



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zaragoza

VIABILIDAD DE FORMAS SANGUINEAS Y DE MEDIO DE CULTIVO DE TRYPANOSOMA CRUZI DESPUES DE LA CRIOPRESERVACION

T E S I S

Que para obtener el Título de QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO presenta

AIDA GUADALUPE DIAZ ROSAS

ASESORES:

Q.B.P. Ma. Lourdes Calvo Méndez  
Q.F.B. Juan Pedro Antonio Hernández



México, D. F.

1993

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

	Página
1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Marco Teórico	4
4. Fundamentación del tema	9
5. Planteamiento del problema	18
6. Hipótesis	20
7. Objetivos	21
8. Material y método	22
9. Resultados	29
10. Discusión de resultados	38
11. Conclusiones	43
12. Anexos	44
13. Bibliografía	45

## RESUMEN

Se ensayo la técnica de criopreservación de formas sanguíneas y de medio de cultivo de Trypanosoma cruzi, basandose en la técnica de congelación lenta, utilizando dimetilsulfóxido como agente crioprotectante. Se congelaron volúmenes de 1 ml en viales de polipropileno mantenidos a  $-196^{\circ}\text{C}$  en Nitrógeno líquido. Las muestras se evaluarón a los 30, 60, 105, 190 y 210 días mediante el recuento de las formas móviles y por curvas de crecimiento.

El mayor porcentaje de recuperación en las formas sanguíneas fue del 64% en los primeros dos meses despues fue disminuyendo conforme pasaba el tiempo hasta los 210 días donde se obtuvo un 23% de recuperación. Con respecto a medios de cultivo la recuperación más alta fue a los 30 días, disminuyendo conforme pasaba el tiempo, llegando a un 14% a los 210 días.

La capacidad infectante de los hemoflagelados de las formas sanguíneas se evaluó por inóculación a ratones donde se obtuvieron las curvas de parasitemia en donde se presento una fase de latencia y una fase de crecimiento logaritmico, lo cual tuvo un comportamiento similar a la del grupo control.

Respecto a medios de cultivo se evaluó mediante la observación de la movilidad de los tripanosomas.

## INTRODUCCION

La criopreservación es una técnica que ha demostrado tener gran utilidad para mantener líneas celulares estables durante prolongados períodos de tiempo.

Esta técnica se ha utilizado para la conservación de protozoarios tanto de vida libre como parásitos y son diversos los autores que han comunicado la conservación por congelación de distintos tipos morfológicos de Trypanosoma cruzi. Estos autores han utilizado como agentes crioprotectores -- glicerol o dimetilsulfóxido (DMSO), utilizando temperaturas finales de  $-70^{\circ}\text{C}$  o  $-196^{\circ}\text{C}$ .

La evaluación de los resultados obtenidos despues de la criopreservación de Trypanosoma cruzi en líquido de Nitrógeno se ha basado en la determinación de la sobrevivencia del parásito y el estudio de sus características biológicas; como son la movilidad y la capacidad del parásito para multiplicarse en los hospederos vertebrados y/o en medios de cultivo.

La importancia de la criopreservación de Trypanosoma cruzi a bajas temperaturas es:

- a) Bajo una técnica estandarizada mantener las características del parásito lo mas integras a la cepa original.
- b) Prevenir cambios inciertos que probablemente puedan ocurrir en la población de Trypanosoma cruzi cuando son mantenidos en animales de laboratorio o en medios de cultivo.
- c) Disminuir el riesgo que se presenta durante el manipuleo de un gran número de cepas bajo las condiciones experimentales en el laboratorio.

## MARCO TEORICO

La palabra criopreservación deriva de la raíz etimológica , frío, por lo que al proceso se le considera un -- procedimiento de conservación y almacenamiento basado en la utilización de bajas temperaturas. Es por ello que su objetivo es la de eliminar todas las alteraciones dependientes del tiempo que normalmente ocurre en un sistema biológico - cuando son mantenidos por períodos prolongados de tiempo.

(8, 9)

Los métodos de criopreservación se han clasificado en dos:

- 1.- una congelación lenta que depende del agente crioprotector el cual penetra y protege a la célula a una - concentración multimolar.
- 2.- una congelación rápida en donde el agente crioprotector no penetra a la célula y su concentración molar es baja.

El factor principal de riesgo en un proceso de criopreservación es la velocidad de enfriamiento, debido a esto se ha sugerido la utilización al inicio de la congelación, un descenso termico de 1-2°C/min hasta llegar a -20°C o -30°C.

(1, 5, 6)

Según Fitzgerald y Levine, 1961 citado en (1); mencionan que otro factor importante es la estabilidad de la temperatura durante el almacenamiento, en donde las fluctuaciones afectaban considerablemente la sobrevivencia de los organismos.

Es también importante mencionar que un descongelamiento rápido a 37°C durante 2 minutos en baño maría da resultados satisfactorios en la recuperación, este mecanismo evita la formación de cristales que afectan la viabilidad de las células criopreservadas. (13)

En un proceso de criopreservación las membranas celulares juegan un papel muy importante, ya que su permeabilidad al agua y a los agentes crioprotectores influye en los eventos físicos que ocurren intracelularmente; es por ello que resulta ser el principal sitio de daño. (10)

El evento que ocurre durante un proceso de congelación cuando las células son sometidas a bajas temperaturas, es que alcanzan el equilibrio dependiendo de su permeabilidad hacia el agua. Cuando ellas son enfriadas lentamente y su permeabilidad al agua es alta, alcanzan el equilibrio por la transferencia del agua intracelular hacia el hielo externo, en otras palabras alcanzan el equilibrio por deshidratación. (8, 10)

Acerca del daño celular que puede ocurrir en la congelación no se han hecho investigaciones, pero se tiene una hipótesis de "doble factor", la que nos propone que el daño celular se debe a:

- 1.- alteraciones en las propiedades de las soluciones intracelulares y extracelulares, refleja el hecho de que las células enfriadas a un menor grado óptimo de su temperatura, provoca una muerte por exposición prolongada a la solución que cambia las características físico-químicas del medio extra e intracelular.
- 2.- congelación intracelular, cuando las células son enfriadas a un mayor grado de su temperatura óptima probablemente ocasiona una congelación intracelular, por lo que el tiempo es insuficiente para que el agua de la célula difunda hacia fuera en respuesta a la diferente presión de vapor entre la congelación del medio externo y la solución congelada del medio interno.

(8, 10)

Los estudios que se han hecho con los crioprotectores indican que la mayor sobrevivencia de las células que han sido expuestas a un proceso de congelación-descongelación solamente se logra con la presencia de agentes químicos que mejoran la permeabilidad de la célula y/o protegen a la membrana celular.

Según Meryman, 1971 (11); los agentes crioprotectores han sido clasificados tradicionalmente en dos grupos:

- 1.- Agentes penetrantes, los cuales a concentraciones altas protegen la vida celular contra el daño de una lenta congelación.
- 2.- Agentes no penetrantes, protegen efectivamente a una baja concentración molar y generalmente requiere mayor rapidez de enfriamiento.

