



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE SONORA
Dirección de Investigación y Estudios de Posgrado
Maestría en Ciencias en Recursos Naturales

Criopreservación y almacenamiento de *Naegleria fowleri* y
Acanthamoeba polyphaga en nitrógeno líquido

TESIS

Que para obtener el grado de Maestro en Ciencias en
Recursos Naturales

Presenta

Jorge Alberto Robles Mascareño

Cd. Obregón, Sonora, agosto de 2002



APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Jorge Alberto Robles Mascareño, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Recursos Naturales

Asesor: Dr. Fernando Lares Villa

Revisor: M. A. María Hermelinda Herrera Andrade

Revisor: M.C. Ramón Miguel Molina Barrios

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Tecnológico de Sonora, por permitir seguirme formando académicamente, y por las facilidades que me dio para poder terminar esta etapa de mi vida.

Al Dr. Fernando Lares Villa, por toda su ayuda en la elaboración de este trabajo, por brindarme la oportunidad de trabajar con él nuevamente, por toda su confianza y por su amistad.

A la Dirección de investigación y estudios de posgrado del ITSON, por el apoyo económico para la realización de este trabajo, que forma parte del proyecto denominado “Criopreservación de un cepario de amibas de vida libre”.

Al Departamento de Medicina Veterinaria y Zootecnia del ITSON, especialmente a la MVZ Ana Laura Miranda Romero y Al MVZ Javier Arturo Munguía X., por todo el apoyo y amistad que me han brindado estos años.

A todos mis compañeros: Jorge Cabrera, Ramses Cuevas, Jorge Peña, Dulce Rochín, Manuel Garibaldi, Elizabeth Ayala, pero muy especialmente a Claudia Pérez y Patricia Adán (MI GRAN EQUIPO), por su amistad, apoyo y por aguantarme estos dos años.

A M.C. Ramón M. Molina B., por la revisión de este trabajo, y por sus consejos y amistad.

A cDr. Lorena Tineo García, por participar como revisor de este trabajo.

A M.A. María Hermelinda Herrera Andrade por su participación como sínodo en mi examen

A todos los maestros con los que curse alguna clase en estos dos años, gracias por lo poco o mucho que compartieron sus conocimientos conmigo.

A Raúl Holguín, por su ayuda en las prácticas que realizamos, por la información que compartió conmigo para hacer este trabajo y por su amistad.

DEDICATORIAS

A Dios por darme la fuerza, la voluntad y la paciencia para poder llevar a buen termino esta etapa de mi vida.

A Maribel Castro (mi flaca), por aguantar las desveladas, los problemas, mi carácter, mis achaques y en general por todo lo que pase estos dos años, con todo mi amor y agradecimiento.

A mis padres y hermanos, por seguir siendo una parte tan importante en mi vida y de mis deseos de superarme siempre.

Al Dr. Fernando Lares Villa, por que ha sido parte importante en mi formación profesional.

RESUMEN

Debido a la importancia que han adquirido las amibas de vida libre gracias a su capacidad infectiva y el gran daño que provocan a la salud en los humanos, se ha hecho necesario realizar investigaciones sobre ellas, por lo que también, es necesario desarrollar métodos que permitan mantenerlas en condiciones óptimas, pero reduciendo la inversión y el riesgo de contagio con el personal que las maneja.

Por lo anterior, se planteó el diseño de un método de crioconservación para una cepa pura en cultivo axénico de *Naegleria fowleri* y otra de *Acanthamoeba polyphaga*, a quienes se les aplicó cuatro concentraciones de dimetilsulfóxido (DMSO) como protector celular, 5, 7.5, 10 y 12.5%; después se congelaron a dos temperaturas, -45° y -70°C , durante por lo menos cuatro horas y se trasladaron a nitrógeno líquido por tres periodos, una semana, un mes y tres meses, al final de éstos se realizaron conteos en cámara de Neubauer, tiñéndolas con azul tripano al 4% para determinar la viabilidad en cada tratamiento.

La diferencia en la viabilidad comparando las dos temperaturas utilizadas fue mínima (menor a dos puntos porcentuales), para ambas especies de amibas utilizadas y en las concentraciones de DMSO, los mejores resultados de sobrevivencia fueron para la concentración de 12.5%, en *N. fowleri* con 43.75% a -70°C y 43.91 a -45°C , y para *A. polyphaga* con 63.46% a -70°C y 62% a -45°C , para ambos casos al término de los tres meses de almacenamiento en nitrógeno líquido.

Se concluye que es posible utilizar cualquiera de las dos temperaturas probadas para la congelación inicial en ambas especies y la mejor concentración de DMSO es la 12.5%.

ÍNDICE

RESUMEN	i
ÍNDICE	ii
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Planteamiento del problema	5
1.3 Justificación	5
1.4 Objetivos	6
1.5 Hipótesis	6
II. FUNDAMENTACIÓN	7
2.1 Efecto de la temperatura sobre el crecimiento	7
2.2 Congelación	8
2.3 Agentes crioprotectores	10
2.3.1 Agentes crioprotectores penetrantes	12
2.3.2 Agentes crioprotectores no penetrantes	12
2.4 Protozoarios	13
2.4.1 Morfología	14
2.4.2 Fisiología	14
2.4.3 División	14
2.5 Amibas de vida libre	15
2.5.1 Naegleria	16
2.5.1.1 Ciclo de vida	17
2.5.1.2 Patología	17
2.5.1.3 Diagnóstico	18
2.5.1.4 Cultivo	19

2.5.2 Acanthamoeba	19
2.5.2.1 Morfología	20
2.5.2.2 Ciclo de vida	21
2.5.2.3 Patología	22
2.5.2.4 Diagnóstico	25
2.5.2.5 Cultivo	26
III. MÉTODO	28
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	40
BIBLIOGRAFÍA	42

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Cantidad de <i>Naegleria fowleri</i> recuperada después de los periodos de almacenamiento en nitrógeno, usando -70°C como temperatura de congelamiento	32
Cuadro 2. Cantidad de <i>Naegleria fowleri</i> recuperada después de los periodos de almacenamiento en nitrógeno, usando -45°C como temperatura de congelamiento	32
Cuadro 3. Cantidad de <i>Acanthamoeba polyphaga</i> recuperada después de los períodos de almacenamiento en nitrógeno, usando -70°C como temperatura de congelamiento	34
Cuadro 4. Cantidad de <i>Acanthamoeba polyphaga</i> recuperada después de los períodos de almacenamiento en nitrógeno, usando -45°C como temperatura de congelamiento	35

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Selección de crioprotector y temperatura de almacenamiento para algunos tipos de células	11
Tabla 2. Taxonomía de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	20
Tabla 3. Comparación de enfermedades causadas por amibas de vida libre	24
Tabla 4. Características clínicas de queratitis por <i>Acanthamoeba</i>	25

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Patogenia de <i>Naegleria fowleri</i>	18
Figura 2. Morfología comparativa de amibas de vida libre	21
Figura 3. Patogenia de <i>Acanthamoeba</i>	23
Figura 4. Representación gráfica de la disminución de la viabilidad con respecto al tiempo para <i>Naegleria fowleri</i> , usando una temperatura de congelación de -45°C , previo al nitrógeno líquido	33
Figura 5. Representación gráfica de la disminución de la viabilidad con respecto al tiempo para <i>Naegleria fowleri</i> , usando una temperatura de congelación de -70°C , previo al nitrógeno líquido	34
Figura 6. Representación gráfica de la disminución de la viabilidad con respecto al tiempo para <i>Acanthamoeba polyphaga</i> , usando una temperatura de congelación de -45°C , previo al nitrógeno líquido.	36
Figura 7. Representación gráfica de la disminución de la viabilidad con respecto al tiempo para <i>Acanthamoeba polyphaga</i> , usando una temperatura de congelación de -70°C , previo al nitrógeno líquido.	37

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Cantidad de <i>Naegleria fowleri</i> recuperada después de los periodos de almacenamiento en nitrógeno, usando -70°C como temperatura de congelamiento	32
Cuadro 2. Cantidad de <i>Naegleria fowleri</i> recuperada después de los periodos de almacenamiento en nitrógeno, usando -45°C como temperatura de congelamiento	32
Cuadro 3. Cantidad de <i>Acanthamoeba polyphaga</i> recuperada después de los períodos de almacenamiento en nitrógeno, usando -70°C como temperatura de congelamiento	34
Cuadro 4. Cantidad de <i>Acanthamoeba polyphaga</i> recuperada después de los períodos de almacenamiento en nitrógeno, usando -45°C como temperatura de congelamiento	35

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Selección de crioprotector y temperatura de almacenamiento para algunos tipos de células	11
Tabla 2. Taxonomía de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	20
Tabla 3. Comparación de enfermedades causadas por amibas de vida libre	24
Tabla 4. Características clínicas de queratitis por <i>Acanthamoeba</i>	25

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Patogenia de <i>Naegleria fowleri</i>	18
Figura 2. Morfología comparativa de amibas de vida libre	21
Figura 3. Patogenia de <i>Acanthamoeba</i>	23
Figura 4. Representación gráfica de la disminución de la viabilidad con respecto al tiempo para <i>Naegleria fowleri</i> , usando una temperatura de congelación de -45°C , previo al nitrógeno líquido	33
Figura 5. Representación gráfica de la disminución de la viabilidad con respecto al tiempo para <i>Naegleria fowleri</i> , usando una temperatura de congelación de -70°C , previo al nitrógeno líquido	34
Figura 6. Representación gráfica de la disminución de la viabilidad con respecto al tiempo para <i>Acanthamoeba polyphaga</i> , usando una temperatura de congelación de -45°C , previo al nitrógeno líquido.	36
Figura 7. Representación gráfica de la disminución de la viabilidad con respecto al tiempo para <i>Acanthamoeba polyphaga</i> , usando una temperatura de congelación de -70°C , previo al nitrógeno líquido.	37

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Para asegurar la reproductibilidad de resultados y la continuidad en las investigaciones, actualmente los científicos se han encontrado con la dificultad del mantenimiento de las células, ya que implica una serie de subcultivos constantes que conllevan un alto consumo de tiempo, riesgos de contaminación de los cultivos puros, variaciones en su comportamiento genético y hasta la posibilidad de la pérdida total del espécimen en estudio (Simione, 1998). Se ha hecho necesario desarrollar técnicas de conservación más adecuadas y eficientes que permitan reducir todos los posibles problemas antes mencionados, siendo uno de los más importantes y de mayor uso en la actualidad la conservación por frío, específicamente la congelación a muy bajas temperaturas (crioconservación), ya sea en congeladores modernos que alcanzan temperaturas de hasta -70°C o bien en nitrógeno líquido con temperaturas que van desde -150°C hasta -196°C .

La mayoría de los laboratorios de microbiología mantienen un cepario para propósitos educativos, de investigación, para bioensayos, para uso industrial, etc. La preservación adecuada de los cultivos es extremadamente importante y debería (aunque a menudo no lo es), dársele la misma atención como a la estandarización de equipos y selección de compuestos químicos. El objetivo primario de la preservación de cultivos es mantener al microorganismo vivo, sin contaminación y sin variación o mutación, esto es, preservar el cultivo en una condición tan cercana como sea posible a la del estado original. Por muchas décadas han sido empleadas técnicas criogénicas para almacenar material biológico en estado viable y las bases para la criopreservación de parásitos radica en las observaciones hechas sobre la criopreservación de células de mamíferos.

