

Universidad Nacional de Loja



**FACULTAD DE LA SALUD HUMANA
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO**

Título

**Implementación de una técnica de
criopreservación de promastigotes de Leishmania**

Macroproyecto

**Identificación genética de especies de Leishmania
en zonas endémicas de la Región Sur del Ecuador**

**Tesis previa a la obtención
del título de Licenciada en
Laboratorio Clínico**

AUTORA:

Viviana del Carmen Quevedo Ordóñez

DIRECTOR:

Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana, Mg. Sc.

**LOJA-ECUADOR
2019**

Certificación

Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana, Mg. Sc.
DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICO:

Que he revisado y orientado todo el proceso de la elaboración del trabajo investigativo titulado: **“IMPLEMENTACIÓN DE UNA TÉCNICA DE CRIOPRESERVACIÓN DE PROMASTIGOTES DE LEISHMANIA”**, de autoría de la Srta. **VIVIANA DEL CARMEN QUEVEDO ORDÓÑEZ**, previo a la obtención del título de Licenciada en Laboratorio Clínico, ha sido desarrollada, corregida y orientada bajo mi dirección y en el marco del reglamento del régimen académico de la Universidad Nacional de Loja vigente.

Loja, 27 de marzo de 2019

Atentamente:



Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana, Mg. Sc.
DIRECTOR DE TESIS

Autoría

Yo, **VIVIANA DEL CARMEN QUEVEDO ORDÓÑEZ** con C1.0705642890 declaro ser autora del presente trabajo de investigación, y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos de posibles reclamos o acciones legales por el contenido de la misma.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja la publicación del presente trabajo en el Repositorio Institucional de la Biblioteca Virtual.

Autora: Viviana del Carmen Quevedo Ordóñez

Firma:

Cedula: 0705642890

Fecha: Loja, 27 de marzo de 2019

Carta de autorización

Yo, Viviana del Carmen Quevedo Ordóñez, declaro ser autora de la tesis titulada: **“IMPLEMENTACIÓN DE UNA TÉCNICA DE CRIOPRESERVACIÓN DE PROMASTIGOTES DE LEISHMANIA”** perteneciente al Macroproyecto **“Identificación genética de especies de Leishmania en zonas endémicas de la Región Sur del Ecuador”** como requisito para optar al grado de Licenciada en Laboratorio Clínico; autorizo al sistema bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad en su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional.

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tengan convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja a los 27 días del mes de marzo de 2019, firma la autora.

Firma:.....

Autora: Viviana del Carmen Quevedo Ordóñez

Cedula de identidad: 0705642890

Correo electrónico: flaka-vivi@hotmail.com

Celular: 0967580367

Datos complementarios:

Director de Tesis: Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana, Mg. Sc.

Tribunal de grado:

Presidenta: Bq. Luisa Ivonne Celi Carrión, Mg. Sc.

Vocal: Bq. María del Cisne Luzuriaga Moncada, Mg. Sc.

Vocal: Lic. Ivanova del Cisne Zúñiga Román, Mg. Sc.

Dedicatoria

Al finalizar una más de las metas planteadas en mi vida, fruto de esfuerzo y sacrificio, quiero dedicar el presente a **DIOS**, por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida. Por los triunfos y momentos difíciles que me han enseñado a valorarlo cada día más.

A toda mi familia especialmente a mi mami, mi esposo y mi hijo seres maravillosos a quienes quiero agradecerles por ser el pilar fundamental en mi vida y por demostrarme siempre su cariño, confianza y apoyo incondicional en cada reto que se presentaba, motivándome para seguir superándome profesionalmente.

Pues es a ellos a quienes les debo por su apoyo incondicional mi infinita gratitud.

Agradecimiento

El presente trabajo de tesis primeramente me gustaría agradecer, a la Universidad Nacional De Loja, Facultad de la Salud Humana y de forma muy particular a la carrera de Laboratorio Clínico por, quien me ayudo a formar mi haber profesional.

A director de tesis, Dr. Luis Morocho por su esfuerzo y dedicación, quien, con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación ha logrado en mí que pueda terminar mis estudios con éxito, para él mi infinita gratitud.

También me gustaría agradecer a mis docentes durante toda mi carrera profesional porque todos han aportado con un granito de arena a mi formación, con su enseñanza y más que todo por su amistad.

Abreviaturas

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPS: Organización Panamericana de la Salud

NNN: Novy, Nicolle y McNeal

LC: Leishmaniasis cutánea

LMC: Leishmaniasis mucocutánea

ACP: Agentes crioprotectores

L: *Leishmania*

V: *Viannia*

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

ADN: Ácido desoxirribonucleico

SFB: Suero Fetal Bovino

MEM: Mínimal Essential Medium

DMSO: Dimetilsulfóxido

BHI: Brain-Heart-Infution

CSB: Cámara de seguridad biológica

ÍNDICE

Carátula.....	i
Certificación	ii
Autoría.....	iii
Carta de autorización	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimiento	vi
Abreviaturas.....	vii
1. Título	1
2. Resumen	2
Summary.....	3
3. Introducción	4
4. Revisión literaria	7
4.1 Leishmaniasis.....	7
4.2 Aspectos epidemiológicos	7
4.3 Principales factores de riesgo	8
4.3.1 La pobreza	8
4.3.2 Malnutrición.....	8
4.3.3 Movilidad de la población.....	9
4.3.4 Cambios ambientales.....	9
4.3.5 Cambio climático	9
4.4 Clasificación Taxonómica	10
4.5 Agente Etiológico	10
4.6 Especies	11

4.6.1	Leishmania (Suprapilarya)	11
4.6.2	Viannia (Perypilaria)	12
4.7	Ciclo de vida	13
4.8	Manifestaciones Clínicas	13
4.8.1	<i>Leishmaniasis</i> visceral o kala azar.	14
4.8.2	<i>Leishmaniasis</i> cutánea.....	14
4.8.3	<i>Leishmaniasis</i> mucocutánea.....	14
4.9	Métodos y técnicas de diagnóstico	15
4.9.1	Método parasitológico.....	15
4.9.2	Biopsia.....	15
4.9.3	Prueba de PCR.	16
4.9.4	Cultivo.....	16
4.10	Medios de Cultivo.....	17
4.10.1	Monofásicos (líquidos).....	17
4.10.2	Bifásicos.	17
4.11	Tratamiento	17
4.12	Criopreservación	18
4.13	Agentes crioprotectores (ACP).....	19
4.13.1	Crioprotectores no penetrantes.....	20
4.13.2	Crioprotectores penetrantes.....	20
4.14	Crioconservación de promastigotes	20
4.15	Descongelamiento de promastigotes.....	21
4.16	Viabilidad Celular.....	21
5.	Materiales y métodos	22
5.1	Tipo de estudio.....	22

5.2	Área de Estudio.....	22
5.4	Muestra	22
5.5	Métodos, técnicas y procedimientos	22
5.5.1	Fase Pre-Analítica:	22
5.5.2	Fase Analítica:	24
5.5.3	Fase Post-Analítica:.....	24
6.	Resultados	26
7.	Discusión.....	29
8.	Conclusiones	32
9.	Recomendaciones.....	33
10.	Bibliografía.....	34
11.	Anexos.....	40
	Anexo 1.- Protocolo de utilización de la Cámara de Seguridad Biológica.....	40
	Anexo 2.- Preparación del medio de cultivo Schneider's Drosophila.....	43
	Anexo 3.- Preparación Del Medio De Cultivo Novy, Nicolle y McNeal (NNN).....	46
	Anexo 4.- Preparación de la Solución de Criopreservación	49
	Anexo 5.- Protocolo de Criopreservación de muestras de <i>Leishmania</i>	52
	Anexo 6.- Protocolo de descongelamiento de las muestras de <i>Leishmania</i>	56
	Anexo 7.- Registro de datos.....	58
	Anexo 8.- Planificación de la difusión de los resultados	60
	Anexo 9.- Difusión de los resultados.....	61
	Anexo 10.- Certificado de traducción del resumen	65

1. Título

Implementación de una técnica de criopreservación de promastigotes de
Leishmania

2. Resumen

La *Leishmaniasis* es una enfermedad producida por parásitos del orden *Kinetoplastida*, familia *Trypanosomatidae* y género *Leishmania*. La morfología del parásito consta de dos formas: los amastigotes que viven en vacuolas en el interior de células del hospedero y los promastigotes que se forman en el interior del tubo digestivo del vector. Para llevar a cabo la criopreservación de promastigotes debemos entender primero que es la criopreservación, la cual consiste en el uso de temperaturas muy bajas para preservar células y tejidos vivos estructuralmente intactos durante un largo período de tiempo. La ejecución del presente estudio se realizó con el objetivo de implementar una técnica de criopreservación de promastigotes de *Leishmania*, siendo esta una investigación de tipo experimental – descriptivo realizada en las condiciones del Laboratorio de Fitoquímica. Se llevó a cabo mediante el desarrollo de protocolos de criopreservación y descongelamiento; los resultados obtenidos en la investigación demostraron que los promastigotes de *Leishmania* mantuvieron su viabilidad celular durante 15 semanas, sin presentar cambios en la temperatura de criopreservación; por lo tanto, esta técnica de criopreservación permite reemplazar al mantenimiento tradicional en nitrógeno líquido a -196°C y también puede ser aplicable a todos los laboratorios de investigación que cuenten con las condiciones adecuadas para realizar la criopreservación.

Palabras Claves: *Leishmania*, Promastigotes, Criopreservación, Descongelamiento.

Summary

Leishmaniasis is a disease caused by parasites of the order *Kinetoplastida*, family *Trypanosomatidae* and genus *Leishmania*. The morphology of the parasite consists in two ways: amastigotes living in vacuoles within cells of the host and the promastigotes that form on the inside of the digestive tract of the vector. To carry out cryopreservation of promastigotes we must first understand that is the cryopreservation, which consists in the use of very low temperatures to preserve stem cells and living tissue is structurally intact for a long period of time. The implementation of the present study was conducted with the objective of implementing a technique of cryopreservation of *Leishmania* promastigotes, this being a experimental research - carried out in the terms descriptive of the Laboratory of Phytochemistry. Was carried out through the development of cryopreservation protocols and thawing; the results obtained in the investigation showed that *Leishmania* promastigotes maintained their cellular viability during 15 weeks, without presenting changes in temperature of cryopreservation; therefore, this technique allows you to replace the cryopreservation traditional maintenance in liquid nitrogen at -196°C and may also be applicable to all research laboratories with appropriate conditions for the cryopreservation.

Keywords: *Leishmania*, promastigotes, cryopreservation, thawing.