Entre los agentes crioprotectores penetrantes tenemos: el glicerol descrito por Polge, Smith y Parkies en 1949; Lovelock y Bishop en 1959 demostraron un mejor efecto del dimetilsulfóxido (DMSO), entre otros compuestos penetrantes podemos mencionar al etilenglicol, etanol, metanol, acetato de amonio y trimetilaminoacetato (TMAA).

El mecanismo por el cual un agente crioprotector penetra previniendo el daño celular es debido a sus propiedades coligativas de formar puentes de hidrógeno y esto tal vez nos indique la capacidad del agente protector para ligar o sustituir el agua. (11)

Los factores que se toman en cuenta para que un agente crioprotector sea conveniente son:

- baja toxicidad.
- alta solubilidad en agua y capacidad de enlace con ella.
- tener facilidad de penetración por las membranas celulares.

Entre los agentes crioprotectores no penetrantes tenemos compuestos de macromoléculas como la polivinilpirrolidona, algunos azúcares como la sacarosa, lactosa y glucosa, alcoholes de azúcares como manitol y sorbitol, polímeros de almidón, los cuales su capacidad crioprotectora efectiva se logra a bajas concentraciones. (11)

El mecanismo por el cual otorga protección no ha sido establecido, pero se ha propuesto uno a nivel extracelular, la presencia de estos agentes altera la permeabilidad de la membrana, en donde una salida irreversible de solutos puede ocurrir bajo la presencia de un cambio osmótico. El cambio hipertónico es disminuido durante el congelamiento por la entrada de solutos extracelulares y la lisis hipotónica es impedida durante el descongelamiento por la salida de solutos. (11)

## FUNDAMENTACION EN LA ELECCION DEL PROBLEMA

Los protozoarios flagelados que viven en la sangre y los tejidos del hombre pertenecen a la familia Trypanosomatidae. Sus cuerpos son típicamente alargados más o menos aplanados y con un flagelo sencillo que se origina en el blefaroplasto, cerca del cual se encuentra el cinetoplasto. El blefaroplasto se encuentra en la parte anterior, media o posterior del cuerpo. Cuando el blefaroplasto se localiza en la parte posterior la porción basal del flagelo forma el borde externo de la membrana ondulante. (3, 15, 19)

Dentro de los géneros de interés médico se encuentra el género Trypanosoma, el cual ocasiona en el hombre dos tipos de enfermedad: (1) la tripanosomiasis africana o enfermedad del sueño cuyos agentes etiológicos, T. gambiense y T. rhodesiense, son transmitidos al hombre por moscas hematófagas del género Glossina (mosca tsé-tsé); (2) la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas cuyo agente etiológico, Trypanosoma cruzi es transmitido al hombre por insectos reduvíidos de los géneros Triatoma, Rhodnius y Panstrongylus (chinche besucona). (19)

En Brasil, Venezuela, Colombia, Panamá, El Salvador, Costa Rica y Guatemala se han descrito casos humanos de una infección tripanosomíásica aparentemente asintomática, el organismo causante parece que se trata de Trypanosoma rangeli,

el cual es transmitido por la picadura de la chinche reduvída Rhodnius prolixus y algunas otras especies relacionadas. No han aparecido signos algunos de patogenicidad en voluntarios infectados natural o experimentalmente. El parásito puede ser aislado del torrente sanguíneo, algunos meses después de la infección. Esta infección se ha encontrado de forma natural en el perro, multiplicándose en diversos animales de laboratorio, así como en animales domésticos y salvajes, en ninguno de los cuales parece producir enfermedad. (19)

Las formas de desarrollo de Trypanosoma cruzi son:

- 1.- Amastigote. Su forma es redondeada y ovalada y no posee flagelo libre. Este estado es esencialmente intracelular, los hemoflagelados se dividen por fisión binaria. (fig. 1)
- 2.- Promastigote. El cinetoplasto se localiza en el extremo anterior al cuerpo. El flagelo es pequeño y surge de la parte anterior final y no hay membrana ondulante. (fig.2)
- 3.- Epimastigote. El cinetoplasto esta situado anteriormente al núcleo, el flagelo surge de este sitio, extendiéndose libremente. La membrana ondulante es más pequeña que en el estado de trypomastigote. (fig. 3)

4.- Tripomastigote. El cinetoplasto se ha situado al extremo posterior del núcleo y el flagelo surge extendiéndose libremente. El cuerpo del parásito es conectado al flagelo por la membrana ondulante. Esta fase se puede encontrar en la sangre de los huéspedes mamíferos donde no se reproducen, y en el intestino posterior de los triatomíneos como tripomastigotes metacíclicos. (fig. 4)

(2, 18)

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas es una histoparásitosis de carácter endémico que afecta tanto al hombre como a mamíferos domésticos y silvestres estando ubicada en la categoría de las zoonosis. La enfermedad se considera exclusivamente del continente americano, la cual afecta a muchos países a excepción de Canadá, Surinam, y Guyana.

Las zonas endémicas más importantes están en Brasil, Chile, Argentina, Uruguay, Paraguay, Bolivia, Ecuador, Colombia, Venezuela, Guatemala y en los Estados de Zacatecas, Jalisco, Michoacán, Guerrero, Chiapas, Oaxaca, Tabasco, Nayarit, Yucatán, Querétaro, Puebla, Morelos, Veracruz y Sinaloa en la República Mexicana. (fig.6) (16, 17)

De los vectores más involucrados en la transmisión del parásito al hombre se encuentra el género Triatoma y Rhodnius ya que son los que tienen hábitos intradomiciliarios.

El cuadro clínico presentado por el huésped varía en función de la virulencia de la cepa, cantidad del inóculo, la inmunidad, estado nutricional y edad del individuo afectado.

La enfermedad de Chagas se puede presentar en tres fases: aguda, subaguda y crónica. Los signos y síntomas predominantes en las zonas endémicas son: el de Romaña y el chagoma de inoculación.

Fase aguda: A menudo se caracteriza por chagoma, fiebre y hepatoesplenomegalia, dura dos a tres semanas y la mayoría de las veces va acompañada de alta parasitemia.

Fase latente: No se observa enfermedad clínica, pero sí una parasitemia baja, al parecer debido a la constante multiplicación del parásito en varios órganos.

