

CRIOPRESERVAÇÃO DE FORMAS DE CULTURA DO *TRYPANOSOMA CRUZI*

LÚCIA MARIA C. GALVÃO
Z. BRENER

Formas de cultura de diferentes cepas de T. cruzi foram submetidas a vários processos de criopreservação. As percentagens de recuperação, avaliadas pela motilidade dos parasitas, foram consideradas como adequadas com algumas das técnicas empregadas, variando entre 60 a 80%. A estabilidade das características biológicas do material criopreservado foi investigada através do estudo das curvas de crescimento e diferenciação em meio acelular, infectividade para células de cultura de tecido ("Vero"), diferenciação intracelular em cultura de tecido assim como infectividade e curso da infecção em animais de laboratório. De um modo geral essas características não foram significativamente alteradas no material congelado e estocado por diferentes períodos de tempo.

São ainda muito escassos os dados na literatura sobre criopreservação de formas de cultura do *Trypanosoma cruzi*. Além disso, os trabalhos referem apenas o período de estocagem a baixa temperatura e a percentagem de recuperação dos parasitas após a descongelação, não sendo mencionados dados sobre a estabilidade das características biológicas no material criopreservado (Santos et al 1978). Neste trabalho realizamos um estudo sistematizado sobre a recuperação de formas de cultura do *T. cruzi* após preservação em baixas temperaturas por diferentes períodos de tempo, testando métodos de congelação já empregados para formas sanguíneas por Filardi & Brener (1975). Investigamos, ainda, o crescimento e diferenciação dos parasitas antes e após a congelação assim como a infectividade dos parasitas criopreservados para cultura de tecido e animais de laboratório, procurando detectar eventuais alterações induzidas pela estocagem a baixas temperaturas.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepas de T. cruzi

Y, isolada de um caso agudo humano (Pereira da Silva & Nussenzweig, 1953); CL e FL, isoladas de *Triatoma infestans* naturalmente infectados, capturados no Rio Grande do Sul (Brener & Chiari, 1963); YUYU, isolada de *Triatoma infestans* capturado na Bahia (Filardi & Brener, 1980).

Trabalho realizado com auxílio do Conselho Nacional de Pesquisas e da Organização Mundial da Saúde no Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Caixa Postal, 1743, Belo Horizonte e Departamento de Parasitologia, I.C.B., Universidade Federal de Minas Gerais, 30000 Belo Horizonte, Brasil.

Recebido para publicação em 10 de fevereiro e aceito em 7 de julho de 1981.

Substâncias crioprotetoras e material de estocagem

Glicerol ("Reagen") e Dimetilsulfóxido (DMSO) ("Baker") na proporção de 10% (v/v) foram utilizados como agentes crioprotetores. Os parasitas eram congelados em tubos de cloreto de polivinil (130mm x 2,5mm) em tubos de polipropileno (37mm x 12mm) (Cooke Provia). A estocagem dos parasitas era realizada em "Liquid Nitrogen Containers" (Union Carbide) tipos LD e LR e em "deep-freezer" a -75°C . (Forma Scientific Inc.).

Cultivo dos parasitas e técnicas de contagem

Os parasitas foram mantidos em meio LIT ("Liver Infusion-Tryptose") (Camaro, 1964). Para os experimentos de crescimento e diferenciação dos flagelados antes da congelação e após descongelação, as culturas foram mantidas em crescimento exponencial com passagens a 48 horas. As culturas vinham sendo passadas em meio LIT há aproximadamente 6 meses desde seu isolamento do hospedeiro vertebrado. Em alguns experimentos utilizamos, além disso, culturas com aproximadamente 10 anos de manutenção em laboratório.

As contagens dos flagelados antes da congelação eram realizadas através de hemocitômetro ou contador eletrônico de partículas (Coulter Counter, Modelo D₂), previamente à adição dos crioprotetores e após 15 minutos, sendo apenas considerados viáveis, os flagelados com motilidade.

Métodos de congelação

Método A – Os flagelados em meio LIT eram mantidos a 4°C , sendo o glicerol e DMSO, conservados à mesma temperatura, adicionados lentamente à cultura. Após 15 minutos, enchíamos os tubos de cloreto de polivinil, selávamos e imergíamos em um tubo de ensaio contendo álcool absoluto a 4°C , o qual era colocado no "deep-freezer" a -75°C . Após 24h., transferíamos o material diretamente para o nitrogênio líquido.

Método B – A cultura, à qual os crioprotetores eram adicionados lentamente, era deixada à temperatura ambiente ($25^{\circ} - 28^{\circ}\text{C}$) por 15 minutos. Após encher os tubos de polivinil com a cultura, eram os mesmos selados, transferidos para um tubo de ensaio com álcool absoluto a 4°C e deixados no "deep-freezer" por cerca de 24 horas. Decorrido esse tempo eram transferidos diretamente para o nitrogênio líquido.