3. Introducción

La *Leishmaniasis* es una enfermedad producida por distintas especies de parásitos protozoarios del género *Leishmania*, transmitida por insectos dípteros de los géneros *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo (Uribarren, 2017).

La morfología del parásito consta de dos formas: los amastigotes que viven en vacuolas en el interior de células del hospedero, principalmente monocitos y macrófagos, y los promastigotes que se forman en el interior del tubo digestivo del vector (Botero & Restrepo, 2012).

Para la Organización Mundial de la Salud (OMS) es una de las grandes endemias y su prevalencia es de 12 millones de personas en todo el mundo (Ávila, Lozano, & Carrasco, 2014).

Se calcula que cada año se producen en el mundo entre 0,6 millones y 1 millón de casos nuevos de *Leishmaniasis* mucocutánea, que causa la destrucción parcial o completa de las membranas mucosas de la nariz, boca y garganta. Más del 90% de los casos de *Leishmaniasis* mucocutánea se producen en Brasil, Bolivia, Etiopía y Perú (OMS, 2017).

En Ecuador, se han identificado nueve especies como agentes causantes de *Leishmaniasis* cutánea (LC) y *Leishmaniasis* mucocutánea (LMC), según el subgénero *Leishmania*: *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. major-like*; subgénero *Viannia*: *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. braziliensis*, *L. naiffi*, *L. lainsoni*, *L. shawi*. (Kato, Gomez, & Robles, 2016).

El cultivo de la *Leishmania* permite el aislamiento del parásito y facilita su detección, los medios universalmente aceptados y más frecuentemente utilizados son los medios difásicos (medio de Novy, Nicolle y McNeal o NNN) y los medios líquidos para cultivos de células de insectos o mamíferos (Schneider, RPMI, etc.) (Montealegre, 2016).

La forma promastigote es la más fácil de ser cultivada *in vitro*, en ella se hacen la mayoría de las investigaciones parasitológicas, entre las cuales tenemos la criopreservación que consiste en el uso de temperaturas muy bajas para preservar células y tejidos vivos estructuralmente intactos durante un largo período de tiempo. Es necesario la utilización de los Agentes crioprotectores(ACP), que se encargan de reducir la lesión por congelación del proceso de criopreservación. Los ACP deben ser biológicamente aceptables, ser capaces de penetrar en las células y tener una toxicidad baja. Se utilizan para reducir la cantidad de hielo formado a cualquier temperatura dada. Por lo tanto, el uso apropiado de los ACP es importante para mejorar la viabilidad de la muestra a criopreservar (Hoon, y otros, 2017).

La criopreservación de *Leishmania* es un proceso simple que no requiere aparatos sofisticados, y se realiza lentamente en presencia de un crioprotector. Esta técnica permite mantener los promastigotes vivos durante un largo periodo de tiempo sin presentar cambios en las características morfológicas y funcionales; por lo tanto, se puede crear un banco de promastigotes, que se los puede utilizar para realizar estudios genéticos, bioquímicos e inmunológicos, de identificación, para probar con nuevos medicamentos, extractos de plantas medicinales, así como también para el estudio de la morfología en las prácticas realizadas por estudiantes.

En el presente proyecto de tesis tuvo como objetivos: 1) implementar una técnica de criopreservación de promastigotes de *Leishmania*; 2) diseñar y validar un protocolo de criopreservación, esta técnica de criopreservación es importante porque nos permite reemplazar al mantenimiento tradicional en nitrógeno líquido a -196°C , ya que es muy costoso; los resultados de viabilidad celular obtenidos en este estudio fueron de 15 semanas, sin presentar cambios en la temperatura de criopreservación; por lo tanto, los protocolos

diseñados pueden ser aplicables a los laboratorios de investigación que cuenten con las condiciones adecuadas para realizar la criopreservación; 4) culminado el proyecto se hizo la difusión de los resultados en presencia de los estudiantes y docentes de la Carrera de Laboratorio Clínico.

4. Revisión literaria

4.1 Leishmaniasis

La *Leishmaniasis* es una enfermedad transmitida por vectores con una variedad de especies de parásitos, reservorios y vectores implicados en su transmisión, es causada por el protozoo *Leishmania*, que se transmite por diversas especies de flebótomos. (OPS, 2017).

La *Leishmania* es un parásito flagelado en el vector e intracelular obligado en el ser humano y otros mamíferos; produce lesiones a niveles cutáneo, mucocutáneo y visceral. Se transmite a los humanos por la picadura de flebótomos hembra infectados (Uribarren, 2017).

4.2 Aspectos epidemiológicos

Para la Organización Mundial de la Salud (OMS) es una de las grandes endemias, y es considerada una de las enfermedades infecciosas más importantes, para la cual no existe un control adecuado. Su prevalencia es de 12 millones de personas en todo el mundo, con otros 350 millones de personas en riesgo de infección. (Ávila, Lozano, & Carrasco, 2014).

En la Región de las Américas, los casos de *Leishmaniasis* se han registrado desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina. Cada año, un promedio de 60.000 casos de *L. cutánea*, mucosa y 4.000 casos de *L. visceral* se diagnostican, con una tasa de mortalidad del 7%. En el mundo, la coinfección de *Leishmania* y VIH ha aumentado la carga de la enfermedad debido a la mayor dificultad del tratamiento clínico. El diagnóstico de la enfermedad es esencial para establecer un tratamiento específico y para limitar el progreso de la enfermedad, aliviar los signos y síntomas para mejorar la calidad de vida de los pacientes. Si no se tratan, las formas mucosa, cutánea pueden causar deformidad y la desfiguración, y la

forma visceral puede ocasionar la muerte en más del 90% de los casos no tratados (OPS, 2017).

En el Ecuador se han notificado 1668 casos de *Leishmaniasis* en el año 2017, siendo la región Costa que reporta el mayor número de casos (988), la Amazonia con 421 casos, la región Sierra con 236 casos y región Insular con 23 casos. Las provincias con el mayor número de casos son Los Ríos (432), El Oro (228), Pastaza (199), Manabí (180), Santa Elena (134), representando el 70,32% del total de los casos del año 2017. El grupo de edad más afectado es de 20 a 49 años. En la provincia de Loja solo se han notificado 19 casos y en la provincia de Zamora Chinchipe se han notificado 14 casos (Granda, 2018).

4.3 Principales factores de riesgo

4.3.1 La pobreza

La pobreza aumenta el riesgo de *Leishmaniasis*. Las malas condiciones de vivienda y las deficiencias de saneamiento de los hogares (por ejemplo, la ausencia de sistemas de gestión de residuos, alcantarillado abierto) pueden promover el desarrollo de los lugares de cría y reposo de los flebótomos y aumentar su acceso a la población humana. Los flebótomos se ven atraídos por el hacinamiento, ya que constituye una buena fuente de ingesta de sangre. Las pautas de comportamiento humano (por ejemplo, dormir a la intemperie o en el suelo) también es probable que aumenten el riesgo de contraer la enfermedad. El uso de mosquiteros tratados con insecticida reduce el riesgo (Cattani, 2016).

4.3.2 Malnutrición

Las dietas bajas en proteínas, hierro, vitamina A y zinc aumentan el riesgo de que la infección progrese hacia el kala-azar (Cattani, 2016).

4.3.3 Movilidad de la población

Las epidemias de las dos formas principales de *Leishmaniasis* a menudo se asocian con la migración y el desplazamiento de personas no inmunizadas a zonas donde ya existen ciclos de transmisión. La exposición en el trabajo y el aumento de la deforestación siguen siendo factores importantes. Por ejemplo, asentarse en zonas previamente boscosas significa acercarse al hábitat del flebótomo, lo que puede llevar a un aumento rápido del número de casos (Catteni, 2016).

4.3.4 Cambios ambientales

Los cambios ambientales que pueden influir en la incidencia de esta enfermedad son: la urbanización, la integración del ciclo de transmisión en el hábitat humano y la incursión de las explotaciones agrícolas y los asentamientos en las zonas boscosas (Catteni, 2016).

4.3.5 Cambio climático

La *Leishmaniasis* es sensible a las condiciones climáticas, y los cambios en las precipitaciones, la temperatura y la humedad influyen en gran medida en la enfermedad. El calentamiento de la tierra y la degradación del suelo afectan en muchos aspectos a la epidemiología de la misma:

- Los cambios de temperatura, precipitaciones y humedad pueden tener efectos importantes en los vectores y los reservorios animales, al alterar su distribución e influir en las tasas de supervivencia y el tamaño de la población.
- Pequeñas fluctuaciones en la temperatura pueden tener un efecto en el ciclo de desarrollo de los promastigotes de *Leishmania* en los flebótomos, y permitir que el parásito se transmita en zonas donde la enfermedad no era previamente endémica.

- Las sequías, las hambrunas y las inundaciones que se producen como consecuencia del cambio climático pueden llevar a desplazamientos masivos y la migración de personas hacia zonas de transmisión de la *Leishmaniasis*, y la desnutrición puede debilitar la inmunidad de las poblaciones afectadas (Catteni, 2016).

4.4 Clasificación Taxonómica

Este protozoo flagelado está ubicado filogenéticamente de la siguiente forma:

- **Reino:** Protista
- **Subreino:** Protozoa
- **Phyllum:** *Sarcomastigophora*
- **Subphylum:** *Mastigophora*
- **Clase:** *Zoomastigophorea*
- **Orden:** *Kinetoplastida*
- **Suborden:** *Trypanosomatina*
- **Familia:** *Trypanosomatidae*
- **Género:** *Leishmania* (Hernández, et al. 2013)

4.5 Agente Etiológico

La *Leishmaniasis* es producida por varias especies de *Leishmania*, un parásito protozoario de la familia *Trypanosomatidae* (orden *Kinetoplastida*). El género *Leishmania* incluye dos subgéneros, *Leishmania* y *Viannia*, que se diferencian por el lugar en el que se multiplican, dentro del tracto digestivo del insecto vector. El subgénero *Leishmania* se ubica en el área suprapilórica (próxima a la probóscide), del insecto; mientras que el subgénero *Viannia* se ubica en el intestino medio y posterior (Becerril, 2014).

Las características morfológicas corresponden a dos formas parasitarias las cuales adoptan según su ciclo de vida: el amastigote es la forma replicativa, redondo u oval, intracelular, reside y se multiplica en los fagolisosomas dentro de fagocitos mononucleares de los hospederos. Mide 2 - 5 μm ; con tinción Giemsa se aprecian un gran núcleo y un cinetoplasto pequeño, ambos de color púrpura, y un filamento delgado que une cinetoplasto y el cuerpo basal (Morelos, 2015).

