 1955).

En 1956 Puck y colaboradores seleccionaron mutantes con requerimientos de crecimiento alterados a partir de células HELA en cultivo (Puck et al., 1956).

En 1958 Temin y Rubin desarrollaron un método cuantitativo para la infección de cultivos de células de pollo mediante el virus del sarcoma de Rous purificado (Temin y Rubin, 1958). En la década siguiente Stoker, Dulbecco, Green y otros virólogos establecieron las características de ésta y de otras transformaciones víricas.

En 1961 Hayflick y Moorhead demostraron que los fibroblastos humanos en cultivo mueren tras un número finito de divisiones (Hayflick y Moorhead, 1961).

En 1964 Littelfield introdujo el medio HAT para el crecimiento selectivo de híbridos celulares somáticos. Junto con la técnica de la fusión celular, este medio hizo accesible la genética de las células somáticas (Littelfield, 1964). Por su parte, Kato y

Takeuchi en 1966 obtuvieron una planta completa de zanahoria a partir de una sola célula de raíz de zanahoria mantenida en cultivo (Kato y Takeuchi, 1966).

En 1965 Ham introdujo un medio definido, sin suero, que permitía el crecimiento clonal de células de mamífero. Al mismo tiempo, Harris y Watkins produjeron los primeros heterocariontes de células de mamífero mediante la fusión inducida víricamente de células humanas y de células de ratón (Ham, 1965).

En 1968 Augusti-Tocco y Sato adaptaron al cultivo células nerviosas tumorales de ratón (neuroblastoma) y aislaron clones que eran excitables eléctricamente y producían prolongaciones nerviosas. En esta época se aislaron otras células diferenciadas, entre ellas líneas celulares de hepatocitos y de músculo esquelético.

En 1975 Köhler y Milstein produjeron las primeras líneas de hibridomas que segregaban anticuerpos monoclonales (Köhler y Milstein, 1975).

En 1976 Sato y colaboradores publicaron el primero de una serie de informes, demostrando que para crecer en un medio sin suero, las líneas celulares diferentes requieren mezclas diferentes de hormonas y de factores de crecimiento (Sato et al., 1976).

En 1977 Wigler, Axel y colaboradores desarrollaron un método eficiente para introducir genes humanos de copia única en el interior de células cultivadas, adaptando los métodos desarrollados inicialmente por Graham (Wigler et al., 1977).

En 1981 Martín, Evans y colaboradores aislaron y cultivaron células madre embrionarias de ratón (Evans y Kaufman. 1981).

En 1998 Thomson, Gearhart y colaboradores aislaron células madre embrionarias humanas (Thomson y Marshall, 1998).

2.3 Tipos de cultivo celular

El cultivo celular es un conjunto de técnicas que permiten la conservación de las células in vitro. En los cultivos celulares se obtienen células individuales ya sea por dispersión enzimática o mecánica, las cuales son mantenidas como monocapas celulares o en suspensión y manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas (Davis, 2002).

Los cultivos celulares se clasifican en tres grupos:

Cultivos Primarios.

Los cultivos primarios provienen de células que han sido disgregadas del tejido original, en este tipo de cultivo se observan los tipos celulares diferenciados y es por ello una buena réplica del tejido de origen, la propagación del crecimiento que muestran in vitro es restringido y limitado en la periferia. Las células se caracterizan por ser heterogéneas, sus cromosomas tienen número diploide ($2n$), su morfología y las propiedades del órgano del que fueron aisladas es conservada aunque el crecimiento que muestran puede ser lento. Estas células pueden mantenerse en cultivo solo durante períodos limitados, una vez que un cultivo primario es sub cultivado este se denominará cepa celular (ATCC® 2012).

Cepa celular.

La cepa celular es un cultivo de células obtenido a partir de un cultivo primario y cuyas células pueden ser cultivadas varias veces. Las cepas celulares con el tiempo degeneran, no pudiendo volver ser a cultivadas. Pero hay células de cepas celulares que sufren una alteración y comienzan a desarrollarse de forma indefinida, formando entonces una línea celular (Butler, 1996).

Líneas celulares.

Los cultivos primarios a menudo son sometidos a procesos de transformación que le confiere capacidad ilimitada de multiplicación, para convertirlos en una línea celular. Las líneas celulares continuas están formadas por células que se diferencian genética y morfológicamente de las cuales se originaron. Pueden provenir de células que se derivan de tumores, procesos de transformación de un cultivo primario mediante mutación con oncogenes o tratamientos carcinogénicos, lo que les confiere un nuevo fenotipo. Este tipo de cultivo tiene la característica de ser aneuploide, de no tener inhibición por contacto y de crecer de manera indefinida. (Freshney, 1987).

Los cultivos celulares pueden diferenciarse por su habilidad de adherencia a diferentes materiales específicos y pueden mantenerse en monocapa o también pueden mantenerse en suspensión.

Cultivos en Monocapa

Las células procedentes de órganos crecen en monocapa, ellas requieren adherirse a la superficie del contenedor y empezar a mostrar confluencia, para poder hacer un pase celular se necesitan enzimas proteolíticas como la tripsina (Freshney, 1987).

Cultivos en Suspensión

Las células pueden crecer en cultivos estacionarios o en suspensión, en este tipo de células no es indispensable el anclaje, la mayor ventaja de este tipo de cultivos es que el manejo se reduce y se optimiza el uso de equipos y reactivos (Davis, 2002).

Cultivos Tridimensionales

Los cultivos tridimensionales permiten mantener la estructura como en el tejido original y gracias a esta disposición es posible estudiar el mantenimiento, la proliferación, las interacciones con células contiguas, así como el efecto de diferentes sustancias o drogas que sean citotóxicos (Freshney, 2000).

2.4 Medios de cultivo

Los medios de cultivo son soluciones cargadas de nutrientes que permiten soportar el crecimiento celular. En un principio eran elaborados a partir de extracto de plantas o infusiones y poco a poco se fueron adicionando algunos productos de origen animal, después de encontrarse con dificultades con la conservación del medio y que este estuviera libre de contaminantes. Los investigadores de la época consideraron, que sería mejor intentar replicar las condiciones naturales, en la que los organismos podrían multiplicarse. Para el caso de cultivos celulares de tejidos de animales, se encontró a principios del siglo XX que soluciones salinas adicionadas de dextrosa y algunos aminoácidos esenciales proporcionaban condiciones viables para su mantenimiento (Davis, 2002).

El primer medio de cultivo estaba compuesto por fluidos biológicos como plasma, linfa, suero y extractos de tejido especialmente de origen embriológico. En 1950 Morgan y colaboradores, desarrollaron el uso de un medio de cultivo sintético en células de embrión de pollo, ellos concluyeron que se podía mantener a las células viables por cuatro a cinco

semanas. Para la década de los 60's surgieron numerosas metodologías, que permitían mantener viables a las células fuera de su ambiente natural (Davis, 2002).

Los medios de cultivo celular, están compuestos por dos distintas partes; un medio basal que satisface a la célula de sus requerimientos de nutrientes y un conjunto de componentes que satisface otros tipos de requerimientos para la célula y permite el crecimiento de células con el medio basal (Morton, 1970). Los medios de cultivo son higroscópicos, compuestos de varios grupos de ingredientes, como son aminoácidos, vitaminas, azúcares, glucosa, sales minerales y puede contener algunos precursores metabólicos o componentes de ácidos nucleicos (Davis, 2002).

El medio basal de Eagle (BME) se utiliza normalmente para células adherentes, como células HeLa y algunas células primarias. Se han desarrollado otros medios a partir del BME. El medio mínimo esencial (MEM), está integrado con componentes que favorecen el crecimiento celular de líneas que forman capas adherentes a la superficie del contenedor. En cambio la mezcla nutritiva L-15 Leibovitz se ha empleado originalmente para células y tejidos de origen embrionario, también se utiliza para cultivo de células de artrópodos (Freshney, 1987).

Suplementos y aditivos

El suero fetal bovino (SFB) es el suplemento más importante que se utiliza para enriquecer los medios de cultivo, este tipo de suero obtenido de fetos de bovino está potencializando la composición del medio y se dice que es vital para el desarrollo celular, por esta razón se considera un suplemento. Otro suplemento comúnmente adicionado es el colesterol, el cual se adiciona a medios que vayan a enriquecer células que en su metabolismo requieran de lípidos para que la célula funcione de manera óptima. Los sustitutos de sueros se utilizan cuando se conocen las necesidades metabólicas de algunos cultivos celulares o el SFB pudiera intervenir con la función esperada, como es el caso de los linfocitos B, para mantener este cultivo necesitan una estimulación con lipopolisacárido (LPS) y si se agrega suero este podría contener factores que pueden reaccionar contra el LPS (Morton, 1970).

Los aditivos son sustancias que cumplen un rol específico en el ambiente del cultivo celular, inducen un beneficio sin llegar a ser aprovechados por las células, como lo

son los antibióticos, estos se añaden en cantidades que no logren ser tóxicas para las células, pero que puedan evitar el crecimiento de microorganismos infecciosos, los antibióticos y los antimicóticos remediarán alguna falla en el proceso del cultivo. (Davis, 2002).