Método C – A cultura adicionada de glicerol ou DMSO à temperatura ambiente ($25^{\circ} - 28^{\circ}\text{C}$), permanecia 15 minutos em repouso. Após esse tempo, os tubos recebiam o material e, após fechamento, eram colocados no "deep-freezer" por cerca de 24 horas, quando eram então transferidos para o nitrogênio líquido. Uma partida dos tubos era deixada no "deep-freezer" a fim de se comparar os resultados da congelação a -196° e -75°C .

Método D – Cultura e crioprotetores eram misturados à temperatura ambiente; decorrido 15 minutos, enchíamos os tubos, selávamos e introduzíamos o material diretamente no nitrogênio líquido.

Método E – Cultura e crioprotetores eram homogeneizados à temperatura ambiente; após 15 minutos, enchíamos os tubos, selávamos e colocávamos em um recipiente contendo etanol, imerso em um banho de etanol e gelo seco ajustado para fornecer uma temperatura de -79°C . Este sistema permite, através da adição gradual de gelo seco ao banho, o decréscimo da temperatura de $1-2^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ no recipiente com etanol. Quando a temperatura de -30°C era alcançada, os tubos eram transferidos para o banho de álcool-gelo seco a -79°C , onde permaneciam 5 minutos sendo a seguir levados ao nitrogênio líquido.

Em alguns experimentos a cultura e os crioprotetores eram misturados à temperatura ambiente e preservados à temperatura de -25°C em um refrigerador comercial.

A descongelação do material preservado era feita através da técnica rápida, o material sendo transferido rapidamente da temperatura de estocagem para um banho-maria a 37°C . A percentagem de recuperação dos flagelados era determinada comparando-se o número de parasitas móveis determinado após descongelação com o número previamente observado na cultura antes da congelação, usando-se igualmente, como descrito, hemocitômetro ou "Coulter Counter".

Nas experiências que exigiam uma maior quantidade de material, a criopreservação era realizada usando-se os tubos de polipropileno nos quais era possível acondicionar cerca de 2 ml da suspensão de flagelados.

Crescimento e diferenciação em LIT dos flagelados antes e após a criopreservação

As experiências foram realizadas com 12 a 20 ml de culturas em fase exponencial de crescimento. Cerca de 6 a 10 ml da cultura eram congelados pelo método C e mantidos em nitrogênio líquido por períodos variáveis de tempo. Após a descongelação os parasitas eram centrifugados a 500g, por 10 minutos a 10°C ; descartado o sobrenadante, o sedimento era re-suspensão em meio LIT e novamente cultivado em frascos "Erlenmeyer" de 125 ml, tomando-se o cuidado de acertar a concentração de flagelados de modo a obter-se o mesmo número de parasitas/ml que o controle da experiência. A curva de crescimento e diferenciação era determinada a partir do segundo dia de cultivo, estendendo-se por 8–10 dias. O controle era representado pelas curvas de crescimento e diferenciação obtidas utilizando-se a outra metade da cultura original (6 a 12 ml), não congelada, submetida à mesma manipulação sofrida pelo material descongelado e semeada em LIT a partir do dia da congelação do material teste.

Infectividade e diferenciação em células de cultura de tecido

Foram utilizadas culturas das cepas Y e CL, recentemente isoladas do vertebrado, mantidas em "LIT" por 20 a 25 dias a 28° e então congeladas pelo método C. Os flagelados, após a descongelação, eram lavados duas vezes em solução de Hanks (500g, 4°C , 15 minutos) sendo em seguida resuspensos no meio de manutenção (TC 199) para cultura de tecido. Células "Vero" (American Type Culture Collection, Rockville, Md. EUA) mantidas no laboratório de Virologia do ICB/UFMG foram utilizadas nos testes de infectividade. Cerca de 200.000 a 300.000 tripomastigotas suspensos em 1 ml do meio de manutenção eram inoculados em tubos de rosca com lamínulas flutuantes, as quais continham aproximadamente 5 a 6×10^4 células "Vero" por lamínula. Após 24 horas a 33° e 37°C , os parasitas que não haviam penetrado eram removidos através de lavagem das células com Hanks, adicionando-se, a cada tubo 1 ml do meio de manutenção. No 3^o, 4^o, e 5^o dias de infecção, duas lamínulas eram retiradas, lavadas em solução salina fisiológica, fixadas em solução Bouin por 15 minutos e coradas segundo Brener et al (1976).

A percentagem de células infectadas era determinada contando-se o número total de células parasitadas e não parasitadas em 50 campos microscópicos (1.000 X). Apenas no 5^o dia de infecção determinávamos a percentagem de células infectadas apresentando tripomastigotas. Isto era feito contando-se 100 células parasitadas, sem seleção, para a cepa CL e 300 células para a Y, já que essa última induziu um baixo índice de infecção em todos os experimentos. Somente eram consideradas as células apresentando mais de 6 parasitas. Os resultados das experiências foram sempre a média de duas contagens em duas preparações, realizadas pelo mesmo observador.

Os controles consistiam em células "Vero" infectadas com formas de cultura não congeladas, a exemplo da metodologia descrita no item anterior referente a crescimento e diferenciação em meio acelular.