Los principios de la conservación de parásitos debieron haber nacido, como en cualquier otra ciencia, de la observación y la práctica. Estas observaciones pudieron ser, por ejemplo, por el hecho de que en zonas polares donde la temperatura es menor de 0°C, se mantenían latentes un gran número de enfermedades como la triquinosis, donde las larvas de *Trichinella spiralis* permanecían viables por largos períodos en los cuerpos congelados de sus huéspedes y eran infectivas si estos cuerpos eran devorados por un segundo huésped susceptible. Otras observaciones pueden provenir del hecho de que quistes y huevecillos de *Entamoeba histolytica* y *Ascaris lumbricoides* soportan temperaturas de congelación por tiempos prolongados (Silva, 1985). Estas observaciones y la necesidad de mantener estos parásitos en almacenamiento, orientaron a los investigadores a tratar de comprender y estudiar dichos fenómenos. A partir de la observación de que algunas sustancias químicas podrían ser empleadas para aumentar el periodo de supervivencia y la probabilidad de disminuir el daño celular por congelamiento y por lo tanto aumentar el porcentaje de viabilidad en el material congelado, se le dio un gran impulso al proceso de criopreservación (Hernández, 1984). A partir de los años sesentas se ha observado un gran avance en esta tecnología, con el uso de nuevos y más efectivos agentes químicos o crioprotectores, nuevas técnicas criogenéticas y el auge que le ha brindado el uso de nuevos y sofisticados aparatos congeladores, que dan un control de enfriamiento muy preciso, y que es un punto clave para recobrar un máximo porcentaje de supervivencia de las células conservadas.

Durante los últimos años se ha descrito una impresionante cantidad de información para detallar y describir el proceso de congelamiento-descongelamiento de células y organismos congelados, en esta información se muestra que un grado de sobreenfriamiento a temperaturas mayores de la congelación puede causar la formación de hielo intracelular, que acoplado a un proceso de descongelación no adecuado, ocasiona resultados fatales para las células (Mazur, 1984)

Las respuestas biológicas y físicas de la célula en el congelamiento son causa de factores combinados a temperaturas bajas, como son: la pérdida de agua celular y cambios de estado de la misma. Ante estas respuestas las membranas celulares juegan un papel muy importante, la permeabilidad al agua de unión influye en los eventos físicos que ocurren intracelularmente y ellos por sí mismos resultan ser el principal sitio de daño (Mazur, 1984).

Debido a este tipo de daños que provoca la congelación se ha hecho necesaria la utilización de crioprotectores que ayuden a la conservación de las células; este tipo de agentes químicos que tienen la capacidad de conferir protección a bajas temperaturas, están por demás bien estudiadas. Estos informes indican que la mayor supervivencia de las células que han sido expuestas a un proceso de congelación-descongelación, solamente se logra con la presencia de crioprotectores que mejoran la permeabilidad de la célula y/o protegen la membrana celular.

Todo esto resalta la importancia de los cuidados que se deben tener para la conservación de células, debido a su gran delicadeza de estructura y para evitar variaciones en sus funciones vitales, motoras, de virulencia, etc.

El éxito o el fracaso de cualquier método de conservación depende también del uso del medio adecuado, el procedimiento de cultivo y de la edad del cultivo al momento de la conservación (Ghera, 1994).

El uso de bajas temperaturas para criopreservación y almacenamiento de protozoarios fue reportado primero por Coggeshall en 1939, quien congeló y almacenó dos especies de parásitos de la malaria a -76°C por 70 días. El primer intento de preservación y

almacenamiento de protozoarios en nitrógeno líquido fue anunciado en 1961 por Diamond y colaboradores durante la 36 Reunión Anual de la Sociedad Americana de Parasitología, donde se utilizó *Entamoeba histolytica* (Diamond, 1995).

Existen algunos trabajos sobre la criopreservación de amibas de vida libre en nitrógeno líquido en los que se evalúan los tiempos y temperaturas de congelación, tanto como el tipo y concentración de los agentes crioprotectores, señalando también el estado fisiológico de la amiba (quiste o trofozoíto), lo que demuestra que no existe una regla para determinar las condiciones para lograr el máximo de viabilidad de estos organismos (John, 1993).

Los quistes de amibas de vida libre se mantienen viables por meses, tal vez por años; a temperatura ambiente, los quistes de *Naegleria fowleri* han sobrevivido por 18 meses y los de *Acanthamoeba culbertsoni* por 24 meses. A bajas temperaturas y sin criopreservador, los quistes se mantienen viables por cortos períodos de tiempo. Por ejemplo los quistes de *N. fowleri* sobreviven de 2 a 8 meses a cuatro grados centígrados y de 2 a 4 meses de -10 a -15°C , *A. culbertsoni* se mantiene viable de 4 a 8 meses a -10°C . Sin un criopreservador, la amiba muere por congelación, además cuando se mezcla con un protector celular, la amiba puede ser congelada y almacenada a -70°C o en nitrógeno líquido. Recobradas después de 7 días de congelación *N. fowleri* presentó una supervivencia del 63% y *Acanthamoeba culbertsoni* de 49% (John, 1993).

Según el mismo autor, se consideran como óptimas para la congelación de *N. fowleri* las siguientes condiciones:

- Concentración de microorganismos de 1,000,000/ml
- Concentración de protector dimetilsulfóxido (DMSO) al 12% v/v
- Tiempo de equilibración de 30 minutos a temperatura ambiente
- Primera fase de congelación de 60 minutos a -20°C
- Almacenamiento a -70°C

Bajo estas condiciones, la viabilidad, determinada por tinción con rojo congo al 0.4%, fue de 76% después de 7 días, de 64% al primer mes, 49% a los tres meses y 38% a los seis meses.

En otra investigación realizada por Alejandro-Aguilar y Col. 1998, se determinó la viabilidad de *A. culbertsoni* bajo condiciones de criopreservación usando concentraciones DMSO de 5, 7.5 y 10%, se presentó una recuperación entre 43.6 y 68.5% para la concentración de 5%, de 54.5 a 73.5% para 7.5 % y entre 75.6 y 86.7 para la concentración de DMSO al 10%, siguiendo el procedimiento mencionado por John, 1993.

1.2 Planteamiento del problema

Alrededor del mundo se han presentado muertes de personas por infecciones con amibas de vida libre, lo cual ha llevado a los investigadores a estudiar estos microorganismos, pero esto ocasiona un problema debido a las necesidades de nutrición, desarrollo y conservación de estos parásitos, ya que se necesita mucha inversión tanto económica como de horas de trabajo para satisfacer los requerimientos de las amibas y así tenerlas en condiciones aptas para seguir realizando los trabajos de investigación sobre ellas. Buscando alternativas de los métodos de conservación que minimicen esta problemática se ha intentado mantenerlas latentes por medio de conservación a -196°C en nitrógeno líquido (crioconservación), pero es necesario utilizar para esto algún compuesto químico como el dimetilsulfóxido que proteja las células del frío y además realizar la congelación en forma controlada, lo que nos obliga a preguntarnos ¿Cuál es la concentración de dimetilsulfóxido que ofrece una mayor protección durante la congelación? y ¿causa algún efecto la temperatura de congelación sobre el porcentaje de recuperación al momento de la descongelación?

1.3 Justificación

Debido a la gran importancia que han adquirido las amibas de vida libre por el hecho de existir especies de reconocida patogenicidad para los humanos y animales, existe la necesidad de contar con un cepario que incluya todas las especies de interés, para apoyar los diversos trabajos de investigación que desde 1993 se han llevado a cabo en la institución. Para esto, se ha decidido implementar el sistema de almacenamiento por congelación con nitrógeno líquido, por ser de los más eficientes en costos, mantenimiento y viabilidad de los organismos; pero debido a que la variedad de datos publicados sobre

las condiciones de criopreservación de amibas de vida libre y a que las condiciones de equipamiento en nuestra institución, materiales y reactivos disponibles pueden no ser los mismos a los de los laboratorios donde se obtuvieron los datos publicados, es necesario establecer las condiciones propias y óptimas para la criopreservación de amibas de vida libre, asegurando el porcentaje de mayor viabilidad.

1.4 Objetivo general

Determinar la concentración óptima del protector dimetilsulfóxido y la temperatura de congelamiento para la conservación en nitrógeno líquido de *Naegleria fowleri* y *Acanthamoeba polyphaga*.

1.4.1 Objetivos específicos

1. Obtener y criopreservar una cepa de *Naegleria fowleri* y una de *Acanthamoeba polyphaga*.
2. Probar cuatro concentraciones del crioprotector dimetilsulfóxido (DMSO) para cada cepa a congelar
3. Determinar el efecto de dos temperaturas de congelamiento previo al almacenamiento en nitrógeno líquido para trozofóitos de las amibas mencionadas.

1.5 Hipótesis

Durante la criopreservación de amibas de vida libre utilizando dimetilsulfóxido como protector, a mayor concentración de éste mayor es el porcentaje de recuperación de organismos vivos durante la descongelación.

La temperatura de congelación utilizada previo a el almacenamiento en nitrógeno líquido, no afecta los porcentajes de viabilidad después de la descongelación.

II. FUNDAMENTACIÓN

2.1 Efecto de la temperatura sobre el crecimiento

La temperatura es uno de los parámetros ambientales más importantes que condicionan el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos.

La temperatura afecta a la velocidad de crecimiento y por lo tanto al tiempo de generación. Cada microorganismo (y suponiendo que el resto de condiciones ambientales se mantienen constantes) muestra una curva característica de tasa de crecimiento en función de la temperatura, donde podemos distinguir tres puntos característicos llamados temperaturas cardinales:

- A) Temperatura mínima: por debajo de ella no hay crecimiento;
- B) Temperatura máxima: por encima de ella tampoco existe crecimiento;
- C) Temperatura óptima: permite la máxima tasa de crecimiento.

El margen entre la temperatura mínima y la máxima se suele llamar margen de crecimiento y en muchos microorganismos suele comprender unos 40 grados.

La temperatura mínima se puede explicar en función de un descenso de la fluidez de la membrana, de modo que se detienen los procesos de transporte de nutrientes y el gradiente de protones, un aumento de la viscosidad del citoplasma, un debilitamiento de los enlaces hidrófobos de las proteínas (debido a cambios físicos en la estructura del agua de solvatación) que provoca inactivación de enzimas alostéricas y de actividad funcional de los ribosomas.

Por encima de la temperatura mínima la tasa de crecimiento va aumentando proporcionalmente hasta alcanzar la temperatura óptima, debido a que las reacciones metabólicas catalizadas por enzimas se van aproximando a su óptimo. En dicha temperatura óptima las enzimas y reacciones se dan a su máxima tasa posible.

A partir de la temperatura óptima, si seguimos subiendo la temperatura se produce un descenso acusado de la tasa de crecimiento hasta alcanzar la temperatura máxima. Dicha temperatura refleja: desnaturalización e inactivación de proteínas enzimáticas esenciales, colapsamiento de la membrana citoplásmica, lisis térmica del microorganismo como lo señala lañez, 1998 (ver en www.ugr.es/eiañez/microbiologia/17_micho.htm).

2.2 Congelación

Para asegurar la reproductibilidad de resultados y la continuidad en investigación y procesos biomédicos, actualmente los investigadores se han enfrentado con la tarea de la estabilización genética de células vivas. Los cultivos sucesivos son consumidores de tiempo y pueden provocarse contaminaciones y/o cambios genéticos. Una población de células puede ser estabilizada a través del mantenimiento a temperaturas criogénicas, es decir, para propósitos prácticos deteniendo el tiempo para esas células. A la estabilización de células a temperaturas criogénicas se le llama criopreservación, que es un aspecto de la aplicación de la criobiología. Los avances en la tecnología de la criopreservación han permitido el desarrollo de métodos para el mantenimiento de una gran variedad de células. Las técnicas están disponibles para la conservación de microorganismos, tejidos, pequeños organismos multicelulares y además organismos complejos como es el caso de los embriones.

Los procesos de congelación envuelven fenómenos complicados que, aun cuando han sido estudiados por décadas no han sido totalmente entendidos. Los estudios criobiológicos han permitido la especulación de qué ocurre durante la congelación de células vivas y qué fenómenos adversos se pueden presentar. Como el agua es el mayor componente de todas las células vivas y debe estar disponible para los procesos biológicos fundamentales para la vida, el metabolismo se detiene cuando toda el agua en el sistema es convertida en hielo.

El hielo se forma en diferentes grados durante el proceso de congelación. Cuando la congelación es lenta, se forma primero hielo extracelular antes que al interior se empiece a formar hielo. Cuando el hielo se forma, el agua es removida de los espacios extracelulares y ocurre un desbalance osmótico permitiendo que el agua migre a través de la membrana celular hacia el exterior. El aumento en la concentración de solutos tanto fuera como dentro de la célula puede ir en detrimento de la sobrevivencia celular. Si demasiada agua permanece dentro de la célula, puede provocarse un daño mortal por la formación de cristales y la recristalización durante la descongelación (Farrant, 1980).