Fase crónica: Se caracteriza por miocarditis progresiva o dilatación irreversible de vísceras huecas y es muy difícil demostrar la presencia del parásito. (14, 17)

La enfermedad de Chagas tiene un gran impacto sobre la salud pública latinoamericana debido a su amplia distribución geográfica, su elevada prevalencia, disminución de la esperanza de vida y particularmente sobre la calidad de ésta; ya que con frecuencia tal enfermedad es invalidante lo que a su vez repercute desfavorablemente sobre la economía de los pueblos que la sufren. (17)

Las infecciones por Trypanosoma cruzi en el hombre son difíciles de evaluar porque la mayoría de las infecciones ocurren en zonas rurales en donde los servicios médicos y de laboratorio son deficientes o no existen, se estima que la mortalidad durante la fase aguda es de 2 a 10% con predominancia en los niños. Esta tripanosomiasis humana en algunas regiones del país constituyen un problema en la salud pública, es por esto que el estudio de las características biológicas, inmunológicas, fisiológicas y estructurales del Trypanosoma cruzi en los laboratorios sea mediante el uso de medios de cultivo o inóculando animales de laboratorio, teniendo ambas desventajas con respecto al tiempo. Es así como el método de criopreservación sea una alternativa de mantener al parásito con sus características afines a las cepas originales y brindarnos un método de transporte adecuado para las especies - traídas de diferentes regiones y en sus diferentes formas de

desarrollo; y que disminuya el riesgo de infección en el laboratorio, ya que siempre presenta un peligro el manejo de un gran número de especies bajo las condiciones experimentales. (6, 9)

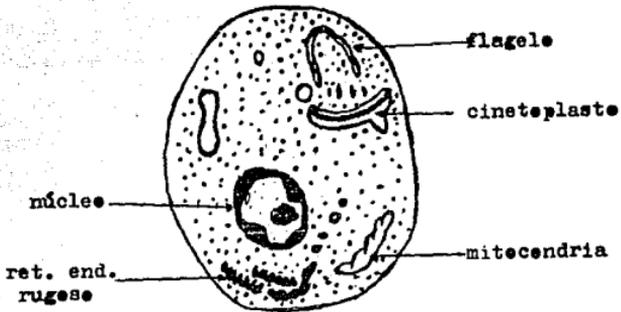


FIG. 1 AMASTIGOTE

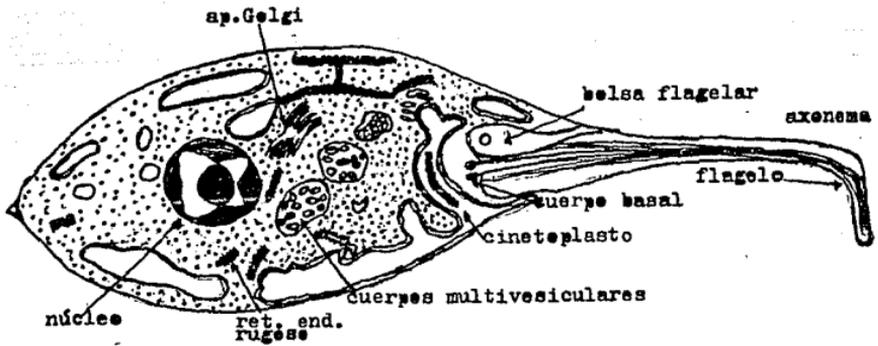


FIG. 2 PROMASTIGOTE

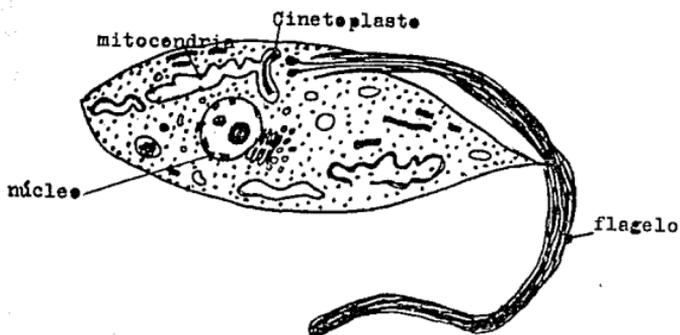


FIG. 3 EPIMASTIGOTE

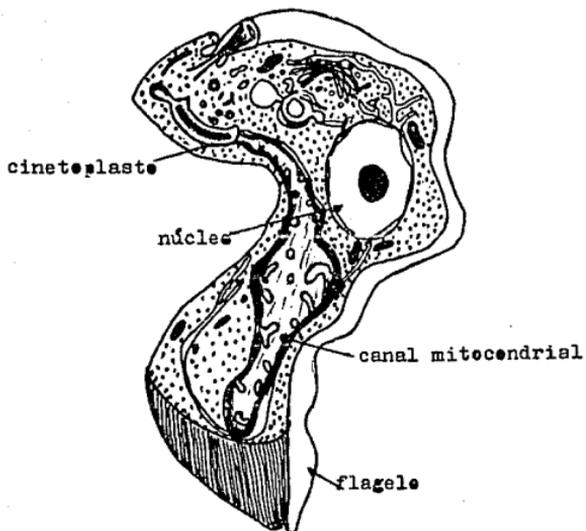


FIG. 4 TRIPOMASTIGOTE

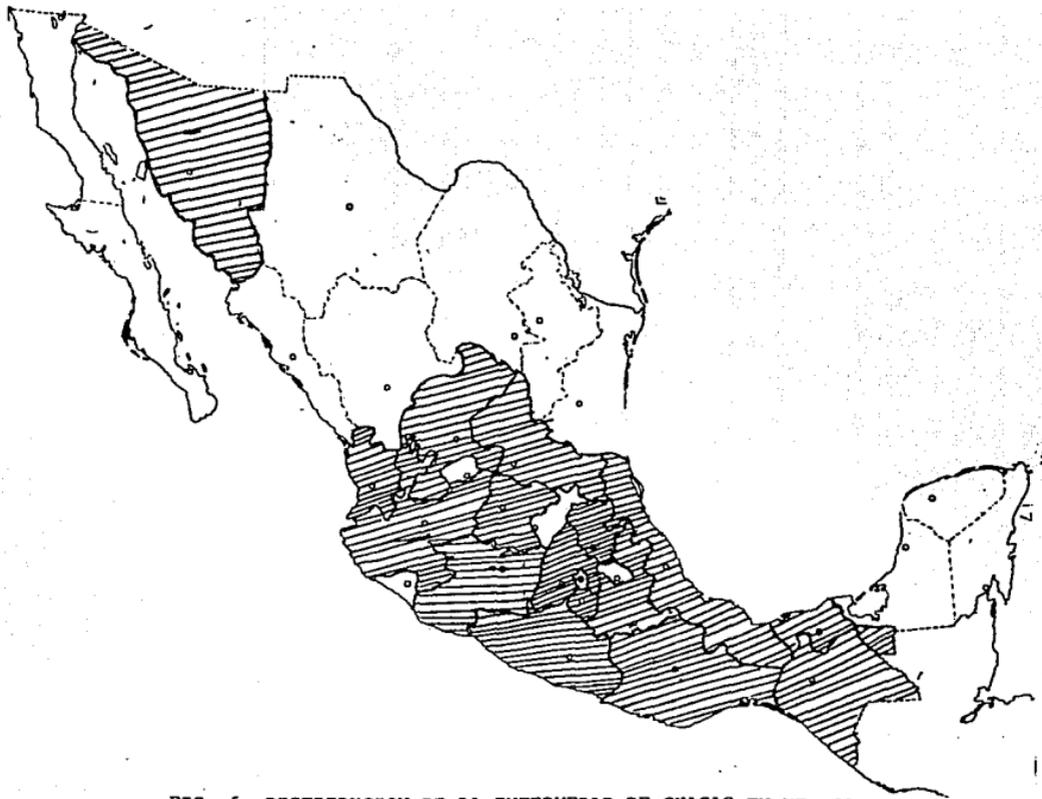


FIG. 6 DISTRIBUCION DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN MEXICO  
(ESTADOS CON CASOS POSITIVOS)

Tomado de la referencia (17)

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dada la importancia de la enfermedad de Chagas producida por Trypanosoma cruzi y que se encuentra de forma endémica en diversos estados de la República Mexicana es necesario conocer mejores técnicas de conservación y almacenamiento para mantener cepas de referencia y sirvan para la identificación y el estudio de las características biológicas, inmunológicas y bioquímicas a partir de las cepas originales; ya que este parásito se mantiene en el laboratorio por pases en ratón o por pases en medios de cultivo difásico lo cual requiere de mayor precaución, de mayor inversión de tiempo y de un costo alto.