Inoculação em animais do material criopreservado

Foram empregados lotes de 6 camundongos albinos machos, 18 – 20g, provenientes do biotério do Centro de Pesquisas René Rachou. Foram usadas culturas das cepas *Y* e *CL*, recentemente isoladas e criopreservadas pelo método *C*. Cada animal recebia um inóculo, por via intraperitoneal, de 50.000 tripomastigotas obtidos de material descongelado, após períodos variáveis de estocagem. Os controles recebiam idêntico inóculo, usando-se a mesma suspensão de flagelados, obtida entretanto, antes de iniciado o processo de criopreservação. As curvas de parasitemia eram determinadas segundo a técnica de Brener (1961).

RESULTADOS

Taxas de recuperação: Não foram observadas, com todos os métodos empregados, diferenças significativas nas taxas de recuperação obtidas com as diferentes cepas usadas. Com exceção do método *A*, no qual as taxas de recuperação foram mais altas com DMSO (70.0–76.3%) do que com o glicerol (44.5–50.5%), as duas substâncias crioprotetoras forneceram resultados semelhantes. Em relação aos diferentes processos de criopreservação, observou-se que com o método *D* a recuperação dos flagelados foi nula, não se detectando parasitas viáveis. A preservação dos flagelados a -25°C forneceu baixas recuperações, sendo as taxas obtidas inferiores a 20% entre 3 e 30 dias de observação, reduzindo-se a 0% aos 60 dias. Com o método *B*, as percentagens de recuperação variaram entre 48.5 a 70.5%.

Os melhores e mais consistentes resultados foram obtidos com os métodos *C* e o de congelação gradual (*E*) sendo que taxas de recuperação entre 60.0–80.0% foram obtidas com as cepas *Y*, *CL* (Fig. 1) e *FL*. Resultados semelhantes ao método *C* foram observados com o material congelado e estocado à temperatura de -75°C em "deep-freezer", não havendo diferenças significativas no material recuperado após estocagem a -196°C ou -75°C .

Crescimento e diferenciação: Curvas de crescimento e diferenciação foram obtidas com formas de cultura não preservadas e com flagelados recuperados após 7 dias, 15 dias e 7 meses de congelação (método *C*). Essas curvas mostraram configuração similar embora, em algumas experiências, as percentagens de crescimento e diferenciação tenham sido um pouco menores no material descongelado (Figs. 2, 3). De um modo geral, entretanto, as características das culturas, no que se refere à sua multiplicação e capacidade de originar tripomastigotas metacíclicos, foram mantidas após a sua estocagem a -196°C .

Inoculação em animais: Todos os camundongos inoculados com parasitas criopreservados pelo método *C* apresentaram parasitemia patente, demonstrando a persistência da infectividade dos tripomastigotas preservados. As configurações das curvas de parasitemia foram também similares, sobretudo aquelas obtidas com a cepa *CL* (Fig. 4).

Infectividade para cultura de tecido: A percentagem de células "Vero" infectadas por culturas da cepa *CL* criopreservadas mostrou-se bastante semelhante à obtida com parasitas não congelados nas temperaturas de 33°C e 37°C . Não houve igualmente, no processo de transformação amastigota-tripomastigota, diferenças essenciais: com ambas as suspensões de flagelados esse processo ocorreu normalmente a 33°C , sendo fortemente inibido a 37°C (Fig. 5).

