

Metodologia da Criopreservação dos *Trypanosomas evansi* e *Trypanosoma vivax*

Várias espécies do gênero *Trypanosoma* causam doenças parasitárias de considerável importância médica e veterinária em todas as partes da África, Ásia e as Américas. Estes parasitas exibem considerável diversidade genética intraespecífica, variação que tem complicado sua classificação taxonômica. Esta diversidade e variação podem ser definidas em ambos níveis: do genoma e genes individuais. Em razão desta diversidade genética tem-se discutido muito sobre a representatividade das cepas mantidas em laboratório quando comparadas com os isolados de campo (Deane et al., 1984). Aparentemente existe uma adaptação do parasita na troca de hospedeiro. Sabe-se que um isolado de campo pode estar constituído por uma população heterogênea de tripanosomas. Nos estudos realizados pelo Laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Pantanal foram encontradas variações na infectividade das cepas de *T. evansi*. Estas foram pouco infectivas em animais de laboratório quando recém isoladas do hospedeiro natural, apresentando um período prepatente de 12 a 43 dias e baixa parasitemia. Após algumas passagens, elas se mostraram mais infectivas com um período prepatente de 2 a 4 dias e uma parasitemia mais alta. Também foram observadas variações biométricas deste parasita nas passagens. Verificou-se que este parasita sofreu alterações morfométricas durante as passagens como provável consequência da adaptação ao novo hospedeiro ou seleção de algumas subpopulações. As características biométricas das passagens foram sempre maiores que as do isolado primário (Dávila et al., 1998). As amostras de campo diferiram significativamente dos isolados após várias passagens em animais de laboratório, sendo que quanto maior o número de passagens mais acentuação das diferenças morfológicas. A criopreservação pode contribuir para que sejam mantidas amostras com variabilidade genética original da cepa. Esse trabalho tem por objetivo descrever o método de criopreservação utilizado no Laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Pantanal.

Passagens em animais de laboratório

Geralmente as passagens são realizadas por via intraperitoneal. Os roedores de laboratório (ratos e camundongos) têm se mostrado sensíveis nas infecções experimentais com *T. evansi*. No caso do *T. vivax* tem sido mais difícil a manutenção deste parasita em animais de laboratório desde que geralmente não são infectivos para estes animais. Alguns autores têm mencionado que as formas de *T. vivax* encontradas durante a fase inicial da infecção em bovinos poderiam infectar roedores de laboratório. Também tem-se obtido algum sucesso na adaptação deste parasita, imunossuprimindo ou irradiando camundongos e ratos e inclusive através de passagens rápidas, logo após o aparecimento de alguns parasitas na corrente sanguínea. Para o controle das parasitemias nos camundongos deve-se fazer esfregaço do sangue da cauda. Para a passagem, somente dois animais são necessários. A frequência das passagens dependerá da virulência da cepa, uma vez adaptada para os camundongos, estes desenvolverão rapidamente a doença e morrerão.

Criopreservação

Hoje muitos pesquisadores deparam-se com a falta de células geneticamente estabilizadas para assegurar resultados reproduzíveis e a continuidade de suas pesquisas científicas. O subcultivo ou a passagem serial em animais de laboratório é muito laborioso e pode levar a contaminação ou seleção genética de determinadas populações. Contudo a população de células ou microorganismos podem ser estabilizadas pela submissão deles a temperatura criogênicas, as quais por propósitos práticos detém o tempo. A estabilização de células à temperaturas criogênicas é chamada criopreservação, um ramo aplicado da criobiologia ou o estudo da vida a baixas temperaturas. Os avanços na tecnologia da criopreservação têm conduzido a métodos que permitem a manutenção de vários tipos celulares a baixas temperaturas. As técnicas estão disponíveis para a preservação de microorganismos, tecidos celulares isolados, pequenos organismos multicelulares e ainda, organismos mais complexos como os embriões. O processo de congelamento envolve um fenômeno complexo, ainda não completamente entendido.

Corumbá, MS
Dezembro, 2003

Autores

Roberto Aguilar M. S. Silva,
MSc. Pesquisador,
Embrapa Pantanal
Rua 21 de Setembro, 1880
CEP 79320-900
rsilva@cpap.embrapa.br

Valdete Sanchez
Assistente de Operações,
Embrapa Pantanal
valdete@cpap.embrapa.br

Alberto M. R. Dávila,
PhD, FIOCRUZ
Av. Brasil 4365
Rio de Janeiro, RJ, Brasil
CEP 21045-900
davila@ioc.fiocruz.br

