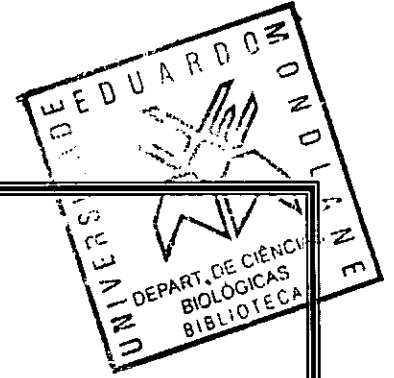


B10-14



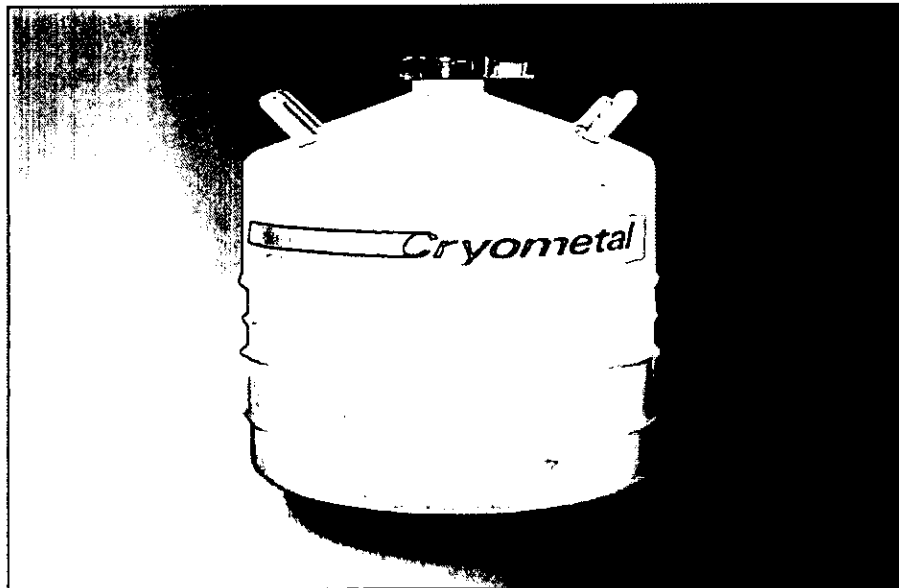
UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE

Faculdade de Ciências

Departamento de Ciências Biológicas

Trabalho de Culminação de Estudos

Tema: Avaliação de Diferentes Métodos de Criopreservação de *Trypanosoma congolense* em Nitrogénio Líquido