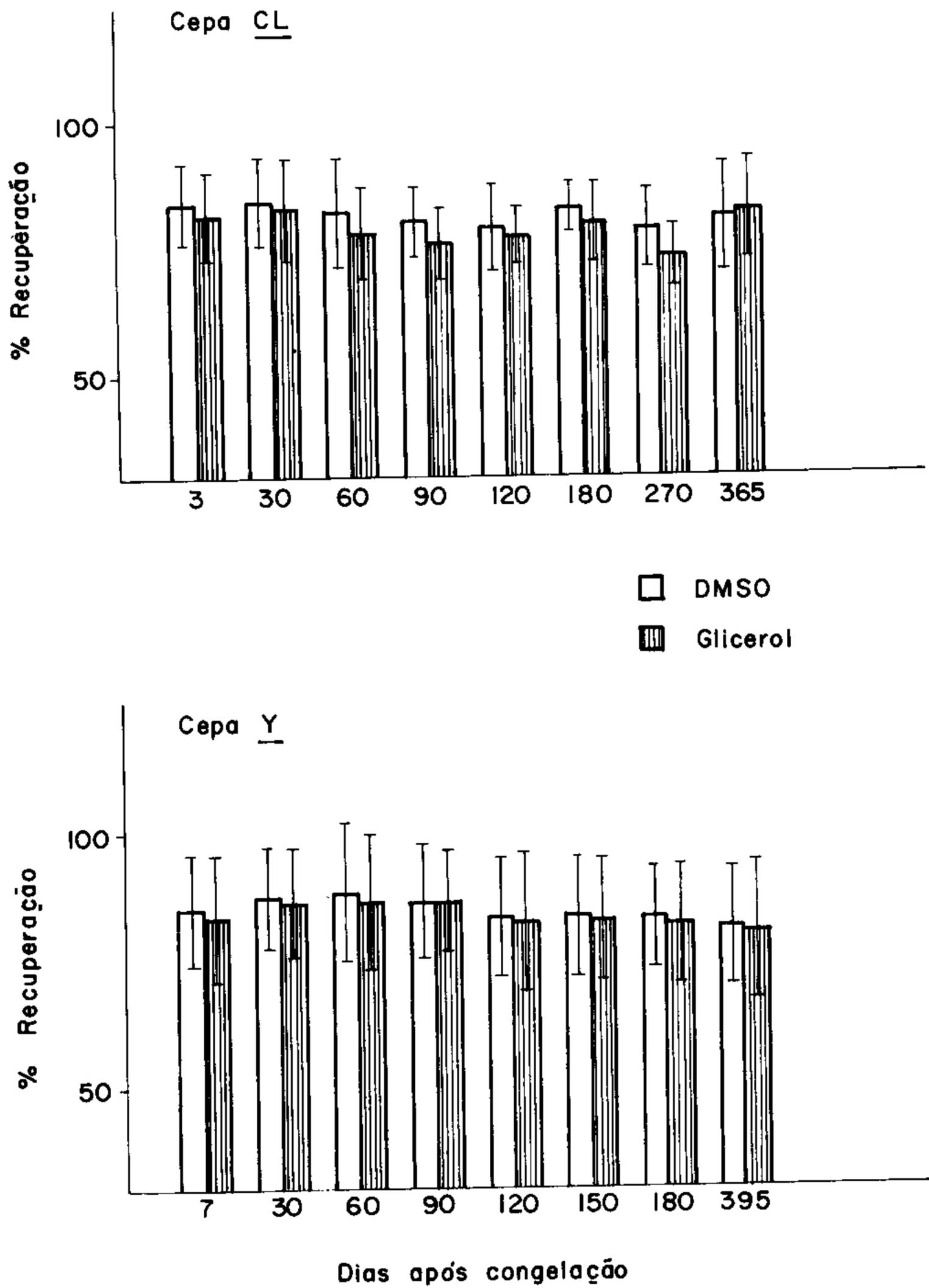


Fig. 1 Percentagens de recuperação de formas de cultura do *T. cruzi* (cepa CL) congeladas pelo método C e descongeladas após diferentes períodos.