2.5 Condiciones del Cultivo Celular

El laboratorio de cultivos celulares debe contar con el equipo necesario y reunir ciertas características del equipo para que el trabajo sea productivo. Lo más característico de un laboratorio de cultivo de tejidos es el mantenimiento de la asepsia. El área de trabajo para realizar cultivos debería de estar en una habitación aislada, aunque la aparición de las cámaras de flujo laminar ha reducido estas necesidades de aislamiento. La estructura y condiciones ambientales de un laboratorio de cultivo celular varía notablemente entre aquel que trabaja con agentes patógenos, bacterias, virus, parásitos y aquel que no los utiliza. En el primer caso las condiciones son más estrictas. A continuación se describen algunos de los instrumentos o equipos más usados en un laboratorio de cultivo de tejidos (Davis, 2002).

Campana de flujo laminar

La campana de flujo laminar tiene la función de mantener el área de trabajo donde se manipulan las células manteniéndolas libres de contaminantes. La campana funciona a partir de un motor, que fuerza el paso del aire por un filtro de gran superficie (filtro HEPA) el filtro está situado en el techo en el caso de las campanas de flujo vertical, o en la pared frontal si la campana es de flujo horizontal. Con estos sistemas se consigue una retención de partículas del 99.99% por debajo generalmente de un grosor de 0.22μ . El flujo del aire es laminar, es decir, sin turbulencias donde puedan quedar retenidas partículas contaminantes. Existen diferentes tipos de cabinas de flujo laminar que tienen como fines generales, proteger al operario de agentes patógenos o contaminantes del interior de la cabina, así como proteger el cultivo de patógenos o contaminantes externos o internos de la cabina y también proteger el medioambiente de patógenos o contaminantes del interior de la cabina. (CDC- NIH, 2009). Según la importancia de la protección de estos tres elementos se distinguen cabinas de clase I, II y III:

- Clase I: Protege al operario y al medioambiente (campanas de gases).
- Clase II: Protegen al operario, el cultivo y el medioambiente.

- Clase III: Son sistemas completamente cerrados, garantizándose así la protección del operario y del entorno. Son utilizadas para la manipulación de patógenos del grupo 4, son agentes patógenos que suelen provocar enfermedades graves en el ser humano o los animales y que se transmiten fácilmente de un individuo a otro, directa o indirectamente. (CDC- NIH, 2009).

Incubadora de CO₂

Las incubadoras más utilizadas en un laboratorio de cultivo celular son las incubadoras de CO₂, pero es posible usar otros sistemas de incubación como son los de temperatura controlada como estufas y baños con termostatos. Esto son equipos que mantienen la temperatura, además poseen un sistema de inyección de CO₂ generalmente entre 4-7% y finalmente controlan la humedad ambiental. Es muy importante la estabilidad de la temperatura ya que las células suelen resistir decrementos en la temperatura ambiental, pero son muy sensibles a aumentos por encima de la temperatura del animal de origen. Para homogeneizar la temperatura interna, algunos incubadores poseen un dispositivo de recirculación de aire que garantiza la homogeneidad de la temperatura en el interior de la cámara. El nivel de CO₂ se ajusta para mantener el equilibrio carbonato-bicarbonato del medio de cultivo (Freshney, 2010).

Microscopio invertido

El microscopio invertido tiene la fuente de iluminación y los objetivos en posición invertida respecto de los microscopios ópticos convencionales. El motivo de la localización de los objetivos y de la fuente de iluminación se basa en el hecho de que los frascos de cultivo suelen tener un grosor de centímetros y por lo tanto los microscopios convencionales no tienen una distancia focal en sus objetivos que permita la observación. En los microscopios invertidos los objetivos están localizados en la parte inferior, por lo tanto la distancia focal al substrato de cultivo se reduce, mejorando la visión (Lodish et al., 1995).

Congeladores y equipo de criogenia

Es recomendable disponer de distintos equipos que mantienen temperaturas bajas. Entre ellos podemos distinguir:

- Refrigeradores de 4°C: para mantener almacenados los medios de cultivo o soluciones.
- Congeladores de -20°C: para mantener el Suero Fetal Bovino, aditivos y enzimas.
- Ultracongeladores de -72°C: para mantener a largo plazo aditivos del medio de cultivo y para sustancias muy sensibles como enzimas, inductores y factores de crecimiento.
- Termo con nitrógeno líquido (-196°C): para el almacenamiento de células vivas. (Freshney, 2010).

El proceso de almacenamiento por congelación de células en cultivo requiere un medio especial de congelación que contiene un agente criopreservante como glicerina, DMSO o PVP. Para proceder a la congelación se realizan pases por temperaturas cada vez más bajas hasta finalmente utilizar los depósitos con nitrógeno líquido. Existen sistemas automáticos para la reducción (Freshney, 2010).

Equipo de esterilización y filtración

La asepsia del cultivo depende no sólo del medio que deberá ser estéril y el área de trabajo lo más aséptica posible (cabina de flujo), también todos los recipientes e instrumentos que entren en contacto con el cultivo deben de ser estériles. A veces podemos utilizar tubos o pipetas que se adquieren estériles, pero en otras ocasiones debemos de proceder a su esterilización. El método más utilizado es la autoclave (aproximadamente 121°C, 115 lb de presión, 15 min). Otros sistemas son la esterilización por irradiación con rayos gamma o rayos X, la esterilización por gas (óxido de etileno o formaldehído), luz ultravioleta, calor seco. Estos sistemas se utilizan generalmente para elementos de cristal o de plástico como frascos, tubos, pipetas. Para esterilizar soluciones líquidas se suelen utilizar sistemas de filtros con un tamaño de poro de 0.22µ que no dejan pasar ni bacterias ni hongos mayores de dicho tamaño, realizándose por lo tanto una esterilización por filtración (Freshney, 2010).

2.6 Cultivos Primarios

Los cultivos primarios tienen características especiales que los diferencian de las líneas celulares: conservan la morfología de las células del órgano del que fueron aisladas,

sus cromosomas tienen un número diploide ($2n$), su crecimiento *in vitro* es limitado y hay inhibición por contacto. Al ser más parecidas a las células que las originaron, se ve reflejada en una mejor actividad y funcionalidad similar a su ambiente natural, por lo que en aislamientos primarios de cepas virales éstas tienen mayor sensibilidad que una línea celular ya establecida. Igualmente para la producción de vacunas los cultivos primarios son recomendables por tener una baja probabilidad de que se transformen en malignos. Dentro de las desventajas está la de una mayor probabilidad de presentar virus adventicios o latentes, lo que implica el desarrollo de la adecuada tecnología para el control de calidad (MacLeod, 1995).

El proceso para establecer un cultivo celular, es seleccionando las células que crecerán según numerosos criterios. Así solo formarán el cultivo aquellas células que sean por una parte capaces de superar el proceso de disgregación, y por otra capaces de adherirse al sustrato y proliferar en forma de monocapa o en suspensión. El crecimiento en monocapa significa que las células se adherirán al sustrato y en esa forma inician la proliferación. Muchas líneas celulares son anclaje dependientes, es decir no inician la proliferación hasta que se han adherido al sustrato. Este es el modo normal de proliferación de la mayor parte de las células, con excepción de las células hematopoyéticas maduras (MacLeod R., 1995). El crecimiento en suspensión es propio de aquellas células capaces de proliferar sin necesidad de adherirse al sustrato, independientes de anclaje y es propio de las células hematopoyéticas, algunas líneas celulares transformadas y de células procedentes de tumores. Es de destacar que en todo tejido existe una fracción o tipo celular que es capaz de crecer en suspensión. A pesar de que su origen no está claro se cree que se trata de células madre ("stem cells") indiferenciadas. Cuando se mantiene el cultivo se establece una nueva selección: aumentan en número aquellas células que tienen una mayor tasa de crecimiento. En el momento en que se eleva la confluencia, las células en general detienen su crecimiento, aunque pueden existir tipos celulares neoplásicos que sigan duplicándose y que desplacen a los otros del cultivo. Así pues se ha de entender el cultivo como un ente dinámico en el que las proporciones relativas de los diferentes elementos que lo forman varían en el tiempo en función de la presión selectiva a la que estén sometidos (Freshney, 2010).

La confluencia en un cultivo es el estado cuando el parecido morfológico y fisiológico es mayor al modelo celular de origen. Es también el momento en el que se detiene el crecimiento y se hace necesario dividir, hacer pase o propagar las células. Es una observación generalizada que después del tercer pase el cultivo se estabiliza y homogeneiza: el tipo celular de mayor tasa de crecimiento ha ocupado completamente el cultivo desplazando a los otros tipos celulares. En general, si no se establecen condiciones selectivas las células del tejido conjuntivo, especialmente fibroblastos, serán las seleccionadas finalmente. Para evitar que las células más especializadas del cultivo se vean desplazadas de éste por los fibroblastos y otras células de rápido crecimiento se han establecido protocolos detallados de medios selectivos (Freshney, 2010).