Autor: Khalid Issufo Esmail Azam

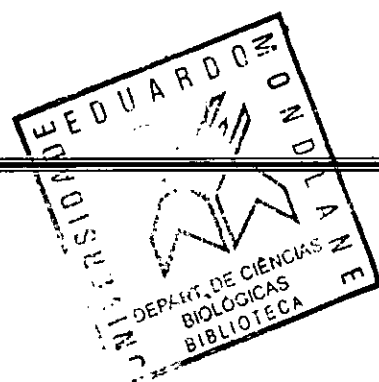
Maputo, Janeiro de 2008



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE

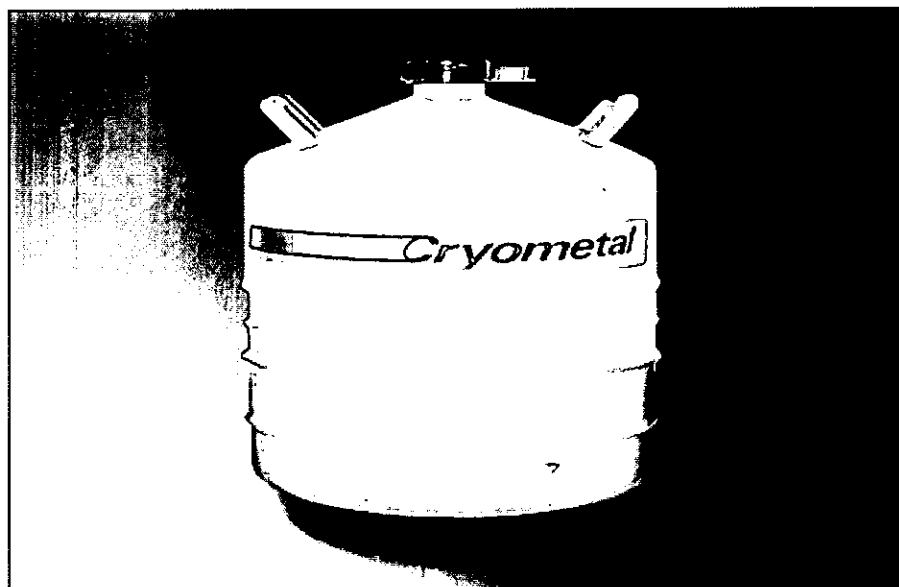
Faculdade de Ciências

Departamento de Ciências Biológicas



Trabalho de Culminação de Estudos

Tema: Avaliação de Diferentes Métodos de Criopreservação de *Trypanosoma congolense* em Nitrogénio Líquido



Supervisores:
Dr. Luís Neves
dra. Cristina Beatriz
dra. Paula Macucule

Autor: Khalid Issufo Esmail Azam

Maputo, Janeiro de 2008

Agradecimentos

- Agradeço à Allah, o criador do céu e da terra e de tudo que neles existe, por tudo que me tem dado na vida.
- Aos meus supervisores, dra. Cristina Beatriz, dra. Paula Macucule e Dr. Luís Neves, pelo apoio, conhecimentos e confiança que me deram durante toda a fase de elaboração deste trabalho. Muitíssimo obrigado! Admiro muito a vossa força e vontade de trabalhar.
- À minha mãe, Maria Cristina Simões, que me trouxe ao mundo e desde cedo incutiu em mim a vontade de estudar. Sei que estas feliz e orgulhosa de mim. Não há palavras no mundo para agradecer alguém tão especial como tu. Obrigado por tudo.
- Aos meus irmãos, Naila, Rosemin, Yassin e Haniched, que desde sempre foram e têm sido a minha grande fonte de inspiração. Obrigado pela força, amizade e carinho.
- Ao meu padrasto José Minória, tios e cunhados. Obrigado pelo apoio.
- À Jamila, pela companhia e amizade durante a formação académica.
- Aos meus amigos Roques, Momed, Ivan e especialmente ao Razul, a quem considero um irmão.
- Ao pessoal do laboratório, particularmente ao Sr. Basílio e a dona Olga e, à todos aqueles que directa ou indirectamente contribuíram na realização deste trabalho.
- Por último, aos murganhos, que com suas vidas contribuíram para que este trabalho se tornasse possível.



Dedicatória

Dedico este trabalho à minha querida mãe **Maria Cristina Simões**, a quem considero melhor mãe do mundo e, em memória, ao meu pai **Issufo Esmail Azam**.

Declaração de Honra

Declaro por minha honra, que o presente trabalho foi por mim elaborado, que os resultados colhidos e as bibliografias consultadas são dignos e reais.

Khalid Issufo Esmail Azam
Khalid Issufo Esmail Azam

Resumo

Os membros do género *Trypanosoma* são parasitas comuns dos grandes grupos de vertebrados. Em geral, os tripanossomas estão bem adaptados aos seus hospedeiros e não causam danos apreciáveis, todavia, o grupo que parasita mamíferos é pouco adaptado, causando comumente doenças – as tripanossomoses. O *T. congolense* é uma espécie de tripanossoma amplamente distribuída em África e uma das mais prevalentes, infectando um elevado número de animais domésticos. Por essa razão, tem sido alvo de uma intensa investigação científica, o que torna imprescindível a sua constante disponibilidade nos laboratórios de todos os países que se dedicam ao seu estudo.