El promastigote (metacíclico), es la forma infectiva, elongado, extracelular, se desarrolla y multiplica en el tracto digestivo de los insectos transmisores. Mide 10 - 20 μm , sin contar la longitud de un único flagelo, cuyo tamaño oscila entre 15 - 25 μm ; presenta un cinetoplasto que aparece como una banda granular electrodensa dentro de la mitocondria, localizado a 1 - 2 μm del extremo anterior del parásito, de donde emerge el flagelo (Uribarren, 2017).

4.6 Especies

4.6.1 Leishmania (Suprapilarya). Infecciones debidas a *Leishmania* spp, se encuentran en los Andes y en las tierras bajas del Pacífico. Se desarrollan en el segmento de tubo digestivo anterior al píloro (Almagro, 2005).

Subgénero *Leishmania*

- *L. (L) chagasi*
- *L. (L) enrietti*
- *L. (L) mexicana*
- *L. (L) pifanoi*
- *L. (L) hertigi*

- *L. (L) amazonensis*
- *L. (L) deanei*
- *L. (L) aristidesi*
- *L. (L) garhami*
- *L. (L) forattinii*
- *L. (L) venezuelensis* (Sánchez, 2004).

4.6.2 Viannia (Perypilaria). La mayoría de las infecciones humanas son causadas por *Viannia*, que se distribuye en las tierras bajas tropicales y subtropicales. Se desarrollarían en píloro y por detrás del mismo (Almagro, 2005).

Subgénero *Viannia*

- *L. (V) brasiliensis*
- *L. (V) peruviana*
- *L. (V) guyanensis*
- *L. (V) panamensis*
- *L. (V) lainsoni*
- *L. (V) shawi*
- *L. (V) naiffi*
- *L. (V.) colombiensis*
- *L. (V.) equatorensis*, (Sánchez, 2004)

4.7 Ciclo de vida

Todos los protozoos del género *Leishmania* poseen un ciclo de vida similar. Los principales vectores pertenecen al género *Lutzomyia*, en el Nuevo Mundo, y el género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo. La hembra se infecta al picar a un vertebrado y succionar amastigotes con la sangre y macrófagos infectados. En el tubo digestivo de los mosquitos, los amastigotes se alargan y desarrollan rápidamente el flagelo para dar origen a los promastigotes, estos viajan la probóscide del mosquito y son inoculados a un nuevo vertebrado como promastigotes metacíclicos que son los parásitos infectantes. Los promastigotes de las diferentes especies de *Leishmania* se reproducen por división binaria en diferentes partes del tubo digestivo, el tiempo que toma el vector para ser infectante es de aproximadamente 10 días. En la naturaleza, la infección de los vectores es baja, por lo tanto, se requiere que piquen repetidas veces para una transmisión adecuada que debe inocular entre 10 y 200 parásitos (Botero & Restrepo, 2012).

Al penetrar los promastigotes por la picadura a la piel, son englobados por las células de Langerhans y otros macrófagos, dentro de los fagosomas se transforman en amastigotes. Estos se reproducen intracelularmente por división binaria, rompen las células y rápidamente entran a nuevas células hasta causar lesiones ulcerativas por destrucción del tejido (Becerril, 2014).

4.8 Manifestaciones Clínicas

Las manifestaciones clínicas son variables y se describen tres formas clínicas: 1) *Leishmaniasis* visceral; 2) *Leishmaniasis* cutánea; 3) *Leishmaniasis* mucocutánea (Jiménez, 2015).

4.8.1 *Leishmaniasis* visceral o kala azar.

También llamada kala-azar, producida por *L. donovani* y *L. infantum*, la mayoría de personas que adquiere la infección genera una respuesta inmunitaria satisfactoria y no presenta síntomas; 48 horas posterior a la entrada de promastigotes, se muestra una hipersensibilidad tardía a los antígenos de *Leishmaniasis* en la prueba cutánea (prueba de Montenegro). Esta enfermedad daña principalmente a los órganos del sistema reticuloendotelial, se puede ver afectado también las amígdalas y la submucosa intestinal, en caso de que se exista disfunción medular se manifiesta una pancitopenia (Jiménez, 2015).

4.8.2 *Leishmaniasis* cutánea.

La lesión cutánea típica es la úlcera, que suele tener un fondo granuloso grueso, con bordes bien delimitados, de tinte violáceo; por lo general son indoloras; más de 80% de los pacientes la desarrollan. Al inicio, en el sitio de la picadura e inoculación del parásito, aparece un eritema pruriginoso que evoluciona a pápula y vesícula pustulosa de base indurada, que luego se abre como una pequeña úlcera, la que se cubre de una costra. La lesión inicial puede ser única o múltiple y en ocasiones las úlceras por lo general tienen bordes netos y edematosos con un color violáceo, son indoloras y cuando se retira la costra que las cubre, se aprecia un fondo granulomatoso grueso, hiperémico y sangrante (Werner, 2013).

4.8.3 *Leishmaniasis* mucocutánea

Llamada también espundia es producida por *L. viannia*, presenta lesiones en la nariz, o en la boca también presentan congestión y hemorragia nasal seguidos de destrucción del cartílago nasal, perforación del tabique nasal y colapso del puente de la nariz. Puede haber

extensión a faringe, laringe, labios, mejillas y paladar blando lo que podría tener secuelas de cicatrización con trastornos de la fonación o deglución (Jiménez, 2015).

En Ecuador los tipos de *Leishmaniasis* más común son la cutánea y mucocutánea. (Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2019).

4.9 Métodos y técnicas de diagnóstico

Según Montalvo para confirmar la *Leishmaniasis* es indispensable identificar el parásito por cualquiera de los métodos que existen para visualizarlo o aislarlo.

4.9.1 Método parasitológico.

Consiste en el examen microscópico del frotis de exudado de la lesión o de la extensión tras punción-aspiración con aguja fina, para comprobar la existencia de amastigotes. La tinción con Giemsa permite observar los amastigotes dentro o fuera de los macrófagos como cuerpos redondeados u ovals, de color azul claro, con un núcleo y un cinetoplasto puntiforme, ambos de color púrpura, en el interior de su citoplasma, pero la sensibilidad es baja, aproximadamente de 50 a 70 % en el Viejo Mundo y puede llegar a ser aún menor en el Nuevo Mundo, con valores de 15 a 30 % (Montalvo, et al. 2016).

4.9.2 Biopsia.

El estudio histopatológico de la muestra tomada de la lesión permite hacer el diagnóstico, al observar la presencia de amastigotes intracelulares. En las formas crónicas no siempre se logra demostrar la presencia de los parásitos, pero el cuadro histopatológico presentado hace sospechar de la enfermedad. En las mucosas es más difícil observar los amastigotes. Cuando se forman granulomas se observan células epitelioides y células gigantes. También se pueden tomar fragmentos de los tejidos para hacer impresiones o macerar para

cultivos o inoculaciones a animales. El estudio histopatológico nunca reemplaza la búsqueda del parásito en el frotis, pero está indicado cuando fue imposible observar amastigotes al examen directo (Botero & Restrepo, 2012).

4.9.3 Prueba de PCR.

Utilizando los métodos de la biología molecular es posible aplicar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar fragmentos específicos de ADN de los parásitos e identificar su presencia en una muestra. Esta técnica tiene gran valor en los tejidos en donde no ha sido posible detectar la presencia de parásitos, especialmente en las lesiones de mucosas y para comprobar la infección en los vectores (Botero & Restrepo, 2012).

4.9.4 Cultivo.

El cultivo de muestras biológicas, por lo general en medio NNN; puede facilitar la identificación y caracterización de las especies por métodos isoenzimáticos o moleculares, pero requiere de mayores condiciones técnicas en el laboratorio y se necesita tiempo para entregar el resultado. La observación de promastigotes móviles fácilmente identificables en la fase líquida del medio cultivo, producto de la transformación de los posibles amastigotes presentes en la muestra sembrada, constituye el resultado positivo. El manejo y mantenimiento de los cultivos de *Leishmania* no cumplen un formato estrictamente debido a que cada especie tiene un comportamiento diferente, por lo que hay que procurar que en el mantenimiento *in vitro* de las especies se le proporcione los elementos nutricionales lo más cercanas a su hábitat o microambiente natural. Los parásitos de *Leishmania* están constituidos esencialmente por proteínas, lípidos e hidratos de carbono, estos últimos en mayor proporción como el glucógeno que se encuentra presente en gran cantidad en la mayoría de las especies (Montalvo, et al. 2016).

4.10 Medios de Cultivo

4.10.1 Monofásicos (líquidos).

En el cultivo de *Leishmania* se han empleado el medio Schneider's Drosophila desarrollado para el cultivo de células de insectos, suplementados con SFB 20%. Otros medios líquidos como MEM, RPMI 1640; suplementados con 20% de SFB (Werner, 2013).

4.10.2 Bifásicos.

Los medios bifásicos están compuestos por una fase sólida de agar no nutritivo, cloruro sódico y sangre de caballo o conejo inactivada. La fase líquida de este medio consiste en el agua que se condensa después de la solidificación de la fase de agar; sin embargo, esta fase líquida se puede enriquecer con medio MEM, Tc-199 o medio RPMI 1 640 enriquecidos con 10 a 20% de suero bovino fetal inactivado. El medio universalmente aceptado y más utilizado es el medio NNN; otros medios bifásicos son el USMARU, Evans (Werner, 2013).

Entre algunas de las ventajas de los medios bifásicos para el diagnóstico primario se mencionan las siguientes: son particularmente valiosos para el aislamiento primario y el mantenimiento, por largo tiempo, de los «stocks» de *Leishmania*, permiten la morfogénesis celular de amastigotes en promastigotes, en la gran mayoría de los aislados de *L. (V) braziliensis*, y de otras especies del subgénero *Viannia*, así como del subgénero *Leishmania* (Montealegre, 2016).

4.11 Tratamiento

Los tratamientos de primera elección para las diferentes formas clínicas de *Leishmaniasis* son las sales de antimonio pentavalente, como el antimoniato de N-metil glucamina (glucantime®) y el estibogluconato de sodio (pentostam®). Ambos fármacos son

de similar eficacia. Antes de iniciar el tratamiento, todo paciente deberá evaluarse clínica y paraclínicamente para descartar alteraciones cardíacas, hepáticas o renales (Ávila, Lozano, & Carrasco, 2014).

4.12 Criopreservación

La criobiología se refiere a los efectos de las temperaturas bajas sobre los sistemas celulares ya que el tiempo biológico es una consecuencia de determinadas reacciones bioquímicas y el frío prolonga el tiempo biológico puesto que enlentece estas reacciones. Sin embargo, este no es un proceso exento de problemas ya que puede inducir variaciones extremas en las propiedades químicas, térmicas y eléctricas las cuales pueden alterar las membranas celulares, los organelos y la delicada interacción célula-célula inherente en las células y tejidos a criopreservar (Ávila, y otros, 2016).