La velocidad de enfriamiento tiene un efecto dramático en este fenómeno. El enfriamiento rápido minimiza el efecto de la concentración de solutos y provoca la formación uniforme de las partículas de hielo. Por otro lado el enfriamiento lento resulta en una mayor pérdida de agua de la célula y disminuye el hielo interno, pero incrementa el efecto solución. La permeabilidad celular afecta el grado de pérdida de agua, células más permeables son capaces de tolerar un enfriamiento rápido mejor que células menos permeables (Simione, 1998).

La formación de cristales y el efecto solución tienen un rol muy importante en la inactivación celular, y un óptimo grado de enfriamiento minimiza sus efectos. Con pocas excepciones, una tasa de enfriamiento de 1°C por minuto se considera el más adecuado. Usando aditivos o químicos que protejan a las células durante el congelamiento se puede disminuir el efecto del incremento de la concentración de solutos y la formación de cristales de hielo, adicionalmente, mantener las células congeladas a las temperaturas de almacenamiento adecuadas y usando un adecuado grado de protección de la temperatura se puede minimizar el daño por congelación de células (Mazur, 1984).

2.2.1 Daños por congelación

Cuando se exponen a bajas temperaturas las células, se encuentran tres problemas: 1) Cambios en la organización espacial de las membranas, 2) disminución de las reacciones químicas y bioquímicas y 3) alteraciones en la disponibilidad y estado del agua. Durante la aclimatación al frío las células inician mecanismos de prevención o sobrevivencia a los daños por frío, durante el congelamiento extracelular, el hielo se forma entre las células, lo que da inicio a la remoción del agua libre del interior para provocar el equilibrio en la presión de vapor lo que provoca estrés por deshidratación celular. El daño por congelación es considerado una consecuencia de las lesiones de la membrana que son causadas por la deshidratación que ocurre durante el proceso, además de otros factores que pueden contribuir al daño celular inducido por la formación de hielo (Burke y col. 1976).

2.3 Agentes crioprotectores

Muchos compuestos químicos han sido probados como agentes crioprotectores, ya sea solos o en combinación, incluyendo azúcares, suero y solventes. Los agentes crioprotectores tienen muchas funciones durante el proceso de congelación y han demostrado ser más efectivos cuando penetran a las células y retardan la congelación intracelular y minimizan los efectos de la solución. La elección de un crioprotector depende del tipo de célula a conservar (ver tabla 1), para muchas células el glicerol es el agente de elección porque es menos tóxico que el DMSO. Además el DMSO es más penetrante por lo que se selecciona para organismos más grandes y complejos como los protistas.

El agente crioprotector debe ser diluido en el medio donde se cultivan las células antes de ponerlo en contacto con ellas, esto minimiza el potencial deterioro por efectos químicos tales como la generación de calor y asegura una mayor uniformidad a la exposición del agente crioprotector reduciendo así su efecto tóxico. La concentración óptima del crioprotector varía con respecto a cada tipo célula y se debe usar la concentración más alta que la célula pueda soportar (Simione, 1998).

Tabla 1. Selección de crioprotector y temperatura de almacenamiento para algunos tipos de células.

Tipo de célula	Número de células	Agente Crioprotector	Temperatura Mínima de almacenamiento
Bacterias	10^7 /ml	Glicerol 10%	-60°C
Bacteriofagos	10^8 pfu/ml	Glicerol 10%	-60°C
Hongos (esporas)	10^6 /ml	Glicerol 10%	-60°C
Levaduras	10^7 /ml	Glicerol 10%	-150°C
Protozoarios	10^5 - 10^7 /ml	DMSO 5-10% o Glicerol 10-20%	-150°C
Algas	10^5 - 10^7 /ml	Metanol 5-10% o Glicerol 5-10%	-150°C
Células animales	10^6 - 10^7 /ml	DMSO 5-10% o Glicerol 5-10%	-150°C
Hibridomas	10^7 /ml	DMSO 5-10% + suero fetal bovino 10%	-150°C
Virus de animales	10^6 /ml	DMSO 7% + suero fetal bovino 10%	-60°C
Plásmidos	10^6 /ml (células infectadas)	Glicerol 10%	-150°C

Fuente: Manual de criopreservación (Simione, 1998).

Los agentes crioprotectores han sido divididos tradicionalmente en dos tipos:

- A) Agentes penetrantes que a concentraciones multimolares protegen la vida celular contra el daño de una lenta congelación.
- B) Agentes que son normalmente impenetrantes, que pueden proteger efectivamente a baja concentración molar y que generalmente requiere de un mayor grado de rapidez de congelamiento y descongelamiento para conferir protección (Meryman, 1971).

2.3.1 Agentes crioprotectores penetrantes

El criterio para este tipo de sustancias se reduce a dos puntos:

La mezcla debe penetrar a la célula osmóticamente y simular un daño por congelamiento

Deben ser no tóxicos en la concentración necesaria para prevenir formación de hielo.

El mecanismo por el cual un agente crioprotector penetrante previene el daño se debe a una base puramente coligativa, una unión de soluto-agua ligada.

Existen dos formas importantes en las cuales las características coligativas de un componente pueden hacer más o menos conveniente a un agente crioprotector. Primero, su capacidad de agua de enlace puede hacer posible el logro de una criopreservación óptima con una baja concentración inicial y una baja concentración final. Segundo, el desarrollo de elevada viscosidad con la concentración y temperaturas reducidas, pueden efectivamente reducir la concentración final lograda sobre el congelamiento (Meryman, 1971).

Algunos de los criopreservadores penetrantes más comunes son glicerol, etilenglicol, dimetilsulfóxido (DMSO), etanol, metanol, acetato de amonio y acetato de trimetil amonio (TMAA). En lo referente al grado de penetración, el glicerol penetra a la célula muy lentamente lo mismo que el TMAA, con respecto a la penetración del DMSO no hay evidencias del fallo a la no penetración del agente. La penetración de otros agentes es extremadamente rápida como es el caso del metanol y el etanol, la cual es aparentemente tan rápida como la difusión del agua (Meryman, 1971).

2.3.2 Agentes crioprotectores no penetrantes

La introducción en una suspensión celular de un agente crioprotector extracelular reduce igualmente la medida de enfriamiento máximo tolerable e incrementa el porcentaje de recuperación de células viables (Simione, 1998).

El mecanismo por el cual estos agentes otorgan protección no ha sido establecido claramente, pero algunas evidencias establecen que la presencia del agente altera la permeabilidad de la membrana característicamente en cada uno de los mecanismos de penetración, en donde una salida reversible de solutos puede ocurrir bajo la presencia de un cambio osmótico. El cambio hipertónico es disminuido durante el congelamiento por una entrada de soluto extracelular y la lisis hipotónica es impedida durante el descongelamiento por la salida de solutos (Meryman, 1971).

Estos datos apoyan la suposición de que los agentes crioprotectores extracelulares confieren protección por permitir una salida y entrada reversible de solutos durante el congelamiento y descongelamiento, así habilitando a las células para evitar los diferentes efectos irreversibles de un exceso de gradiente osmótico. El buen éxito de tal efecto depende sobre la realización de una velocidad de enfriamiento que es bastante rápida para los límites de salida de solutos de bajo peso molecular, evitando la pérdida de varios elementos protoplásmicos esenciales y sin embargo no lo es tan rápida como para producir congelamiento intracelular (Silva, 1985).

Algunos componentes no penetrantes reportados por poseer capacidad crioprotectora son: polivinil pirrolidona, algunos azúcares como sacarosa, lactosa y glucosa y alcoholes de azúcares como manitol y sorbitol; el polímero de almidón e hidroxiacetil (Silva, 1985).

2.4 Protozoarios

Los protozoos son protistas eucarióticos que se presentan como células aisladas o en colonias. Por su tamaño son predominantemente microscópicos. Su nombre deriva de las palabras griegas *protos* y *zoon*, que significan “primero” y “animal” (Pelczar, 1993).

Son microorganismos unicelulares que carecen de pared celular. Por lo general son incoloros y móviles. Los protozoarios se distinguen de las bacterias por su tamaño que es mayor y su naturaleza eucariótica; de las algas por su falta de clorofila; de las levaduras y de otros hongos por su movilidad y ausencia de una pared celular; y de los mohos viscosos por su falta de formación de cuerpos de fructificación. Los protozoarios obtienen su alimento al ingerir otros organismos o partículas orgánicas (Brock y Madigan, 1993).

2.4.1 Morfología

Los protozoarios son organismos unicelulares que pueden medir desde 1 μm hasta 50 mm o más, midiendo la mayoría entre 50 y 250 μm . La mayoría son uninucleados pero algunos son multinucleados, pueden presentar reproducción sexual y/o asexual. Diversas formas de locomoción pueden o no presentarse, dependiendo del grupo.

Todos los protozoarios tienen al menos un núcleo distinto del protoplasma. Los centenares de diferentes especies varían mucho en tamaño. Algunas formas parásitas tienen las dimensiones de las bacterias más pequeñas, mientras que muchas otras alcanzan 20, 50, 100 e incluso 400 μm de longitud, por 30 a 50 μm de ancho (Burdon y Williams, 1982).

2.4.2 Fisiología

Los protozoarios se encuentran en una variedad de hábitats de agua dulce y de agua de mar; gran cantidad de ellos son parásitos de otros animales, incluyendo el hombre y algunos se encuentran desarrollándose sobre la tierra y en hábitats aéreos, por ejemplo las superficies de los árboles (Brock y Madigan, 1993).

La gran mayoría de los protozoarios, tanto de vida libre como parásitos, se parece claramente a los animales en sus hábitos alimenticios. Ingieren partículas sólidas, las digieren y luego expulsan al exterior el residuo indigerible. Cuando las amibas se desarrollan junto con bacterias en un cultivo de laboratorio, no obtienen su alimento del medio sino que se alimentan de las misma bacterias (Burdon y Williams, 1982).

2.4.3 División

Desde el punto de vista ecológico, los protozoos se dividen en: *de vida libre* y los que viven sobre o dentro de otros organismos. Este último grupo se conocen como protozoos *simbióticos* (o parásitos).

Como es lo apropiado para los organismos que “cazan” su alimento propio, la mayor parte de los protozoarios son móviles. Más aún, su mecanismo de movilidad es característica clave que se usa para dividirlo entre grupos taxonómicos importantes (Brock y Madigan, 1993).

Los protozoarios parásitos se encuentran prácticamente asociados con toda clase de animales vivos e incluso con tipos que parasitan en otros protozoarios. Estas formas parásitas tienen distribución más limitada que los organismos de vida libre, al encontrarse sólo en determinados animales o en huéspedes humanos a los que se han llegado a adaptar (Burdon y Williams, 1982).

Los estadios vegetativos (tróficos) de estos protozoarios de vida libre existen en cualquier clase de agua y en la arena, tierra, o materia orgánica en descomposición. También, en las regiones polares y a grandes altitudes. Los factores que influyen en su distribución geográfica y número en un hábitat determinado son la humedad, temperatura, alimentos disponibles y otras condiciones físicas y químicas (Pelczar, 1993).

Las pequeñas amibas de vida libre *Naegleria* y *Acanthamoeba*, han sido consideradas por los clínicos y microbiólogos como organismos exóticos encontrados en infecciones raras, tales como meningoencefalitis amibiana primaria y queratitis. El interés en este grupo de microorganismos fue generado originalmente por el diagnóstico de un caso de queratitis por *Acanthamoeba* en 1979. Recientes descubrimientos de casos nuevos en personas que usan lentes de contacto despertaron este interés (Ma y col., 1990).

Por otro lado, la meningoencefalitis amibiana primaria (MAP) es una enfermedad provocada en los humanos por ameboflagelados de vida libre del género *Naegleria* y caracterizada por lesiones necrotizantes y hemorrágicas del sistema nervioso central (SNC), con una evolución clínica rápidamente fatal (García y col., 1980).

