

# TIEMPO DE SUPERVIVENCIA *In vivo* Y CRIOPRESERVACIÓN DE *Trypanosoma vivax*.

## *In vivo* Survival Time and Cryopreservation of *Trypanosoma vivax*.

Ely Gómez-Piñeres<sup>1,2,4</sup>, Lucinda Tavares-Marques<sup>2,3</sup> y Armando Reyna-Bello<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias Veterinarias. Postgrado de Medicina Veterinaria. Maracay, Estado Aragua. <sup>2</sup> Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez-IDECYT. Centro de Estudios Biomédicos y Veterinarios. Laboratorio de Inmunobiología. Caracas. Distrito Capital. <sup>3</sup> Universidad Simón Bolívar. División de Ciencias Biológicas. Departamento de Biología Celular. Caracas. Distrito Capital. <sup>4</sup> Universidad de Oriente. Núcleo Monagas. Escuela de Zootecnia. Departamento de Biología y Sanidad Animal. Maturín, Estado Monagas. \*Dirección del autor: Armando Reyna, Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez-IDECYT, Centro de Estudios Biomédicos y Veterinarios, Laboratorio de Inmunobiología. Apartado postal 47925, Caracas 1041. Venezuela. Tel/Fax +58 212 671-92-89. E-mail: areyna@inmunobiologia.net.ve

### RESUMEN

Uno de los problemas más comunes del trabajo con *Trypanosoma vivax*, es la supervivencia y criopreservación de este protozoo, lo cual origina pérdida de aislados de campo y errores en exámenes parasitológicos. Se propone evaluar la supervivencia *in vivo* en condiciones de campo y criopreservación de *T. vivax*. Para determinar la supervivencia, la sangre se sometió a temperatura ambiente y refrigeración a 4°C, luego se determinó la sobrevivencia en el tiempo. Para el estudio de criopreservación, se emplearon dos crioprotectores de diferente naturaleza química: glicerol 10% y DMSO 5% de concentración final. Además, la criopreservación se realizó bajo tres condiciones de almacenamiento en nitrógeno líquido: 1) fase gaseosa 2) líquida y 3) combinación de ambas. Durante la evaluación de la supervivencia, se observó que la sobrevivencia de *T. vivax* en sangre refrigerada disminuyó significativamente ( $P < 0,01$ ), en comparación con aquellas sometidas a temperatura ambiente. Sin embargo, la sobrevivencia de éstos últimos comienza a disminuir luego de 6 horas, aunque algunos hemoparásitos permanecieron viables hasta 24 horas post-recolección. Para evaluar la criopreservación, al cabo de dos semanas, se descongelaron los crioviales, se determinó la sobrevivencia, resultando negativas las muestras sometidas a congelamiento directo en fase líquida. Los otros dos métodos empleados, resultaron similares (estadísticamente no significativos), el glicerol 10% resultó con mayor número de parásitos viables. En conclusión, se determinó que, las muestras infecta-

das con *T. vivax* deben evaluarse antes de 8 horas post-recolección y mantenerlas a temperatura ambiente. Por otra parte, el congelamiento debe realizarse en primera instancia en fase gaseosa o combinación gaseosa/líquida, empleando glicerol 10%. Estos resultados, permiten sugerir la mejor metodología a ser empleada para la supervivencia de los parásitos antes de exámenes parasitológicos directos, así como también las condiciones óptimas para la criopreservación del *Trypanosoma vivax*.