2.7 Cultivos de Células Embrionarias de Artrópodos

El crecimiento de las células de artrópodos en cultivo primario es lento. Durante las primeras semanas de crecimiento se debe ir reemplazando el medio, pero se deben recobrar por centrifugación las células que pudieron ser extraídas en el medio viejo. Los cultivos se deben monitorear en el microscopio invertido. Cuando el cultivo alcanza el 80% de confluencia se puede realizar un subcultivo. Para desprender las células de la placa de cultivo en el procedimiento de subcultivo, se puede emplear la fuerza mecánica (bombeo) de una pipeta, el enfriamiento del cultivo a 4°C durante 20 minutos seguido de bombeo con pipeta, tratamientos enzimáticos, o un rayador de células, que no es más que un tubo estéril diseñado para estos propósitos. De la misma manera que cualquier otro cultivo celular, en los cultivos de insectos se debe tener precaución de la contaminación y muy especialmente de la contaminación cruzada con otras líneas celulares. Algunos cultivos de células embrionarias de insecto necesitan, gases especiales, el cultivo de células embrionarias de *Rhipicephalus microplus* necesita de una inyección gas CO₂ al 5 % (Sudeep, 2005).

Las líneas deben ser monitoreadas periódicamente para detectar contaminantes, el primer método para esto es evitar el uso de antibióticos en el medio, de esta forma si un agente bacteriano llega a penetrar en el cultivo podrá desarrollarse y será detectado rápidamente. Para otros contaminantes como virus y micoplasmas existen pruebas comerciales y es recomendable revisar los cultivos periódicamente. Por estas razones es

importante mantener un stock congelado de las líneas celulares que se manejen, para que en el caso de hallar contaminantes en el cultivo se pueda retomar el cultivo desde el stock (Sudeep, 2005).

2.8 Ventajas y desventajas de los cultivos celulares

Como ventajas podemos citar:

a) Permiten un control preciso y fino del medio ambiente

El medio definido es aquél en el que se conocen todos y cada uno de los componentes que lo forman y su concentración exacta, las condiciones físico-químicas (pH, temperatura, presión osmótica, presión parcial de O₂ y CO₂) y fisiológicas como hormonas, factores de crecimiento, densidad celular. Para algunas líneas celulares se han determinado medios definidos (Davis J.M., 2002). Para establecer un medio definido hay que conocer con precisión las necesidades nutritivas de las células en cuestión. Sin embargo en el caso de muchas líneas celulares, estas necesidades no se conocen. En estos casos se utilizan medios que se suplementan con disoluciones complejas: suero, extractos de embrión, etc., que contienen factores hormonales y nutritivos imprescindibles para el cultivo pero cuya naturaleza se desconoce (Freshney, 2010).

b) Caracterización y homogeneidad de la muestra

Las líneas celulares cultivadas son homogéneas, ya que después de dos o tres pases, su morfología y su composición son uniformes. La presión selectiva de las condiciones de cultivo da lugar a un cultivo homogéneo del tipo celular más vigoroso. A partir de ese momento se pueden obtener réplicas idénticas en cada subcultivo y las características de la línea celular se conservan durante varias generaciones o de forma indefinida si la línea celular se conserva en nitrógeno líquido. Esto facilita mucho el tratamiento estadístico de los resultados (Freshney, 2010).

c) Economía

Los cultivos celulares emplean soluciones con una concentración mucho menor que en el caso del animal completo. Además, se garantiza el acceso directo de la sustancia a las células sin que se diluya y sin que sufra ningún tipo de modificación metabólica. El costo de los ensayos clínicos se reduce considerablemente y se puede hacer un mayor número de pruebas. También se reducen los costos relacionados con la fabricación del

posible nuevo medicamento: en lugar de fabricar cantidades del orden del gramo (para el estudio en animales) basta con que se sinteticen unos pocos miligramos (Freshney, 2010).

d) Cuestiones éticas

La investigación biomédica supone el sacrificio cada año de miles de animales de experimentación. El cultivo celular no puede reemplazar siempre al ensayo '*in vivo*' pero es una alternativa válida en muchas situaciones y cada vez más aceptada. Para obtener un cultivo celular primario es posible que haya que sacrificar algún animal, pero con ellos se pueden ensayar un elevado número de condiciones experimentales que, en otras circunstancias, supondrían el sacrificio de decenas o cientos de animales de experimentación (Freshney, 2010).

Los cultivos celulares también pueden suponer algunas desventajas:

a) Técnica sensible

El crecimiento de las células animales se tiene que realizar en estrictas condiciones de asepsia, porque su crecimiento es mucho más lento que el de los contaminantes más habituales como hongos, levaduras, bacterias, micoplasmas, etc. Además, las células animales son incapaces de mantenerse vivas en ausencia de la compleja mezcla de nutrientes presente en el plasma o en el fluido intersticial. Todo esto condiciona en gran medida el instrumental requerido y el grado de preparación del personal encargado de los cultivos (Freshney, 2010).

b) Cantidad y costo

La siembra de un gramo de células en cultivo cuesta 10 veces menos que obtenerlas a partir del tejido de un animal. En un laboratorio normal se pueden conseguir hasta 10 gramos de células sin que se resienta mucho el presupuesto de investigación. Para producir hasta 100 gramos de células hay que incrementar tanto el instrumental como el personal. Para producir cantidades mayores se necesitan instalaciones de tipo industrial.

c) Inestabilidad

Las líneas celulares continuas pueden llegar a ser inestables y adoptan una dotación cromosómica aneuploide, lo que afecta tanto a su velocidad de crecimiento como a su capacidad para diferenciarse. Es posible, por tanto, encontrar diferencias significativas en la línea celular de una generación a la siguiente. La única manera de evitarlo es emplear

líneas estables que se resiembran cada determinado tiempo o después de un determinado número de generaciones a partir de un stock congelado (Freshney, 2010).

d) Desdiferenciación e identificación de las células

La línea celular, al propagarse pierde las características fenotípicas propias del tejido de procedencia. Este fenómeno se denomina desdiferenciación y las células, entre otras cosas, se hacen móviles e inician su proliferación. La relación entre las células cultivadas y las células originales del tejido puede perderse. En este caso se necesitan marcadores estables que permitan identificar la procedencia de las células. En algunos casos es posible revertir la desdiferenciación, bien por procedimientos de diferenciación inducida por hormonas, bien por compuestos químicos (ésteres de forbol) pero no está claro si el estado rediferenciado es equivalente al estado de diferenciación “*in vivo*” (Freshney, 2010).

e) Validez del modelo '*in vitro*'

En realidad, un cultivo celular es un disgregado celular de un tejido y se diferencia de éste en que:

- La organización espacial tridimensional propia del tejido se pierde, ya que éstas se propagan en dos dimensiones.
- Las interacciones entre los distintos tipos celulares y entre las células y la matriz extracelular se han perdido. Además, al formarse una línea celular sólo se conservan uno o dos tipos celulares (los que proliferan a mayor velocidad).
- Carece de los componentes sistémicos implicados en la regulación de la homeostasis “*in vivo*”, especialmente los sistemas nervioso y endocrino.
- La presión parcial de O₂ es reducida, ya que no hay un transportador de oxígeno como la hemoglobina. Por tanto, la energía se obtiene principalmente a través de la glicolisis, ya que el ciclo de Krebs juega un papel muy reducido. Por tanto, se deberá ser precavido en cuanto a la validez de los resultados obtenidos “*in vitro*” porque pueden diferir de lo que pueda observarse “*in vivo*”.

B. Rhipicephalus microplus

2.9 Agente etiológico

Las garrapatas son ácaros, ectoparásitos temporales obligados de reptiles, aves y mamíferos. En los estadios adultos es posible observarlas a simple vista. Presentan una morfología y biología muy uniformes y se dice que aparecieron hace unos 290 millones de años en el paleozoico. Se dividen en dos familias Argasidae también llamada garrapatas blandas y la familia Ixodidae o garrapatas duras. (Corwin, 1997). El ser humano con la introducción de la ganadería favoreció extraordinariamente a este tipo de garrapatas al facilitarles el contacto con los hospedadores, mediante el mantenimiento de un número elevado de animales en pequeños espacios (Barker y Murrell, 2004).

Las garrapatas son parásitos obligados y requieren sangre y líquidos tisulares para su desarrollo. El efecto perjudicial sobre sus hospedadores, puede ser directo cuando hay succión de sangre y provoca lesiones dérmicas. O un efecto indirecto cuando transmiten protozoos, rickettsias, bacterias y virus (Camino, 1991).

La garrapata *Rhipicephalus microplus* en su condición de parásito hematófago es considerada la más importante del ganado bovino a nivel mundial. Se encuentra en las partes más húmedas y cálidas al oeste de la India, México, América central, Sudamérica, África, Australia, el oriente de Micronesia y también se ha podido encontrar en algunas poblaciones de Florida y Texas en EEUU (APHIS USDA, 1976).