Agentes Crioprotetores

Vários compostos têm sido testados como agentes crioprotetores isoladamente ou em combinação e dentre eles estão os açúcares, soro e solventes. Embora não haja regras absolutas na criopreservação, o glicerol e o dimetil sulfoxido (DMSO) têm sido amplamente usados e parecer ser os mais efetivos. A escolha do agente crioprotetor é dependente do tipo celular a ser preservado. Para a maioria das células o glicerol é o agente de escolha porque ele é geralmente menos tóxico do que o DMSO. Contudo o DMSO é mais penetrante na célula e geralmente é o agente de escolha para células mais complexas tais como os protistas. O agente crioprotetor deve ser diluído à concentração desejada antes de ser adicionado a suspensão de células. Este procedimento minimiza os efeitos potencialmente deletérios das reações químicas, tais como geração de calor e assegura a exposição mais uniforme para o agente crioprotetor quando ele é adicionado a suspensão de células, reduzindo seus efeitos potencialmente tóxicos. O DMSO e o glicerol são geralmente usados em concentrações que variam de 5-10% (v/v), e não são usadas juntas na mesma solução, com exceção de células de plantas. A concentração ótima varia com o tipo celular. O glicerol e o DMSO devem ser esterilizados antes do uso. O glicerol pode ser esterilizado pela autoclavagem durante 15 minutos a 121°C. O glicerol deve ser protegido da luz durante o armazenamento. O DMSO deve ser esterilizado por filtração usando-se uma seringa filtro de nylon de 0.2- μ ou seringa de Teflon PTFE as quais foram pré-lavadas com álcool e enxaguadas com DMSO. Os agentes crioprotetores devem ser preparados para uso único para minimizar o risco de contaminação. O DMSO deve ser sempre manuseado com luvas, pois pode penetrar através da pele e causar intoxicação.

Método de Criopreservação

- I. Coletar sangue infectado em tubos com heparina ou EDTA (de preferência os tubos com anticoagulante deverão estar a baixa temperatura, rodeados com gelo ou água gelada);
- II. Misturar o sangue dos tubos com 7-10% de glicerol;
- III. Homogeneizar;
- IV. Colocar o sangue homogeneizado com glicerol em frascos de criopreservação preenchendo no máximo 75% do volume do recipiente;
- V. Colocar os frascos de criopreservação contendo o sangue no vapor de nitrogênio líquido (num isopor contendo um pouco de nitrogênio líquido) durante 20 min.;

VI. Depois deste procedimento poderá ser armazenado no botijão de nitrogênio líquido a -196°C.

Descongelamento

Para o descongelamento, retirar os frascos a serem descongelados do nitrogênio líquido e colocá-los em banho- maria a 37 °C durante 5-7 min. Depois deste procedimento poderão ser conferidos no microscópio a viabilidade e motilidade destes parasitas.

Conclusões

O método de criopreservação para os *Trypanosomas evansi* e *Trypanosoma vivax*, utilizado no Laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Pantanal mostrou-se efetivo e com um índice de recuperação de cepas criopreservadas superior a 90%.

Recomendações

Baseados em nossas experiências de campo e laboratório recomendamos criopreservar as amostras isoladas diretamente do campo: "isolado", "isolado primário" ou "isolado de campo", fazendo o menor número de passagens em animais de laboratório como uma tentativa de estudar as propriedades destes parasitas como expressadas na natureza.

Os camundongos são os melhores hospedeiros para o isolamento do *Trypanosoma evansi*. Para ser obtida uma alta parasitemia são necessárias várias passagens em camundongos. Quando uma alta parasitemia é alcançada, então é possível congelar a cepa.

Deve-se fazer esforços para guardar como material criopreservado todos os isolados de campo ou cada uma das passagens nos animais de laboratório.

Referencias Bibliográficas

DÁVILA, A. M. R.; RAMIREZ, L.; SILVA, R. A. M. S. Biometrical alterations of *Trypanosoma evansi* isolate in laboratory rodents. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 76, p.149-152, 1998.

DEANE, M. P.; JANSEN, A. M.; MANGIA, R. H. R.;
GONÇALVES, A. M.; MOREL, C. M. Are our
laboratory "strains" representative samples of
Trypanosoma cruzi populations that circulate in
nature?. *Memórias do Instituto*

Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.79, p.19-24,
1984.

**Circular
Técnica, 40**

**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Pantanal
Endereço: Rua 21 de Setembro, 1880
Caixa Postal 109
CEP 79320-900 Corumbá, MS
Fone: 67-2332430
Fax: 67-2331011
Email: sac@cpap.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2003): formato digital

**Comitê de
Publicações**

Presidente: Aiesca Oliveira Pellegrin
Secretário-Executivo: Marco Aurélio Rotta
Membros: Balbina Maria Araújo Soriano
Evaldo Luis Cardoso da Silva
José Robson Bezerra Sereno
Regina Célia Rachel dos Santos

Expediente

Supervisor editorial: Marco Aurélio Rotta
Revisão de texto: Mirane dos Santos Costa
Tratamento das ilustrações: Regina Célia R. Santos
Editoração eletrônica: Regina Célia R. Santos
Élcio Lopes Sarath