Os métodos convencionais para a propagação e preservação de microorganismos parasitas *in vivo*, ou *in vitro*, têm algumas limitações que incluem a necessidade de laboratórios, isolamento inicial e perda de linhagem, contaminação bacteriana e fúngica e mudanças nas características originais biológicas e metabólicas. Essas desvantagens podem ser ultrapassadas se o método de preservação for a criopreservação, que é uma técnica de conservação em nitrogénio líquido.

O propósito do presente trabalho foi de avaliar diferentes métodos de criopreservação de *T. congolense* em nitrogénio líquido através da combinação dos seguintes factores: velocidades de congelamento (2 e 27,5°C/min), tipos de crioprotectores (glicerol, dimetil sulfoxido e polivinilpirrolidona) e concentrações de cada crioprotector (8 e 10%). $2 \times 3 \times 2 = 12 \text{ perf's}$

Após o congelamento dos tripanossomas e 25 dias de armazenamento no nitrogénio líquido (-196°C), determinou-se *in vivo* em murganhos, a eficácia de cada velocidade de congelamento, tipo e concentração de crioprotector. Os resultados mostraram que, apesar de não ter havido diferença significativa entre as duas velocidades testadas, 2°C/min foi bastante eficaz para conservar o *T. congolense* e que, dos três crioprotectores avaliados, o glicerol (em ambas concentrações) mostrou um alto efeito de crioprotecção.

Como assim?

~~_____~~
/
nó significa
no tipo que os
ou tem

Lista de Figuras

Figura 1. Representação esquemática da distribuição de sangue dum isolado e os tipo e concentração dos crioprotectores nos tubos criogénicos.

Figura 2a. Parasitémia estimada no sangue, antes da adição dos crioprotectores, em amostras criopreservadas pelo congelamento rápido.

Figura 2b. Parasitémia estimada nas amostras pelo congelamento rápido, após a adição dos diferentes tipos e concentração dos crioprotectores.

Figura 3a. Parasitémia estimada no sangue, antes da adição dos crioprotectores, em amostras criopreservadas pelo congelamento lento.

Figura 3b. Parasitémia estimada nas amostras criopreservadas pelo congelamento lento, após a adição dos diferentes tipos e concentração dos crioprotectores.

Figura 3a. Parasitémia estimada nas amostras dos dois isolados criopreservados pelo congelamento rápido.

Figura 3b. Parasitémia estimada nas amostras dos dois isolados criopreservados pelo congelamento lento.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Quantificação de tripanossomas no controlo de parasitémia.

Tabela 2. Forma de distribuição dos tubos criogénicos durante a criopreservação.

Tabela 3. Infectividade de *Trypanosoma congolense* criopreservado a diferentes velocidades de congelamento, tipos e concentrações de crioprotectores.

Lista de Abreviaturas

ADN – Ácido desoxirribonucleico.

DMSO – Dimetil sulfóxido.

INIVE - Instituto Nacional de Investigação Veterinária.

PBS - Tampão salino fosfato.

PVP – Polivinilpirrolidona.

rpm - Rotações por minuto.

SPSS - Programa estatístico para Ciências Sociais.

UEM - Universidade Eduardo Mondlane.

Lista de Anexos

A. Preparação de PBS.

B1. *Teste-t* para a comparação entre as velocidades de congelamento.

B2. ANOVA e LSD na eficácia entre os três crioprotectores.

B3: *Teste-t* na comparação entre as duas concentrações dos crioprotectores.

B4: *Teste-t* na comparação entre os isolados.