Los inconvenientes que se tienen al utilizar medios de cultivo es que las cepas pueden ser inestables en sus características biológicas ya que la población se esta reproduciendo constantemente y por lo mismo esta sujeta a selección por las condiciones en las cuales se mantienen, debido a que las características de los medios de cultivo son diferentes a las del hábitat de donde fueron aisladas, sufriendo cambios morfológicos, fisiológicos e inmunológicos.

Al igual que los medios de cultivo los pases sucesivos en ratón por un período largo nos dan desventajas como el polimorfismo que presentan, incapacidad de infectar a huéspedes invertebrados y de crecer en medios de cultivo.

Debido a lo anterior se requiere la utilización de un método de conservación que nos proporcione mayores ventajas como es la criopreservación, la cual nos puede mantener las características biológicas originales de las cepas por períodos prolongados.

El objetivo principal de un proceso de criopreservación es eliminar todas las alteraciones dependientes del tiempo que normalmente ocurren en los sistemas biológicos, por períodos prolongados. (6)

## HIPOTESIS

Los tripanosomas con un agente crioprotector como el dimetilsulfóxido, congelados y almacenados en Nitrógeno líquido por períodos prolongados, conservaran su viabilidad y su virulencia, por lo que al descongelarlos después de varios meses se multiplicarán en medios de cultivo e infectaran a ratones de laboratorio.

OBJETIVO GENERAL

Preservar en Nitrógeno líquido por períodos prolongados formas sanguíneas y de cultivo de Trypanosoma cruzi.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.1. Ensayar una técnica de criopreservación para formas sanguíneas y de cultivo de Trypanosoma cruzi.
- 1.2. Comprobar la viabilidad e infectividad de los tripanosomas sanguíneos despues de la criopreservación mediante su inoculación en ratones blancos y su efecto en ellos.
- 1.3. Determinar su viabilidad de las formas de cultivo criopreservadas en medios de cultivo difásico de gelsa sangre con solución salina.

**MATERIAL****A) EQUIPO**

- Incubadora marca MAPSA modelo EC-334
- Balanza analítica marca SARTORIUS
- Balanza granataria marca OHAUS modelo Florham Park
- Tanque de Nitrógeno marca UNION CARBIDE modelo XR-8 222-08-NO
- Microscopio óptico binocular

**B) MATERIAL BASICO**

- Tubos de ensaye con tapón de rosca
- Portaobjetos
- Cubreobjetos 22 x 22 mm del N° 1
- Pipeta para cuenta de glóbulos blancos
- Cámara de Neubauer
- Termómetro 10°C a -50°C
- Pipeta automática 5 ul
- Puntillas para pipeta automática
- Contador manual marca TAMACO
- Viales de polipropileno 2 ml
- Jeringas desechables estériles 1ml, 5ml
- Pipetas Pasteur
- Mechero bunsen
- Mechero fisher
- Matraz Erlenmeyer 250 ml

## C) MEDIO DE CULTIVO

- Base de Agar Sangre marca BIOXON lote n° 04G20181
- Sangre desfibrinada de carnero

## D) REACTIVOS

- Dimetilsulfóxido marca BAKER ANALYZED lote n° 141627
- Acetona marca BAKER ANALYZED lote n° 39860
- Glicerol marca BAKER ANALYZED lote n° 39011
- Metanol marca BAKER ANALYZED lote n° 39074
- Cloruro de sodio marca BAKER ANALYZED lote n° 39014
- Hielo seco
- Agua destilada

## E) MATERIAL BIOLÓGICO

- Trypanosoma cruzi cepa CID
- Ratonos blancos cepa NIH hembras de 18 a 20 gr.

## MATERIAL Y METODO

MATERIAL BIOLOGICO

1. Se utilizó la cepa CID de Trypanosoma cruzi aislado de un caso humano en el estado de Oaxaca, Oax.
2. Se utilizarón ratones blancos, hembras de la cepa NIH de 18-20 gr.

OBTENCION DE TRIPANOSOMAS DE MEDIOS DE CULTIVO

Se sembraron tubos con gelosa sangre/solución salina con Trypanosoma cruzi, se incubaron a 28°C. Después de 30 días se observó el crecimiento de tripanosomas, cuando fue abundante y no hubo contaminación bacteriana se consideraron positivos para la criopreservación.

OBTENCION DE TRIPANOSOMAS SANGUINEOS

Se inocularón 20 ratones blancos cepa NIH, de 18-20 gr -- hembras, por vía intraperitoneal con Trypanosoma cruzi cepa CID al quinto día se revisaron mediante una gota de sangre obtenida por punción de la cola del ratón y se observó al microscopio a 40X, así se procedio cada tercer día hasta que se tuvieron 10 o más tripomastigotes sanguíneos por campo a 40X, se procedió a sangrar a los ratones por punción cardíaca con una jeringa heparinizada.

CRIOPRESERVACION DE FORMAS DE MEDIOS DE CULTIVOY DE TRIPOMASTIGOTES SANGUINEOS

Separadamente los tripanosomas procedentes de diferentes fuentes se suspendieron con dimetilsulfóxido (DMSO) realizando una dilución (1:10), trabajandose en condiciones -- frias utilizando un baño de hielo y en condiciones de esterilidad.

Se realizó una cuenta de los tripanosomas con solución salina en cámara de Neubauer haciendo una dilución 1:20 con una pipeta para globulos blancos.

Se colocó 1.0 ml de los tripanosomas en viales de polipropileno con tapón de rosca estériles y se procedió a congelar.

Los viales se mantuvieron en un baño de hielo a una temperatura de 4°C.

Después se pasarón al siguiente sistema: en un recipiente grande se colocó hielo seco con acetona; dentro de este baño se colocó un recipiente el cual contenía glicerol, y dentro de este último otro recipiente el cual contenía los viales y el metanol, se puso un termómetro para controlar la -- velocidad de descenso de la temperatura de 1-2°C/min hasta llegar a -50°C, después se pasarón los viales a un congelador con hielo seco para tener una temperatura de -70°C y se dejó mínimo 2 horas. Después se almacenaron en tanques de -- Nitrógeno líquido durante 30, 60, 105, 190 y 210 días. (fig.7)

#### DETERMINACION DE LA VIABILIDAD E INFECTIVIDAD DE LOS TRIPANOSOMAS

##### SOMAS

Se descongelarán cada vez un vial a los 30, 60, 105, 190 y 210 días después de haber realizado la criopreservación.

