

CRIOPRESERVAÇÃO DE TROFOZOÍTOS DE *Trichomonas gallinae*

BRUNA BACCEGA¹ YAN WAHAST ISLABÃO²; CAROLINA CAETANO SANTOS³; NARA AMÉLIA DA ROSA FARIAS⁴; MARCOS MARREIRO VILLELA⁵; CAMILA BELMONTE OLIVEIRA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – brubaccega@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – yanwahast06@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – carol_cssantos@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – naraameliafarias@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – marcosmvillela@bol.com.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – camilabelmontevet@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Trichomonas gallinae, é um organismo eucariota, com distribuição mundial. O parasito aloja-se no aparelho digestivo superior e, ocasionalmente, no trato respiratório de uma grande variedade de aves, principalmente na ordem Columbiformes e Falconiformes (ROUFFAER et al., 2014). O ciclo biológico do parasito é direto (COOPER, 2002), sendo o organismo transmitido de um hospedeiro para outro (FORRESTER & FOSTER, 2009) sem o envolvimento de hospedeiros intermediários ou paratênicos (COLE, 1999).

A criopreservação consiste na manutenção de uma variedade de microrganismos sob baixas temperaturas, tendo como principal objetivo a redução de métodos que minimizem danos aos materiais biológicos, durante o processo de congelamento e estocagem a frio (COSTA et al., 2009).

Diante da necessidade de utilização dos agentes crioprotetores, muitos estudos têm sido desenvolvidos na busca de otimizar a escolha de diferentes crioprotetores, diferentes concentrações, relação do tempo e da temperatura para sua adição durante o processo de congelamento e até mesmo quanto a possível toxicidade que estes agentes podem oferecer ao material biológico a ser conservado (COSTA et al., 2009; CASTRO et al., 2011).

Com o objetivo de manter isolados de trofozoítos de *T. gallinae* viáveis por um maior período de tempo em laboratório, este estudo avaliou a viabilidade dos protozoários isolados de pombos naturalmente infectados após processo de criopreservação com glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol e propilenoglicol a 10%, sob freezer (-20°C) nitrogênio (-196°C), ultra freezer (-80°C), avaliados nos tempos de 2, 15, 30, 60 e 90 dias.

2. METODOLOGIA

Foram utilizadas amostra de *T. gallinae* isolada de pombos domésticos (*C. livia*) naturalmente infectados do município de Pelotas, obtida por meio de swab oral, acrescido em meio TYM: Trypticase- Yeast Extract- Maltose (Diamond, 1957) pH 7,2, com 1ml de soro bovino adulto, 300 µl de antibiótico e 40µl de antifúngico, e incubados a 37°C em aerobiose por 48 horas.

Os crioprotetores utilizados foram: dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol, propileno glicol e glicerol, na concentração de 10%. Para a realização do experimento foram utilizados 10 criotubos para cada crioprotetor.

Os trofozoítos utilizados foram isolados de de cultivos de 24 horas, obtidos pela centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos, com a quantidade de 1×10⁵ trofozoítos/mL em meio TYM suplementado com soro bovinos estéril e antibiótico meropeném. Para as leituras serão retirados 2 criotubos de cada método de

congelamento utilizado (freezer, ultrafreezer e nitrogênio) nos seus respectivos tempos determinados.

Após a realização do alíquotamento dos crioprotetores e trofozoítos, os criotubos foram acondicionados diretamente em freezer comum (-20°C) e ultrafreezer (-80°C). Já os criotubos que foram alocados em nitrogênio foram previamente congelados no vapor do líquido a -45°C por 10 minutos, e posteriormente para o nitrogênio líquido a -196°C .

Para a primeira avaliação da viabilidade do congelamento (após 48 hs), se realizou o descongelamento com o auxílio de água aquecida (25°C) de dois criotubos de cada crioprotetor ($n=8$). Os quais foram examinados ao microscópio óptico (40X) para verificação da motilidade dos protozoários. Uma alíquota de 100mL foi repicada em caldo TYM a 37°C em aerobiose por 48 horas para observação da viabilidade, através da multiplicação dos trofozoítos. Por fim, os mesmos parâmetros de avaliação da amostra foram realizados em 15, 30 e 60 dias.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação do crioprotetor etilenoglicol, realizada em dois, 15, 30, e 60 dias, após o descongelamento, pode-se observar um grande número de formas viáveis com motilidade ao exame microscópico, bem como o crescimento de trofozoítos após o cultivo das amostras (48hs). Isso sugere que os micro-organismos continuaram viáveis nos intervalos de tempo testados em freezer (70%) e ultrafreezer (90%) sob este crioprotetor.