La estructura y composición de las membranas plasmáticas determinan los principales eventos celulares que tienen lugar durante los procesos de criopreservación, su comportamiento durante la congelación y descongelación definirá los índices de supervivencia de la célula congelada. Los periodos críticos para la sobrevivencia celular durante la criopreservación son la fase inicial del congelamiento y el periodo de retorno a condiciones fisiológicas. Las reacciones biológicas y químicas en las células vivas se reducen drásticamente a baja temperatura, un fenómeno que puede conducir a la posible preservación a largo plazo de células y tejidos. Sin embargo, la congelación es fatal para la mayoría de los organismos vivos, ya que se forman cristales de hielo intra-extracelulares y producen cambios en la configuración química de las células que conducen a restricciones y lesiones mecánicas celulares (Ávila, y otros, 2016).

El principal obstáculo para que las células superen las bajas temperaturas es la transición de la fase de agua a hielo. La lesión celular a velocidades de enfriamiento rápidas se atribuye a la formación de hielo intracelular, mientras que el enfriamiento lento causa cambios osmóticos debido a los efectos de la exposición a soluciones intra y extracelulares altamente concentradas o a interacciones mecánicas entre las células y el hielo extracelular (Hoon, y otros, 2017).

4.13 Agentes crioprotectores (ACP)

Los ACP son sustancias hidrosolubles capaces de modificar las propiedades fisicoquímicas de las soluciones acuosas presentes en la materia viva. La función de los crioprotectores variará dependiendo del tipo elegido. No obstante, sus funciones principales son promover una rápida deshidratación celular, y amortiguar el efecto de la alta concentración de solutos en el interior de la célula u organismo a criopreservar (Barranco, Bellver, & Bernal, 2007).

Bioquímicamente es posible distinguir tres tipos de crioprotectores: los alcoholes, azúcares y el DMSO. No obstante, los crioprotectores se catalogan en base a diversos criterios, especialmente de acuerdo al grado de protección al cristal de agua, a la toxicidad química que pueden tener sobre las células y a la velocidad para penetrar los tejidos. Además, estos productos se utilizan en conjunto con los medios nutritivos líquidos que conforman las mezclas congelantes; las concentraciones crioprotectoras son lamentablemente tóxicas para el tejido a temperatura ambiente, por lo cual en el procedimiento de congelado se deben respetar ciertos tiempos de exposición del material a 4°C, para que el producto protector penetre el tejido sin alcanzar los niveles tóxicos referidos, antes del inicio del proceso de congelación propiamente dicho. Del mismo modo, cuando se procede a la técnica de descongelado, se debe

someter a un lavado minucioso con medios nutritivos a concentraciones decrecientes del crioprotector, para su total eliminación evitando de esta forma los efectos tóxicos (Barranco, Bellver, & Bernal, 2007).

De acuerdo a la permeabilidad celular se pueden considerar dos tipos de crioprotectores:

4.13.1 Crioprotectores no penetrantes.

Son sustancias de alto peso molecular, caracterizadas por ejercer su acción protectora a altas velocidades de congelación, promoviendo la rápida deshidratación celular. Los más utilizados son: sacarosa, dextrosa, glucosa, polivinilpirrolidona (PVP), dextrano y polietilenglicol (Barranco, Bellver, & Bernal, 2007).

4.13.2 Crioprotectores penetrantes.

Son sustancias de bajo peso molecular que penetran el interior de la célula y actúan deshidratándola por sustitución del agua intracelular, amortiguando el incremento de concentración de solutos en el medio extracelular, impidiendo la formación de cristales en el interior y evitando el estrés osmótico. Los más empleados son: el 1-2 propanodiol, dimetilsulfóxido (DMSO), etilenglicol y glicerol (Barranco, Bellver, & Bernal, 2007).

El Glicerol es un no electrolito y actúa reemplazando el agua intracelular minimizando la formación de cristales, regula la deshidratación y también protege la estructura proteica (Jang, Park, & Jang, 2017).

4.14 Crioconservación de promastigotes

- La criopreservación de promastigotes la realizan a -80°C según (Martínez, 2018); otros autores también la realizan a -86°C y luego en nitrógeno líquido (-196) (Cavus, y otros, 2017).

4.15 Descongelamiento de promastigotes

- El descongelamiento de promastigotes lo realizan diluyendo el contenido del vial congelado en medio RPMI 1640 modificado suplementado con 10 o 20% de suero fetal bovino inactivado según (Martínez, 2018).

4.16 Viabilidad Celular

- En la técnica de criopreservación utilizada por Martínez (2018) y Cavus (2017) obtuvieron unos resultados de viabilidad positiva.

5. Materiales y métodos

5.1 Tipo de estudio

El estudio es experimental - descriptivo.

5.2 Área de Estudio

El proyecto se lo desarrolló en el Laboratorio de Fitoquímica, adscrito a la Dirección de Investigación de la Universidad Nacional de Loja, ubicado en el sector La Argelia, en la ciudad de Loja – Ecuador.

5.4 Muestra

Estuvo constituido por medios de cultivo con promastigotes de *L. major*.

5.5 Métodos, técnicas y procedimientos

5.5.1 Fase Pre-Analítica:

1. Diseño de protocolos

Se realizó una revisión bibliográfica de protocolos de criopreservación y descongelamiento y se los diseñó de acuerdo a las condiciones presentadas por el Laboratorio de Fitoquímica.

2. Congelador

De acuerdo al manual de usuario del congelador nos indica que este emite una alarma sonora al momento de tener la puerta abierta durante 1 minuto y a los 4 minutos hay un cambio de temperatura de 1 °C.

3. Protocolo de utilización de la Cámara de Seguridad Biológica, (Ver anexo 1).

4. Cultivo de promastigotes de *L. major*

La cepa de *L. major* se mantuvieron con pases sucesivos en medio NNN suplementado con medio Schneider's Drosophila, 10% de suero fetal bovino inactivado y gentamicina 0.1mg/mL. Se utilizó esta cepa de *Leishmania* porque fue la de mejor crecimiento en los medios de cultivo.

5. Medio Schneider's Drosophila

Para preparar el medio se utilizó 10% suero fetal bovino inactivado, solución de gentamicina 10mg/mL, orina estéril de adulto; se distribuyen en tubos cónicos tapa rosca, 5mL/tubo; luego se lo incubaba a 37°C por 24–48 horas para control de calidad y se lo almacena en refrigeración a 8°C, (Ver anexo 2).

6. Medio NNN

Para preparar el medio se utilizó 15% sangre de conejo defibrinada e inactivada a 56°C durante 30 minutos, solución de gentamicina 10mg/mL, agar infusión cerebro-corazón; se distribuyen en tubos cónicos tapa rosca, 2ml/tubo; se colocan en posición de pico de flauta, luego se lo incubaba a 37°C por 24–48 horas para control de calidad y se lo almacena en refrigeración a 8°C, la vialidad del medio 6 meses, (Ver anexo 3).

7. Solución de criopreservación

Para preparar la solución de criopreservación se utilizó 15% suero fetal bovino inactivado, 4% glicerol en 31% medio Schneider's Drosophila líquido se lo incubaba a 37°C por 24-48 horas para control de calidad y se almacena en un congelador - 20°C hasta su uso, (Ver anexo 4).

Por lo tanto, se utilizó el glicerol como crioprotector ya que no es un producto tóxico para los promastigotes, es decir no produce ninguna alteración morfológica, funcional y es de fácil acceso para conseguirlo.

5.5.2 Fase Analítica:

1. Criopreservación de muestras de *L. major*

Se utilizó un cultivo de *Leishmania* de 3-4 días en el medio NNN, se transfirió el cultivo a tubos cónicos y se agrega medio Schneider's Drosophila y se incuban los tubos a 25°C por 24-48 horas; se centrifugó los tubos 4000 rpm y se resuspende el sedimento en medio Schneider's Drosophila puro, luego se realiza el recuento en la cámara de Neubauer; se coloca la solución en los criotubos y se completa hasta 1.5ml con medio Schneider's Drosophila se centrifuga a 4000 rpm y se resuspende el sedimento en la solución de criopreservación. La suspensión de los parásitos se los distribuye en alícuotas que van a criopreservarse a -20°C durante 1 hora y luego a -86°C. Se criopreservaron 10 tubos, (Ver anexo 5).

2. Descongelamiento de las muestras criopreservadas

El descongelamiento de dos alícuotas se hizo en la primera, segunda, cuarta, séptima y décima quinta semana; introduciendo las alícuotas en baño maría a temperatura de 37°C durante 5 minutos, luego se tomó una muestra para confirmar la viabilidad celular, los casos positivos se sembraron en tres tubos de medio NNN suplementado con Schneider's Drosophila y se revisó el crecimiento al 3-4 día. Total, de tubos sembrados 30, (Ver anexo 6).

3. Registro de datos, (Ver anexo 7).

5.5.3 Fase Post-Analítica:

1. Resultados de viabilidad después de la criopreservación.

Interpretación: Promastigotes vivos se consideran aquellos que presentaron una movilidad activa con desplazamiento rápido, se los representó por cruces.

2. Resultados de viabilidad en el medio NNN.

Interpretación: Promastigotes vivos se consideran aquellos que presentaron una movilidad activa con desplazamiento rápido, + (crecimiento positivo); no se observó promastigotes, - (crecimiento negativo).

6. Resultados

Viabilidad celular antes de la criopreservación

La concentración inicial de promastigotes fue de 1.445×10^9 /mL equivalente a ++++.

Tabla N° 1

Viabilidad de promastigotes de Leishmania major luego de la criopreservación

Semanas/Días	Alícuotas									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Semana 1 (7 días)	++	++								
Semana 2 (14 días)			+++	+++						
Semana 4 (28 días)					++	++				
Semana 7 (49 días)							++	++		
Semana 15 (105 días)									++	++

Nota: +, 10-20 p/c (promastigotes vivos por campo); ++, 20-40 p/c; +++, 40-60 p/c; ++++, >60 p/c.

Nota: Promastigotes vivos se consideran aquellos que presentaron una movilidad activa con desplazamiento rápido.

Elaborador por: Viviana Quevedo

Interpretación

Se realizaron revisiones semanales de cada alícuota criopreservada para verificar la viabilidad de los promastigotes. La viabilidad se representó por cruces de parásitos activos/campo.

En la primera, segunda, cuarta, séptima y décima quinta semana se descongelaron dos alícuotas por semana de los cuales se tomó una muestra y se observó al microscopio. Observese que en la segunda semana la alícuota 3 y 4 el recuento es mayor. De los tubos con

viabilidad se tomó una muestra y se sembró en tres tubos con medio NNN suplementado con Schneider's Drosophila, los cuales se verificó el crecimiento al 3-4 día.