B5. ANOVA na interacção entre as variáveis

ÍNDICE

Conteúdo	Páginas
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Os tripanossomas	3
2.2. Criopreservação: conceito e contexto histórico	4
2.3. Métodos e velocidades de congelamento	5
2.4. Crioprotectores e suas concentrações	6
2.5. Vantagens e desvantagens da criopreservação	7
3. OBJECTIVOS	9
3.1. Objectivo geral.....	9
3.2. Objectivos específicos	9
4. LOCAL DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO.....	10
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
5.1. Animais e parasitas	10
5.2. Controlo de parasitémia.....	10
5.3. Crioprotectores e diluente.....	11
5.4. Colecta e preparação do sangue parasitado	12
5.5. Avaliação <i>in vitro</i> da viabilidade dos tripanossomas após a adição dos crioprotectores	13
5.6. Congelamento e armazenamento em nitrogénio líquido	13
5.7. Descongelamento das amostras	15
5.8. Teste de viabilidade <i>in vitro</i> dos tripanossomas após a criopreservação.....	15
5.9. Teste de infectividade dos tripanossomas	15
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	16
7. RESULTADOS	17
7.1. Viabilidade <i>in vitro</i> dos tripanossomas após a adição dos crioprotectores	17
7.2. Viabilidade <i>in vitro</i> dos tripanossomas após a criopreservação	19
7.3. Infectividade dos tripanossomas em murganhos	21

8. DISCUSSÃO	23
8.1. Efeitos da adição de crioprotectores na viabilidade dos tripanossomas	23
8.2. Viabilidade dos tripanossomas após a criopreservação	24
8.3. Velocidade de congelamento	25
8.4. Crioprotector e concentração ideal	25
9. CONCLUSÃO	27
10. RECOMENDAÇÕES	28
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
12. ANEXOS	35

1. INTRODUÇÃO

Os tripanossomas são protozoários parasitas ^{que parasitam} de todas as classes de vertebrados: peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos. Em geral, os tripanossomas estão bem adaptados aos seus hospedeiros e não causam danos apreciáveis, todavia, o grupo que parasita ^o mamíferos é pouco adaptado, causando comumente doenças – as tripanossomoses (Connor, 1994). As tripanossomoses encontram-se entre as 10 zoonoses mais importantes juntamente com o antrax, tuberculose bovina, cisticercose e outras; e entre as 20 doenças mais importantes de acordo com seu impacto na pobreza (Perry *et al.*, 2002 citados por Silva *et al.*, 2002).

Em África, cerca de 10 milhões de Km² envolvendo 37 países são infestados pelas moscas tsé-tsé, o vector da doença (Uilenberg, 1998). Segundo Kettle (1995), os tripanossomas africanos das espécies *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma congolense* e *Trypanosoma vivax* são os mais patogénicos. Em Moçambique, a tripanossomose afecta cerca de 75% do território e, a espécie de tripanossoma mais comum é a *T. congolense*. Os casos actuais tendem a ser elevados nas províncias de Zambézia, Manica e Tete (Jamal, 2005).

O crescente interesse científico no tema geral dos tripanossomas, torna imprescindíveis a sua disponibilidade nos laboratórios que se dedicam ao seu estudo. Este facto, leva a que seja crucial o estudo de formas de preservação de espécies de tripanossomas, a médio e longo prazo. Em muitos laboratórios, vários tipos de organismos patogénicos são mantidos em animais ou em meios de cultura (Polge e Soltys, 1957). Segundo Malik (1995), a preservação de microorganismos é particularmente útil para o ensino, investigação, biotecnologia, bem como para a preservação da biodiversidade.

Vários métodos de preservação dos tripanossomas são actualmente usados: meios de culturas, passagens em animais, clonagem e criopreservação (Silva *et al.*, 2002). Destes métodos, a criopreservação, que é um ramo aplicado da criobiologia, tem sido opção primária devido a vantagem de manutenção nas características originais biológicas e metabólicas (Mutetwa e James, 1984; Gill e Redwin, 1995).