2.10 Características anatómicas y fisiológicas de la garrapata *Rhipicephalus microplus*

La garrapata *R. microplus* se puede encontrar en diversos hospedadores, entre ellos el ganado bovino, búfalos, caballos, asnos, cabras, ovejas, ciervos, cerdos, perros y algunos animales silvestres. Una alta carga de garrapatas en los animales puede disminuir la producción y dañar los cueros. *R. microplus* también puede transmitir enfermedades como

la babesiosis causada por los parásitos protozoarios *Babesia bigemina* y *Babesia bovis* y la anaplasmosis causada por *Anaplasma marginale* (Corwin, 1997).

Las garrapatas duras poseen un escudo dorsal que es completo en los machos (Figura 3) y en las hembras es incompleto (Figura 1). Las hembras tienen el cuerpo en forma entre ovalada y rectangular y el escudo es ovalado y más ancho en la porción anterior. El surco anal está ausente o poco definido en las hembras, y levemente visible en los machos. Las garrapatas *R. microplus* adultas poseen un capítulo corto y derecho con base hexagonal (Figura 4). Todos los estadios presentan un gnatosoma anterior con hipostoma. El hipostoma presenta cuatro hileras de dientes y a su costado de cada lado se encuentran los palpos. En las hembras el gnatosoma, presenta áreas porosas (Figura 2). Estas garrapatas carecen de festones y ornamentos (Barker y Murrell, 2004). (Walker, 2003).

Las larvas de *R. microplus* poseen un capítulo corto y derecho y un cuerpo de color marrón o crema. Las larvas poseen seis patas en lugar de ocho (Walker, 2003).

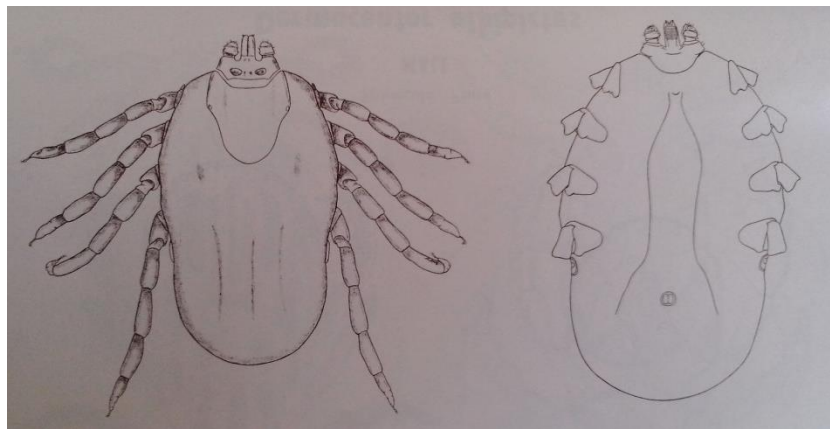


Figura 1 Hembra de *R. microplus* (tomado de ALPHIS-USDA, 1976)

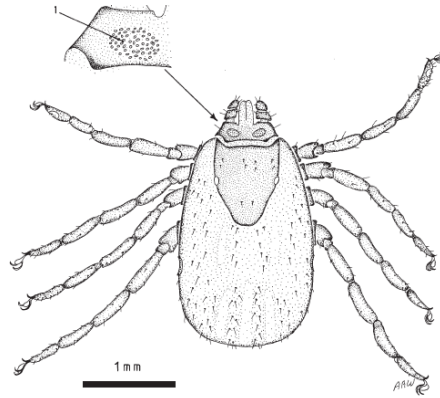


Figura 2 Hembra de *R. microplus* donde se muestran las áreas porosas (tomado de Walker A R, 2003).

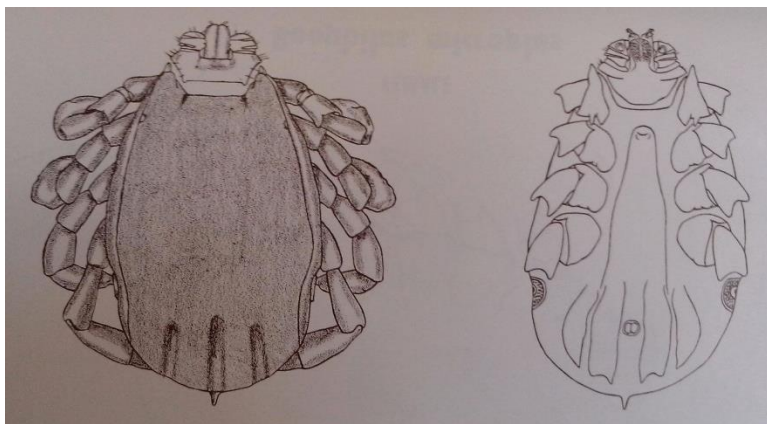


Figura 3 Macho de *R. microplus* (tomado de ALPHIS-USDA, 1976).

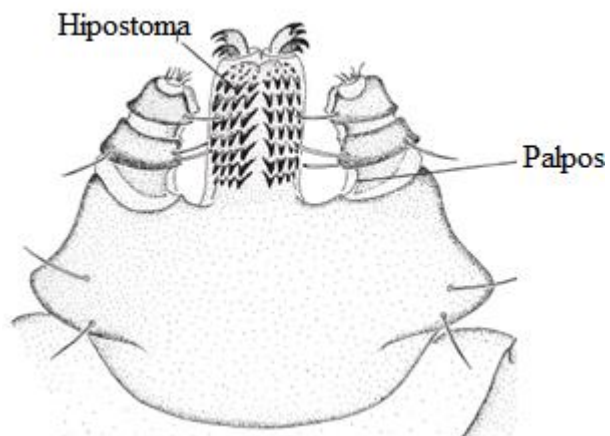


Figura 4 Capítulo de *R. microplus* (Walker, 2003).

2.11 Taxonomía de *Rhipicephalus microplus*

Las garrapatas, al igual que arañas y escorpiones pertenecen a la Clase Aracnida. A diferencia de los componentes de la Clase Insecta, las garrapatas no tienen antenas y tienen la cabeza y tórax fusionados (Rodríguez, 2006).

Phylum: Artropoda

Clase: Aracnida

Orden: Acarina

Suborden: Ixodidos

Familias: Ixodidae

Garrapatas duras

Géneros: *Rhipicephalus*

Especie: *microplus*

2.12 Distribución geográfica

La distribución geográfica de las garrapatas en México obedece a factores ambientales como humedad relativa y temperatura, vegetación, presencia y abundancia de hospederos que son determinantes en la distribución de las especies. *R. microplus* presenta en el país un área de distribución que abarca zonas tropicales, subtropicales y templadas; en conjunto se considera que cubre 1 043 772 Km² (53% del territorio nacional). Muchos municipios que estaban erradicados de garrapatas *R. microplus*, están siendo reinfestados. (Solis, 1991).

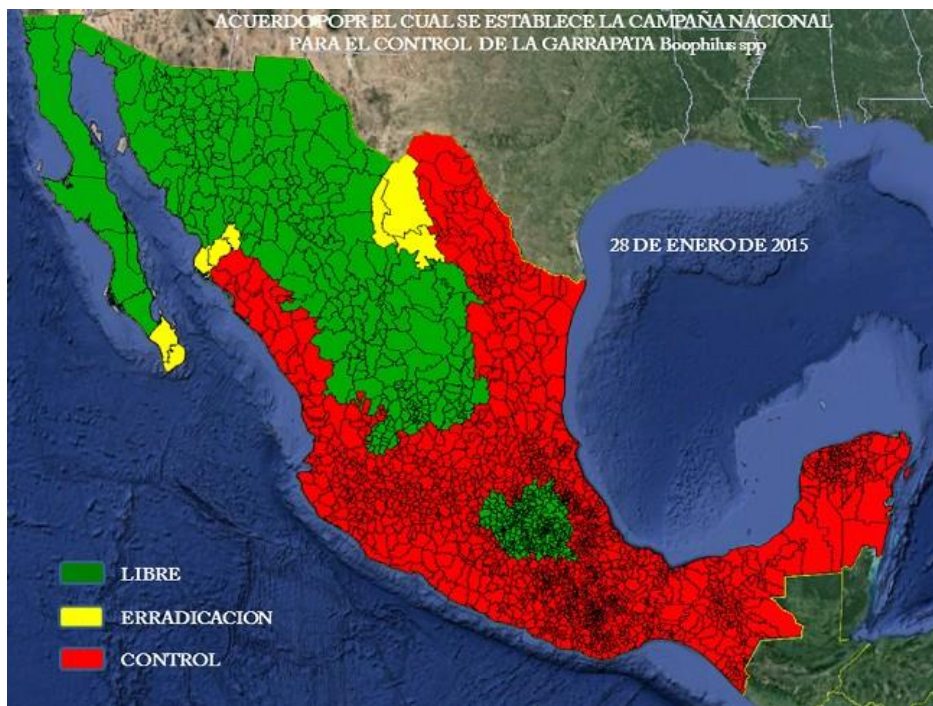


Figura 5 Mapa de México donde se esquematiza la situación actual de *R. microplus* en la donde existen áreas libres, en control y en proceso de erradicación (tomado de Sagarpa, 2015).