Os criotubos que foram preservados com propilenoglicol apresentaram resultados semelhantes ao etilenoglicol na criopreservação em ultrafreezer (80%) nos diferentes tempos testados, e sob o congelamento em freezer obtivemos resultados diferentes. Na leitura em dois e 15 dias, podemos observar 30% de formas viáveis, e após 48 horas esse resultado se manteve. Após 30 e 60 dias os criotubos quando descongelados e observados (48hs) em microscópio apresentaram poucas formas viáveis e com baixa motilidade (10%).

Na criopreservação com o crioprotetor DMSO na leitura realizada em dois e 15 dias observou-se 40% de formas viáveis e com boa motilidade. Para as leituras em 30 e 60 dias, pode-se observar que o número de trofozoítos era menor e com baixa motilidade (10%) em ultrafreezer.

DMSO quando utilizado para a criopreservação do trofozoítos sob o congelamento em freezer, nas leituras realizadas em dois e 15 dias 20% de formas viáveis foram visualizadas em microscópio. Na leitura em 30 e 60 dias, verificou-se que a quantidade de trofozoítos apresentou-se baixíssima e com pouca motilidade (1%).

Sob o crioprotetor glicerol na leitura em dois, 15 e 30 dias foram observadas formas viáveis com motilidade (50%), e em 48 horas, houve um leve crescimento (70%). Na leitura em 60 dias foram observados poucos trofozoítos viáveis e com baixa motilidade (20%), sob congelamento de ultrafreezer.

Trofozoítos criopreservados com glicerol, sob o congelamento em freezer apresentaram positividade de 20% na leitura em dois dias, e quando observados em 15, 30 e 60 dias o número de formas viáveis ocorreu uma grande redução (1%), com pouca motilidade.

Sob o congelamento em nitrogênio, na leitura em dois dias, com o crioprotetor DMSO não se observou trofozoítos viáveis. Com glicerol, propilenoglicol e etilenoglicol visualizaram-se poucos trofozoítos, apresentando pouca motilidade (1%), e após 48 horas, nenhuma forma viável foi visualizada.

Quando realizada as leituras nos outros tempos determinados, não se obteve êxito, pois não haviam trofozoítos viáveis e móveis. Acredita-se que o mesmo deve ter um congelamento diferenciado, para que não ocorra o rompimento dos trofozoítos.

O estudo realizado por Campero (1989) com *Trichomonas foetus*, difere do nosso trabalho, o qual pode observar que foram preservados com sucesso trofozoítos sob nitrogênio líquido a -196°C na presença de 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), recuperando 65 a 85% dos parasitos, respectivamente.

Uga & Matsumura (1979) criopreservaram *Trichomonas vaginalis* em nitrogênio líquido, utilizando glicerina e DMSO, os quais, demonstraram 60% de viabilidade dos trofozoítos em DMSO. Os resultados encontrados neste estudo diferem ao de Matsuo (2007) em um experimento de congelamento rápido de sedimentação para *Trichomonas vaginalis*, utilizou como crioprotetores, DMSO, etilenoglicol, propilenoglicol e glicerol. Destes, o DMSO apresentou um alto efeito protetor, com um efeito máximo na concentração de 20%.

McEntegart (1954) criopreservou quatro espécies de *Trichomonas*: *T. foetus*, *T. vaginalis*, *T. hominis* e *T. gallinae* com glicerol e verificou que o congelamento rápido, causou uma maior destruição dos trofozoítos, no que foi utilizado o protocolo de resfriamento lento. Lumsden et al. (1966) também relataram que o protocolo de congelamento rápido, com DMSO, glicerol ou polivinilpirrolidona 10%, ocorrendo também a degradação dos trofozoítos. Em nosso estudos crioprotetores etilenoglicol e propilenoglicol sob criopreservação rápida obtiveram resultados positivos neste estudo.