**Palabras clave:** *Trypanosoma vivax*, crioprotectores, congelamiento, criopreservación, supervivencia.

### ABSTRACT

One of the common problems working with *Trypanosoma vivax* is its survival and cryopreservation, which originates loss of field isolates and parasitological examinations mistakes. The aim of this paper was to study the best methodologies for *in vivo* survival under field conditions and cryopreservation of the *T. vivax*. In order to study complete blood survival of *T. vivax*, two surviving conditions were tested at: room temperature and refrigeration at 4°C. The result shows that surviving in cooled sampled diminished significantly ( $P < 0.01$ ) compare with room temperature. Nevertheless, surviving of room temperature parasite begins to diminish after 6 hours, although some parasites remained viable up to 24 hours post-harvesting. Cryopreservation studies were made under three liquid nitrogen storage conditions: 1) gaseous phase 2) liquid and 3) gaseous/liquid phase combination (glycerol 10% and DMSO 5%, were used as cryoprotectants). After two weeks and defrost the sur-

vive of *T. vivax* from cryovials determined. The result show that: a) direct freezing in liquid phase samples were negative and b) the other two methodology were positive and statistically similar, glycerol 10% resulted with the greatest number of viable parasites. In conclusion, these results suggest that the best methodologies for conservation under field conditions, were that the samples infected with *T. vivax* must be evaluated before 8 hours post-harvesting at room temperature and cryopreservation condition of the *T. vivax*, must be made in gaseous phase or gaseous/liquid phase combination.

**Key words:** *Trypanosoma vivax*, cryoprotectants, freezing, cryopreservation, survival.

## INTRODUCCIÓN

La tripanosomosis, es una de las principales enfermedades de interés veterinario ampliamente difundida en las regiones tropicales de África, América Latina y algunas regiones de Asia [4]. *Trypanosoma (Duttonella) vivax* (*T. vivax*) es un parásito que afecta bovinos (*Bos taurus*, *Bos indicus*), ovinos (*Ovis aries*), caprinos (*Capra hircus*), búfalos (*Bubalus bubalis*) y cérvidos salvajes (*Odocoileus gymnotis*), ubicándose principalmente en sangre, linfa y ganglios linfáticos [4, 8, 11, 14]. Esta enfermedad se caracteriza por: anemia, fiebre, pérdida progresiva de peso y deterioro de condición física general. Además afecta negativamente la fertilidad, tanto en machos como hembras, y ocasiona significantes pérdidas en la producción de leche, carne e incluso la posible muerte de los animales afectados [1, 19, 21-23].

El diagnóstico parasitológico directo de esta enfermedad es ampliamente utilizado, debido a su simplicidad, economía y rapidez. De éstos, uno de los más empleados es el método de Woo o MHC (Concentración de microhematocrito) [25], debido a su superior sensibilidad. Sin embargo, para realizar esta prueba, se requiere que los hemoflagelados estén vivos, pues la prueba detecta realmente el movimiento de los parásitos [21].

Por otra parte, en las investigaciones con *T. vivax*, se cruzan numerosas dificultades para tratar de aislar el parásito y reproducirlo en animales de laboratorio [9]. En este sentido, se ha utilizado la esplecnetomía o la inyección de suero ovino con el inóculo, para inducir parasitemia en ratones (*Mus musculus*) y ratas (*Rattus rattus*). Sin embargo, sólo algunos aislados de *T. vivax* han sido adaptados exitosamente a los roedores. Además de esto, se ha observado que estos aislados adaptados a roedores no logran inducir altas parasitemias [8, 9, 11].

Los métodos de propagación y preservación de parásitos *in vivo* o *in vitro*, tienen algunas limitaciones las cuales incluyen: elevado costo, pérdida de aislados por contaminación de bacterias y hongos, así como también cambios de características biológicas y metabólicas propias [16, 20]. No obstante, mediante la criopreservación utilizando sustancias crioprotectoras y tiempos de congelación correctos, se ven disminuidas las desventajas señaladas anteriormente [16].

Sin embargo, la concentración, tipo de crioprotector y tasa de congelación/descongelación, son factores que afectan la viabilidad del parásito después de la criopreservación [12, 16]. Además, existen varias sustancias crioprotectoras, entre las más utilizadas para el almacenamiento de células están: el glicerol, dimetil sulfóxido (DMSO) y polivinil-pirrolidona (PVP) [16]. Estos agentes protegen las células revistiéndolas, permitiendo la disminución del punto de congelamiento del medio celular, alterando el patrón de cristalización en la formación de hielo extracelular [12, 18, 24].