La fase libre ocupa una porción importante del norte del país, así como áreas del centro; comprende 94.4 millones de hectáreas, las cuales equivalen al 47.88% del territorio nacional. Las zonas en fase de erradicación cuentan con 1.1 millones de hectáreas que se ubican en las áreas en las cuales el parásito ha sido eliminado por efectos de la campaña de control y representan un 0.57%. Las áreas en fase de control en este momento alcanzan una superficie total de 101.6 millones de hectáreas y representan el 51.5% del país (SENASICA, 2015).

2.13 Ciclo de Vida de la Garrapata *Rhipicephalus microplus*

La garrapata *R. microplus* tiene 4 estadios evolutivos: huevo, larva, ninfa y adultos macho y hembra. Las garrapatas *R. microplus* son de un hospedero y necesitan cursar tres fases: no parásita, de encuentro y parasítica (Rodríguez, 2006).

Ciclo de vida libre o también llamado no parasítico

La vida libre de la garrapata comienza una vez que la hembra repleta o teleogina se desprende del hospedero y cae al suelo, a partir de ahí pasa por seis distintas etapas: Preoviposición, oviposición, postoviposición, incubación, eclosión y larva de vida libre (Rodríguez-Vivas, 2005).

a) Preoviposición o Protoquia.

Es la etapa en que la hembra repleta se desprende del huésped y cae al suelo, se mueve en busca de un lugar protegido y con sombra para desovar huevos; esta etapa dura aproximadamente de 2 a 4 días en verano y bajo condiciones de laboratorio y puede ser de 20 a 23 días en invierno (Núñez, 1996).

b) Oviposición u Otoquia.

Es el período que comienza desde que la teleogina desova el primer huevo hasta que desova el último. Los factores ambientales tienen influencia definitiva sobre la duración de este período, pero puede decirse que en términos generales, la oviposición dura en verano de 5 a 15 días y que en invierno este período se duplica o triplica en condiciones extremas, pudiendo llegar a los 44 días (APHIS- USDA, 1976). El promedio de desove de una hembra ovígera de *R. microplus* oscila entre 2500 y 3000 huevos (Núñez, 1996).

c) Postoviposición ó Metatoquia.

Es el período de tiempo que transcurre desde la puesta del último huevo hasta la muerte de las hembras adultas repletas, después de haber llevado a cabo su función. (Rodríguez-Vivas, 2005). Este período dura de 2 a 15 días (Nuñez, 1986).

d) Incubación:

Es el período que abarca desde que los huevos han sido depositados en el ambiente hasta su eclosión (Rodríguez-Vivas, 2005). Los huevos depositados en el ambiente tienen una forma elíptica y miden aproximadamente 550 por 400 μ , son de color marrón oscuro y de superficie brillante y pegajosa cubierta por una sustancia de aspecto albuminoide. La evolución del embrión está influenciada por el ambiente, principalmente por la temperatura y la humedad; especialmente la temperatura. El periodo de incubación puede ser considerablemente acortado o alargado; siendo más corta en verano que en invierno pudiendo ser de 14 a 146 días (APHIS-USDA, 1976). Los períodos de incubación

donde se obtienen mejores porcentajes de eclosión, se encuentran entre los rangos de 24.9 a 35 °C y humedad relativa de 80-90 % (Nuñez, 1996).

e) Eclosión.

La radiación solar directa en condiciones de campo, puede destruir prácticamente la totalidad de los huevos. La humedad es otro factor importante para la fertilidad, siendo la óptima de 80-90%; pero un exceso permanente tiene consecuencias en la formación de hongos (Nuñez, 1986). Cuando se estudia con huevos normales sin alteraciones morfológicas visibles y que no hayan sufrido manipuleo, ni estén afectados por algún tratamiento ixodicida, o por excesivo calor, luz solar; el porcentaje de eclosión bajo condiciones de laboratorio suele ser muy alto, casi siempre superiores al 80% (Rodríguez-Vivas, 2005).

f) Larva de vida libre.

La larva de *R. microplus* es de aproximadamente 500μ de largo por 400μ de ancho; tienen forma ligeramente ovoide y cuenta con tres pares de patas. Al inicio es de color ámbar y con el paso del tiempo va tomando un tono rojo oscuro. Una vez que eclosiona el huevo, las larvas suben al pasto y ascienden a las hojas, prefieren las zonas sombreadas de la brizna, y se mueven girando en la hoja evitando la luz solar directa. En esta fase las larvas incrementan enormemente su actividad cuando detectan el movimiento de un cuerpo en la cercanía, adoptando una curiosa posición ya que se sostienen en sus dos pares de patas posteriores, extendiendo el par de patas anterior tratan de adherirse al posible hospedero (Nuñez, 1986).

Ciclo de vida parasítico

El tiempo que dura el ciclo parasítico de la garrapata *R. microplus* es relativamente constante y dura de 18 a 22 días. El índice de mortalidad de las garrapatas durante esta fase está determinado por la resistencia del hospedero. La etapa parasitaria comienza una vez que las larvas logran treparse a un bovino como su hospedero favorito, las larvas son estimuladas fuertemente por el bióxido de carbono (Nuñez, 1986). Una vez sobre el hospedero, las larvas se fijan de preferencia en zonas protegidas de la luz solar, vientre, axila, parte interna de la pierna, ubre, escroto e ingle, también se pueden encontrar

en cuello, hombro, papada. El ciclo parasítico puede ser dividido en tres etapas principales: larva, ninfa y adulto (Rodríguez-Vivas, 2005).

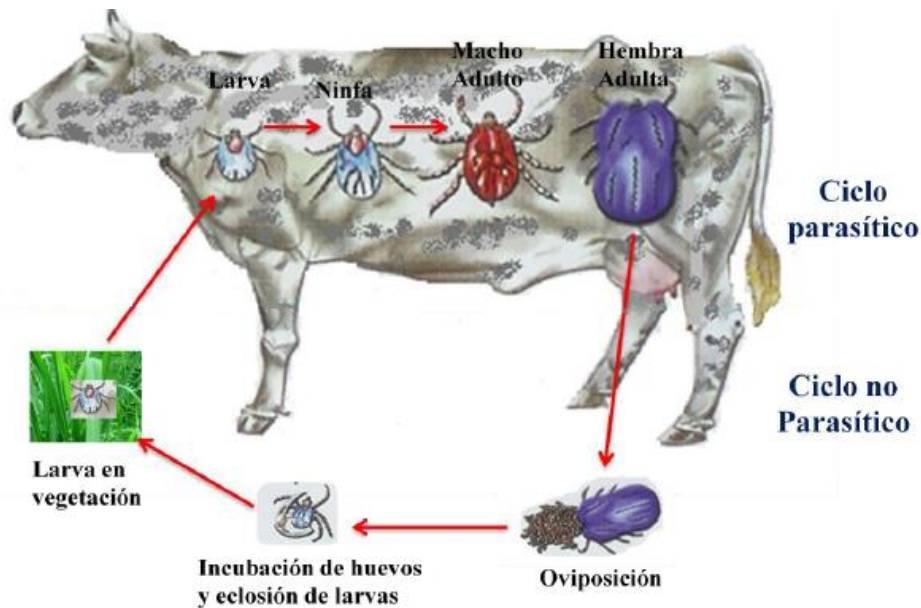


Figura 6 Estadios del ciclo de vida de la garrapata *R. microplus*.

Etapa Larva.

Las características morfológicas más importantes son: tres pares de patas y la doble hilera de dientes en el hipostoma. Cuando la larva se adhiere al huésped se traslada por el cuerpo del animal hasta alcanzar un sitio adecuado para adherirse, que son por lo general zonas donde la piel es laxa y muy irrigadas, perfora la piel con los quelíceros, fija el hipostoma y comienza a alimentarse. A las 72 horas el movimiento de las patas se debilita y gradualmente se minimizan en las articulaciones distales, únicamente persisten movimientos en las articulaciones coxofemorales. Después de 5 días la muda se aproxima, el tamaño se incrementa hasta alcanzar 2.0 mm de largo y un peso aproximado de 0.236 mg. Por lo general se puede apreciar el mayor porcentaje de larvas repletas después del sexto día hasta el noveno día (Núñez, 1996). Aunque hay reportes que este periodo puede extenderse de 7 a 12 días (ALPHIS-USDA, 1976).

La etapa de Ninfa es donde ocurren más cambios morfológicos: aparecen cuatro pares de patas y la triple doble hilera de dientes en el hipostoma. Además, se pueden apreciar espiráculos en ambos lados del cuerpo detrás del cuarto par de patas (Núñez, 1996). La ruptura del tegumento, queda adherida a la epidermis del huésped y casi al lado

de donde estaba fijada con anterioridad. Rápidamente comienza alimentarse, gradualmente sus patas pierden movilidad y se dice se convierte en metaninfa.