Se sacarán los viales del Nitrógeno líquido y se paso rápidamente a un baño maría a una temperatura de 37°C. Se realizó una cuenta de los tripanosomas viables en una cámara de Neubauer utilizando una solución salina al 0.85% realizando una dilución 1:20 con una pipeta de glóbulos blancos. Se inocularón 6 ratones con las formas sanguíneas y se observó la infectividad de los tripanosomas realizando curvas de parasitemia.

Las formas de medio de cultivo se descongelaron a 37°C y se sembraron en tubos con agar sangre/solución salina, se identificó la viabilidad de los tripanosomas al quinto día de ser sembrados observando crecimiento y movilidad de los tripanosomas durante dos semanas.

#### CURVAS DE PARASITEMIA

Se tomó una gota de sangre de la cola del ratón con la pipeta automática midiendo 5.0 ul, teniendo la precaución de que no se formaran burbujas, se colocó la gota de sangre en el portaobjetos limpio y se puso un cubreobjetos de 22 x 22 mm del n°1 de manera que abarcará toda la zona del mismo. Se realizó la cuenta de tripanosomas móviles a 40X en 100 campos con un contador manual.

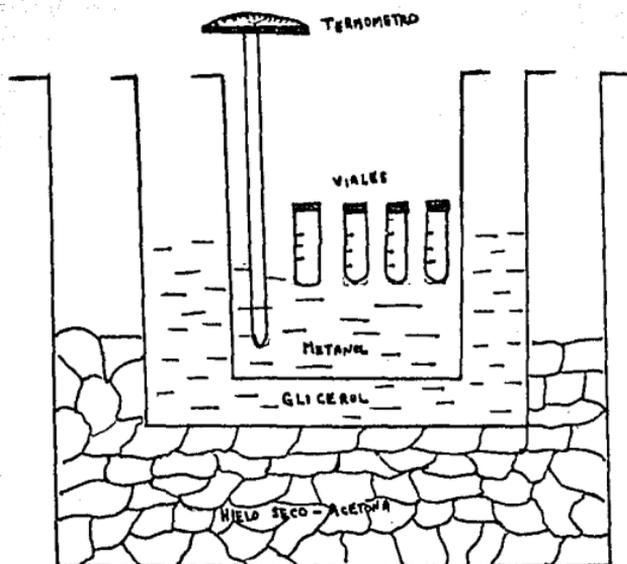


FIG. 7 SISTEMA DE BAÑOS EMPLEADOS PARA BAJAR LA TEMPERATURA  
HASTA  $-50^{\circ}\text{C}$

## RESULTADOS

A) Porcentajes de recuperación.

Los resultados obtenidos se sacaron mediante un promedio, ya que se realizó el experimento por duplicado.

## 1.1. Medios de cultivo

Se obtuvo una recuperación del 14 al 50%. Las tazas de recuperación más alta fue a los 30 días, disminuyendo esta conforme paso el tiempo, llegando a un 14% a los 210 días. Se tomó en cuenta aquellos tripanosomas que poseían buena movilidad. (Gráfica 1)

## 1.2. Formas sanguíneas

En las formas sanguíneas se obtuvo una recuperación que va del 23 al 64%; siendo los primeros dos meses el más alto porcentaje de recuperación, se observa que conforme va pasando el tiempo la recuperación de los tripanosomas va disminuyendo siendo a los 210 días un porcentaje del 23%. (Gráfica 2)

B) Determinación de la viabilidad e infectividad

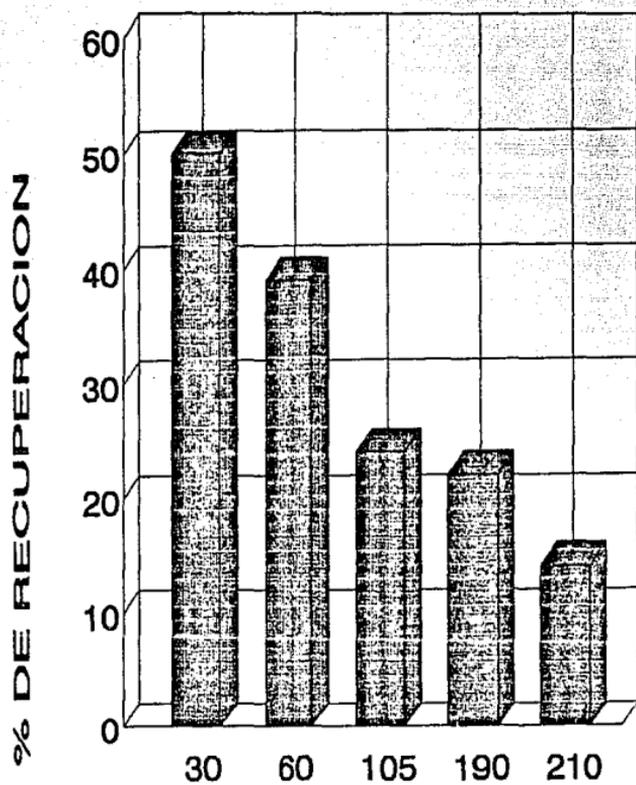
## 1.1. Viabilidad en medios de cultivo.

Se determinó observando al microscopio si había crecimiento y conservaban su movilidad los tripanosomas, al tercer día después de descongelarse se observaban con poca movilidad, al pasar el tiempo iban cobrando su movilidad y el número de tripanosomas fue aumentando.

### 1.2. Curvas de parasitemia.

Se determinó la capacidad infectante de los tripanosomas sanguíneos congelados, inóculando 100,000 t/ml a ratones blancos. Se obtuvo una infectividad semejante a los parásitos no congelados, observándose una alta parasitemia entre los 20 a 30 días en los primeros dos meses, después de los 105 días se observa que el número de tripanosomas fue disminuyendo y las curvas fueron decreciendo conforme pasaron los días.