El objetivo de esta investigación consistió, por una parte, evaluar la sobrevivencia *in vivo* de los hemoflagelados en condiciones de campo, a fin de establecer el tiempo máximo en el cual la muestra debe ser procesada, bien para realizar un examen parasitológico directo o para criopreservar la muestra, debido a que es trascendental conocer cuanto tiempo duran los tripanosomas vivos a nivel de campo, luego de tomada la muestra.

El otro objetivo del presente trabajo, fue probar dos crioprotectores (DMSO y glicerol) y diferentes formas de congelar los crioviales para aumentar en lo posible la tasa de sobrevivencia de los viales almacenados en nitrógeno líquido.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Infección Experimental

Se utilizó un ovino mestizo de 6 meses de edad y de 20 kg pv, el cual fue previamente evaluado parasitológicamente (Woo) y serológicamente (ELISA) resultando negativo a tripanosomosis.

El animal fue inmunosuprimido con dexametasona, empleando para ello un protocolo de cinco (5) dosis de 2mg/kg, vía IV, de manera interdiaria. Simultáneamente con la cuarta dosis, se inocularon 2 mL de sangre infectada con *T. vivax* proveniente de un bovino parasitológicamente positivo por la técnica de Woo (++) [25], procedente de Temblador, estado Monagas, Venezuela, criopreservado con glicerol 10% de concentración final en una solución buffer fosfato salino (PBS-G), 0,02 M y 150 mM NaCl, pH 7,2 conteniendo 1% de glucosa.

Una vez inoculado, el ovino fue evaluado después de la infección experimental. Para ello, se dejaron transcurrir dos días después de la inoculación y se comenzó a realizar pruebas diarias para determinar la presencia del parásito en sangre total utilizando la técnica de Brener [2] para la cuantificación, frotis de gota gruesa y técnica de Woo [25] para la evaluación parasitológica, determinación de hematocrito y medición de temperatura corporal para la evaluación de la evolución clínica. Cuando el animal infectado alcanzó una parasitemia de  $3,49 \times 10^6$  tripanosomas/ml, el día 10 post-infección, se procedió a realizar el análisis de sobrevivencia y criopreservación de los parásitos.

**Evaluación de la supervivencia de *Trypanosoma vivax***

El ensayo se condujo, evaluando muestras colectadas en la vena yugular empleando tubos Vacutainer® con EDTA.

Una vez que el ovino alcanzó la parasitemia  $3,49 \times 10^6$  trip/mL, se procedió a determinar la concentración de parásitos contenidos en 5 µL de sangre infectada en diferentes tiempos y temperaturas, respectivamente. Para ello se utilizó un microscopio óptico (marca Zeiss®, Modelo Montagesutz T-UL, Alemania), objetivo 40X, portaobjetos y cubreobjetos tradicionales. Se contaron 20 campos de microscopio, y el resultado se promedió multiplicándose por 100 y el factor de microscopio (30,4319) además del factor dilución 200 [2] en los tiempos: 0; 2; 4; 6; 8 y 24 horas y finalmente, se evaluó la supervivencia. Las temperaturas bajo las cuales se mantenían las muestras fueron: Temperatura ambiente (TA), aproximadamente, 25- 28°C y refrigeración (4°C).

**Criopreservación de *Trypanosoma vivax***

Para ambos agentes crioprotectores, se empleó el protocolo propuesto por Ndao y col. [17], con ciertas modificaciones de PBS-G [13]. Los agentes crioprotectores empleados fueron: glicerol 20% concentración final y DMSO mezclado al 10% en PBS-G en partes iguales con sangre infectada con tripanosomas, de manera que la concentración final quedara al 10 y 5%, respectivamente. Posteriormente, se colocaron 200 µL de la mezcla en crioviales Nalgene®. Se almacenaron en un tanque con nitrógeno, divididos en tres grupos cada uno. El primer grupo se sometió a fase gaseosa (FG), (vapores de nitrógeno -140°C, aproximadamente), el segundo se sumergió en la fase líquida del Nitrógeno (-196°C) y el tercer grupo de crioviales se sometieron a fase gaseosa y luego la siguiente semana, colocados en fase líquida (FG/NL). Pasadas dos semanas, se evaluaron los crioviales y se realizó el conteo de parásitos vivos por el método de Brener [2].