El cuerpo se estrecha notablemente detrás del último par de patas. Al final de la etapa se puede notar el dimorfismo sexual ya que las hembras son más grandes y de color claro en relación con los machos. Generalmente aparecen al día nueve postinfección y la mayoría se observa alrededor del día 13. Es posible que se observen hasta el día 28 postinfección, dependiendo en gran medida del lugar donde se localicen (ALPHIS-USDA, 1976). El peso se incrementa notablemente, duplicándose alrededor del día 10 y alcanzando un máximo el día 14 postinfestación (Núñez, 1996).

Adultos

Los cambios morfológicos más sobresalientes de esta etapa son los cuatro pares de patas y una cuádruple hilera dentaria en el hipostoma (Núñez, 1996).

Macho

El tegumento de las ninfas repletas más pequeñas y oscuras se abre longitudinalmente, emergen los machos, los cuales son de color oscuro con un largo total de 2.0 a 2.5 mm de largo. Sus ocho patas son relativamente fuertes y con gran movilidad. Ventralmente, se observa el orificio genital a nivel del segundo par de patas. En el tercio posterior del cuerpo se puede apreciar el ano. El macho se alimenta moviendo a varios sitios y deambulando por la piel buscando una hembra para fecundarla, se ubica detrás de ella y la fertiliza. Se pueden observar machos desde el día 13-14 postinfestación. Para el día 42, el 100% de los machos constituye la población parasitaria; ya que las hembras una vez completado su ciclo caen al suelo (Nuñez, 1996).

Hembra plegada:

Las ninfas repletas de mayor tamaño, generalmente el 50%, se transforman en hembras púberes denominadas hembras plegadas o neoginas. Tienen forma oval aplanada de color café claro con ocho patas largas y fuertes. Miden aproximadamente 2.0 mm y ventralmente el orificio genital aparece a nivel del segundo par de patas. Las primeras hembras plegadas aparecen generalmente al día 14-15 postinfestación, y generalmente no deambulan por la superficie corporal, sino que se adhieren nuevamente cerca del sitio de donde ellas fueron ninfas (Núñez, 1996).

Hembras semirepletas:

Las hembras semirepletas comienzan a alimentarse hasta que se fertilizan, al aumentar su tamaño, se desprenden del hospedero como hembras repletas. Su crecimiento es lento, pero al tercer o cuarto día después de ser hembras plegadas su cuerpo se incrementa en un 80%. En lo sucesivo el crecimiento es rápido de hasta un 400% al día 4-5 después de ser hembra plegada. Las hembras semirepletas se pueden apreciar claramente a los 17-18 días postinfección. Se considera importante señalar que no todas las hembras son fertilizadas, en tales casos, el desarrollo cesa (Núñez, 1996).

Hembras repletas

Las hembras cuando están completamente ingurgitadas, terminan su desarrollo y se desprenden para desovar fuera del huésped. La hembra semirepleta o parteneogina incrementa su tamaño de 4.0 a 6.0 mm y espera hasta copular con el macho para posteriormente alcanzar el estado final de hembra repleta o teleogina (Figuras 4 y 5). Su forma es ovoide, grisácea y mide de 7.0 a 13.0 mm de longitud y de 4.0 a 8.0 mm de ancho. La gran mayoría de hembras repletas se desprenden alrededor del día 21 a 23 postinfección. Generalmente se ha observado que el desprendimiento ocurre en las mañanas y también que algunas sufren ciertas modificaciones morfológicas, sin afectar el porcentaje normal de ovoposición (Núñez, 1996). En condiciones tropicales favorables pueden producir más de cuatro generaciones cada año (ALPHIS-USDA, 1976).

III. OBJETIVO GENERAL

Implementar un cultivo celular a partir de embriones de garrapata *Rhipicephalus microplus*

IV. METODOLOGÍA

4.1 Colección de Hembras

Las hembras repletas se colectaron de un bovino infestado en el Campus Amazcala de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ. En el laboratorio las hembras se colocaron en una coladera de plástico y se lavaron al flujo de agua para retirar suciedad, se desinfectaron con una solución de cloruro de benzalconio al 10%, donde fueron sumergidas por 15 minutos, se enjuagaron dos veces con agua desionizada estéril y se realizó un último enjuague con agua desionizada estéril con Pen/Strepto/Anfotericina B. Las hembras repletas, se dejaron secar al aire en papel filtro estéril, se colocaron en cajas de Petri en grupos de 30 garrapatas, posteriormente se incubaron a 28 °C, con 90% de humedad relativa (Pudney et al, 1973).

4.2 Cosecha de huevos de garrapata

Las hembras repletas comenzaron a ovopositar, después de tres días de incubación. Se recolectaron los huevos ovopositados durante 24 horas, en condiciones de esterilidad, las hembras repletas se cambiaron a una caja de Petri nueva y estéril, se etiquetaron con la fecha y se mantuvieron en incubación a 28° C con 90 % de humedad relativa. Esto se realizó por los siguientes cuatro días, para tener cinco grupos de huevos.

4.3 Siembra de Células

Al día diez después de la colección, se tomaron las placas de Petri con los huevos y se llevaron a la campana de flujo laminar. El cultivo primario se preparó como lo describió Holman y Ronald en 1980. Se recolectaron las masas de huevos en un tubo cónico de 50 ml y se lavaron con cloruro benzalconio estéril al 10%, agitando suavemente durante quince minutos, posteriormente se lavaron con 5ml de una solución de fosfatos y Pen/Strepto/Anfotericina B por 10 minutos, pasado el tiempo se decantó esta solución y se agregaron 15 ml de medio MEM con sales de Hanks-LAC (0.5% lact albumin hydrolysate, PH 6.8) las masas de huevos se maceraron en un mortero estéril y solo se hizo la presión

necesaria para romper los cascarones. La suspensión de tejido no se filtró se removieron algunos cascarones evitando cargarlos con la pipeta, el macerado se transfirió a un tubo estéril de 50 ml, se centrifugó a 200 x g por 15 minutos. El pellet se resuspendió en medio de cultivo completo este se preparó siguiendo la fórmula de 40% de medio MEM con sales de Hanks-LAC 40% de medio L-15 Leibovitz's, 10% caldo triptosa fosfato, 10% suero fetal bovino inactivado, 1% de ABAM antibiótico antimicótico. El medio se esterilizó por filtración usando un poro de membrana de 0.22 μ . la suspensión completa se colocó en placas para seis pozos para cultivo celular añadiendo 5 ml a un pozo y 5 ml de medio solo a otro pozo como control, el cultivo se mantuvo en incubación a 28°C (Holman y Ronald, 1980).

4.4 Mantenimiento del Cultivo

Al tercer día post-siembra se le añadió medio completo con Penicilina/Streptomycin/Anfotericina B, para evitar contaminaciones. El cultivo fue monitoreado cada semana con un microscopio invertido, después de tres semanas se hizo cambió del medio de cultivo, inclinando la placa, para rescatar el medio sin llevarnos células. A partir de la tercera semana se realizó un cambio semanal de medio.

V. RESULTADOS

Siembra

El día de la siembra, el cultivo se incubó a una temperatura de 28 °C, en cámara húmeda, en la figura 7 se puede observar gran cantidad de detritos celulares, aglomeraciones de células y restos de los cascarones de los huevos de las garrapatas. A las 48 horas se pudo observar gran cantidad de detritos celulares y también se observó la presencia de numerosas y pequeñas células redondas algunas con citoplasma claro y algunas con citoplasma muy granular, también se observan restos de cascarón.



Figura 7 Imagen del cultivo el día de la siembra. Se observa gran cantidad de restos del macerado y aglomerados de células pequeñas y redondas 400 ×.

Mantenimiento del cultivo

La primera semana se retiró la mitad del medio de cultivo contenido en la placa y se añadió medio completo. En la figura 8 se observan células grandes con apariencia de tener vesículas en el citoplasma. Pequeñas células redondas, distribuidas pocas localizaciones en el medio de cultivo. También algunas células con apariencia de fibroblastos. Ronald y Holman (1980), reportan que ellos pudieron observar a los 10 días células grandes con presencia de vacuolas y también reportan observar conjuntos de agregados celulares y que estas se pudieron observar hasta el séptimo pasaje.

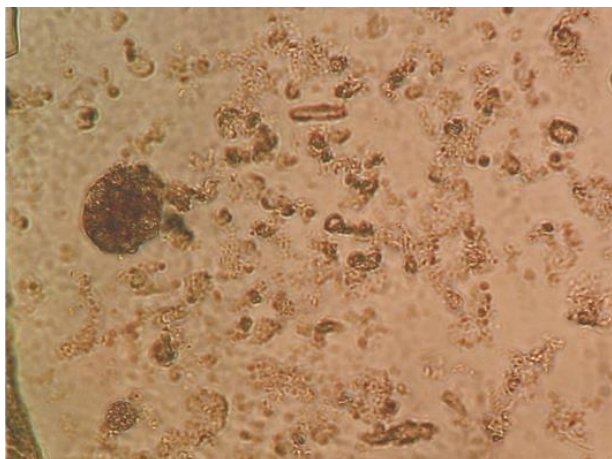


Figura 8 Imagen del cultivo a la primera semana, se puede observar restos de cascarón y algunas células redondas y una célula grande (400 ×).