Tabla N° 2*Crecimiento en medio NNN de muestras criopreservadas*

Alícuotas																																
1			2			3			4			5			6			7			8			9			10					
T ₁	T ₂	T ₃	T ₁	T ₂	T ₃	T ₁	T ₂	T ₃	T ₁	T ₂	T ₃	T ₁	T ₂	T ₃	T ₁	T ₂	T ₃	T ₁	T ₂	T ₃	T ₁	T ₂	T ₃	T ₁	T ₂	T ₃	T ₁	T ₂	T ₃			
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Nota: +, crecimiento positivo; -, crecimiento negativo.

Nota: T₁, tubo 1; T₂, tubo 2; T₃, tubo 3.

Elaborado por: Viviana Quevedo

Interpretación

De cada alícuota se sembró tres tubos con medio NNN suplementado con Schneider's Drosophila, se incubaron a 25°C y se revisaron al tercer día para verificar el crecimiento de promastigotes. Todos los 30 tubos presentaron crecimiento positivo(+).

7. Discusión

Según la OPS la *Leishmaniasis* es una enfermedad transmitida por vectores con una variedad de especies de parásitos, reservorios y vectores implicados en su transmisión, es causada por el protozoo *Leishmania*, que se transmite por diversas especies de flebótomos. La *Leishmania* es un parásito flagelado en el vector e intracelular obligado en el ser humano y otros mamíferos; produce lesiones a niveles cutáneo, mucocutáneo y visceral, Uribarren (2017). Para la OMS es una de las grandes endemias, y es considerada una de las enfermedades infecciosas más importantes, para la cual no existe un control adecuado. Su prevalencia es de 12 millones de personas en todo el mundo, con otros 350 millones de personas en riesgo de infección. En el Ecuador se han notificado 1668 casos de *Leishmaniasis* en el año 2017, siendo la región Costa que reporta el mayor número de casos (988), la Amazonia con 421 casos, la región Sierra con 236 casos y región Insular con 23 casos, Granda (2018).

Cavus (2017) realiza la criopreservación de promastigotes de varias especies de *Leishmania* utilizando como crioprotector el DMSO, los congela a -86°C luego los transfiere a nitrógeno líquido (-196°C) e informa que los parásitos se conservan viables sin alteraciones morfológicas. En nuestro estudio realizamos la criopreservación de promastigotes de *L. major* utilizando como crioprotector el Glicerol, los congelamos a -86°C e indicamos que los promastigotes si mantienen su viabilidad celular sin presentar alteraciones morfológicas y funcionales. Señalado esto podemos observar un punto de divergencia entre ambos estudios, el cual radica en el almacenamiento y en la utilización de otro crioprotector.

En el estudio realizado por Martínez (2018) utilizan *L. major*, realizan la criopreservación a -80°C comparando con nuestro estudio utilizan la misma especie y la misma técnica de

criopreservación, pero, sin embargo, hay una diferencia en el descongelamiento ya que lo realizan diluyendo el contenido del vial congelado en medio RPMI 1640 modificado suplementado con 10 o 20% de suero fetal bovino inactivado; mientras que nosotros descongelamos en el mismo medio a 37°C durante 5 minutos; cabe recalcar que en ambos estudios se mantiene la viabilidad celular.

Santo & Cupolillo (2010) informan que los promastigotes de *L. major* presentan una excelente viabilidad y las tasas de congelación que utilizan para mantener esta especie son: 0°C / -80°C / -196°C o -20°C / -80°C / -196°C y en cuanto a las condiciones de descongelamiento que utilizaron son: 25°C/5min, 37°C/3min, 40°C/3min; por lo tanto, en la viabilidad celular tuvieron una disminución de $\leq 10\%$ en el número de células viables. En nuestro estudio realizamos la criopreservación de promastigotes de *L. major* a -86°C y descongelamos a 37°C durante 5 minutos e indicamos que los promastigotes si mantienen su viabilidad celular sin presentar alteraciones morfológicas y funcionales. Señalado esto podemos observar una diferencia entre ambos estudios, el cual radica en el almacenamiento y en descongelamiento.

Los estudios realizados por Martínez (2018), Cavus (2017) y Santo & Cupolillo (2010); al igual que en nuestro estudio, coinciden en los resultados que si se mantienen la viabilidad celular de los promastigotes; aunque cada autor utiliza una técnica de criopreservación y descongelamiento diferente.

Los resultados obtenidos en el presente proyecto de tesis corroboran con los estudios antes mencionados; en donde los protocolos diseñados, son accesibles en las condiciones del Laboratorio Fitoquímica y se los puede utilizar en laboratorios de investigación que no cuenten con nitrógeno líquido.

En base a los resultados *in vitro* del proyecto de tesis realizado, sí se puede criopreservar a -86°C y descongelar a 37°C durante 5 minutos utilizando el glicerol como crioprotector en la especie *L. major*; por lo tanto, este estudio servirá como un aporte para las futuras investigaciones en las diferentes especies en forma de promastigotes.

8. Conclusiones

- Se diseñó y validó los protocolos de criopreservación y descongelamiento.
- La técnica utilizada para la criopreservación de promastigotes de *Leishmania* permite criopreservar la *L. major* en las condiciones del Laboratorio de Fitoquímica utilizando los protocolos diseñados.
- La técnica descongelamiento aplicada es funcional, porque si se observó viabilidad celular luego de descongelar a 37°C durante 5 minutos.
- Se realizó la difusión de los resultados obtenidos de la investigación a los estudiantes y docentes de la carrera de Laboratorio Clínico.

9. Recomendaciones

Así mismo y en base a las conclusiones antes propuestas se generan las siguientes recomendaciones:

- Se recomienda aplicar los protocolos diseñados con otras especies de *Leishmania*.
- Al momento de sacar las muestras del congelador no mantener por más de 4 minutos la puerta abierta.
- Realizar futuras investigaciones en la criopreservación de amastigotes de *Leishmania*.

10. Bibliografía

- Acharya, T. (2016). *NNN medium: Composition, Procedure and Results*. Obtenido de Microbe Online: <https://microbeonline.com/nnn-medium-composition-procedure-and-results/>
- Almagro, D. G. (2005). *Leishmaniasis cutánea*. Obtenido de <http://www.actasdermo.org/es/leishmaniasis-cutanea/articulo/13071104/>
- Ávila, E., Lozano, J., & Carrasco, I. (2014). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. Obtenido de Perfil epidemiológico de la Leishmaniasis: <http://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2014/ei141e.pdf>
- Ávila, L., Madero, J., López, C., León, M., Acosta, L., Gómez, C., . . . Reguero, M. (2016). Fundamentos de la Criopreservación. *Revista Colombiana Obstetricia y Ginecología*, págs 291-300. Obtenido de <https://revista.fecolsog.org/index.php/rcog/article/view/468>
- Barranco, F., Bellver, C., & Bernal, J. (2007). *Generalidades de la Criopreservación*. Obtenido de Escuela Superior de Ingenieros de Sevilla: <http://bibing.us.es/proyectos/abreproy/12044/fichero/VOLUMEN+I%252F01+-+CAPITULO+I.pdf>
- Becerril, M. (2014). *Parásitología Médica. En Leishmaniasis*. México: D.F: Mc Graw Hill Education. Obtenido de <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1483§ionid=102299881>
- Botero, D., & Restrepo, M. (2012). *Parasitosis humanas* (Quinta ed.). Medellín, Colombia: Corporación parra Investigaciones Biológicas.

- Carbajal, A. (2018). *Medios de cultivo celular: una revisión*. Obtenido de Labome: <http://www.labome.es/method/Cell-Culture-Media-A-Review.html>
- Cattani, A. (2016). *Leishmaniasis: la enfermedad de la pobreza y los cambios ambientales*. Obtenido de ELENTRERIOS: <https://www.elentrerios.com/opinion/leishmaniasis-la-enfermedad-de-la-pobreza-y-los-cambios-ambientales.htm>
- Cavus, Ibrahim ; Ocak, Fulya ; Kaya, Tugba; Özbilgin, Ahmet. (2017). *Cryopreservation of Leishmania Species in Manisa Province*. Obtenido de Researchgate: https://www.researchgate.net/publication/320429425_Cryopreservation_of_Leishmania_Species_in_Manisa_Province
- Del Rosal, R., Baquero, A., & García, M. (2010). *Leishmaniasis cutánea*. Obtenido de Pediatría de Atención Primaria: <https://www.mendeley.com/catalogue/leishmaniasis-cut%C3%A1nea/>
- Department of Biology, University of York, UK. (2007). Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol.*, págs. 39-57. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18080461>
- Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica. (2019). *Enfermedades trnasmitidas por vectores*. Obtenido de <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/01/GACETA-VECTORES-SE-08-2019.pdf>
- Evans. (2005). *Media preparation, maintenance of parasite, cell lines and cryopreservation*. Obtenido de http://shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/14772/9/09_chapter%202.pdf

- Gallegos, M., & Riera, C. (2005). *Unidad de Parasitología, Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitaria*. Obtenido de Las Leishmaniosis Humanas: Leishmaniosis autóctona por Leishmania Infatum: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/parasitologia/leish.pdf>
- Granda, J. (2018). *Ministerio de Salud Pública del Ecuador*. Obtenido de Dirección de Vigilancia Epidemiológica MSP, 1994-2017: <https://public.tableau.com/profile/vvicentee80#!/vizhome/EnfermeddaesdelaPiel-2014/ANUARIO>
- Hernández, A., Valdés, M., Vivanco, D., & Zuazo, J. L. (2013). *Microbiología y Parasitología Médicas Tomo III*. Editorial Ciencias Médicas. Obtenido de [https://www.ecured.cu/Microbiolog%C3%ADa_y_Parasitolog%C3%ADa_M%C3%A9dicas_\(Libro\)](https://www.ecured.cu/Microbiolog%C3%ADa_y_Parasitolog%C3%ADa_M%C3%A9dicas_(Libro))
- Hoon, T., Choel, S., Hyun, J., Yoon, J., Hong, J., Seo, U., . . . Han, J. (2017). Cryopreservation and its clinical applications. *NCBI*, págs. 12-18. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5395684/>
- Jang, T., Park, S., & Jang, J. (2017). Cryopreservation and its clinical applications. *Integr Med Res.*, págs. 12-18. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5395684/>
- Jiménez, D. C. (2015). Leishmaniasis. *Revista médica de Costa Rica y Centroamérica LXXII*. Obtenido de <http://www.medigraphic.com/pdfs/revmedcoscen/rmc-2015/rmc151y.pdf>
- Kato, H., Gomez, E., & Robles, L. (2016). Geographic Distribution of Leishmania Species in Ecuador Based on the Cytochrome B Gene Sequence Analysis. *PLoS Negl Trop Dis*.

Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4943627/#pntd.0004844.ref005>.

Lei, S., Ramer, A., Dahlin, R., Mullin, K., & Beetham, J. (2010). Reduced hamster usage and stress in propagation *Leishmania Chagasi* promastigotes using cryoprsvervation and saphenous vein inoculation. *J Parasitol*, Págs 103-108. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3628779/>

Martínez, M. (2018). *Caracterización de una nueva diana farmacológica en Leishmania spp. e identificación de compuestos activos frente a Trypanosoma brucei*. Obtenido de Universidad de Granada: <http://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/52398/29109243.pdf?sequence=4&isAllowed=y>

Montalvo , A., Fraga, J., Monzote, L., García, M., & Fonseca, L. (2016). *Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN*. Obtenido de http://bvs.sld.cu/revistas/mtr/v64n2_12/mtr02212.htm

Montealegre, I. A. (2016). Importancia de los medios de cultivo en el diagnóstico de Leishmaniasis. *Revista Médica Experimental*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/316650873_Importancia_de_los_medios_de_cultivo_en_el_diagnostico_de_leishmaniasis


Morelos, J. M. (2015). *Subsecretaría de prevención y promoción de la Salud*. Obtenido de Manual para el diagnóstico, tratamiento y control de las Leishmaniasis: http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/Manual_Leishmaniasis2015.pdf

- Neves, B. (2014). *Criopreservação manual de amostras*. Obtenido de Instituto Oswaldo Cruz.
- Neves, B. (2014). *Descongelamento de amostras retiradas do criobanco*. Obtenido de Instituto Oswaldo Cruz.
- Neves, B. (2014). *Prepara e suplementação de meio de cultura fase líquida: schneider*. Obtenido de Instituto Oswaldo Cruz.
- Neves, B. (2014). *Preparo de meio de cultura fase sólida NNN*. Obtenido de Instituto Oswaldo Cruz.
- Neves, B. (2014). *Preparo de solução de criopreservação*. Obtenido de Instituto Oswaldo Cruz.
- OMS. (2017). *Leishmaniasis*. Obtenido de Organización Mundial de la Salud: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>
- OPS. (2002). *Cabinas de Seguridad Biológica: Uso, desinfección y mantenimiento*. Obtenido de Organización Panamericana de la Salud: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s16575s/s16575s.pdf>
- OPS. (2017). *Leishmaniasis*. Obtenido de Organización Panamericana de la Salud: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=29&lang=es
- QuimiNet. (2008). *¿Qué es el SFB y su aplicación?* Obtenido de QuimiNet.com: <https://www.quiminet.com/articulos/que-es-el-sfb-y-su-aplicacion-27555.htm>
- Sánchez, L. (2004). *Leishmaniasis*. Obtenido de http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/dermatologia/v14_n2/pdf/a02.pdf

- Sanchez, L., Sáenz, E., Pancorbo, J., Zegarra, R., Garcés, N., & Regis, A. (2004). Leishmaniasis. *Dermatología Peruana*, págs. 1-17. Obtenido de Leishmaniasis: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/dermatologia/v14_n2/pdf/a02.pdf
- Santo, F., & Cupolillo, E. (2010). *Comparison of efficiency of different cryopreservation protocols for Leishmania spp. Storage*. Obtenido de Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose, Coleção de Leishmania do Instituto Oswaldo Cruz: http://www.wfcc.info/iccc12/poster/p_felipe.pdf
- Sztein, J. (2013). *Principios de Criobiología*. Obtenido de National Institutes of Health: <https://www.bioterios.com/post.php?s=2013-05-01-principios-de-criobiologa>
- Teston, L. (2010). *Enfermedades Tropicales Desatendidas*. Obtenido de Leishmaniasis: <http://epidemiologiaescobar.blogspot.com/2010/11/enfermedades-tropicales-desatendidas.html>
- Thermo Fisher Scientific. (s.f.). *Schneider's Drosophila Medium*. Obtenido de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/21720001>
- Uribarren, T. (2017). *Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM*. Obtenido de Leishmaniosis o Leishmaniasis: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/leishmaniosis.html>
- Werner, L. (2013). *Parasitología Humana*. México: D.F: Mc Graw Hill Education. Obtenido de <https://es.scribd.com/document/324147723/Parasitologia-Humana-Werner#download>

11. Anexos

Anexo 1.- Protocolo de utilización de la Cámara de Seguridad Biológica.

 UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA Laboratorio de Fitoquímica	Protocolo de utilización de la Cámara de Seguridad Biológica	Código: LFQ-P-CSB	
		Revisión: 0.2	Edición:0.2
		Fecha: 4 junio 2018	

1.1. OBJETIVO

Utilizar correctamente la Cámara de Seguridad Biológica(CSB).

1.2.ALCANCE

Docentes y estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja.

1.3.FUNDAMENTO

Las CSB son equipos que proporcionan una barrera de contención para trabajar de forma segura con agentes infecciosos. Son equipos que han sido diseñados para mantener un área denominada zona de trabajo, libre de partículas o de probables contaminantes tales como bacterias que pueden alterar el producto con el cual se trabaja, afectar la salud del trabajador o al medio ambiente.

La protección se logra mediante la combinación de elementos electromecánicos/electrónicos y procesos físicos que impulsan el aire a través de unos filtros especiales que tienen una eficiencia mínima de retención de partículas del 99.99%. dichos filtros se conocen internacionalmente como filtros HEPA y resultan adecuados para retener aerosoles que se generan cuando realizan procedimientos con agentes biológicos como agitación, centrifugación o mezcla.

1.4. PROCEDIMIENTO


- a) Desinfectar las superficies de trabajo y las paredes internas deben limpiarse con un paño empapado en un desinfectante que elimine los microorganismos que pudiera haber.
- b) Encender la luz ultravioleta durante 30 minutos.
- c) Antes de comenzar el trabajo poner en marcha la CSB durante unos 5 minutos, con el objetivo de obtener un flujo de aire estable.
- d) Colocar el material necesario dentro de la cabina, para evitar la entrada y salida continua de material.
- e) Antes de sacar o introducir el material, se debe descontaminar el envase.
- f) Trabajar a unos 10 cm del borde de la CSB hacia el interior.
- g) No se debe obstruir las rejillas de aire posteriores o frontales con materiales.
- h) Evitar las corrientes de aire procedentes de puertas, ventanas, aires acondicionados, movimiento de personas, etc., porque pueden alterar el flujo vertical. Al mover los brazos y manos en el interior de la cabina, hacerlo lentamente.
- i) Al final del día de trabajo, la descontaminación final de las superficies debe incluir la limpieza de la superficie de trabajo, los laterales, la cara posterior y el interior de la ventana de cristal. Para los organismos sensibles se utilizará una solución de lejía o alcohol al 70%.
- j) Antes de apagarla habrá que dejarla funcionando durante 5 minutos para purgar la atmósfera interior.

1.5 REFERENCIAS

OPS. (2002). *Cabinas de Seguridad Biológica: Uso, desinfección y mantenimiento*. Obtenido de Organización Panamericana de la Salud:
<http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s16575s/s16575s.pdf>

REDACTADO POR:	REVISADO Y APROBADO :
Viviana del Carmen Quevedo Ordóñez	Dr. Luis Morocho Yaguana

Anexo 2.- Preparación del medio de cultivo Schneider's Drosophila

 <p style="text-align: center;">UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</p> <p style="text-align: center;">Laboratorio de Fitoquímica</p>	<p>Protocolo para la preparación de medio de cultivo Schneider's Drosophila</p>	Código: LFQ-P-SD	
		Revisión: 0.2	Edición:0.2
		Fecha: 4 junio 2018	

2.1.OBJETIVO

Preparar adecuadamente el medio de cultivo Schneider's Drosophila.

2.2.ALCANCE

Docentes y estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja.

2.3. FUNDAMENTO

El Drosophila Medium de Schneider fue diseñado originalmente para el crecimiento de células S2 de la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaser*. Es un medio Monofásico (líquido) empleado en el cultivo de leishmania, habitualmente suplementado con Suero Fetal Bovino inactivado (SFB). El SFB se trata de un complemento que contiene portadores o quelantes de nutrientes lábiles o insolubles en agua, hormonas y factores de crecimiento, inhibidores de proteasas, se une y neutraliza sustancias tóxicas.

2.4. MATERIALES Y REACTIVOS

- Equipo de protección personal
- 10 ml de Suero fetal bovino

- 1 ml de solución de gentamicina 10mg/mL
- 1 ml de orina estéril de adulto
- 40 ml Medio Schneider' Drosophila líquido
- Cabina de seguridad biológica
- Incubadora
- Probeta de 50 mL estéril
- Vaso de precipitación 50 mL estéril
- Filtro 0.22µm estéril para jeringuilla
- Jeringuilla de 60 mL estéril
- Jeringuilla de 1 mL estéril
- Diez tubos cónicos estériles 16 x 160 mm tapa rosca
- Mechero
- Gradilla

2.5. PROCEDIMIENTO

- a) Preparar el lugar de trabajo para la preparación del medio de cultivo:
 - Sanitizar la cabina de seguridad biológica según el Anexo 1.
 - Preparar los materiales y los reactivos.
- b) Añadir en una probeta los siguientes reactivos:
 - 10 mL de Suero Fetal Bovino inactivado por 30 minutos a 56°C en baño maría
 - 1 mL de solución de gentamicina 10 mg/mL
 - 1 mL de orina estéril de adulto
 - 38 mL de medio Schneider's Drosophila
- c) Esterilizar por filtración el medio preparado y dispensar en tubos estériles.

- d) Incubar a 37°C por 24–48horas.
- e) Almacenar en refrigeración a 8°C.

2.6. REFERENCIAS


Montealegre, I. A. (2016). Importancia de los medios de cultivo en el diagnóstico de Leishmaniasis. *Revista Médica Experimental*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/316650873_Importancia_de_los_medios_de_cultivo_en_el_diagnostico_de_leishmaniasis

Neves, B. (2014). *Prepara e suplementação de meio de cultura fase líquida: schneider*. Obtenido de Instituto Oswaldo Cruz.

Thermo Fisher Scientific. (s.f.). *Schneider's Drosophila Medium*. Obtenido de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/21720001>

ACTUALIZADO POR:	REVISADO Y APROBADO :
Viviana del Carmen Quevedo Ordóñez	Dr. Luis Morocho Yaguana

Anexo 3.- Preparación Del Medio De Cultivo Novy, Nicolle y McNeal (NNN).