**Análisis estadísticos**

Se tabularon los datos para los diferentes tiempos y condiciones evaluadas. Se aplicó una prueba de t-student a los resultados obtenidos, con correcciones de Welch de resultados no pareados, utilizando el software estadístico GraphPad InStat versión 3,05 [10].

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

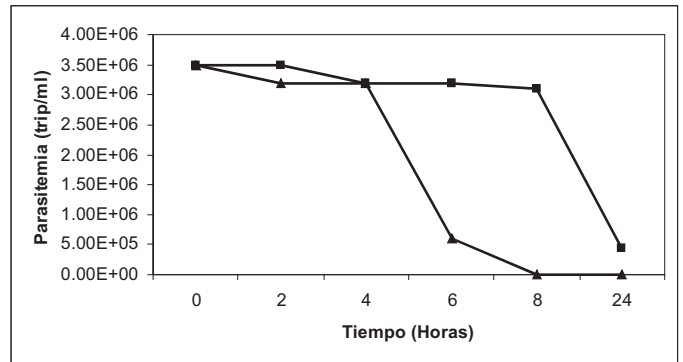
**Parasitemia**

Diez días después de la inoculación del ovino, se determinó la parasitemia por el método de Brener [2] en  $3,49 \times 10^6$  tripanosomas/mL, equivalente a 5,27 parásitos/campo, utilizando el objetivo 40 X.

Una vez determinada la parasitemia, se extrajeron dos tubos Vacutainer® con EDTA a fin de realizar las pruebas de supervivencia a temperatura ambiente (TA) y refrigerada (4°C), así como también para el experimento de la criopreservación.

**Evaluación de la supervivencia de *T. vivax*, a temperatura ambiente y refrigerada**

La evaluación de la supervivencia de *T. vivax*, se aprecia en la FIG. 1, se observan las variaciones poblacionales de los protozoarios en el tiempo, tanto a TA como 4°C. En el caso de las muestras evaluadas a TA, se observó mayor supervivencia de parásitos en las diferentes horas evaluadas. En este sentido, las muestras luego de 6 a 8 horas de recolección, mantienen la carga parasitaria entre 92 y 89%, respectivamente. Posteriormente, a las 24 horas de recolección, se observó que la supervivencia de tripanosomas se redujo a un 13%.



**FIGURA 1. PARASITEMIA DE *T. vivax*, A TEMPERATURA AMBIENTE Y REFRIGERACIÓN. LÍNEA CON CUADROS (-■-): SUPERVIVENCIA DE *T. vivax* A TEMPERATURA AMBIENTE. LÍNEA CON TRIÁNGULOS (-▲-): SUPERVIVENCIA DE *T. vivax* a 4°C / PARASITAEMIC OF *T. vivax* AT ROOM TEMPERATURE AND REFRIGERATION. LINE WITH SQUARES (-■-): SURVIVAL OF *T. vivax* AT ROOM TEMPERATURE. LINE WITH TRIANGLES (-▲-): SURVIVAL OF *T. vivax* AT ROOM 4°C.**

Por otra parte, en las muestras conservadas a 4°C se observó que los parásitos eran viables en un 92% hasta las 4 horas. Luego de 6 horas, se evidenció una marcada reducción en la viabilidad de los parásitos quedando solamente 17% viables y a las 8 horas el 0,29%, hasta la desaparición total de los hemoflagelados a las 24 horas post-recolección.