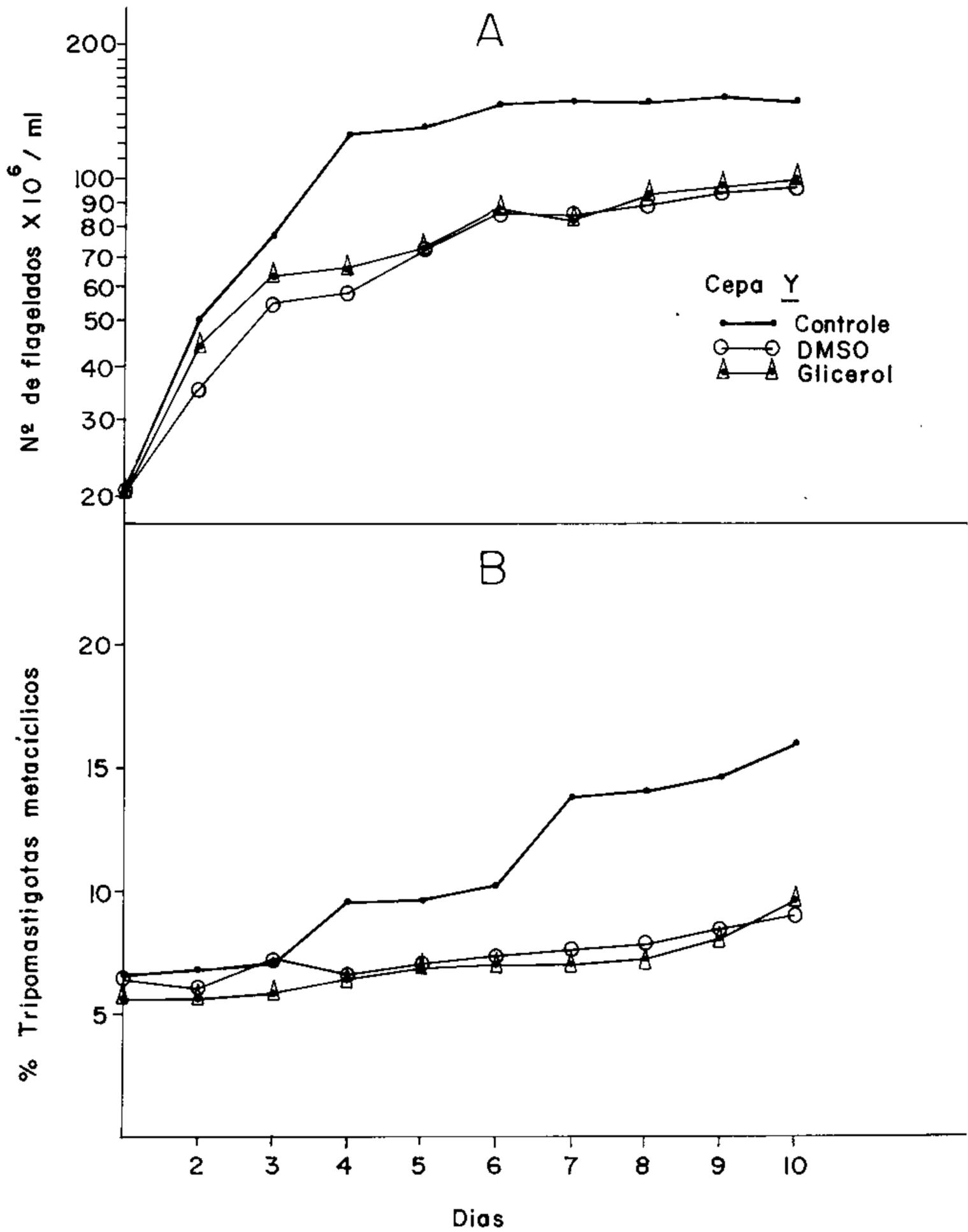


Fig. 2 – Curvas de crescimento (A) e diferenciação (B) de formas de cultura do *T. cruzi* (cepa Y) congeladas pelo método C por um período de sete meses.

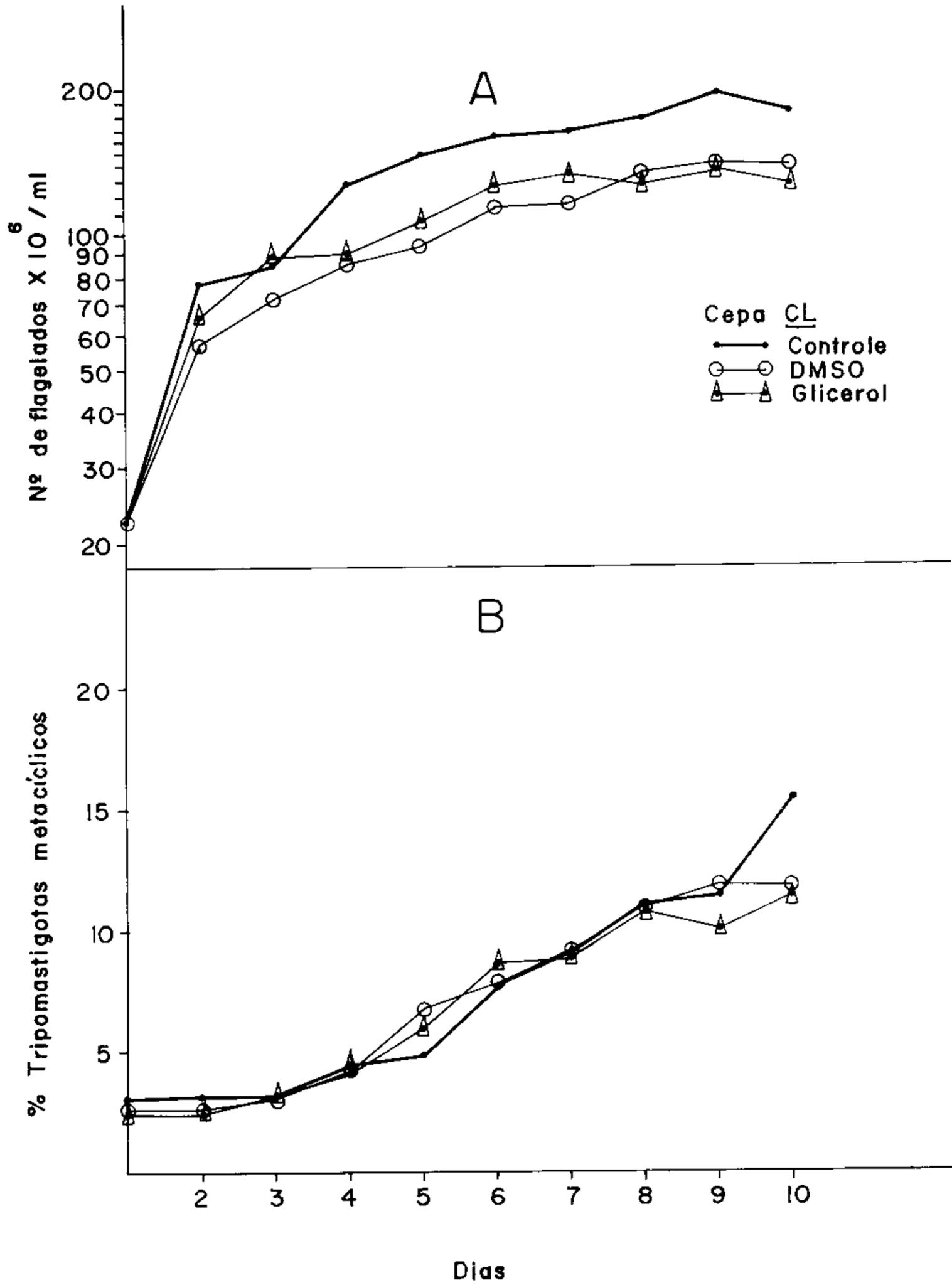


Fig. 3 – Curvas de crescimento (A) e diferenciação (B) de formas de cultura do *T. cruzi* (cepa *CL*) congeladas pelo método *C* por um período de sete meses.