2.5 Amibas de vida libre

Una amiba es un organismo microscópico, verdaderamente primitivo, de estructura elemental. Su cuerpo unicelular es una masa diminuta de materia viva dentro de una

membrana semipermeable, delgada y flexible. No tienen estructuras internas especiales, a excepción del núcleo. En el citoplasma, sin embargo, hay numerosas vacuolas y varias inclusiones (Burdon y Williams, 1982).

Las amibas de vida libre en general constituyen un gran grupo que habita en aguas dulces, salobres, agua de mar, suelos húmedos o vegetales en descomposición. Desde el siglo pasado las amibas de vida libre se han usado como herramientas para la investigación por biólogos celulares. Fue relativamente reciente (finales de los 50's) que se apreció su potencial de patógenos para el hombre, cuando Culbertson demostró que las amibas cultivadas en células de riñón del mono *rhesus* eran patógenas para ratones y monos (Culbertson y col., 1958). Sin embargo, no se establecieron sus causas de enfermedades en humanos hasta que una década más tarde cuando Fowler y Carter (1965) demostraran que las amibas de vida libre eran las responsables de la meningoencefalitis fatal de niños de Australia del sur. Durante el mismo período, Butt (1966), reportó casos similares en Florida y nombró a la enfermedad como "meningoencefalitis amibiana primaria" (MAP) para distinguirla de los abscesos causados por la infección con *Entamoeba histolytica*. En los últimos años se ha puesto de relieve con una frecuencia cada vez mayor que algunas "amibas acuáticas" de vida libre pertenecientes a los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba* son capaces de pasar a una situación de parasitismo facultativo, pudiendo provocar graves perjuicios para salud del hombre y de los animales de laboratorio (Mehlhorn y Piekarski, 1989).

2.5.1 Naegleria

Estas amibas se caracterizan por ser ameboflagelados, capaces de asumir temporalmente la forma flagelada o la forma ameboide, que carece de flagelos (Markell y Voge, 1986).

Se han descrito varias especies de *Naegleria* (*N. gruberi*, *N. jadini*, *N. fowleri*, *N. lovaniensis*, *N. australiensis*, *N. itálica*, *N. andersoni*, *N. jamiesoni*, *N. minor*, *N. clarki*, *N. galeacystis*, *N. pussardi*), pero se sabe que solo *N. fowleri* causa enfermedad en los humanos. Debido a que *N. fowleri* es morfológicamente indistinguible de las otras

especies de *Naegleria*, criterios no morfológicos (tales como electroforesis de isoenzimas, inmunofluorescencia y patrones de restricción de DNA) tienen que ser usados para identificar la especie.

2.5.1.1 Ciclo de vida

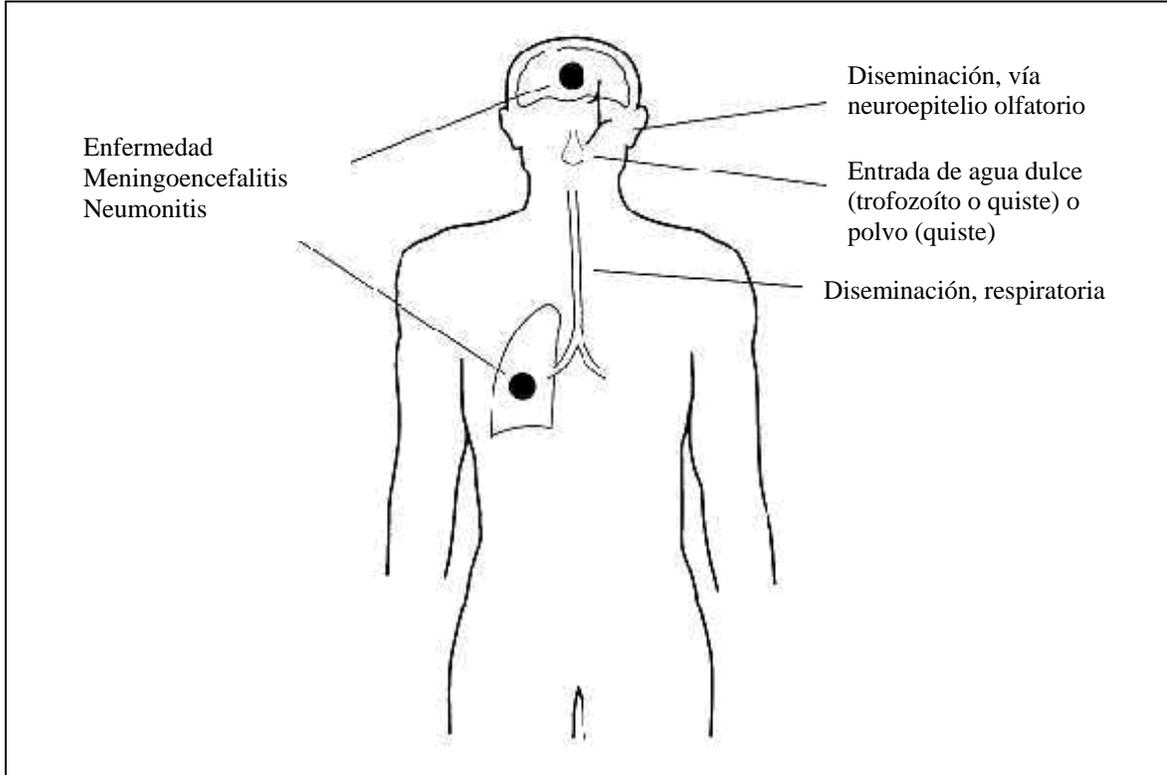
Naegleria fowleri tiene un ciclo de vida complejo para un organismo unicelular; pueden existir como quiste, trofozoíto vegetativo o forma flagelada móvil. La temperatura es uno de los factores que mejor determina la persistencia de fases específicas encontradas en el ambiente, además de nutrientes medioambientales y concentraciones iónicas (Ferrante, 1990).

2.5.1.2 Patología

Se habla de naegleriamebiasis si la infección es causada por *N. fowleri*, que inicia como nasofaringitis que progresa hasta originar meningoencefalitis (Figura 1). El cuadro clínico originado por esta amiba es de tipo agudo y hemorrágico y por ello, durante mucho tiempo el diagnóstico solo se realizó con material de necropsia (Rodríguez y col., 1984).

Los pacientes normalmente presentan cambios tempranos en sabor y olor a tres días después de la exposición al agua, seguido por un ataque de fiebre, náuseas, vómitos y adormecimiento encaminado a coma. La mayoría de los pacientes sobreviven menos de una semana después de haberse presentado los síntomas iniciales. Evidentemente no existen diferencias clínicas obvias entre meningoencefalitis por *Naegleria* de la meningoencefalitis por piogénica bacteriana aguda (Ferrante, 1990).

Las fases ameboides se consideran infecciosas, produciendo la infección por vía nasal al bañarse en aguas contaminadas. Estos parásitos migran por los nervios olfatorios hasta el cerebro. En este caso, tras un período de incubación de 1 a 9 días, se produce una MAP, que casi siempre es mortal (Mehlhorn y Piekarski, 1989).



Fuente: <http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch081.htm>

Figura 1. Patogenía de *Naegleria fowleri*.

2.5.1.3 Diagnóstico

El hecho de haber nadado en agua dulce poco antes del ataque de los síntomas apuntaría a un diagnóstico de meningoencefalitis por *Naegleria*, pero otro diagnóstico antes de la muerte es la identificación de trofozoítos en el líquido cefalorraquídeo. Microscópicamente se puede visualizar el movimiento de la amiba en el líquido cefalorraquídeo. La invasión de la amiba se lleva a cabo por la vía del neuroepitelio olfatorio donde son vistas las primeras lesiones (en infecciones de ratones) (Carter 1970, Martínez, 1977). La amiba no parece extenderse hacia la sangre (Ferrante, 1990). La invasión del sistema nervioso central es directo a lo largo del nervio olfatorio. En el sistema nervioso central la amiba se multiplica rápidamente destruyendo los bulbos olfatorios y produciendo una hemorragia extendida y una necrosis encefálica (Ferrante, 1990).

Por lo general no pueden reconocerse por la tinción de la técnica de Gram, pero se distinguen fácilmente de las células inflamatorias en las preparaciones teñidas por la técnica de Wright (John, 1982).

Según Rodríguez y col. (1984), este parásito también se puede identificar al utilizar tinción de Gomori, pero hay otras pruebas importantes, como: la capacidad de crecer a 42°C y tomar su forma flagelar; por la morfología de sus quistes, tipo de división nuclear y patogenicidad para el ratón blanco suizo, así también crecer en medio de agar no nutritivo y por efecto citopatógeno que produce en cultivos celulares de aves y mamíferos. Por otra parte, pueden encontrarse e identificarse en secciones histopatológicas mediante las técnicas de inmunofluorescencia indirecta e inmunoperoxidasa (Culbertson y Harper, 1980).

2.5.1.4 Cultivo

Para el aislamiento de *Naegleria* del líquido cefalorraquídeo, del cerebro u otros tejidos se recomienda el empleo de un medio descrito por Culbertson y col. (1968). Se trata de una placa de agar no nutritivo al 1.5 %, que se siembra con *Escherichia coli*, cultivada de forma independiente y añadida después.

2.5.2 *Acanthamoeba*

Acanthamoeba fue por primera vez aislada como contaminante de cultivos de tejidos y posteriormente se descubrió que producía una meningoencefalitis por instilación nasal en ratón y otros animales de laboratorio (Markell y Vogt, 1986).

Aunque el quiste de *Acanthamoeba* identifica inmediatamente al género, la diferenciación de especies se ha tornado muy difícil debido a la proliferación que ha habido de éstas y cuyas descripciones en su mayoría han sido sobre diferencias morfológicas menores. Con el empleo de técnicas bioquímicas tales como el análisis isoenzimático principalmente, se ha corregido la taxonomía de estas amibas cuya base fundamental era morfológica. Como resultado de tomar en cuenta características morfológicas que recaen enteramente en el

quiste y características no morfológicas como la temperatura de crecimiento y el análisis isoenzimático, se han incorporando nuevas especies descritas pocos años atrás y las sinonimias sugeridas en trabajos recientes, reconociendo finalmente, 17 especies para el género *Acanthamoeba* (Ver Tabla 2) (Lares, 1990).

Tabla 2. Taxonomía de *Acanthamoeba* spp (Page, 1988).

GRUPO I	<i>A. astronyxis</i> <i>A. comandoni</i> (<i>A. Echinulata</i>) <i>A. tubiashi</i>
GRUPO II	<i>A. polyphaga</i> <i>A. castellanii</i> <i>A. rhyodes</i> <i>A. griffini</i> <i>A. mauritaniensis</i> <i>A. lugnudensis</i> <i>A. quina</i> <i>A. divionensis</i> <i>A. triangularis</i> <i>A. hatchetti</i>
GRUPO III	<i>A. palestinensis</i> <i>A. culbertsoni</i> <i>A. lenticulata</i> <i>A. royreba</i>

() = sinónimos según estudios bioquímicos.

Las especies de *Acanthamoeba*, *A. culbertsoni*, *A. castellanii*, *A. palestinensis* y *A. astronyxis* han sido implicados como agente etiológico en infecciones oculares o supuraciones auditivas (García y col., 1980).