 <p>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA Laboratorio de Fitoquímica</p>	<p>Protocolo para la preparación de medio de cultivo NNN</p>	Código: LFQ-P-M3N	
		Revisión: 0.2	Edición:0.2
		Fecha: 4 junio 2018	

3.1.OBJETIVO

Preparar adecuadamente el medio de cultivo NNN.

3.2.ALCANCE

Docentes y estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja.

3.3. FUNDAMENTO

NNN Medium fue desarrollado por Novy, McNeal y modificado por Nicolle. Este medio consiste en un agar sangre y un medio de recubrimiento que contiene solución salina, Drosophila Schneider y sangre de conejo desfibrinada e inactivada a 56°C por 30 minutos en baño maría. La base de agar de sangre es un medio altamente nutritivo que apoya el crecimiento de organismos exigentes como *Leishmania* y Tripanosoma.

Las muestras se inoculan en la fase líquida del medio bifásico y se incuban. Los amastigotes se transforman en promastigotes en aproximadamente 24 horas.

3.4.MATERIALES Y REACTIVOS

- Equipo de protección personal
- 15 mL sangre de conejo desfibrinada e inactivada a 56°C por 30 minutos
- Agar BHI(Brain-Heart-Infution)
- Solución de Gentamicina 10mg/mL

- Lámpara de alcohol
- Tubos plásticos cónicos con tapa rosca (estériles)
- Matraz de 250 mL estéril
- Agua destilada
- Pipeta serológica de 10 mL estéril
- Pipetas pasteur estériles
- Autoclave
- Cámara de bioseguridad
- Incubadora
- Balanza analítica
- Baño María
- Gradilla

3.5. PROCEDIMIENTO

- Preparar el lugar de trabajo para la preparación del medio de cultivo:
 - Sanitizar la cabina de seguridad biológica según anexo 1.
 - Preparar los materiales y los reactivos.
- Pesar 5,2g de agar infusión cerebro – corazón.
- Disolver el agar pesado en 84 ml de agua destilada y calentar hasta que hierva, se sella y se autoclava por 15 minutos a 121°C.
- Dejar enfriar hasta que se encuentre a $\approx 50^{\circ}\text{C}$, agregar 15 ml de sangre de conejo, la cual se la desfibrina en un matraz con perlas de vidrio y se inactiva (56°C por 30 minutos).
- Agregar 1 mL de solución de Gentamicina 10mg/mL.

- Mezclar y dispensar en los tubos a medida de 2 mL.
- Dejar enfriar los medios para que se solidifiquen inclinados (pico de flauta).
- Una vez solidificado el medio dejarlo en refrigeración durante 10 a 15 minutos y luego incubar a 37°C por 24-48 horas para control de calidad.
- Almacenar en refrigeración y el medio es útil por 6 meses.

3.6. REFERENCIAS


Acharya, T. (2016). *NNN medium: Composition, Procedure and Results*. Obtenido de Microbe

Online: <https://microbeonline.com/nnn-medium-composition-procedure-and-results/>

Neves, B. (2014). *Preparo de meio de cultura fase sólida NNN*. Obtenido de Instituto Oswaldo Cruz.

ACTUALIZADO POR:	REVISADO Y APROBADO :
Viviana del Carmen Quevedo Ordóñez	Dr. Luis Morocho Yaguana

Anexo 4.- Preparación de la Solución de Criopreservación

 <p>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA Laboratorio de Fitoquímica</p>	<p>Protocolo para la preparación de la Solución de Criopreservación</p>	Código: LFQ-P-SC	
		Revisión: 0.2	Edición:0.2
		Fecha: 4 junio 2018	

4.1. OBJETIVO

Preparar la solución de criopreservación.

4.2. ALCANCE

Docentes y estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja.

4.3.FUNDAMENTO

La crioconservación es el uso de temperaturas muy bajas para preservar células y tejidos vivos estructuralmente intactos durante un largo período de tiempo. La solución de criopreservación contiene suero fetal bovino que es el único medio universal aplicable para el cultivo y proliferación *in vitro* y en la producción biológica de células animales; el glicerol es un crioprotector permeable que tiene función desplazar o extraer el agua del citoplasma y así evitar que durante la congelación se formen cristales de hielo en el interior de la célula y el medio Drosophila Schneider líquido es un medio monofásico (líquido) empleado en el cultivo de leishmania.

4.4. MATERIALES Y REACTIVOS

- Equipo de protección personal
- 15 mL de Suero fetal bovino inactivado a 56°C por 30 minutos
- 4 mL de Glicerol
- 31 mL medio Drosophila Schneider's líquido
- Cabina de seguridad biológica
- Incubadora
- Congelador a -20°C
- Probeta de 50 mL estéril
- Vaso de precipitación de 50 mL estéril
- Filtro 0.22µm estéril para jeringuilla
- Jeringuilla de 60 mL estéril
- Jeringuilla de 1 mL estéril
- Erlenmeyer de 100 mL estéril

4.5. PROCEDIMIENTO

- 1) Preparar el lugar de trabajo para la preparación de la solución de criopreservación:
 - Sanitizar la cabina de seguridad biológica según anexo 1.
 - Preparar los materiales y los reactivos.
- 2) Añadir en una probeta estéril los siguientes reactivos:
 - 15 mL de Suero Fetal Bovino inactivado
 - 4 mL de glicerol estéril
 - 31 mL de medio Schneider
- 3) Homogenizar la solución y esterilizar por filtración.

- 4) Tomar una alícuota de esta solución para el control de calidad y dejar a 37°C por 24-48°C.
- 5) Colocar el volumen total preparado de la solución en un erlenmeyer y almacenar en congelador - 20°C hasta su uso.

4.6. REFERENCIAS

Hoon, T., Choel, S., Hyun, J., Yoon, J., Hong, J., Seo, U., . . . Han, J. (2017). Cryopreservation and its clinical applications. *NCBI*, págs. 12-18. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5395684/>

Montealegre, I. A. (2016). Importancia de los medios de cultivo en el diagnóstico de Leishmaniasis. *Revista Médica Experimental*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/316650873_Importancia_de_los_medios_de_cultivo_en_el_diagnostico_de_leishmaniasis


Neves, B. (2014). *Preparo de solução de criopreservação*. Obtenido de Instituto Oswaldo Cruz.

QuimiNet. (2008). *¿Qué es el SFB y su aplicación?* Obtenido de QuimiNet.com: <https://www.quiminet.com/articulos/que-es-el-sfb-y-su-aplicacion-27555.htm>

Sztein, J. (2013). *Principios de Criobiología*. Obtenido de National Institutes of Health: <https://www.bioterios.com/post.php?s=2013-05-01-principios-de-criobiologa>

REDACTADO POR:	REVISADO Y APROBADO :
Viviana del Carmen Quevedo Ordóñez	Dr. Luis Morocho Yaguana

Anexo 5.- Protocolo de Criopreservación de muestras de *Leishmania*.

 <p>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA Laboratorio de Fitoquímica</p>	<p>Protocolo para la Criopreservación de muestras de Leishmania</p>	Código: LFQ-P-CM	
		Revisión: 0.2	Edición:0.2
		Fecha: 4 junio 2018	

5.1. OBJETIVO

Establecer los procedimientos para la estandarización del método de criopreservación de *Leishmania* sp.

5.2. ALCANCE

Docentes y estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja.

5.3. FUNDAMENTO

La crioconservación es el uso de temperaturas muy bajas para preservar células y tejidos vivos estructuralmente intactos durante un largo período de tiempo. Los Agentes Crioprotectores(ACP), reducen la lesión por congelación del proceso de crioconservación. Los ACP deben ser biológicamente aceptables, ser capaces de penetrar en las células y tener una toxicidad baja. La criopreservación de los promastigotes se llevó a cabo a -20°C durante una hora y luego se mantienen a -86°C .

5.4. MATERIALES Y REACTIVOS

- Equipo de protección personal
- 50 mL de Medio de cultivo Schneider's Drosophila.
- 50 mL de Solución de criopreservación
- Autoclave

- Congelador
- Centrífuga
- Cabina de seguridad biológica
- Microscopio óptico
- Pipeta automática estéril de volumen variable 10-100 μ l.
- Pipeta serológica graduada 10 mL
- Cámara de Neubauer
- Diez criotubos de 1,5 mL estériles
- Cien puntas desechables estériles
- Diez tubos cónicos estériles 16x16mm tapa rosca
- Mechero
- Gradilla

5.5. PROCEDIMIENTO

Primera etapa.

- a) Observar al microscopio óptico una alícuota del cultivo en el medio NNN mantenido en una fase exponencial de crecimiento (3 días), para verificar la viabilidad de los parásitos y la ausencia de agentes contaminantes.
- b) Transferir 1mL del tubo de la muestra a ser crio preservada en los tubos cónicos utilizando pipetas graduadas desechables estériles.
- c) Añadir el medio de cultivo Schneider en los tubos cónicos en la proporción de 1:10.
- d) Incubar los tubos cónicos a 25°C por 24-48 h para el crecimiento de los parásitos.

- e) Colocar una gota de la muestra en la cámara de Neubauer para verificar la viabilidad celular.
- f) Centrifugar los tubos a 4000 rpm durante 10 min a 4°C.
- g) Descartar el sobrenadante y re suspender el sedimento en 1 ml de medio Schneider puro.
- h) Preparar una dilución de 1/100.
- i) Colocar 10µl de la solución final diluida en cámara de Neubauer para realizar el recuento de los parásitos.
- j) Después del conteo, calcular la cantidad de parásitos obtenidos a partir de la dilución realizada. Se debe tener en cuenta el factor de corrección de 10^4 de la cámara de Neubauer.
- k) Colocar 100ul de la muestra en los criotubos y completar hasta 1.5 ml con el medio Schneider's Drosophila y centrifugar a 4000 rpm, 10 min a 4°C.
- l) Descartar el sobrenadante y resuspender el sedimento en la solución de criopreservación
- m) Homogenizar suavemente el contenido e iniciar inmediatamente el proceso de congelación.

Segunda etapa.

- a) Los tubos que contienen las muestras a ser criopreservadas deben colocarse por 1h a la temperatura de -20°C.
- b) Después de ese período, las muestras se mantendrán -86°C.


5.6. REFERENCIAS

Hoon, T., Choel, S., Hyun, J., Yoon, J., Hong, J., Seo, U., . . . Han, J. (2017). Cryopreservation and its clinical applications. *NCBI*, págs. 12-18. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5395684/>

Neves, B. (2014). *Criopreservação manual de amostras*. Obtenido de Instituto Oswaldo Cruz.