Al comparar las curvas TA y 4°C entre si, no se observan diferencias a las 0; 2 y 4 horas, sin embargo, a las 6; 8 y 24 horas, se encontraron diferencias altamente significativas (P<0,01), debido a la mayor supervivencia descrita a TA.

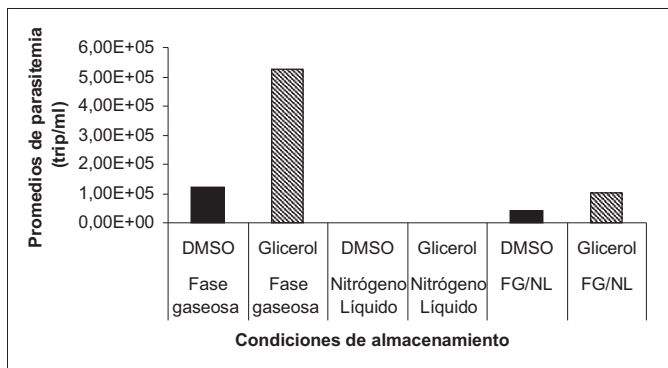
Sin embargo, Ekwurure y col. [5], reportaron resultados contrarios a este estudio, empleando un aislado africano de *T. vivax*. Ellos encontraron que en sangre de ovejas y cabras infectadas, el número de parásitos permanecía constante por 24 horas, cuando la muestra es refrigerada. Es posible que el hecho de ser aislados de continentes diferentes, proporcione resultados diferentes. De hecho, recientes trabajos genéticos sugieren que los aislados Suramericanos, del este y oeste africano podrían ser clasificados como subespecies o especies relacionadas a *T. vivax* [3].

En Venezuela, otras investigaciones [7] también han evaluado la sobrevivencia de *T. vivax* en condiciones experimentales, reportando viabilidad satisfactoria hasta 24 horas y sin reducción de la masa parasitaria. Sin embargo, estos autores mezclaron la sangre con RPMI 1640 y quizás este medio enriquecido en aminoácidos, permitió la sobrevivencia por mayor tiempo. Además, Meléndez [15] estudió infecciones en ovinos (*Ovis aries*), después de la criopreservación prolongada de *T. vivax*, reportando curso de infecciones similares a hemoflagelados no criopreservados, señalando que el método de criopreservación con glicerol al 8% no altera la patogenicidad ni la infectividad de los aislados almacenados por 3 y 4 años respectivamente.

### Evaluación y/o conteo de parásitos criopreservados post-congelación

Con la finalidad de evaluar la criopreservación, se utilizaron dos crioprotectores (DMSO y glicerol) y tres condiciones de almacenamiento (fase gaseosa, líquida y combinación de ambas).

En la FIG. 2, se observa mayor cantidad de tripanosomas vivos en las muestras criopreservadas en fase gaseosa, empleando como agente crioprotector el glicerol a una concentración final de 10%. Los parásitos criopreservados mediante la combinación de las dos fases y ambos agentes crioprotectores, evidenciaron una disminución en el número de parásitos vivos. Para el caso de las muestras criopreservadas directamente en la fase líquida del nitrógeno, no hubo sobrevivencia.



**FIGURA 2. PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA Y CRIOPRESERVACIÓN DE *T. vivax* BAJO TRES CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO EN NITRÓGENO LÍQUIDO. BARRA NEGRA: DMSO, BARRA CON LÍNEAS: GLICEROL/ SURVIVAL PERCENTAGE AND CRYOPRESERVATION OF *T. vivax* UNDER THREE CONDITIONS OF LIQUID NITROGEN STORAGE. BLACK BAR: DMSO, BAR WITH LINES: GLYCEROL.**