2.5.2.1 Morfología

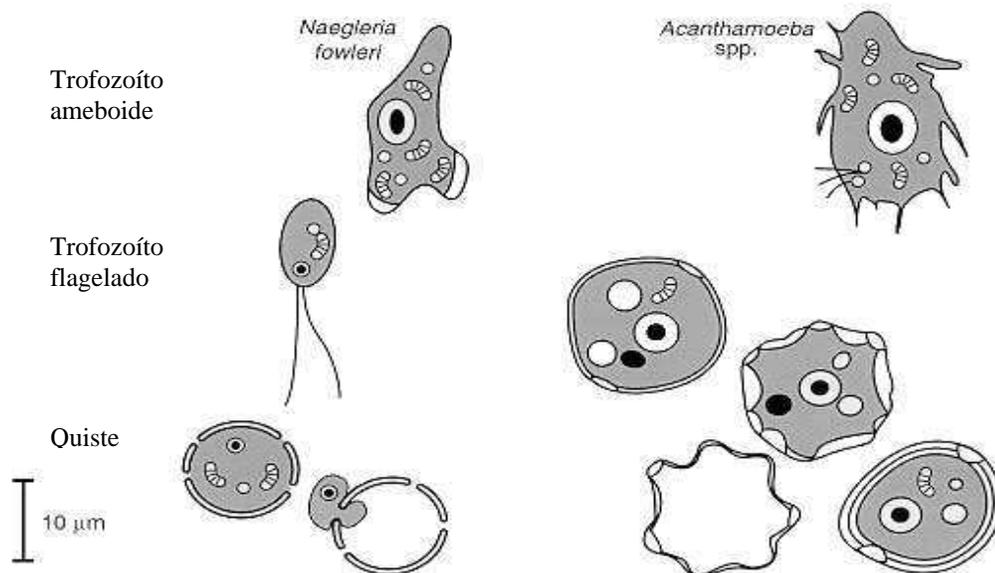
El trofozoíto representa la fase vegetativa y proliferativa de *Acanthamoeba*. Los trofozoítos son fácilmente diferenciados de otras amibas por la presencia de dos tipos de pseudópodos: uno o dos pseudópodos amplios y hialinos llamados lobópodos y a lo largo del perímetro celular, finas proyecciones llamadas filópodos o acantópodos, que aparecen y desaparecen durante la locomoción de la amiba. Los trofozoítos miden de 20 a 40 μm y pueden presentar formas ovales, alargadas o irregulares. El citoplasma se observa granulado con gran cantidad de vacuolas (Lares, 1990).

2.5.2.2 Ciclo de vida

Las especies de *Acanthamoeba* presentan dos fases en su ciclo de vida, a diferencia de *Naegleria* (Figura 2), quistes y trofozoítos y crecen mejor a bajas temperaturas.

Se ha observado que las amibas de este tipo extraídas del líquido cefalorraquídeo (LCR) producen numerosos y finos pseudópodos, a veces bifurcados. Tanto en el LCR como en el exterior, producen además quistes, de un diámetro de 8 – 30 μm , cuya pared interna suele presentar una apariencia poligonal. No existen formas flageladas, infectándose el hombre, por tanto, a través de fases ameboides (Mehlhorn y Piekarski, 1989).

Los trofozoítos de *Acanthamoeba* pueden formar quistes de manera espontánea en el medio de crecimiento, después de haber llegado a la fase estacionaria o cuando prevalecen la desecación u otras condiciones ambientales adversas (Martínez, 1985).



Fuente: <http://gsbs.utmb.edu/microbook>

Figura 2. Morfología comparativa de amibas de vida libre

A partir de que se inicia el enquistamiento, 5 – 7 horas después, comienzan a aparecer células redondeadas que reciben el nombre de quistes jóvenes o inmaduros. Después de 12 – 14 horas, muchas de estas células parecen tener una pared, que continua engrosándose hasta que se hacen visibles dos capas; éstas le dan la característica a los quistes maduros (Lares, 1990).

El enquistamiento es inducido cuando los quistes maduros son activados en un medio de crecimiento y se presumen que los aminoácidos juegan un papel en este proceso, además es inhibido por cilcohexamida y actinomicina-D, lo que sugiere que depende de la síntesis de macromoléculas (Byers, 1979).

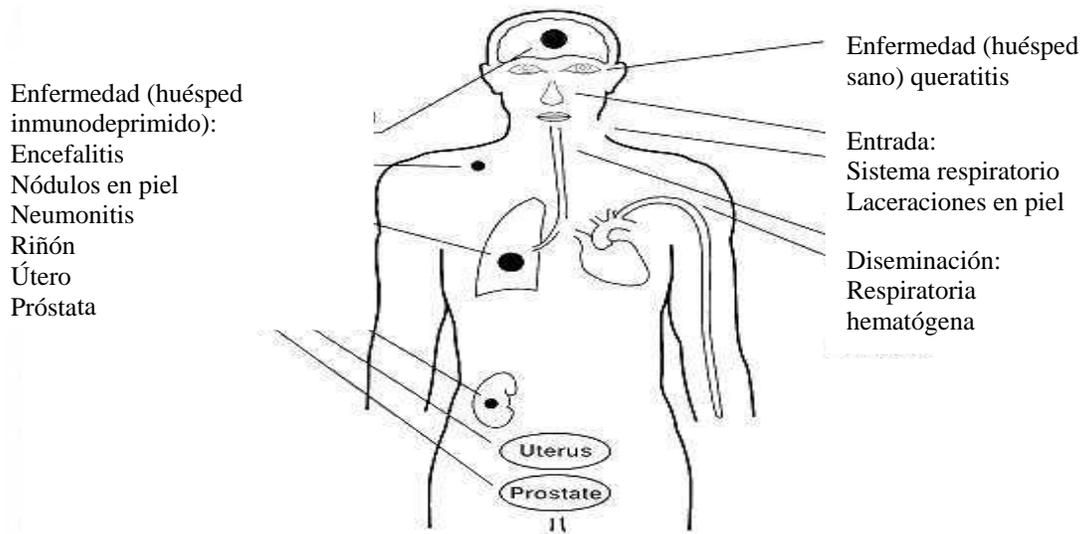
2.5.2.3 Patología

Mientras que *Naegleria* solo posee una vía de infección, la *Acanthamoeba* puede penetrar a través de la piel rota y ulcerada o por la conjuntiva ocular, y posiblemente también por los pulmones y las vías genitourinarias.

Al contrario de las especies del género *Naegleria* que suelen afectar a personas jóvenes y sanas, parece ser que las especies de *Acanthamoeba* prefieren a las personas que padecen enfermedades crónicas o fenómenos de inmunosupresión (Chester, 1986).

Las Acantamebas suelen provocar enfermedades de curso crónico, pero también se han observado, tras períodos de incubación de más de 10 días, síntomas agudos de meningoencefalitis, inflamación de órganos internos, formación de granulomas, diarreas, queratitis, etc. (ver figura 3). Se ha comprobado un fuerte incremento de *Acanthamoeba* sobre la córnea de los portadores de lentes de contacto (Mehlhorn y Piekarski, 1989).

Se ha comunicado el hallazgo de lesiones granulomatosas crónicas producidas por *Acanthamoeba* en lugares distintos del cerebro, como piel, riñones, hígado, bazo, útero y próstata (Martínez y col., 1977).



Fuente: <http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch081.htm>

Figura 3. Patogenía de *Acanthamoeba*

Encefalitis amibiana granulomatosa (EAG)

La encefalitis amibiana granulomatosa (EAG) o acanthamoebiasis, es una infección del sistema nervioso central producida por *Acanthamoeba* spp. Esta infección ocurre por lo general en individuos debilitados crónicamente enfermos o bajo tratamiento inmunodepresor (Martínez, 1982).

La encefalitis amibiana granulomatosa tiene un período de incubación menos definido que puede variar desde una semana a meses a diferencia de la meningoencefalitis por *Naegleria* (Ferrante, 1990).

La vía de penetración e invasión al sistema nervioso central en los casos de EAG parece ser hematogena, probablemente de un foco primario en cualquier parte del cuerpo. Sin embargo, estas amibas pueden alcanzar el sistema nervioso central por vía del neuroepitelio olfatorio como se demostró experimentalmente (Culbertson y col. 1966).

Al inicio del curso clínico, aparecen signos neurológicos focales, hemiparesia y convulsiones, dependiendo de la zona del cerebro afectado. Otras manifestaciones clínicas son la náusea y el vómito que aparecen en forma temprana, parálisis de los nervios craneales, ataxia cerebelosa y coma que es el evento final del curso clínico (ver tabla 3). La causa de muerte suele ser bronconeumonía, insuficiencia hepática o renal asociada con septicemia (Martínez, 1987).

Tabla 3. Comparación de enfermedades causadas por amibas de vida libre

Amiba	Naegleria fowleri	Acanthamoeba sp./ Balamuthia mandrillaris
Tamaño de trofozoítos	Trofozoítos: 10 – 15 micra	Trofozoítos: 25 – 40 micra
Enfermedad	Meningoencefalitis amibiana primaria (PAM)	Encefalitis amibiana granulomatosa (GAE) Queratitis por <i>Acanthamoeba</i>
Epidemiología	Buena salud, historia reciente de nadar en lagos y albercas	Inmunoincompetencia
Tiempo de incubación	3 – 7 días	Probablemente 10 días
Punto de entrada	Neuroepitelio olfatorio	Piel, pulmón y neuroepitelio olfatorio
Ataque	Rápido	Lento
Curso clínico	Agudo, fulminante; fatal en un lapso de 10 días	Subagudo (8 a 30 días) o crónico (más de 32 días)
Signos y síntomas	Dolor de cabeza, anorexia, náuseas, vómito, fiebre, meningitis.	Anormalidades mentales, fiebre, dolor de cabeza, meningitis, problemas visuales
Respuesta del huésped	Leptomeningitis purulenta, meningoencefalitis hemorrágica necrotizante, edema pulmonar, acumulación perivascular de amibas	Encefalitis granulomatosa con necrosis local y células gigantes multinucleadas
Tratamiento	Anfotericina B + miconazol + rifampicina	Sulfadiazina, ketoconazol, propamidina

Fuente: <http://gsbs.utmb.edu/microbook>

➤ *Queratitis.*

La queratitis por *Acanthamoeba* es una infección crónica poco común pero altamente devastadora de la córnea (ver tabla 4). La infección ocurre generalmente en individuos jóvenes, sanos e inmunocompetentes y puede presentarse por el contacto directo de la ameba con la córnea o a través del contacto con cuerpo extraños o líquidos contaminados con dicho organismo (Lares, 1990).

Tabla 4. Características clínicas de queratitis por *Acanthamoeba*.

- | |
|--|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. Individuos jóvenes, sanos e inmunocompetentes. 2. Antecedentes de contacto directo de la córnea con: <ul style="list-style-type: none"> - Líquidos contaminados. - Lentes de contacto. - Cuerpos extraños, traumatismos menores. 3. Dolor ocular severo. 4. Generalmente unilateral (raramente bilateral). 5. Reacción de mediana intensidad en cámara anterior, raramente hipopión. 6. Erosiones del epitelio corneal recurrentes, pseudodendritas. 7. Infiltrado anular, infiltrado numular, infiltrado neural, lesiones satélites. 8. Nódulos esclerales, escleritis. 9. Diagnosticados como queratitis por <i>Herpes simplex</i>. 10. Evolución crónica con curso progresivo a pesar del tratamiento. 11. Cultivos repetidamente negativos para bacterias, virus y hongos. 12. Cultivos positivos falsos a virus, debido al efecto citopático en cultivos de tejido. |
|--|

Fuente: Martínez (1987)

2.5.2.4 Diagnóstico

➤ *Encefalitis amibiana granulomatosa (EAG)*

El aislamiento e identificación de los trofozoítos y quistes de *Acanthamoeba* a partir del sistema nervioso central resulta ser un método efectivo para el diagnóstico. El examen del líquido cefalorraquídeo puede ser de valor diagnóstico, sin embargo, la punción lumbar

puede estar contraindicada debido a los signos de una presión intracraneal aumentada (Martínez, 1987).

La característica histopatológica más resaltante en el caso de EAG es la reacción granulomatosa asociada a la presencia de trofozoítos amibianos. Recientemente este tipo de alteraciones han sido señaladas como características de EAG provocadas por amibas del género *Acanthamoeba* (García y col. 1980).

➤ *Queratitis.*

El diagnóstico puede ser confirmado por un raspado vigoroso de la córnea con un hisopo o una espátula, tiñendo el material obtenido con tinciones de Giemsa, tricrómica, Wright, hemacolor o Gram y examinándolo a 400x en un microscopio estándar de luz. Pero si el raspado superficial de la córnea es hecho cuando el epitelio está intacto, especialmente si el infiltrado está localizado en el estroma y cubierto por el epitelio, el material incluido puede no incluir a la amiba. La tinción con blanco de Calcofluor y anticuerpos fluorescentes pueden también usarse para detección del organismo en raspados y secciones de tejidos corneales (Lares, 1990).