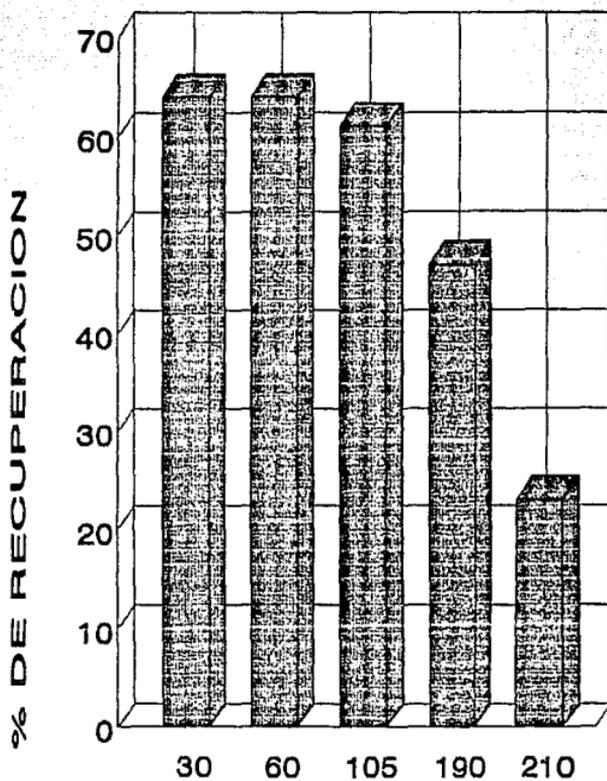
( Gráficas 3,4,5,6,7)



DIAS DESPUES DE CRIOPRESERVAR

■ GRAFICA NO. 1

RECUPERACION DE MEDIOS DE CULTIVO

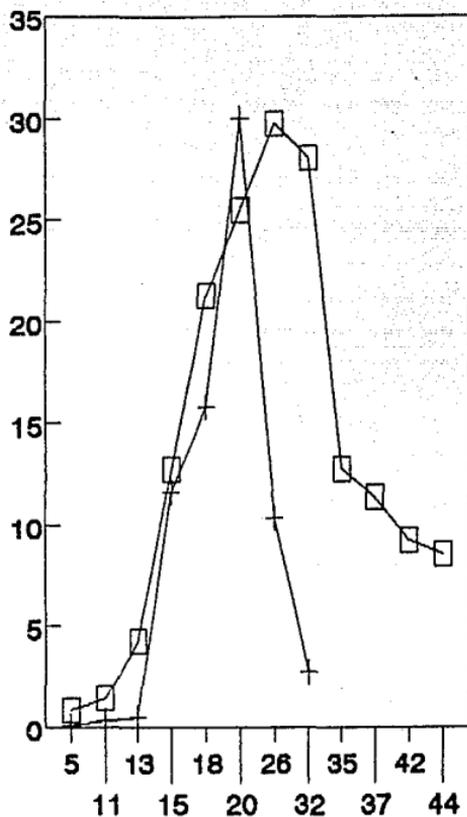


DIAS DESPUES DE CRIOPRESERVAR

GRAFICA NO. 2

RECUPERACION DE FORMAS SANGUINEAS

NO. TRYPANOSOMAS/5 mm<sup>3</sup> (dato en miles)



DIAS DESPUES DE INOCULAR

□ GRAFICA NO. 3

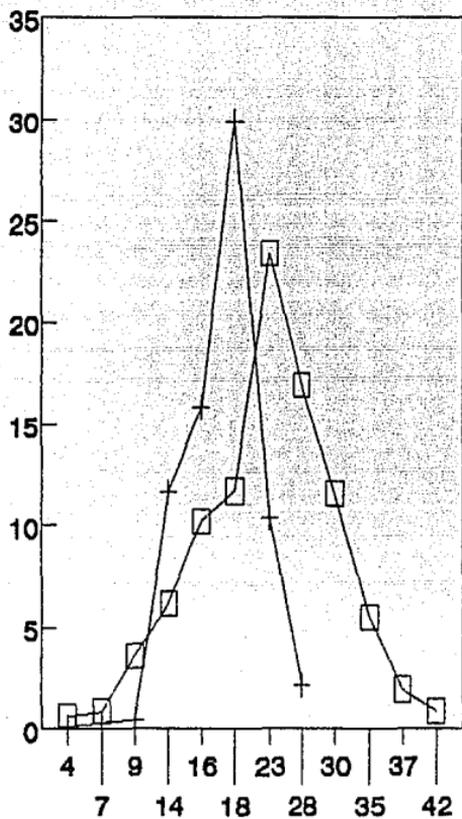
+ TRIPANOSOMAS NO CONGELADOS

□ TRIPANOSOMAS CONGELADOS

FORMAS SANGUINEAS DESCONGELACION

A LOS 30 DIAS

NO. TRIPANOSOMAS/5 mm<sup>3</sup> (datos en miles)



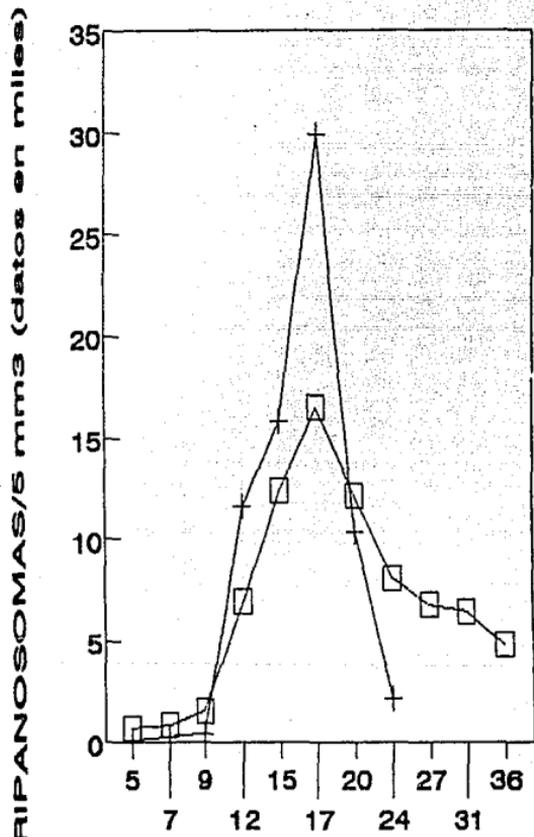
DIAS DESPUES DE INOCULAR

□ GRAFICA NO. 4

+ TRIPANOSOMAS NO CONGELADOS

□ TRIPANOSOMAS CONGELADOS

FORMAS SANGUINEAS DESCONGELACION A LOS 60 DIAS.



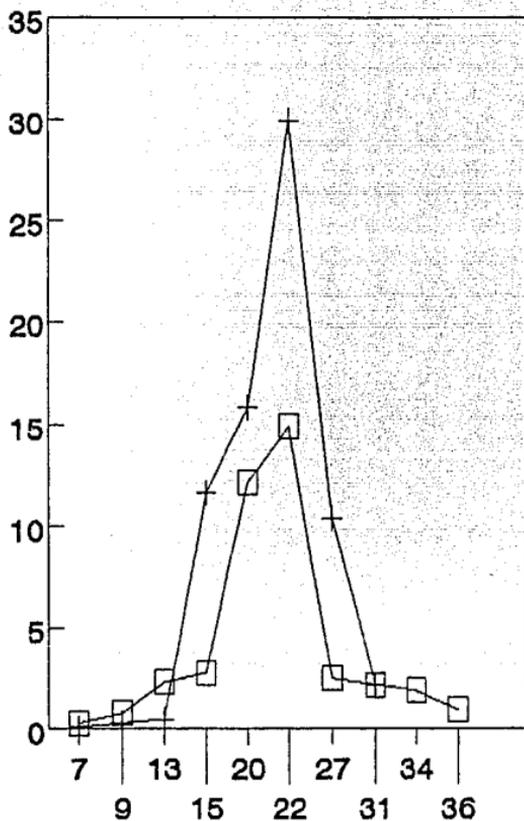
DIAS DESPUES DE INOCULAR

□ GRAFICA NO. 5

+ TRIPANOSOMAS NO CONGELADOS  
 □ TRIPANOSOMAS CONGELADOS

FORMAS SANGUINEAS DESCONGELACION A LOS 105 DIAS.