Curiosamente, en las muestras criopreservadas en fase gaseosa y combinación de ambas, el número de tripanosomas viables resultaron estadísticamente no significativos, entre ambos crioprotectores usados. No obstante, resultó mayor número

de parásitos viables cuando se empleó la fase gaseosa y el glicerol a 10%, con el 15% de sobrevivencia, a diferencia de 4% cuando se utilizó DMSO. Mientras con la metodología mixta, se observó sobrevivencia de parásitos entre 1 y 3% empleando DMSO y glicerol, respectivamente. Estos resultados coinciden con Miyake y col. [16], quienes reportan efectos de varias condiciones de congelamiento sobre la sobrevivencia de algunos protozoarios después de la criopreservación, donde DMSO al 10% y glicerol al 15% resultaron con mejor efectos crioprotector que otros seis agentes evaluados. Otros trabajos de criopreservación de *T. vivax* adaptado a rata, emplearon dos crioprotectores: glicerol 10,9% y DMSO 5% de concentración final, colocados en alícuotas de volúmenes 100  $\mu$ L y 200  $\mu$ L. Reportando que el glicerol permite mayor sobrevivencia de parásitos con 90 y 57%, respectivamente. Mientras que en el caso del DMSO, se obtuvo 35 y 29% para ambas alícuotas evaluadas [17]. Trabajando con aislados venezolanos, Espinoza y Tortolero [6], estandarizaron un método simple de criopreservación para *T. vivax*, empleando DMSO a concentraciones finales de 10; 5 y 2,5%, indicando sobrevivencia de los tripanosomas, sin embargo al 2,5% observaron parásitos muertos o sin movilidad y al 10%, no encontraron resultados favorables. Mientras, que la concentración de glicerol al 8%, resultó ser la más satisfactoria que las anteriores.

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El período de tiempo para realizar el procesamiento de muestras sanguíneas infectadas con tripanosomas, no debe exceder de 8 horas post-recolección y debe conservarse a temperatura ambiente. Es importante destacar, que esto es válido, tanto para la criopreservación de la muestra, como para el examen parasitológico de Woo, el cual, requiere los parásitos vivos.

En caso que la muestra sea refrigerada, debe ser procesada antes de las 4 horas post-recolección ya que como se observa en la FIG. 1, la refrigeración disminuye drásticamente la carga parasitaria existente.

Estos resultados sugieren que para realizar la criopreservación de *T. vivax*, es más recomendable mantener el criopreservado en la fase gaseosa del nitrógeno líquido. También se sugiere utilizar glicerol al 10% en PBS (0,02 M y 150 mM NaCl, pH 7,2 conteniendo 1% de glucosa).