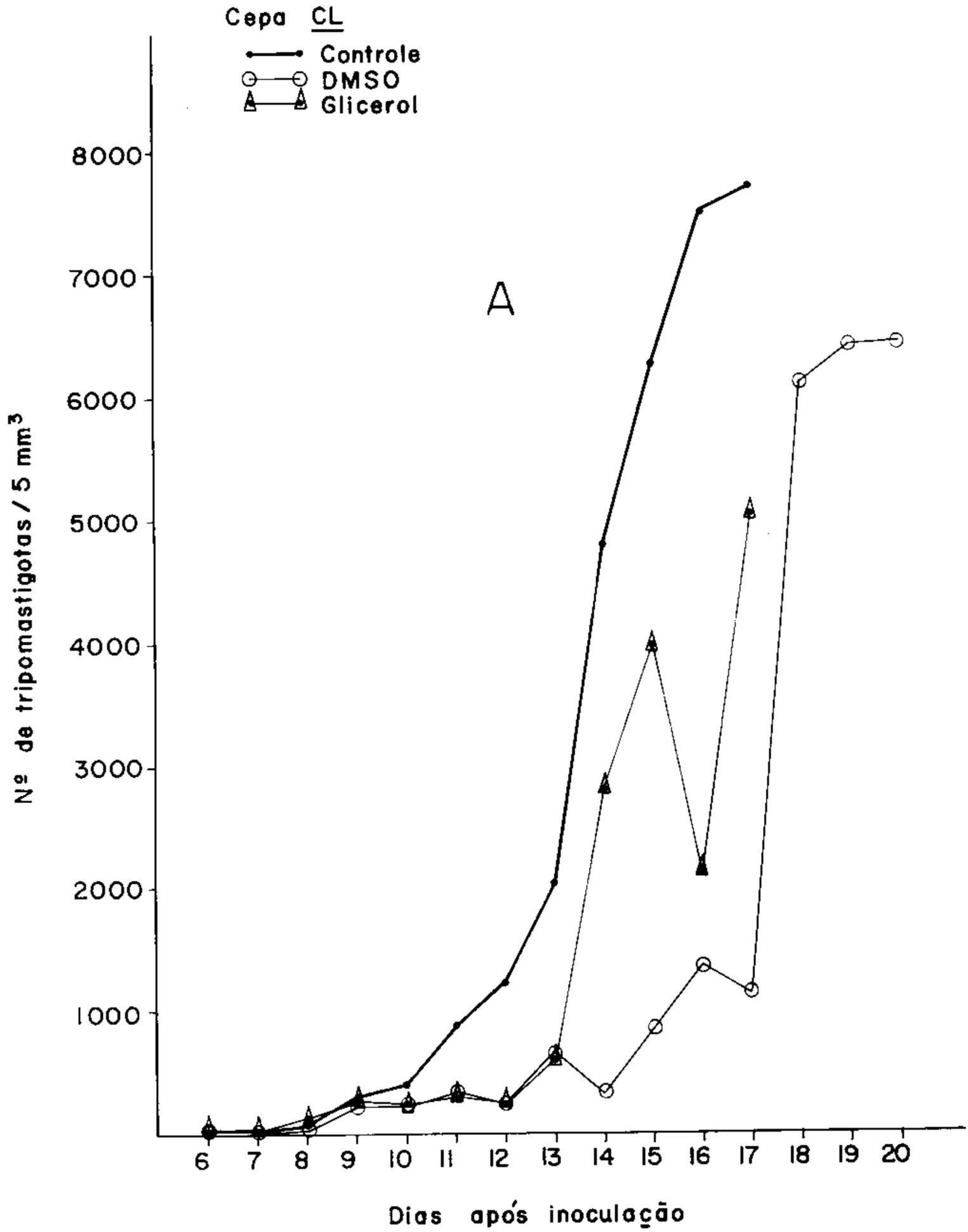


Fig. 4 – Curvas de parasitemia em camundongos inoculados com 5×10^4 tripomastigotas metacíclicos obtidos de formas de cultura do *T. cruzi* (cepa *CL*) congeladas pelo método *C* e criopreservadas por um período de quinze dias.