Duma forma geral, o sucesso da criopresevação dos microorganismos depende de factores como a concentração e o tipo de crioprotector, bem como as velocidades de congelamento e descongelamento (Miyake *et al.*, 2004). De acordo com Diamond (1964), o glicerol e o dimetil sulfóxido são crioprotectores efectivos para várias espécies de protozoários, e o congelamento lento tem sido aplicado com sucesso para espécies de plasmódio e tripanossomas. O crioprotector polivinilpirrolidona também tem sido usado para a criopreservação de vários protozoários (Hubálek, 2003). Por outro lado, a velocidade óptima de congelamento varia para os diferentes tipos de células (Mazur e Schmidt, 1968; Leibo *et al.*, 1970; Callow e Farrant, 1973) e, para um tipo particular de célula, a velocidade óptima de congelamento varia de acordo com o crioprotector e sua concentração (Leibo *et al.*, 1970).

Apesar da criopreservação ser a forma mais viável para a manutenção de muitos microorganismos, estudos de criopreservação de tripanossomas, em particular o *T. congolense*, têm sido pouco realizados. Segundo Miyake *et al.* (2004), artigos como de Lyman e Marchin (1984) e Pozio *et al.* (1988) reportam sobre os procedimentos óptimos de criopreservação de parasitas, mas não deixam claro como tais métodos podem ser aplicados para outras espécies de parasitas.

???

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Os tripanossomas

Os tripanossomas são protozoários parasitas pertencentes ao género *Trypanosoma*, ordem Kinetoplastida, que têm como organelos característicos, o cinetoplasto e o flagelo (Connor, 1994; Kettle, 1995). O cinetoplasto é formado por um segmento da sua única e longa mitocôndria, e apresenta com abundância um tipo especial de ADN - o ADN cinetoplástico (kADN) (Rey, 2002). O núcleo situa-se ao longo do comprimento do corpo. A membrana e o citoplasma são comprimidos para cima, formando uma porção fina de tecido denominado membrana ondulante, sendo a sua margem exterior percorrida por uma fibra flagelar que tem origem na extremidade posterior do corpo, perto do corpo basal, e pode, nalgumas espécies ou tipos, continuar para além da extremidade anterior do corpo em forma de chicote, como um flagelo livre (Boyt, 1991). O tamanho dos tripanossomas varia entre 8-40µm (Boyt, 1991).

O género *Trypanosoma* é dividido em duas secções, Salivaria e Stercocaria, que diferem no seu modo de transmissão. Os tripanossomas da secção Salivaria são geralmente patogénicos, desenvolvem-se no interior ou nas zonas intermédias do tubo digestivo do insecto vector que os transmite, a mosca tsé-tsé (*Glossina* spp.) e, são transmitidos ao hospedeiro por intermédio das armaduras bucais especializadas durante a refeição de sangue. Os da secção Stercocaria, no estágio final (infeccioso), encontram-se na parte posterior do intestino da tsé-tsé e são excretadas com as fezes da mesma, infectando o hospedeiro final por contaminação e penetração através da pele (Boyt, 1991). Segundo Dgedge e Arroz (1995), os tripanossomas vivem no líquido intersticial, no sangue, no sistema linfático e no líquido céfalo-raquidiano; estando sempre em movimento quando presentes no sangue.

Os tripanossomas patogénicos africanos de importância veterinária podem afectar animais domésticos como: bovinos (*T. congolense*, *T. vivax*, *T. brucei*, *T. evansi* e *T. rhodesiense*), carneiros e cabras (*T. congolense*, *T. vivax*, *T. brucei* e *T. gambiense*), cavalos (*T. congolense*, *T. vivax*, *T. brucei* e *T. evansi*), cães (*T. congolense*, *T. brucei*, *T. evansi* e *T. gambiense*), camelos e hipopótamos (*T. evansi*) e suínos (*T. congolense*, *T.*

domésticos?

simiae, *T. brucei* e *T. gambiense*) (Boyt, 1991). O *T. congolense* é a espécie mais distribuída em África e uma das mais prevalentes.