### AGRADECIMIENTO

A la Oficina de Planificación del Sector Universitario (OPSU) a través del Programa "ALMA MATER", proyecto G-98003462 FONACIT, "BID FONACIT II", y a la "Red de Identificación y Diagnóstico Molecular de Hemoparásitos" proyecto 2004000400, Proyecto TRYPADVAC2, por el financiamiento del presente trabajo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ANOSA, V.O. Haematological and biochemical changes in human and animal Tripanosomiasis. Part. II. **Revue D'Elevage et De Med. Vet. des Pays Trop.** 41(2): 151-164. 1988.
- [2] BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev. do Inst. de Med. Trop. de São Paulo.** 4: 389-396. 1969.
- [3] CORTEZ, A.P.; VENTURA, R.M.; RODRIGUES, A.C.; BATISTA, J.S.; PAIVA, F.; AÑEZ, N.; MACHADO, R.Z.; GIBSON, W.C.; TEIXEIRA, M.M.G. The taxonomic and phylogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* from South America and Africa. **Parasitol.** 133(2):159-69. 2006.
- [4] DESQUESNES, M. Trypanosomes. **Livestock Trypanosomes and their Vectors in Latin America.** Centre de Cooperation Internationale en Recherché Agronomique pour le Développement (CIRAD)/Élevage et Médecine Vétérinaire Tropical (EMVT). OIE. Paris. 174 pp. 2004.
- [5] EKWURURE, J.; IKEDE, B.; OPASINA, B. Survival period of field isolates of *Trypanosoma vivax* in refrigerate blood. **Acta Trop.** 42: 273-274. 1985.
- [6] ESPINOZA, E.; TORTOLERO, E. Un método simple de conservación de *Trypanosoma vivax* para su uso en infecciones experimentales. En: **Hemoparásitos: Biología y Diagnóstico.** Universidad Simón Bolívar. Caracas. 148-154pp. 1990.
- [7] ESPINOZA, E.; GONZÁLEZ, N.; PRIMERA, G.; DESQUESNES, M.; HIDALGO, L. Sobrevivencia del *Trypanosoma vivax* (cepa IIV) y *Trypanosoma evansi* (cepa TEVAI) en condiciones experimentales. **Vet. Trop.** 22(2): 189-194. 1997.
- [8] GARDINER, P.R. Recent Studies of the Biology of *Trypanosoma vivax*. **Adv. In Parasitol.** 28: 229-315. 1989.
- [9] GATHUO, H.K.; NANTULYA, V.M.; GARDINER, P.R. *Trypanosoma vivax*: adaptation of two East african stocks to laboratory rodents. **J. Protozool.** 34(1):48-53. 1987.
- [10] GRAPHPAD SOFTWARE, INC., San Diego California. USA. Versión 3.05. 1998.
- [11] HOARE, A. The salivaria. **The trypanosomes of mammals.** Chapter XI. Blackwell Sci. Publ. Oxford. Edinburgh, UK. 401-429 pp. 1972.
- [12] HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiol.** 46:205-229. 2003.
- [13] LANHAM, S.; GODFREY, D. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other animals using DEAE-cellulose. **Exp. Parasitol.** 28: 521-534. 1970.
- [14] LOSOS, G. Tripanosomiasis. In: **Infectious Tropical Diseases of Domesticated Animal.** Longman Scientific and Technical. Canada. 182-318 pp. 1986.
- [15] MELENDEZ, R. Estudio sobre *Trypanosoma vivax*. II Curso de la infección en ovinos después de criopreservación prolongada del hemoflagelado. **Vet. Trop.** 5(10): 9-18. 1980.
- [16] MIYAKE, Y.; KARANIS, P.; UGA, S. Cryopreservation of protozoan parasites. **Cryobiol.** 48(1):1-7. 2004.
- [17] NDAO, M.; MAGNUS, E.; BUSCHER, P.; GEERTS, S. *Trypanosoma vivax*: A simplified protocol for *in vivo* growth, isolation and cryopreservation. **Parasite.** 11: 103-106. 2004.
- [18] POZIO, E.; ROSSI, P.; SCRIMITORE, F. Studies on the cryopreservation of *Trichinella* species. **Exp. Parasitol.** 67: 182-189. 1988.
- [19] RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. **Veterinary Medicine.** In: Part two: Special Medicine. 9th Ed. W. B. Saunders Company Ltd. Edinburgh. 1877 pp. 2000.
- [20] RAETHER, W.; MICHEL, R.; UPHOFF, M. Effects of dimethylsulfoxide and the deep-freezing process on the infectivity, motility, and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Res.** 74(4): 307-13. 1988.
- [21] RIVERA, M.A. Tripanosomosis. En: **Hemoparasitosis Bovinas.** Editorial Universidad Central de Venezuela, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Caracas, Ediciones Arauco. 238 pp. 1996.
- [22] SEIDL, A.; DAVILA, A.M.; SILVA, R.A. Estimated financial impact of *Trypanosoma vivax* on the Brazilian Pantanal and Bolivian Lowlands. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 94:269-272. 1999.
- [23] SEKONI, V.O. Reproductive disorders caused by animal tripanosomiasis: A review. **Theriogenol.** 42:557-570. 1994.
- [24] SOUZA, P.; ELISEI, C.; SOARES, C.; MASSARD, C. Criopreservación de *Plamodium (Novyella) juxtannucleare* con glicerol. **Parasitol. al día.** 24(1-2): 1-6. 2000.
- [25] WOO P.T.K. The Haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomosis. **Acta Trop.** 27: 384-386. 1970.