2.5.2.5 Cultivo

Las acantamebas crecen rápidamente sobre placas de agar no nutritivo adicionado de bacterias vivas o muertas, lo cual resulta ventajoso para aislar estos organismos de muestras del medio ambiente o de fluidos de pacientes sospechosos de tener infecciones por *Acanthamoeba*. Todas las cepas crecen a 30°C, pero algunas se multiplican y enquistan más rápido a temperaturas mayores (Page, 1988).

Para la mayoría de los trabajos experimentales, las amibas son cultivadas en forma axénica en medios complejos y sintéticos. Los medios de crecimiento generalmente contienen proteosa-peptona, glucosa y iones metálicos divalentes a menudo suplementados con extracto de levadura (Lares, 1990).

La combinación de bajas temperaturas de almacenamiento y la utilización de agentes de protección celular son una herramienta de gran importancia en la conservación de células, ya que se pueden mantener en condiciones viables por largos periodos de tiempo, sin que se vean afectados sus parámetros vitales más importantes. Esto produce un ahorro en cuanto a los materiales necesarios para el mantenimiento de las células, la utilización de horas hombre empleadas para este efecto, reducción en los riesgos de contaminación de los cultivos, también una reducción en la posibilidad de infección para el personal en el caso de microorganismos patógenos, etc. Por eso de la importancia de diseñar un método de conservación de largos periodos de tiempo, adaptándolo a las condiciones, materiales y equipos disponibles en cada laboratorio en particular.

III. MÉTODO

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Molecular de la Dirección de Investigación y Estudios de Posgrado del Instituto Tecnológico de Sonora, en Cd. Obregón, Sonora, México, durante los meses de noviembre de 2001 a junio de 2002.

- A) Cepas a utilizar: se trabajó con las amibas *Naegleria fowleri* y *Acanthamoeba polyphaga*.
- B) Cultivos monoxénicos: se sembraron las cepas de amibas en agar no nutritivo al 1.5 % previamente esterilizado durante 15 minutos a 121°C y 15 lb/in² y vaciado en placa, adicionando como nutriente al cultivo 0.5 ml de una suspensión de la bacteria *Escherichia coli*, una vez que la suspensión de bacterias fue absorbida por el agar, la placa se colocó en incubación a 37°C por 72 horas.
- C) Cultivo axénico: de la placa de cultivo monoxénico se realizó una recuperación de las amibas por medio de un corte del agar de aproximadamente 1 cm², donde se observó con el microscopio desarrollo abundante de los trofozoítos, el cual se colocó en un

tubo conteniendo el medio de cultivo axénico que es medio de casitona (OXOID) al 2% esterilizado durante 15 minutos a 121°C y 15 libras de presión, adicionado con suero fetal de ternera al 10%, 200 µg /ml de estreptomycin y 200 UI/ml de penicilina G y se incubó a 30°C por un lapso de 5 días. Se realizó una resiembra una vez que se confirmó el desarrollo de las amibas a otro tubo conteniendo el mismo medio de cultivo y se incubó de nuevo a 30°C por 5 días, hasta que se encontraban en la fase logarítmica de crecimiento.

- D) Preparación del agente crioprotector: se utilizaron soluciones de dimetilsulfóxido (DMSO) al 5, 7.5, 10 y 12% (v/v), utilizando medio de cultivo axénico estéril como diluyente. El DMSO se esterilizó por medio de filtración utilizando filtro de nylon de 0.2 micras, previamente lavado con alcohol etílico y enjuagado con DMSO.
- E) Concentración de células a congelar: de los cultivos axénicos de amibas, se realizó un conteo celular mezclando 0.05 ml del cultivo con 0.05 ml de azul tripano al 4% y se realizó la observación y conteo de células vivas al microscopio en una cámara de Neubauer, para conocer la concentración de amibas por mililitro de cultivo y se realizó una dilución o concentración del cultivo hasta obtener un rango de 1×10^5 a 1×10^7 amibas/ml de cultivo.
- F) Adición del crioprotector: al cultivo ya estandarizado se le adicionó un volumen igual del crioprotector (previa homogenización de los microorganismos en el medio de cultivo). Se llenaron 20 crioviales con 1 ml de la mezcla amiba-protector con cada una de las concentraciones de DMSO utilizadas, estos viales se dividieron en dos series de 10 tubos cada una, para someter cada serie a una diferente temperatura de congelamiento.
- G) Congelamiento: se utilizaron dos temperaturas de congelamiento para cada amiba, que fueron de -45 °C y -70 °C utilizando ultracongeladores (REVCO), los viales ya llenos con la mezcla se colocaron en un contenedor (Mr. Frosty de NALGENE) al cual se le adicionó alcohol isopropílico al 99%, para que la disminución de la temperatura durante el congelamiento sea controlada aproximadamente a 1°C/min. En estas temperaturas se mantuvieron las amibas por un lapso de 4 horas como mínimo.

- H) Almacenamiento en nitrógeno líquido: una vez transcurrido el tiempo de congelación se trasladaron los viales a los tanques conteniendo el nitrógeno líquido, donde se almacenaron hasta que cumplieron los tiempos de permanencia marcados, que fueron de una semana, un mes y tres meses, al final de cada periodo fueron extraídos del nitrógeno un par de viales de cada concentración para realizar un conteo de células vivas.
- I) Determinación de la viabilidad: los viales extraídos del nitrógeno se colocaron en un baño María a 37°C hasta su descongelación, después de resuspender los microorganismos en el medio de cultivo, se realizó un conteo de células vivas, mezclando 0.05 ml del cultivo con 0.05 ml de azul tripano al 4% y se realizó la observación y conteo de células vivas al microscopio en una cámara de Neubauer.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 RESULTADOS

Para la realización de este trabajo, los procesos de congelamiento, almacenamiento en nitrógeno y los conteos de células vivas antes y después de la congelación se llevaron a cabo por duplicado para las dos especies de amibas utilizadas, lo que representa un total de 98 muestras analizadas, los datos que se reportan son un promedio de las dos repeticiones para cada temperatura de congelamiento y cada concentración de protector utilizados.

El número total de células de *N. fowleri* con que se inició el trabajo que fue de 5.6×10^5 cel/ml, el cual descendió con el transcurso del tiempo de almacenamiento. La disminución fue mayor donde se utilizó menor cantidad de protector celular, ya que el número final de amibas para DMSO al 5% fue de 1.17×10^5 cel/ml, DMSO al 7.5% con 1.77×10^5 cel/ml, con DMSO al 10% fue de 2.27×10^5 cel/ml y con DMSO al 12.5% de 2.45×10^5 cel/ml, utilizando una temperatura de congelación de -70°C y un tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido de tres meses (ver cuadro 1).

Cuadro 1. Cantidad de *Naegleria fowleri* recuperada después de los períodos de almacenamiento en nitrógeno, usando -70°C como temperatura de congelamiento.

Tiempo de congelación	Concentración de Dimetilsulfóxido			
	5%	7.5 %	10%	12.5%
0 días	5.6×10^5 / ml	5.6×10^5 / ml	5.6×10^5 / ml	5.6×10^5 / ml
1 semana	4.3×10^5 / ml	4.2×10^5 / ml	4.8×10^5 / ml	4.7×10^5 / ml
1 mes	1.7×10^5 / ml	2.1×10^5 / ml	2.9×10^5 / ml	2.8×10^5 / ml
3 meses	1.17×10^5 / ml	1.8×10^5 / ml	2.3×10^5 / ml	2.4×10^5 / ml

El mismo comportamiento se observó utilizando -45°C como temperatura de congelación donde se observó que la reducción desde el tiempo cero de 5.18×10^5 cel/ml, y al término de los tres meses de almacenamiento con DMSO al 5% el conteo final fue de 1.1×10^5 cel/ml, con DMSO al 7.5% con 1.8×10^5 cel/ml, utilizando 10% de protector quedó en 2.5×10^5 cel/ml y la cuenta celular a la máxima concentración de protector quedó en 2.27×10^5 cel/ml (ver cuadro 2).

Cuadro 2. Cantidad de *Naegleria fowleri* recuperada después de los períodos de almacenamiento en nitrógeno, usando -45°C como temperatura de congelamiento.

Tiempo de congelación	Concentración de Dimetilsulfóxido			
	5%	7.5 %	10%	12.5%
0 días	5.2×10^5 / ml	5.2×10^5 / ml	5.2×10^5 / ml	5.2×10^5 / ml
1 semana	4.2×10^5 / ml	4.1×10^5 / ml	4.7×10^5 / ml	4.6×10^5 / ml
1 mes	2.4×10^5 / ml	2.8×10^5 / ml	3.2×10^5 / ml	3.5×10^5 / ml
3 meses	1.1×10^5 / ml	1.8×10^5 / ml	2.1×10^5 / ml	2.3×10^5 / ml

Utilizando la temperatura de congelación de -45°C para *N. fowleri*, se separaron en dos grupos las concentraciones de DMSO utilizadas, agrupándose las dos menores y en otro grupo las dos mayores, en el primer periodo de descongelación que es el de una semana, la sobrevivencia de células fue alrededor de 90% para el grupo de concentraciones de

DMSO altas y de 80% para las bajas, pero se observó una caída fuerte al aumentar el tiempo de almacenamiento ya que al primer mes en el grupo de concentraciones bajas la reducción de células a la descongelación fue muy cercana o mayor al 50% y en las más altas de 35%; finalmente a los tres meses de almacenamiento el porcentaje de células viables para el DMSO en el grupo de 5 y 7.5% fue aproximadamente de 20 y 35%, observándose que la mejor concentración de protector fue la de 12.5% ya que el total de microorganismos recuperados fue de 44% (ver figura 4).

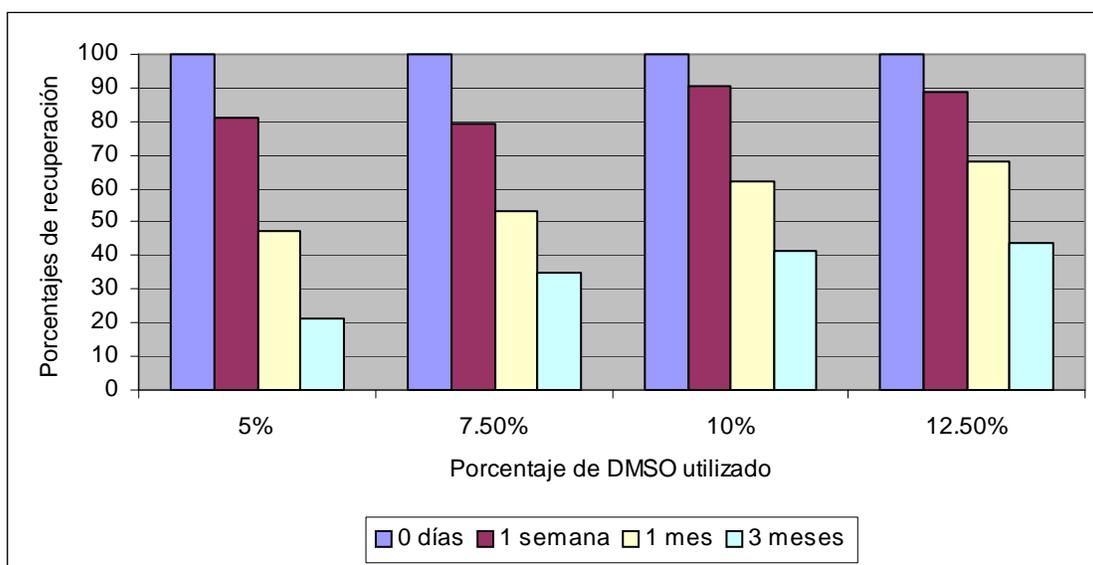


Figura 4. Representación gráfica de la disminución de la viabilidad con respecto al tiempo para *Naegleria fowleri*, usando una temperatura de congelación de -45°C , previo al nitrógeno líquido.

En el caso de la congelación a -70°C para *N. fowleri*, se observó el mismo comportamiento en la agrupación de las concentraciones de DMSO utilizadas, pero la disminución del porcentaje de células viables después de la descongelación en los dos primeros tiempos de almacenamiento utilizados (1 semana y 1 mes) son aun mayores, ya que a la semana la pérdida va desde 15 hasta 25%, y al primer mes de 70 a 50%; en el tiempo de tres meses se redujo la tendencia de la muerte celular, ya que los porcentajes de sobrevivencia van de 20 a casi 45 % que son muy parecidos a los obtenidos con -45°C donde también la mayor protección obtenida fue con DMSO al 12.5% (ver figura 5).