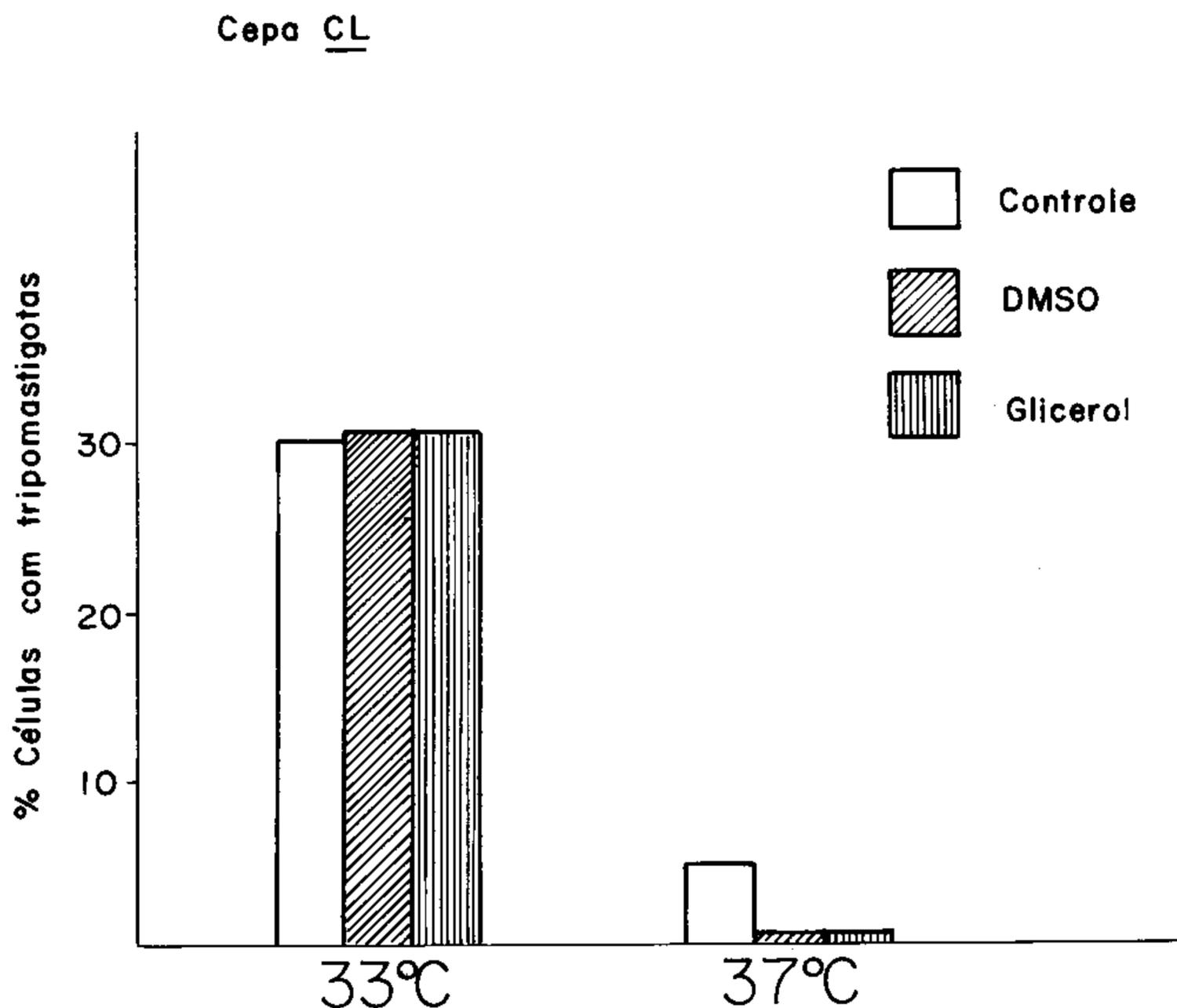


Fig. 5 – Percentagem de células “Vero” apresentando tripomastigotas no 5º dia de infecção por formas de cultura de *T. cruzi* (cepa *CL*) congeladas pelo método *C* e criopreservadas por um período de quinze dias.

DISCUSSÃO

De um modo geral, não foram observadas diferenças fundamentais entre o glicerol e DMSO como agentes crioprotetores em relação às formas de cultura do *T. cruzi*, a não ser quando, com o método *A*, melhores resultados foram obtidos com o DMSO. Isso se explica pelo fato de que, como já foi assinalado com *Trichomonas foetus* (Fitzgerald & Levine, 1961) e formas sangüíneas do *T. cruzi* (Filardi & Brener, 1975), o glicerol exerce uma ação tóxica à temperatura de 4°C. Não foram igualmente observadas diferenças significativas nas taxas de recuperação entre as diferentes cepas de *T. cruzi* utilizadas.

Taxas de recuperação altas e consistentes foram obtidas com o método *C*, o processo *E* de congelação gradual e a estocagem em “deep-freezer” a –75°C. Como a congelação gradual é mais laboriosa e demorada, e como a estocagem a –75°C em “deep-freezer” envolve o risco da ocorrência de falhas mecânicas tão comuns em nosso meio, a nossa tendência tem sido a de usar o processo *C*. Uma alternativa seria representada pela estocagem a –75°C em gelo seco, cuja praticabilidade também é discutível nas nossas condições. Outros processos, tais como a introdução direta do material em nitrogênio líquido e a criopreservação a –25°C mostraram-se, a exemplo da experiência com outros parasitas, impróprios para preservação das formas de cultura do *T. cruzi*.