El cultivo se mantuvo a 28 °C en cámara húmeda, para evitar resequeidad en el medio, y solo se observó al microscopio invertido una vez por semana que coincidía con el día de cambio de medio de cultivo. En la segunda semana (Fig. 9, panel A) se observa una gran cantidad de células redondas formando agregados, también se observan células más grandes con vesículas, Algunas células con apariencia a fibroblastos formando pequeños focos. En la tercera semana (Fig. 9, panel B) se realizó el cambio de medio de cultivo y aquí se puede observar el medio claro y han sido eliminados los detritos celulares así como restos de células flotantes que no consiguieron adherirse al fondo de la placa, nuevamente se observan algunas células grandes que parece que están en formación. Todavía se pueden observar algunos aglomerados de pequeñas células redondas. Holman y Ronald (1980) reportaron que a las tres semanas después de la siembra observaron que estaba presente una red de células de fibroblastos adherentes. También reportaron numerosos agregados celulares con muchas células que aparentemente parecen surgir de estos grumos. En la cuarta semana (Fig. 9, panel C) se observan grandes células con vesículas, y algunas células parecidas a fibroblastos. En la quinta semana (Fig. 9, panel D) se pudo observar un aumento en el número de los agregados celulares, también se notó la presencia de algunos focos de células similares a fibroblastos y de pequeñas células redondas. Holman y Ronald (1980) reportan que el tipo celular más predominante que observaron fue el de células con apariencia de fibroblastos alargados con citoplasmas claros. Mencionan también que hubo

gran cantidad de células pequeñas y redondas y que algunas se observaban con citoplasma claro y algunas con citoplasma muy granular.

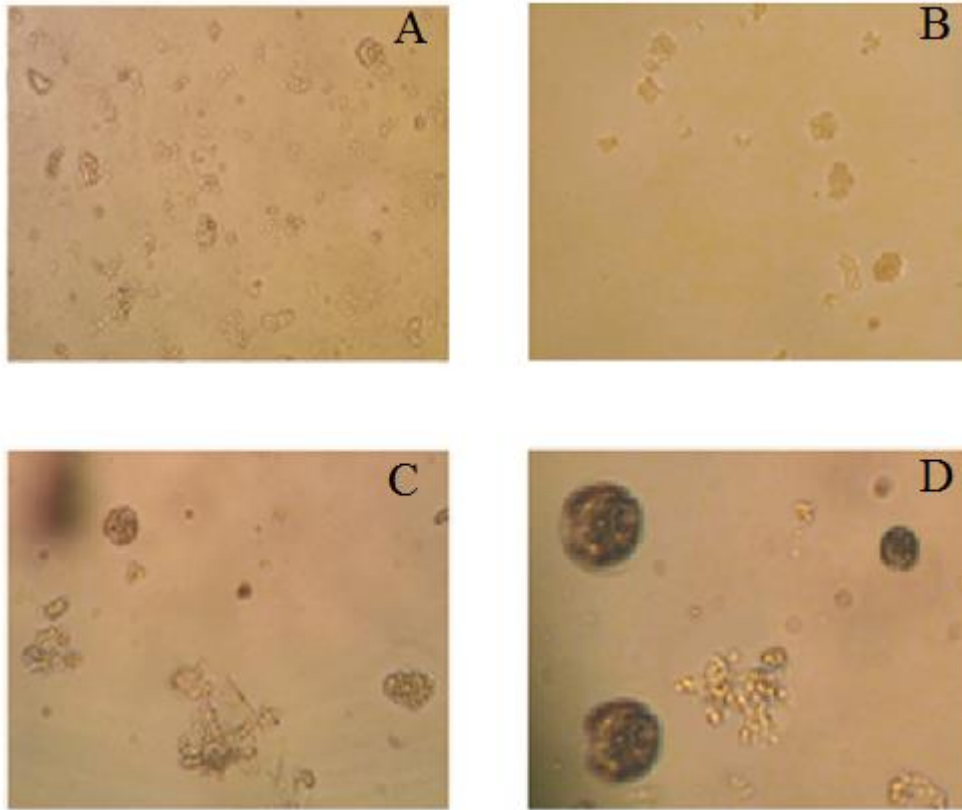


Figura 9 (A) Segunda semana, se observan células redondas aglomeradas. (B) Tercera semana, algunos agregados celulares (C) Cuarta semana, agregados celulares (D) Imagen del cultivo a la quinta semana (2000 \times). Células redondas y grupos de células similares a fibroblastos. Excepto D, todas las imágenes fueron tomadas a 400 \times .

VI. DISCUSIÓN

Se debe mencionar que en total se hicieron tres intentos más de este cultivo sin éxito, en ocasiones debido a la contaminación asociada con la poca cantidad de antibiótico añadido al medio del crecimiento, por lo que nosotros añadimos 30% más que lo reportado por Ronald y Holman (1980). En otra ocasión también fue insuficiente el número de huevos de hembras repletas recolectadas y el cambio de incubadora de CO₂ a una incubadora convencional.

La colonia de garrapatas de la cepa Media Joya alcanza una mayor cantidad de huevos ovopositados al tercer día nosotros comenzamos a recolectar desde el primer día, de puesta, pero las muestras de huevos que utilizamos para el cultivo primario fueron del tercer al quinto día de ovoposición. Sin embargo nosotros utilizamos huevos de 30 garrapatas repletas del día 10 de haber sido ovipositados. Estas muestras fueron las que proporcionaron el mejor modelo de células para nuestros cultivos. Pudney et al., (1973) reportaron que los huevos de 10 garrapatas producen material suficiente para un cultivo primario y ellos utilizaron huevos de 12 a 13 días de edad y los sembraron en botellas de 25 cm². En este trabajo fue insuficiente esa cantidad de células para un pozo de una placa de cultivo de seis pozos. Ronald y Holman (1980) describen que ellos encontraron que la siembra de dos botellas de 25 cm² con tejidos obtenidos a partir de las masas de huevos de 20 a 25 garrapatas tomadas 10 días después del inicio de la ovoposición les dio mejores resultados con sus cultivos. Esto pudiera deberse al tipo de células presentes en huevos de 12 a 13 días de edad y la diferencia en la composición del medio de crecimiento utilizado, la temperatura y el pH que han demostrado en cultivos celulares ser factores de cambio en la morfología de las células.

De acuerdo con reportes de Holman y Ronald en 1980, ellos mencionan que observaron a las 48 horas células con apariencia de fibroblastos, también mencionan que encontraron muchas células no adheridas, a la placa de cultivo, pero no se reporta partes de material proveniente del cascarón esto puede deberse a que ellos filtraron en dos ocasiones después de macerar, y en el presente trabajo, no se realizó filtración del macerado.

Ronald y Holman (1980) mencionan que en cultivos fallidos donde habían observado poca cantidad de fibroblastos, estos cultivos llegaban a formar gran cantidad de

células vacuolares, estas células normalmente se desprendían y morían. Ellos mencionan que estos cultivos no contenían cantidades considerables de pequeñas células redondas que ellos observaron en cultivos exitosos, por lo que aseveran que la presencia de células redondas parece ser un paso crítico en el desarrollo de líneas de células de *R. microplus*. En nuestra experiencia con este cultivo, se notó que la morfología celular, mencionada de células redondas estuvo presente en todos los intentos realizados, sin embargo no se llegó al número de pases suficiente para observar las células con morfología de fibroblastos la cual Ronald y Holman notaron que era uniforme en el pase número seis.

Pudney et al., (1973) menciona que utilizó una formulación diferente en cantidades de SFB y la cantidad de Medio L-15 Leibovitz's, a un pH de 7. Holman y Ronald (1980) utilizaron el medio de crecimiento como se describe anteriormente a un pH de 6.7-6.8 ellos observaron que el pH es un factor crítico en la longevidad de los cultivos. Si el pH no permanece ácido las células granulares se separan y desprenden de la placa, por lo tanto el cultivo pierde viabilidad. En un intento fallido de un cultivo celular, donde había gran cantidad de células redondas, se hizo un cambio de nuestro cultivo de incubadora de inyección de CO₂ y cámara húmeda a una incubadora convencional, se observó que muchas células se desprendieron a los 15 días de realizado este cambio, esto podría deberse a que como sabemos el CO₂, reacciona con la molécula del agua y forma el ácido carbónico lo que mantenía el pH ácido en nuestro cultivo, comprobando así lo indispensable que es mantener un pH ácido en el cultivo.

Ronald y Holman (1980) también mencionan que ellos realizaban sus cultivos celulares en otro laboratorio, por lo que frecuentemente dejaron de cambiar el medio hasta por seis semanas, ellos observaron que el cultivo se desarrolló más rápidamente, la red de fibroblastos y la falta de oxígeno beneficio en el desarrollo temprano de la monocapa celular. En nuestra experiencia lo máximo que dejamos sin cambiar el medio fue de dos semanas.