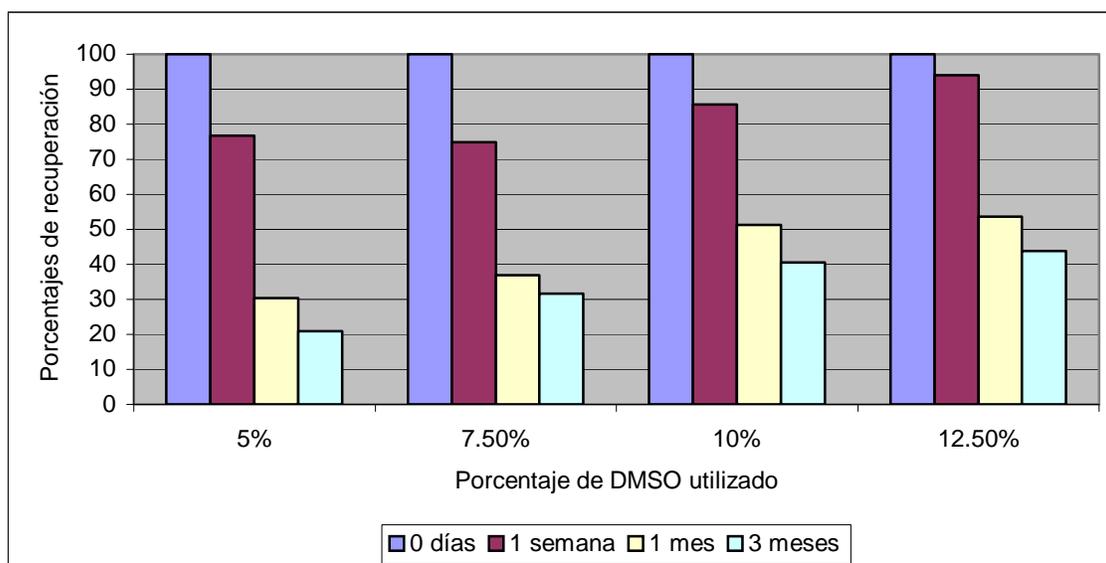


Figura 5. Representación gráfica de la disminución de la viabilidad con respecto al tiempo para *Naegleria fowleri*, usando una temperatura de congelación de -70°C , previo al nitrógeno líquido.

En el caso de *A. polyphaga* donde se utilizó -70°C como temperatura de congelación y se inició el experimento con 1.3×10^5 cel/ml, se obtuvo una recuperación final de células por arriba del 50% en las concentraciones de protector más altas, ya que al 10% de DMSO el total de amibas recuperadas fue de 0.72×10^5 cel/ml y con DMSO al 12.5% quedó en 0.82×10^5 cel/ml (ver cuadro 3).

Cuadro 3. Cantidad de *Acanthamoeba polyphaga* recuperada después de los períodos de almacenamiento en nitrógeno, usando -70°C como temperatura de congelamiento.

Tiempo de congelación	Concentración de Dimetilsulfóxido			
	5%	7.5 %	10%	12.5%
0 días	1.30×10^5 / ml	1.30×10^5 / ml	1.30×10^5 / ml	1.30×10^5 / ml
1 semana	0.92×10^5 / ml	0.91×10^5 / ml	1.07×10^5 / ml	1.10×10^5 / ml
1 mes	0.62×10^5 / ml	0.75×10^5 / ml	0.92×10^5 / ml	0.95×10^5 / ml
3 meses		0.52×10^5 / ml	0.72×10^5 / ml	0.82×10^5 / ml

Con la otra temperatura de congelación utilizada (-45°C), también los mayores números de células vivas recuperadas fueron para esas concentraciones de crioprotector utilizado y fueron de 0.7×10^5 cel/ml y 0.77×10^5 cel/ml para DMSO al 10% y 12.5% respectivamente (ver cuadro 4).

Cuadro 4. Cantidad de *Acanthamoeba polyphaga* recuperada después de los períodos de almacenamiento en nitrógeno, usando -45°C como temperatura de congelamiento.

Tiempo de congelación	Concentración de Dimetilsulfóxido			
	5%	7.5 %	10%	12.5%
0 días	$1.25 \times 10^5 / \text{ml}$	$1.25 \times 10^5 / \text{ml}$	$1.25 \times 10^5 / \text{ml}$	$1.25 \times 10^5 / \text{ml}$
1 semana	$0.95 \times 10^5 / \text{ml}$	$0.75 \times 10^5 / \text{ml}$	$1.12 \times 10^5 / \text{ml}$	$1.05 \times 10^5 / \text{ml}$
1 mes	$0.67 \times 10^5 / \text{ml}$	$0.70 \times 10^5 / \text{ml}$	$0.92 \times 10^5 / \text{ml}$	$0.90 \times 10^5 / \text{ml}$
3 meses	$0.45 \times 10^5 / \text{ml}$	$0.45 \times 10^5 / \text{ml}$	$0.70 \times 10^5 / \text{ml}$	$0.77 \times 10^5 / \text{ml}$

Para *A. polyphaga* utilizando una temperatura de -45°C como temperatura de congelación también se formaron las agrupaciones entre las concentraciones bajas y las concentraciones altas de DMSO, se obtuvo una viabilidad en la primera semana de 76 a casi 90%, y en el primer mes de almacenamiento la sobrevivencia se redujo un rango entre 54 y 72%, en estos primeros dos periodos de congelación las concentraciones de células viables fueron mayores a menor concentración de DMSO en cada grupo formando. No fue así en el último tiempo de almacenamiento en nitrógeno donde la mayor protección se dio con DMSO al 12.5% y fue de 62% de sobrevivencia y en las dos concentraciones más bajas de 36%, para DMSO al 10% se obtuvo un porcentaje de recuperación de 56% (ver figura 6).

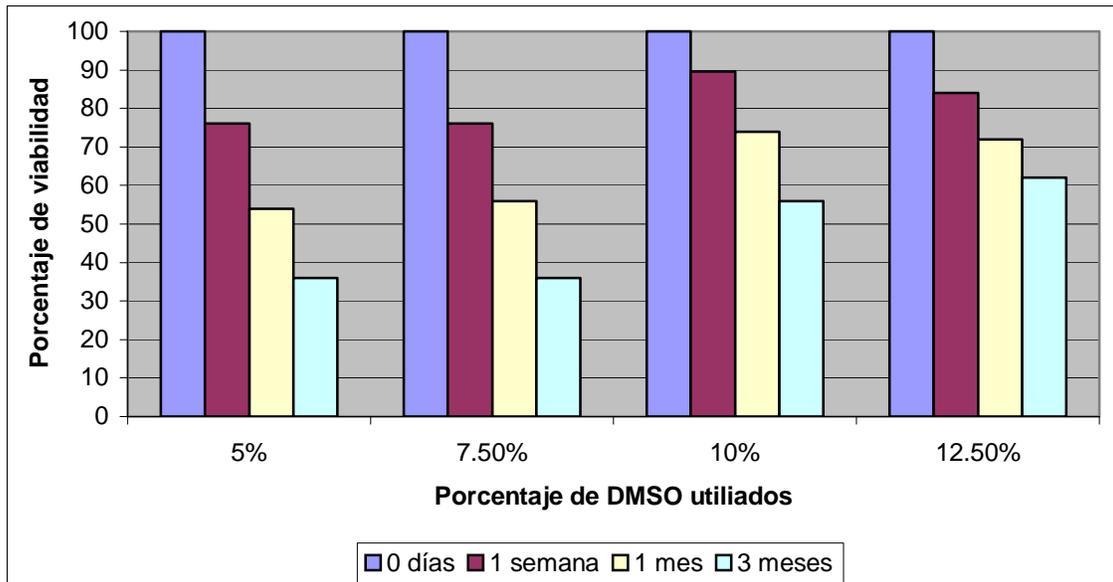


Figura 6. Representación gráfica de la disminución de la viabilidad con respecto al tiempo para *Acanthamoeba polyphaga*, usando una temperatura de -45°C previo al nitrógeno líquido.

Con la utilización de -70°C sobre *A. polyphaga*, se tuvo el mismo comportamiento de agrupaciones, y a la primera semana de almacenamiento los porcentajes de recuperación van de 71% a casi 85% de menor a mayor concentración de DMSO utilizada, en el primer mes de conservación en nitrógeno, el grupo de concentraciones más altas se mantienen muy cerca alrededor del 70% de sobrevivencia y en el grupo menor se ve una diferencia de 10 puntos porcentuales entre ellos, ya que al 5% de DMSO sobrevivió el 48% y con DMSO al 7.5% fue de casi 58%. Al cumplirse el periodo de los tres meses, existió una separación más marcada entre DMSO al 10% y al 12.5%, ya que los porcentajes de sobrevivencia fueron de 56% y 63% respectivamente. Para las concentraciones de crioprotector más bajas solo se tuvo lectura de 7.5% de protector y la sobrevivencia fue de 40% (ver figura 7).

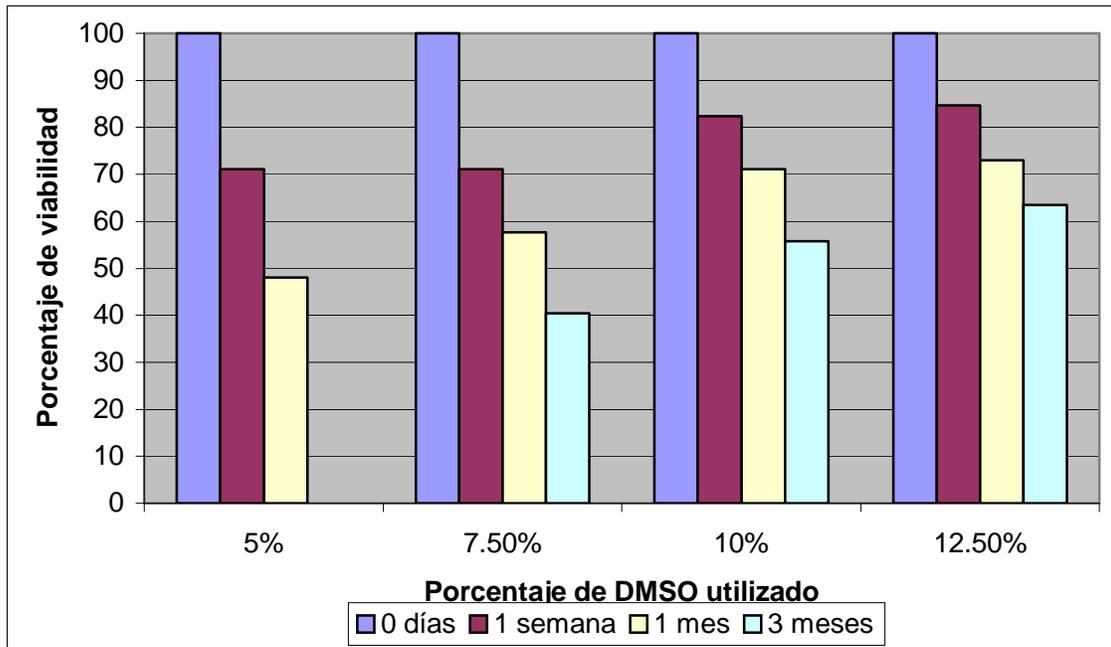


Figura 7. Representación gráfica de la disminución de la viabilidad con respecto al tiempo para *Acanthamoeba polyphaga*, usando una temperatura de congelación de -70°C previo al nitrógeno líquido.

4.2 DISCUSIÓN

En los resultados se observa un agrupamiento en los porcentajes de recuperación entre las concentraciones de DMSO más bajas (5 y 7.5%) y otro grupo en las concentraciones más altas utilizadas (10 y 12.5%) para las dos especies de amibas que se sometieron a los tratamientos; el grupo de las concentraciones de DMSO más altas presentó un mayor grado de protección a las células, ya que los porcentajes de recuperación fueron más altos.