A estabilidade das características das culturas criopreservadas foi também investigada. Embora Allain (1964) e Engel et al (1979) tenham demonstrado que as formas de cultura do *T. cruzi* criopreservadas por diferentes períodos de tempo cresceram bem em meios de cultura, as condições em que esse crescimento se processava não foram investigadas. Na nossa experiência, tanto as características do crescimento quanto da diferenciação em tripomastigotas metacíclicos em meio líquido não foram sensivelmente alteradas, uma evidência de que o processo de congelamento não induziu injúria apreciável nos parasitas. Conclusão semelhante pode ser alcançada pelos dados de inoculação em animais, os quais mostraram que a criopreservação não afetou a infectividade dos parasitas. Em relação à parasitemia, os animais inoculados com formas de cultura congeladas da cepa Y apresentaram número de parasitas, em relação aos controles, algo inferior ao obtido com a cepa CL, fato que, aparentemente, se insere no conjunto de diferenças intraespecíficas, já assinaladas em relação a essas duas populações do *T. cruzi*.

As observações realizadas em cultura de tecido confirmam, a nível celular, a manutenção da infectividade das formas de cultura criopreservadas. Entretanto, o aspecto mais interessante refere-se ao processo de diferenciação intracelular neste material. Brener et al (1976) já haviam demonstrado que, em células "Vero" infectadas pela cepa CL do *T. cruzi*, a transformação amastigota-tripomastigota era marcadamente inibida a 37°C, processando-se normalmente a 33°C. No nosso material essa inibição da diferenciação foi observada, na mesma proporção, nos parasitas criopreservados e naqueles não submetidos ao congelamento, demonstrando que esse caráter fenotípico ligado a uma termosensitividade seletiva não foi alterado pela estocagem a baixa temperatura. Romanha et al (1980), por outro lado, já haviam repetidamente demonstrado que outra característica intrínseca das cepas, ou seja, o perfil isoenzimático, não é alterado pelo processo de congelamento e estocagem prolongada em nitrogênio líquido. Esse conjunto de observações sugere que a criopreservação realmente não afeta significativamente a sobrevivência e características biológicas das formas de cultura do *T. cruzi*, podendo ser usada na rotina de manutenção deste parasita em laboratório.

SUMMARY

A systematic study of the cryopreservation of *T. cruzi* culture forms was performed using different parasite strains and freezing methods. The recovery rates with some of the methods as evaluated by motility of the thawed parasites were fairly high (60–80%). The following aspects have been used to investigate the stability of the parasites' biological characteristics after cryopreservation: growth and differentiation in acellular medium, infectivity to tissue culture "Vero" cells, intracellular differentiation and infectivity to animals. Those characteristics had not been significantly changed by the cryopreservation procedures.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLAIN, D.S., 1964. Evaluation of the viability and pathogenicity of hemoflagellates after freezing and storage. *J. Parasitol.* 50 :604-607.
- BRENER, Z., 1961. *Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas*. Tese à Docência Livre da Cadeira de Parasitologia. Universidade Federal de Minas Gerais, 79 pp.
- BRENNER, Z. & CHIARI, E., 1963. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 5 :220-224.
- BRENER, Z.; GOLGHER, R.R.; BERTELLI, M.S.M. & TEIXEIRA, R.J., 1976. Strain-dependent thermosensitivity influencing intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi* in cell culture. *J. Protozool.* 23 :147-150.
- CAMARGO, E.P., 1964. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi* I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 6 :93-100.
- ENGEL, J.C.; PEREZ, A.; ABRAMO, L. & MARTINI, G.W., 1979. Criopreservacion del *Trypanosoma cruzi*. Enfermedad de Chagas. V Reunion Anual, Rosario, Santa Fé, Argentina.
- FILARDI, L.S. & BRENER, Z., 1975. Cryopreservation of *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms. *J. Protozool.* 22 :398-401.
- FILARDI, L.S. & BRENER, Z., 1980. Dados não publicados.
- FITZGERALD, P.R. & LEVINE, N.D., 1961. Effect of storage temperature, equilibration time, and buffers on survival of *Tritrichomonas foetus* in the presence of glycerol at freezing temperatures. *J. Protozool.* 8 :21-27.
- PEREIRA DA SILVA, L.H. & NUSSENZWEIG, V., 1953. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo albino. *Folia Clin. Biol.* 20 :191-207.
- ROMANHA, A.J.; SILVA PEREIRA, A.; CHIARI, E. & DIAS, J.C.P., 1980. Dados não publicados.
- SANTOS, R.R.; GAL FURTADO, C.C. VON; MARTINS, J.B. & MARTINS, A.C.P., 1978. Avaliação da influência da criopreservação a -196°C na capacidade "vaccínica" da amostra PF do *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Bras. Pesq. Med. e Biol.* 11 :99-104.