O. TRIPANOSOMAS/5 mm<sup>3</sup> (datos en miles)

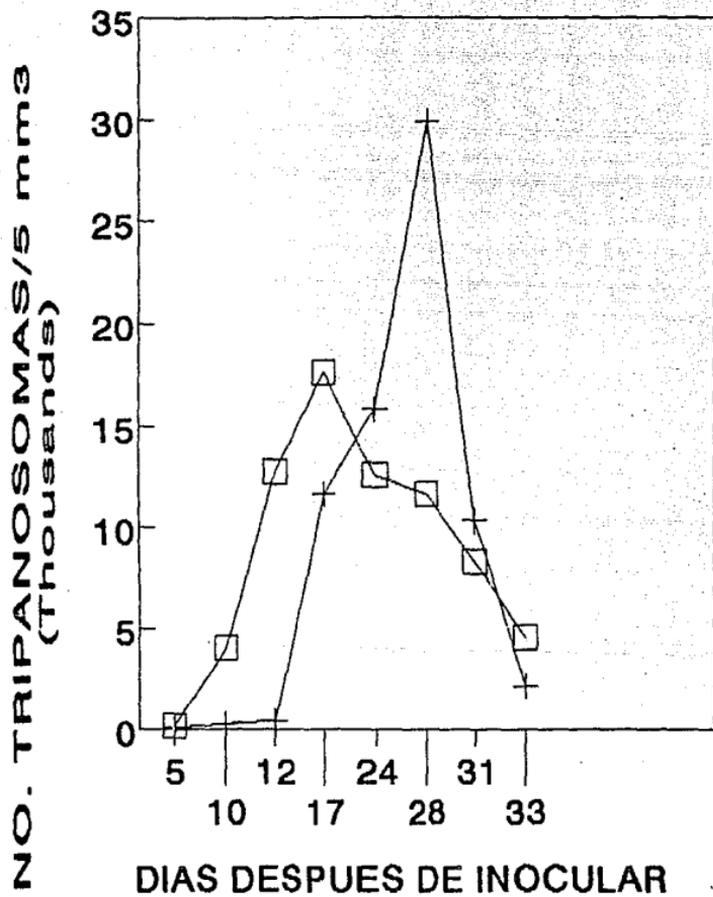


DIAS DESPUES DE INOCULAR

□ GRAFICA NO. 6

+ TRIPANOSOMAS NO CONGELADOS  
□ TRIPANOSOMAS CONGELADOS

FORMAS SANGUINEAS DESCONGELACION A LOS 190 DIAS.



□ GRAFICA NO. 7

+ TRIPANOSOMAS NO CONGELADAS  
 □ TRIPANOSOMAS CONGELADAS

FORMAS SANGUINEAS DESCONGELACION A LOS 210 DIAS.

## DISCUSION DE LOS RESULTADOS

En este trabajo se ensayo la técnica de criopreservación para Trypanosoma cruzi, utilizando el método de enfriamiento gradual utilizando como agente crioprotector el dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%. Los porcentajes que obtuvimos en la recuperación de formas sanguíneas fueron del 23 al 64% (gráfica n°2) de los cuales el mayor porcentaje de 64% se obtuvo a los 30 y 60 días despues de haber criopreservado; entre los 105 y 190 días los porcentajes de recuperación fueron disminuyendo, teniendo como resultado un 61% y 53% respectivamente, el menor porcentaje de recuperación fue a los 210 días siendo este del 33%.

Aunque el porcentaje de recuperación entre los 190 y 210 días son bajos, menores al 50% se observó que los tripanosomas poseían muy buena movilidad y al inócularse en los ratones eran viables ya que infectaban a éstos produciendoles un cuadro patológico e incluso hasta la muerte.

El tiempo de almacenamiento que se mantuvo a los viales fue de 210 días (7 meses), la recuperación que obtuvimos fue mayor en los primeros dos meses y fue disminuyendo conforme pasaba el tiempo, este podría haberse prolongado y verificar si los tripanosomas eran viables e infectivas despues de un año. Y observar si seguian el mismo comportamiento.

Los porcentajes obtenidos comparados con otros autores que congelaron formas sanguíneas fueron menores, obteniendo ellos arriba del 80%, como es el trabajo realizado por Engel, J.C y colaboradores (5) realizaron la criopreservación de Trypanosoma cruzi, utilizando una mezcla protectora con glicerol, yema de huevo y glucosa, teniendo una recuperación arriba del 80%, esta mezcla que utilizaron pudo darle mayor protección al parásito ya que la yema de huevo es rica en proteínas y la glucosa es fuente de energía, esto podría ser dos factores importantes que se tomarían en cuenta para obtener una mayor recuperación.

En un proceso de congelación un factor importante es la exposición al agente crioprotector, por lo que fue determinante el mantener frío el DMSO ya que a temperatura ambiente daña a los tripanosomas.

Con respecto a las curvas de parasitemia (gráficas 3, 4, 5, 6, 7) estas se obtuvieron de muestras sanguíneas; en donde observamos que los tripanosomas después de haberse congelado-descongelado fueron infectivos para los ratones obteniéndose un período de latencia en los primeros días (4-8 días) y después un pico máximo de parásitos en sangre pasando después a un descenso en el número de tripanosomas, donde seguramente estos tripanosomas se establecieron en otros órganos como es el corazón, hígado o bazo.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Las curvas de parasitemia de los tripanosomas congelados fueron comparadas con una curva control de parásitos no congelados en donde observamos que:

a) En la gráfica n°3 que corresponde a la descongelación pasado 30 días observamos que ambas curvas de parasitemia son muy semejantes, teniendo el mayor número de tripanosomas entre los 20 y los 25 días, siendo en ambas la cantidad muy cercana a los  $30,000 \text{ t}/5 \text{ mm}^3$ , después se observa que va disminuyendo el número de tripanosomas; este comportamiento semejante nos indica que la cepa no ha sufrido alteración alguna por la congelación.

b) En la gráfica n°4 cuando se descongeló después de 60 días el comportamiento de los tripanosomas congelados es semejante a la curva de los tripanosomas no congelados; pero se observa que el número de tripanosomas ya fue disminuyendo, siendo la cantidad máxima de  $24,000 \text{ t}/5 \text{ mm}^3$ .

c) En la gráfica n°5 a los 105 días después de descongelar el número de parásitos es mucho menor teniendo un máximo de 16,000 tripanosomas, pero el comportamiento es el mismo: una fase de latencia, una fase de multiplicación y después un descenso en donde probablemente los tripanosomas ya se encuentran en los órganos del huésped.

d) En las gráficas 6 y 7, a los 190 y 210 días se tuvieron  $15,000$  y  $17,000 \text{ t}/5 \text{ mm}^3$  respectivamente. Como se observa hay un aumento en el número de tripanosomas.