Esta misma tendencia se observó en un trabajo realizado por Alejandre y cols., en 1998, donde se trabajó con otra especie de *Acanthamoeba* (*A. culbertsoni*), el mayor porcentaje de sobrevivencia se presentó con la utilización de DMSO al 10%, los porcentajes de recuperación fueron mayores pero existió la diferencia en la temperatura del tiempo de equilibrio aplicado, la de Alejandre y cols., fue de 4°C y la de esta investigación fue a

temperatura ambiente (25°C), otro trabajo realizado por Sung-Ah en 1992 donde se utilizaron dos especies no identificadas de *Acanthamoeba*, se puede comparar con los aquí obtenidos en las concentraciones bajas de DMSO utilizadas ya que con 7.5% de DMSO informa resultados de recuperación de entre 20 y 64%, durante 30 días de almacenamiento en nitrógeno líquido y finalmente en una investigación realizada por John y cols. en 1993 utilizando *A. culbertsoni* obtuvo una viabilidad de 39% con DMSO al 12% y 12 meses de almacenamiento en nitrógeno líquido y estos resultados pueden compararse con los obtenidos en el grupo de concentración de DMSO más altas; esto debido a que al aumentar la concentración del protector y al ser este un protector intracelular, la diferencia entre la concentración de sólidos extra e intracelular durante el proceso de congelamiento es menor y por lo tanto ocurre un menor porcentaje de muerte celular debido a la pérdida de líquidos que se presenta por efecto de los cambios de presión osmótica, al tratar la célula de nivelar los porcentajes de sólidos (Meryman, 1971; Simione, 1998).

El mismo comportamiento presentó *N. fowleri* en cuanto al agrupamiento de las concentraciones de DMSO utilizado. En lo referente a los porcentajes de recuperación se pueden comparar a los obtenidos por John en 1993 donde con una concentración de 12% de DMSO se obtuvo un porcentaje de recuperación de 47%, y Simione y Daggett (1976) con dos especies no definidas de *Naegleria* y utilizando 5% de DMSO y 7 días de almacenamiento obtuvieron un porcentaje de recuperación entre 48 y 63%.

En lo referente a las temperaturas de congelación utilizadas (-45 y -70°C), no se observó diferencia entre ellas con respecto a los porcentajes de recuperación ya que los resultados muestran una diferencia de tan solo 0.2 puntos porcentuales, además, en las investigaciones de Simmione y Dagget (1976), John y Eddy (1993) y Sunh Ah (1992) se utilizó una temperatura de -20°C para congelación, por lo que al comparar los resultados obtenidos con dichas investigaciones, tampoco se observa una gran diferencia en los porcentajes de sobrevivencia. En el caso de Alejandre y cols; (1998), si se utilizó la temperatura de -70°C.

Es importante resaltar que durante la congelación se utilizó un contenedor para los viales, el cual tenía alcohol isopropílico para controlar la disminución de la temperatura a

aproximadamente 1°C por minuto, esto para homogeneizar el grado de enfriamiento y así poder disminuir los daños por congelación, principalmente por ruptura de membrana celular al formarse cristales de hielo muy grandes, y esto explica probablemente el porqué nosotros no detectamos diferencias en la temperatura de congelación (Simione, 1998).

Las amibas son células con un alto contenido de agua y por lo tanto fácilmente afectadas por la presión osmótica al desarrollarse la formación del hielo y la concentración de los sólidos extra e intracelulares (Burdon y Williams,1982), por lo que el funcionamiento del protector celular utilizado fue el adecuado, ya que se observaron muy buenos porcentajes de sobrevivencia en las dos especies de amibas utilizadas.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La concentración de dimetilsulfóxido al 12.5% proporcionó una mayor protección celular, ya que los mayores porcentajes de sobrevivencia tanto para *N. fowleri* como para *A. polyphaga* se obtuvieron con este tratamiento. Aunque la diferencia obtenida con respecto a la utilización de DMSO al 10% es muy pequeña, es posible utilizar esta última concentración sin ver disminuido en gran número las células vivas después de la descongelación, pero sí obteniendo un ahorro en la cantidad de reactivo utilizado y por lo tanto una disminución en el costo de los tratamientos.

Es posible utilizar las temperaturas de congelación de -45°C y -70°C previo al nitrógeno líquido, ya que las diferencias de sobrevivencia son muy pequeñas entre ellas.

Con estos datos se puede decir que el método de criopreservación es adecuado para el almacenamiento de amibas de vida libre, ya que se puede mantener un alto porcentaje de viabilidad, reduciendo de esta manera los riesgos de manejo, alteraciones genéticas de las amibas, posibles contaminaciones y pérdidas de los especímenes.

Es necesario hacer un estudio donde se manejen tiempos de almacenamiento más largos y diferentes temperaturas de equilibrio para poder determinar el tiempo máximo de viabilidad de las células, y así determinar los lapsos necesarios de descongelación y activación de las cepas para mantenerlos vivos.

También se recomienda trabajar con otras especies de cada uno de los géneros utilizados para ver diferencias entre ellas y así poder determinar exactamente los parámetros adecuados para cada una.

Es importante realizar pruebas de patogenicidad en animales de laboratorio para confirmar que no existe disminución o pérdida de la capacidad infectiva y de los daños que provocan estos microorganismos, debido a cambios genéticos provocados por los procesos de congelación-descongelación.

BIBLIOGRAFÍA

- Alejandre, A. R., C.M. Méndez, T.B. Noguera, A.F. Jara. 1998. Maintenance of *Acanthamoeba culbertsoni* by Cryopreservation. **Journal of Parasitology** 84(6) 1998. USA Pp 1261-1263.
- Brock, T., M. Madigan. 1993. **Microbiología**. sexta edición, editorial Prentice Hall, México, 956 p.
- Burdon, K., Y. Williams. 1982. **Microbiología**. Publicaciones Cultural S.A., México D. F. 830 p.
- Burke, M.J., L.V. Gusta, H.A. Quamme, C.J. Weiser, P.H. Li. 1976. Freezing and injury in cells. **Annu. Rev. Physiol.** 27: 507-528.
- Butt, C. G. 1966. Primary amebic meningoencephalitis. N. Eng. **J. Med.** 274: 1473 - 1476.

- Byers, T. J. 1979. Growth, Reproduction, and Differentiation in *Acanthamoeba*, **Int. Rev. Cytol.**, 61: 283 – 341.
- Carter, R. F. 1970. Description of *Naegleria* spp. Isolated from two cases of primary amebic meningoencephalitis and of the experimental pathological changes induced by it, **J. Path.** 100: 217 – 244.
- Chester, B. P. 1986. **Patología clínica**. segunda edición, Editorial Salvat, México.
- Culbertson, C. G., K. Harper. 1980. Surface coagulation with formalinized, stained protein. A staphylococci in the immunologic study of three pathogenic amebae. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 29: 785 - 794.
- _____, P. W. Ensminger, W. M. Overton. 1968. Pathogenic *Naegleria* sp. – study of strain isolated from human cerebrospinal fluid. **J. Protozool.** 15: 353 - 363.
- _____, P.W. Ensminger, W. M. Overton. 1966. *Hartmanella* (*Acanthamoeba*). Experimental Chronic Granulomatous Brain infections produced by New Isolates of Low Virulence, **Am. J. Clin Pathol.**, 46, 3: 305 – 314.
- _____, J. W. Smith, J.R. Minner 1958. *Acanthamoeba*: Observations on animal pathogenicity. **Science**, 127:1506.
- Diamond, L. 1995. Cryopreservation and Storage of Parasitic protozoa in Liquid Nitrogen. **Journal Euk. Microbiol** 42(5). USA. Pp 585-590.
- Farrant, J. 1980. General observations on cell preervation. In **Low Temperature Preservation in Medicine and Biology**. Ashwood_Smith and Farrant Editores. Kent, England. Pp 1-18.

- Ferrante, A. 1990. Free-living amoebae: pathogenicity and immunity, **Parasite Immunology**, 13: 31 - 47.
- Fowler M., R.F. Carter. 1965. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.: a primary report. **Br Med J.**; 2: 740 - 742
- García,T. J.,J.E. González, y A. J. Martínez. 1980. Meningoencefalitis Amibiana primaria y Encefalitis Amibiana Granulomatosa. Estudio comparativo de dos casos venezolanos, **Acta Médica Venezolana**, 27: 84 – 91.
- Ghera, R.L. 1994. Culture preservation. In Methods of General and Molecular Bacteriology. Gerhardt, Murray, Wood and Krieg Eds. **American Society for Microbiology**. Washington, D.C. . Pp 278-292
- Hernández, R. C.H. 1984. **Evaluación de diferentes sustancias protectoras (soportes) en la liofilización de toxoide tetánico**. Tesis de licenciatura. ENCB, IPN. P 49.
- John, D.T. 1993. Oportunistically Pathogenic Free-Living Amebe. In **Parasitic Protozoa**. Krieg and Baker eds. Pp 143-246. Academic Press Inc., San Diego.
- _____, P.L. Eddy. 1989. Freeze-preservation of *Naegleria fowleri* amebae. In **38th Annual Meeting of de American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. Abstract 156. Pag. 161..
- _____. 1982. Primary amebic meningoencephalitis and the biology of *Naegleria fowleri*. **Ann. Rev. Microbiol.** 36: 101 - 123.
- Lares, V. F. 1990. Biología y aspectos de patogenicidad de *Acanthamoeba*. **Rev. Latamer. Microbiol.** 32: 71 - 88.
- Ma, P., G. S. Vivesvara, A. J. Martínez, F. H. Theodore, P. Marc-Dagget, T. K. Sawyer. 1990. *Naegleria* y *Acanthamoeba* Infection: Review, **Rev. Infect. Dis.** 12: 409 – 513.

- Markell E., M. Voge. 1986. **Parasitología médica**. Sexta edición, Editorial Interamericana, Madrid España, Pág. 49 - 54.
- Martínez, A. J. 1987. **Anatomic-pathology of free-living amebis infections**. En *Amphizoic Amoebae: Human Pathology, Infectious Diseases Color Atlas Monographs*, Piccin Nuova Libreria, Padova, Italy, pp. 179 – 191.
- _____. 1985. **Free living Amebas: Natural History, Prevention Pathology and Treatment of Desease**, Diagnosis, CRC Press, Inc. Boca Ratón Florida, pp. 1 – 156.
- _____. 1982. Acanthamoebiasis and immunosupression. Case Report, **Neurophath Exp. Neurol**, 41: 548 – 557.
- _____. 1977. Amebic meningoencephalitis due to *Naegleria* and *Acanthamoeba*. Proceedings of the International Conference on Amebiasis. México, Instituto Mexicano del Seguro Social, pp. 64 - 81.
- Mazur, P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology**. 247:125-142.
- Mehlhorn, H y Piekarski. 1989. **Fundamentos de Parasitología**. Tercera edición, Editorial Acribia; Zaragoza España, Págs. 52 - 54.
- Meryman, H.T. 1971. Cryoprotective agents. **Criobiology**. 8: 173-183.
- Page, F. C. 1988. A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae with instructions for culture, *Freshwater Biol. Assoc. Scottich Marine Biological Assoc.*, **Natural Environet Research Council**, pp. 1 - 122
- Pelczar, M.J. 1993. **Microbiología**. Cuarta edición. Editorial McGraw-Hill. México, D.F. Pp. 230-241.

Rodriguez, J. Y. M.L. Chavez, J.R. Olivera, A. J. Martínez. 1984. Encefalitis por una nueva amiba de vida libre. **Patología** 27:137-141.

Silva, J.J. 1985. **Criopreservación de parásitos en el laboratorio**. Ensayo bibliográfico. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México, D. F.

Simione, F.P. 1998. **Criopreservation Manual**. American Type Culture Collection (ATCC) and Nalge Nunc International. USA.

_____, P.M. Daggett. 1976. Freeze preservation of pathogenic and nonpathogenic Naegleria species. **Journal of Parasitology** 62: 49

Sung-Ah, S. 1992. The maintenance of free-living amoeba by cryopreservation. **Korean Journal of Parasitology** 30: 151-153.