El cultivo celular primario realizado en este trabajo, se mantuvo por cinco semanas, y tenemos intentos fallidos de hasta 12 semanas y tres pases. Sería importante montar nuevamente este cultivo de células embrionarias de garrapata para así lograr la línea celular. Ronald y Holman (1980) reportan que después de 14 meses y 26 pases, lograron obtener el cultivo de células embrionarias; también reportaron que en los cultivos que se

incubaron a 32 °C encontraron mayor cantidad de fibroblastos o células de tipo epitelial, esto ocurrió en el pase número seis; los cultivos mantenidos a 28 °C crecieron más lentos y se presenciaban gran cantidad de células pequeñas y células granulares redondas que persistieron en el octavo pasaje. Valdría la pena probar el cultivo a 32 °C, para verificar que se obtuvieran mayor cantidad de células con apariencia de fibroblastos.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Animal and Plant Health Inspection Service–United States Department of Agriculture (1976) Agriculture Handbook N° 485
2. Arif B., Pavlik L. (2013). Insect cell culture: virus replication and application in biotechnology. *Journal of invertebrate Pathology*. 112. S138-141
3. ATCC® (2012). *Animal Cell Culture Guide*
4. Barker S.C., Murrell A. (2004). Systematic and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitol.* 129: 15-36.
5. Bruce A., Alexander J., Julian L., Martin R., Keith R., and Peter W. (2003). *Biología Molecular de la Célula*. 4ª Edición Ed. Omega, Barcelona España.
6. Butler M. (1996). *Animal Cell Culture and Technology. The Basics*. IRL Press at Oxford University Press, Nueva York, USA.
7. Camino L.M. (1991). Manejo y modificación del hábitat en el control de las garrapatas. Segundo Seminario Internacional de Parasitología Animal. Garrapatas y enfermedades que transmiten. Morelos, México. pp 66-71.
8. Carrel, A. (1913). Las contribuciones al estudio del mecanismo de crecimiento de tejido conectivo *J. Exp. Med.* 18: 287-298.
9. Center for Disease Control (CDC) National Institutes of Health (NIH), (2009) *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories 5th Edition*. Appendix A, 209 pp
10. Cohen S., Levi-Montalcini R, Hamburger V. (1954). A nerve growth-stimulating factor isolated from sarcom AS 37 and 180. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 40:1014-1018.
11. Corwin R. M, Nahm J. (1997). *Boophilus* spp. University of Missouri, College of Veterinary Medicine.
12. Cossio-Bayugar R., Barhoumi R., Burghardt R.C., Wagner G.G. & Holman P.J. (2002). In vitro generation of organophosphate Resistant *Boophilus microplus* Cell Lines. *Journal of Medical Entomology*. 39(2) 278-284.
13. Davis J. M. (2002). *Basic Cell Culture*. Second Edition. Oxford University Press, Oxford, UK.

14. Drummond, R., Ernst, E., Trevino, J.; Gladney, W., Grahan, O. (1973). *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*. Laboratory Test of Insecticides. J. Econ. Entomol. 66(1): 130-133.
15. Dwight E. L. (2001). Novel Techniques to Establish new Insect Cell Lines. In Vitro Cell. Dev Biol. Animal 37:319-321.
16. Eagle, H. (1955). Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. Science.122; 501-504
17. Evans M. J., Kaufman. M. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 292, 154-156.
18. Freshney R. I. (1986). Animal cell culture. A practical approach. IRL Press, Oxford.
19. Freshney R. I. (2000). Culture of animal Cells: A manual of basic technique. 6th Edition. John Wiley & Sons.
20. Freshney R. I. (1987). *Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique*. 2^a edición Ed. Alan R. Liss., pág.45-50.
21. Grace, T. D. C. (1967) Establishment of a line cells from the silkworm, *Bombyx mori*. Nature, London.
22. Ham, R. (1965). Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined synthetic medium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 53;288-293.
23. Hayflick L, Moorhead PS (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp Cell Res 25 (3): 585–621
24. Holbrock K.A. and Henning, H. (1938) Phenotypic Expresión of Epiderman Cell in Vitro A Review. pág 81.115-245.
25. Holman J. P. (1981). Partial Characterization of a unique Female Diploid Cell Strain from the Tick *Boophilus microplus*. Journal of Medical Entomology. Vol.18, n° 1: 84-88.
26. Holman J. P. and Ronald N.C. (1980). A New Cell Line Derived from *Boophilus microplus*. Research in veterinary Science. 29, 383-387.
27. Kato, H. and Takeuchi, M. (1966). Embryogenesis from the epidermal cells of carrot hypocotyl. Papers College Gen. Educ. Univ. Tokyo 16;245.
28. Klober, R. (2001). Garrapatas en caninos, un estudio en Maracay, Edo. Aragua. Fac. Cs. Vet. Postgrado en Medicina Veterinaria UCV, Tesis de Maestría. Maracay. Venezuela. 50 pp..

29. Köhler, G., y C. Milstein. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of determined specificity. *Nature* 256: 495-7
30. Littlefield, J. W. (1964). Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. *Science*. 145; 709-710.
31. Lodish, H., Berk, A., Matsudatra, P., Baltimore, D., Zipursky, L., and Darnell, J. (1995) *Molecular Cell biology*. Scientific Books, Inc. N.J, USA. pp. 148-150.
32. MacLeod R. (1995). Rapid monolayer primary cell culture from tissue biopsy, *Cell and Tissue Culture. Laboratory procedures Vol. 1*, Jhon Wiley and sons ltd; 3E: 2.1.
33. Morton H J. (1970). A survey of commercially available tissue culture media. *In vitro*. 6(2) 89.
34. Nuñez J. (1996). Garrapata: Taxonomía y ciclo biológico de *Boophilus microplus*. Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos. Bases epidemiológicas para su prevención y control. Nari A., Fiel C. (ed). Hemisferio Sur. Uruguay.
35. Núñez J. L., Muñoz C.M., Moltedo H.L., (1982). *Boophilus microplus* la garrapata común del ganado vacuno. 1º ed. Buenos Aries, Argentina: Editorial hemisferio sur; 94 (1): 184.
36. Puck, T.T. Marcus P.I., and Cieciura S.I. (1956). Clonal growth of mammalian cells in vitro: growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a feeder layer. *J.Exp. Med.* 103:273-284
37. Pudney, M., Varma G. R. and Leake C.J. (1973). Culture of embryonic cells from the tick *Boophilus microplus* (Ixodidae) *J. Med. Entomol.* 10: 493-496
38. Rivera, M. (1990). Hemoparásitos: Biología, y Diagnóstico. Departamento Biolog. Celular, Universidad Simón Bolívar. Cátedra Parasitología. Fac. Cs. Vet. Universidad Central de Venezuela. 246 p.
39. Rodríguez V.R.I. (2006). Manual Técnico para el control de Garrapatas en el Ganado Bovino CENID- Parasitología, Jiutepec Morelos.
40. Rodríguez-Vivas RI, Quiñones AF, Fragoso SH. (2005). Epidemiología y control de la garrapata *Boophilus* en México. En: Enfermedades de importancia económica en producción animal. Rodríguez-Vivas, R.I. Editor. México D.F. McGraw-Hill-UADY.
41. Rous P., (1910). A Transmissible Avian Neoplasm Sarcoma of the Common Fow. *J. Exp. Med.* 12 (5): 696–705
42. Sato_G, Hayashi I. (1976). The replacement of serum by hormones in cell culture media. *Arch Biol Med Exp (Santiago)*. Dec;10(1-3):120-1.

43. Scherer, W.F., Syverton J. T., Gey G. O. (1951). Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses: in viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain hela) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix». The journal of experimental medicine 97 (5): 695–715.
44. SENASICA 2014 <http://www.senasica.gob.mx/?id=4393> tomado el 23 de octubre del 2014
45. Smaghe G. Goodman C. L. Stanley D. (2009). Insect cell culture and applications to research and pest management. In Vitro Cell. Dev Biol.-Animal.
46. Solís S.S.,(1991). Ecología de garrapatas en México. Seminario Internacional de Parasitología Animal. AMPAVE. SARH. Cuernavaca, Morelos, México.
47. Sudeep, A.B., Mourya, D.T and. Mishra A.C. (2005). Insect cell culture in research: Indian scenario. Indian J Med Res 121,
48. Temin H. M. and Rubin H. (1958). Characteristics of an assay for Rous sarcoma virus and Rous sarcoma cells in tissue culture. Virology 6:669-88.
49. Thomson J.A., Marshall VS. (1998). Primate embryonic stem cells. Curr Top Dev Biol. 1998;38:133-65.
50. Vlak, J. M. (2007) His legacy in insect cell culture and insect virology. J. Invertebr. Pathol 95: 152–160.
51. Walker A.R., Bouattour A., Camicas J.-L., Estrada-Peña A., Horak I.G., Latif A.A., Pegram R.G., Preston P.M (2003). Ticks of Domestic Animals in Africa: a Guide to Identification of Species. The University of Edinburgh.
52. Wigler M, Silverstein S, Lee LS, Pellicer A, Cheng Yc, Axel R. (1977). Transfer of purified herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells. Cell. 1977 May;11(1):223-32.