Levine et al. (1962) mantiveram organismos viáveis por três meses na presença de glicerol a -28°C e -95°C , e observaram que a porcentagem de sobreviventes e a motilidade dos mesmos foi melhor após armazenamento a -95°C , o que corrobora com os achados neste estudo, quando comparados com o etilenoglicol sob o congelamento em ultrafreezer, mostrando-se um método eficaz para a preservação de trofozoítos de *T. gallinae*, permitindo comparações de características biológicas e bioquímicas de inúmeras cepas, que podem ser comparadas simultaneamente e proporcionando segurança contra a perda causada por contaminação, acidentes e eliminando possíveis problemas de mudança de patogenicidade e caráter antigênico durante repetidos subcultivos *in vitro*.

4. CONCLUSÃO

De acordo com nossos resultados prévios, os crioprotetores etilenoglicol e propilenoglicol apresentaram efetividade na criopreservação de trofozoítos de *T. gallinae* sob o congelamento em freezer e ultrafreezer. Sob os crioprotetores DMSO e glicerol poucas formas viáveis foram observadas pós- descongelamento. Na análise do congelamento sob nitrogênio não foi obtido nenhum resultado positivo na criopreservação, o qual os trofozoítos não apresentaram viabilidade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAMPERO, C.M. Use of DMSO for the cryopreservation of *Trichomonas foetus* in liquid nitrogen. **Veterinary Parasitology**, v.31, n.3-4, p.339-343, 1989.

CASTRO, S. V.; CARVALHO, A. A.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Agentes crioprotetores intracelulares:

características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 39, n.2, p. 1-18, 2011.

COLE, R.A. Trichomonosis. In: Friend, M. & Franson, J.C.; **Field Manual of Wildlife Diseases, General Field Procedures and Diseases of Birds**. Madison, Wisconsin: U.S. Geological Survey, Biological Resource Division, National Wildlife Health Center, 1999. Cap. 4, p.201-206.

COOPER, J.E. Parasitic Diseases, In: Krone, O. & Cooper, J.E.; **Birds of Prey: Health and Disease**. Oxford: Blackwell Science, 2002. Cap. (7), p. 110-112.

COSTA, E. C.; TEIXEIRA, M. F. S.; DANTAS, T. V. M.; MELO, V. S. P.; ARAUJO, S. A. C.; ROLIM, B. N. Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. **Ciência Animal**, Goiânia, v. 19, n. 2, p.111-122, 2009.

DIAMOND, L.S. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. **Journal of Parasitology**, v. 43, n.4, p.488-499, 1957.

FORRESTER, D.J. & FOSTER, G.W. (2009). Trichomonosis. In: Atkinson, C.T., Thomas, N.J. & Hunter, D.B. **Parasitic Diseases of Wild Birds**. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2009. Cap. 2, p. 120-153.

LEVINE, ND.; ANDERSEN, F.L.; LOSCH, M.B.; NOTZOLD, R.A.; MEHRA K.N. Survival of *Trichomonas foetus* stored at -28 and -95 degrees C after freezing in the presence of glycerol. **Journal of Protozoology**, v. 9, n.3, p.347-350, 1962.

LUMSDEN, W.H.R., ROBERTSON, D.H.H. AND MCNEILLAGE, G.J.C., Isolation, cultivation, low temperature preservation and infectivity titration of *Trichomonas vaginalis*. **Br. J. Vener. Dis.**, v.42, n.1, p. 145-154. 1966.

MATSUO, J. A simple and rapid method for cryopreservation of *Trichomonas vaginalis*. **Parasitology Research**, v.101,n. 4, p.907-911, 2007.

McENTEGART MG. The maintenance of stock strains of trichomonads by freezing. **J Hyg (Lond)** v.52, n. 4; p 545–550, 1954.

ROUFFAER, L., ADRIAENSEN, C., DE BOECK, C., CLAEREBOUT, E., & MARTEL, A. Racing Pigeons: A Reservoir for Nitro-Imidazole- Resistant *Trichomonas gallinae*. **The Journal of Parasitology**, 100: 360-363, 2014.

UGA, S. MATSUMURA, T. Studies on the cryopreservation of, effects of cryoprotective agent and "seeding" of ice, Jpn. **J. Parasitol.** v.28, n.1, p.421–426, 1979.