Como se observa el comportamiento del parásito es semejante en todas las curva, pero vemos que a medida que pasa el tiempo el número de tripanosomas viables va disminuyendo; pero a pesar de esto si fueron capaces de infectar a los ratones.

Este comportamiento se debe probablemente a que se pudiera afectar a nivel ultraestructural a los tripanosomas (12) en el complejo que se forma en la estructura cinetoplasto-mitocondria ya que son organelos donde el tripanosoma contiene DNA y a la vez su fuente de energía.

Con respecto a medios de cultivo se han trabajado pocos experimentos, nuestros resultados de recuperación son bajos y fueron disminuyendo conforme pasaba el tiempo, a los 30 días se tuvo un 50% de recuperación, a los 60 días un 38%, a los 105 días un 24%, a los 190 días un 22% y a los 210 días un 14%. Se observó que los parásitos de medios de cultivo tardaban en recuperar su movilidad y había gran cantidad de tripanosomas muertos. Gráfica n°1

Comparando nuestros resultados con otros trabajos son muy bajos ya que Brener y Galváo (7), Ribeiro Dos Santos (13) trajeron igualmente medios de cultivo y como agente crioprotector DMSO obteniendo una recuperación entre el 60% y 80%.

Es importante mencionar que se ha congelado Trypanosoma cruzi en la fase de amastigote en tejido (20) con una técnica lenta de congelación utilizando glicerol al 10% conservando su viabilidad y patogenicidad después de 7 años, lo que nos hace suponer que hay fases de los tripanosomas más resistentes al enfriamiento, es por ello que en medios de cultivo podemos encontrar las formas de epimastigote, promastigote y tripomastigote que al ser afectados por el enfriamiento sean los porcentajes de recuperación más bajos que en las formas sanguíneas.

## CONCLUSION

En conclusión podemos decir que la técnica que se utilizó para criopreservar Trypanosoma cruzi es favorable, ya que se mantuvieron viables los parásitos, dando como resultado un método excelente para mantener a estos hemoflagelados en el laboratorio por un tiempo indeterminado conservando sus características afines a las cepas originales; y de esta manera evitar la necesidad de mantener animales de laboratorio infectados, lo cual reduce costos y consumo de tiempo, además de que puede ser establecido para el embarque de parásitos donde las zonas endémicas se encuentran alejadas de los laboratorios o áreas de estudio.

## ANEXOS

## 1.- Solución salina al 0.85%

NaCl -----0.85 g  
 H<sub>2</sub>O dest.-----100 ml

Disolver en agua destilada, etiquetar y esterilizar a 15 lb durante 15 minutos. Guardar en refrigeración.

## 2.- Medio de cultivo difásico

Agar base para sangre----- 40 g  
 H<sub>2</sub>O destilada----- 1000 ml

Se disuelve el medio base de gelosa sangre en agua destilada se etiqueta y esteriliza a 15 lb/15 min, dejar enfriar hasta que la temperatura la tolera el dorso de la mano, en ese momento adicionar el 15% de sangre desfibrinada de borrego, se mezcla se adiciona una pequeña cantidad de penprocilina, se envasa en tubos con tapón de rosca, los cuales se colocaran en forma inclinada y se deja solidificar. Una vez solidifica da se agrega la solución salina estéril con un poco de penprocilina.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Allain, S.D. Evaluation of the viability and pathogenicity of hemoflagellates after freezing and storage. The Journ. of Parasitol. 50(5): 604-607. 1964.
- 2.- Belding, L.D. Textbook of Parasitology. 3era edición. Appleton Century Crofts. New York. 1965.
- 3.- Chen, T.C. General Parasitology, Academic Press, New York, 1973.
- 4.- Díaz, Meza F. Efecto de la criopreservación sobre la virulencia y viabilidad de los aislados de Trypanosoma cruzi CID y FIDELFA. Lic. en Q.B.P., I.P.N.; E.N.C.B. México D.F., 1990.
- 5.- Engel, J.C.; Perez A.C.; Wynne M.J. Criopreservación de Trypanosoma cruzi. Medicina, Buenos Aires. 40 (supl.1) 103-108. 1980
- 6.- Filardi, L.S.; Brener Z. Cryopreservation of Trypanosoma cruzi bloodstream forms. Journ. Protozool. 22(3): 398-401. 1975.
- 7.- Galvão, L.M. and Brener Z. Criopreservação do formas do cultura do Trypanosoma cruzi. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Río de Janeiro. 76(3): 247-257.

- 8.- Leibo, S.P. and Mazur P. The role of cooling rates in low temperature preservation. *Cryobiology*. 8, 447-452. 1971.
- 9.- Lumsden, W.H.R. Principles of viable preservation of parasitic protozoa. *Int. Journ. for Parasitol.* 2. 327-332.
- 10.-Mazur, P. *Cryobiology: the freezing of biological Systems*. Science. 168. 939-949. 1970.
- 11.-Meryman, H.T. Cryoprotective Agents. *Cryobiology*. 8(2). 173-183. 1971.
- 12.-Raether, W. and Uphoff M. Effects of dimethylsulfoxide and the deep-freezing process on the infectivity, motility and ultrastructure of --- Trypanosoma cruzi. *Parasitol. Res.* 74:307-313. 1988.
- 13.-Ribeiro dos Santos, R, Gal. F.C. et al. Avaliação da influência da criopreservação -196°C na capacidade vaccínica da amostra "PF" do Trypanosoma cruzi. *Rev. Bras. Pesq. Med. e Biol.* 11(2-3): 99-104. 1978.
- 14.-Salazar, S.P. Aspectos clinicos de la Enfermedad de Chagas en México. VIII Congreso Nacional de Parasitología. Pachuca, Hgo. 146-148. 1988.
- 15.-Schmidt, G.D. and L.S. Robert. *Foundations of Parasitology*, Mosby. Saint Louis. 1981.

- 16.-Tay, Z.J. Aspectos epidemiológicos de la enfermedad de Chagas en México. VIII Congreso Nacional de Parasitología. Pachuca, Hgo. 145-146. 1988.
- 17.-Velazco, C.D. Importancia de la Enfermedad de Chagas en México. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 28:275-283.
- 18.-Vigar, Z. Scanning electron microscopy of medically important parasites. ADIS Health Science Press. Aust. 112-115. 1983.
- 19.-Voge, M. and Markell, E.K. Parasitología-Diagnóstico Prevención y Tratamiento. 1a. Ed. El Manual moderno. México. 1984.
- 20.-Yaeger, R.G. Long term cryopreservation of the amastigote stages of hemofagellates. Journ. Protozool. 35(1): 114-115. 1988.
- 21.- Instructivo de Parasitología 1. Departamento de parasitología. E.N.C.B. Instituto Politecnico Nacional. 1988-1989.