REDACTADO POR:	REVISADO Y APROBADO :
Viviana del Carmen Quevedo Ordóñez	Dr. Luis Morocho Yaguana

Anexo 6.- Protocolo de descongelamiento de las muestras de *Leishmania*.

 <p>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA Laboratorio de Fitoquímica</p>	<p>Protocolo de descongelamiento de las muestras de Leishmania</p>	Código: LFQ-P-DM	
		Revisión: 0.2	Edición:0.2
		Fecha: 4 junio 2018	

6.1. OBJETIVO

Establecer los procedimientos para la estandarización del método de manual de descongelación *Leishmania* sp.

6.2. ALCANCE

Docentes y estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja.

6.3. FUNDAMENTO

Las velocidades de enfriamiento y descongelamiento pueden afectar en gran medida las reacciones fisicoquímicas y biofísicas, lo que altera la tasa de supervivencia.

El descongelamiento de los promastigotes de leishmania se lo lleva a cabo sumergiendo los tubos en el baño maría a 37°C durante 5 minutos, para verificar la viabilidad. Todos los tubos resultaron viables, por lo tanto, se procedió a sembrar una muestra en el medio NNN suplementado con Schneider's Drosophila y se los reviso al tercer día para ver si había crecimiento.

6.4 MATERIALES Y REACTIVOS

- Equipo de protección personal
- 20 ml de Medio de cultivo Schneider's Drosophila
- Medio NNN

- Congelador
- Cabina de seguridad biológica
- Microscopio óptico
- Diez pipetas pasteur estériles
- Diez portaobjetos
- Diez cubreobjetos
- Diez criotubos de 1,5 mL estériles
- Mechero
- Gradilla
- Baño maría

6.5 PROCEDIMIENTO

- a) Verificar la ubicación de las muestras en el congelador.
- b) Retirar la muestra y sumergirla parcialmente en baño maría a temperatura de 37°C, durante 5 minutos.
- c) Colocar los tubos que contengan las muestras descongeladas en la cabina de seguridad biológica.
- d) Retirar con una pipeta Pasteur una gota del contenido y colocar en un portaobjetos para verificar la viabilidad celular.
- e) De los tubos positivos transferir una alícuota a un tubo que contiene medio NNN suplementado con Schneider's Drosophila.
- f) Incubar los tubos con las muestras a 25°C.
- g) Revisar los tubos al 3er día para verificar el crecimiento de los promastigotes; en caso de que no presente viabilidad celular en no más de 30 días, ésta debe descartarse.

6.6 REFERENCIAS

- Hoon, T., Choel, S., Hyun, J., Yoon, J., Hong, J., Seo, U., . . . Han, J. (2017). Cryopreservation and its clinical applications. *NCBI*, págs. 12-18. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5395684/>
- Neves, B. (2014). *Descongelamento de amostras retiradas do criobanco*. Obtenido de Instituto Oswaldo Cruz.

REDACTADO POR:	REVISADO Y APROBADO :
Viviana del Carmen Quevedo Ordóñez	Dr. Luis Morocho Yaguana

Anexo 7.- Registro de datos



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

FECHA DE CRIOPRESERVACION	FECHA DE DESCONGELAMIENTO	VIABILIDAD CELULAR (CRUCES)	FECHA DE SIEMBRA EN NNN	FECHA DE REVISION AL 3ER DIA	CANTIDAD DE TUBOS	VIABILIDAD CELULAR
29 de junio del 2018 1 ^{ra} semana	09/07/2018	T ₁ ++	09/07/2018	12/07/2018	3 Tubos	+
	09/07/2018	T ₂ ++	09/07/2018	12/07/2018	3 Tubos	+
29 de junio del 2018 2 ^{da} semana	16/07/2018	T ₁ +++	16/07/2018	19/07/2018	3 Tubos	+
	16/07/2018	T ₂ +++	16/07/2018	19/07/2018	3 Tubos	+
29 de junio del 2018 4 ^{ta} semana	31/07/2018	T ₁ ++	31/07/2018	03/08/2018	3 Tubos	+
	31/07/2018	T ₂ ++	31/07/2018	03/08/2018	3 Tubos	+
29 de junio del 2018 7 ^{ma} semana	22/08/2018	T ₁ ++	22/08/2018	25/08/2018	3 Tubos	+
	22/08/2018	T ₂ ++	22/08/2018	25/08/2018	3 Tubos	+
29 de junio del 2018 15 ^{ta} semana	18/10/2018	T ₁ ++	18/10/2018	21/10/2018	3 Tubos	+
	18/10/2018	T ₂ ++	18/10/2018	21/10/2018	3 Tubos	+



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

Anexo 8.- Planificación de la difusión de los resultados

Planificación de la difusión de los resultados

Oficio dirigido a la Gestora de la Carrera de Laboratorio Clínico para solicitar permiso a los estudiantes y docentes para la realizar la difusión de los resultados

Lugar: Aula Magna Dr. Edmundo Granda U. de la Facultad de la Salud Humana

Fecha: 21 de Febrero del 2019

Hora: 16H00

Tema: Implementación de una técnica de Criopreservación de promastigotes de Leishmania

Diapositivas:

<p style="text-align: center;">IMPLEMENTACIÓN DE UNA TÉCNICA DE CRIOPRESERVACIÓN DE PROMASTIGOTES DE LEISHMANIA</p> <p>Tesista: Srta. Viviana Quevedo Ordóñez</p> <p>Director: Dr. Luis Morocho Yaguana, Mg. Sc.</p>	<p style="text-align: center;">Introducción</p> <ul style="list-style-type: none"> ❖ La leishmaniasis es una enfermedad producida por distintas especies de parásitos protozoarios del género <i>Leishmania</i>, transmitida por insectos dípteros de los géneros <i>Phlebotomus</i> en el Viejo Mundo y <i>Lutzomyia</i> en el Nuevo Mundo. ❖ Para la OMS es una de las grandes endemias y su prevalencia es de 12 millones de personas en todo el mundo. ❖ En Ecuador, se han identificado nueve especies como agentes causantes de <i>Leishmaniasis</i> cutánea humana (CL) y <i>Leishmaniasis</i> mucocutánea (MCL), <i>L. mexicana</i>, <i>L. amazonensis</i>, <i>L. major-like</i>, <i>L. guyanensis</i>, <i>L. panamensis</i>, <i>L. braziliensis</i>, <i>L. naiffi</i>, <i>L. lainsoni</i>, <i>L. shawi</i>. ❖ El cultivo de la leishmania permite el aislamiento del parásito y facilita su detección.
---	--



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

Anexo 9.- Difusión de los resultados



Descripción: Socialización de resultados en el Aula Magna Dr. Edmundo Granda U. de la Facultad de la Salud Humana, el 21 de febrero del 2019. Asisten estudiantes y Docentes de la Carrera de Laboratorio Clínico



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

TEMA: Difusión de resultados de Implementación de una técnica de criopreservación de Leishmania

FECHA: 21 de febrero del 2019

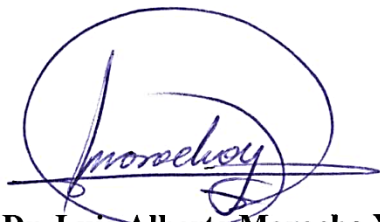
REGISTRO DE ASISTENCIA: ESTUDIANTES

NOMBRES Y APELLIDOS	CICLO	CÉDULA	FIRMA
Cecilia Jiménez	IV "B"	1105276156	
Leonela Sáez	IV "B"	1105504854	
Daniela Ruiz	IV "B"	1105097669	Daniela Ruiz
Betsaida Vera B.	IV "B"	1600475410	
Jholissa C. Erazo D.	IV "B"	1105648263	
BALDO ISRAEL ROJAS GALVEZ	IV "B"	1105575888	
Michelle Villacres Rodríguez	IV "B"	1104354871	
Yelena Neira Correa	IV "B"	1105868618	
Evelyn B. Mendoza P.	IV "B"	1104110042	
David Alejandro Gallegos C.	IV "B"	1104806532	
John Alexander Bravo	IV "B"	1150895660	
Lever Andres Enríquez P.	IV "B"	1104436585	
Diana Carolina Goereso	IV "B"	1106088924	
Anahy Gaona G	IV "B"	1105609737	
Gabriela Pérez I	IV "B"	1150694204	

Anexo 10.- Certificación de traducción del resumen**Certificación de traducción****Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana****Docente de la Carrera de laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja****CERTIFICA:**

Haber traducido al inglés del resumen de la Tesis, titulada **“Implementación de una técnica de criopreservación de promastigotes de Leishmania”**, de autoría de la Srta. **Viviana del Carmen Quevedo Ordóñez**, el cual es correcto y hace referencia al contenido del citado trabajo.

Loja, 20 de marzo de 2019

**Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana****Docente de la Carrera de laboratorio Clínico**

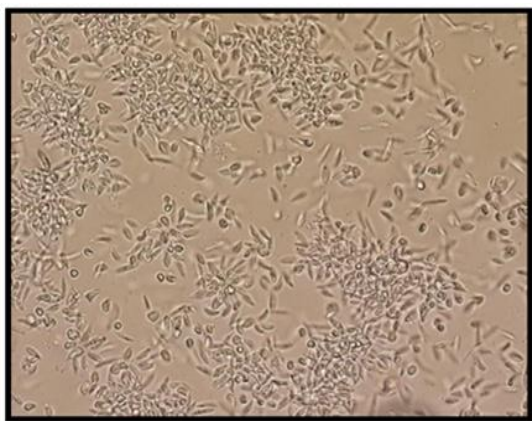
Apéndice: Evidencias fotográficas



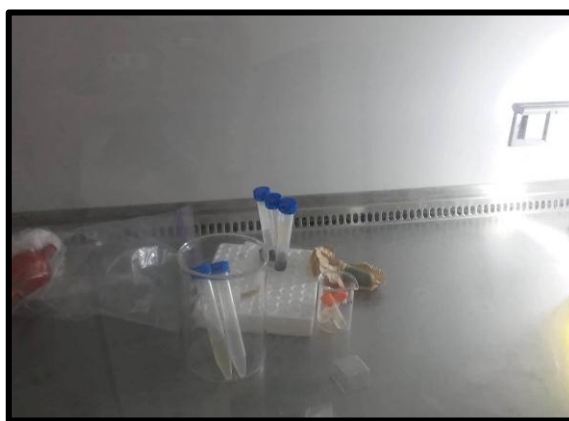
Descripción: Criopreservación de promastigotes.



Descripción: Observación de Promastigotes de *L. major*



Descripción: Promastigotes de *L. major*



Descripción: Siembra en medio NNN de muestras descongeladas