2.2. Criopreservação: conceito e contexto histórico

A criopreservação (do grego, kryos= frio intenso) é literalmente a preservação no estado congelado (Bilgrami e Pandey, 1998). Benson (1999) define a criopreservação como sendo a preservação de células viáveis, tecidos e órgãos em nitrogénio líquido. Na prática, segundo Bilgrami e Pandey (1998), a criopreservação é geralmente feita acima da temperatura do carbono sólido (-79°C), em congeladores (-80°C ou abaixo), na fase vapor (aproximadamente -150°C) ou no nitrogénio líquido (-196°C). No geral, a criopreservação é um método de conservação que pode ser aplicado às plantas, animais, microorganismos, órgãos, tecidos, célula, etc.

ou abaixo

???
O₂

O uso de técnicas de congelamento para a preservação de protozoários vivos foi pela primeira vez estabelecido por Coggeshall em 1939 (Diamond, 1964). De acordo com Smith (1961) citado por Diamond (1964), as investigações mais antigas sobre os efeitos do congelamento em protozoários datam desde os trabalhos de Antony van Leeuwenhoek no século XVII, o primeiro a se ocupar com observações na resistência dos protozoários a temperaturas baixas. Nas investigações pioneiras de Coggeshall, estágios eritrocíticos de dois parasitas da malária, *Plasmodium knowlesi* e *P. inui*, foram congelados a -76°C durante 70 dias. Depois de armazenados a esta temperatura, ambos mantiveram a viabilidade e a capacidade patogénica. Encorajados por esta demonstração, outros investigadores procuraram preservar da mesma forma diferentes espécies de protozoários bem como outros parasitas da malária (Diamond, 1964).

Segundo Polge e Soltys (1957), a primeira obra literária relacionada com o congelamento de tripanossomas estava virada, principalmente, para a sobrevivência dos tripanossomas após rápida exposição a temperaturas baixas, ao invés da sobrevivência após longo tempo de conservação a essas temperaturas. Estes autores reportam que Gayland (1908), em seus estudos, observou que *T. gambiense* resistiu à temperatura do ar líquido (-192°C) durante 20 minutos mas sucumbiu depois de 40 minutos e que, De Jong

(1922) reportou que *T. equiperdum* congelado a -191°C e conservado a essa temperatura durante 21 dias continuou vivo e patogénico após o descongelamento. Desde então, muitos investigadores têm demonstrado que as formas sanguíneas dos tripanossomas africanos podem sobreviver a temperaturas muito baixas e que as velocidades usadas no congelamento afectam grandemente a viabilidade após a criopreservação (Herbert *et al.*, 1968; Dar *et al.*, 1972; Miyake *et al.*, 2004 e Maina *et al.*, 2006).

2.3. Velocidades de congelamento

As velocidades de congelamento que têm sido usados na criopreservação dos microorganismos parasitas são: a velocidade rápida e a velocidade lenta. Na velocidade de congelamento rápido, os eriotubos contendo os parasitas são imersos directamente no nitrogénio líquido ($3600-5100^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Usando este método, Filardi e Brener (1975), criopreservaram com sucesso *T. cruzi*. O congelamento lento usa congeladores ou banho de álcool para o controlo da velocidade de congelamento (entre 1 a $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Esta forma de congelamento é aplicável a muitos protozoários (por exemplo, *Plasmodium* spp. e *Trypanosoma* spp.) que também podem ser criopreservados pelo congelamento rápido (Miyake *et al.*, 2004).

Durante o congelamento e o descongelamento, a célula é exposta a alterações de temperatura, conteúdo de água, estado da água e concentração dos solutos. O primeiro evento que ocorre é a formação de gelo no meio extracelular. Inicialmente, a água do interior da célula torna-se super congelada e, devido à sua alta pressão de vapor, ela começa a fluir para fora da célula e congela extracelularmente. Se o congelamento for lento, a célula irá desidratar-se suficientemente para permanecer em equilíbrio com o gelo externo na pressão de vapor e, será então incapaz de se congelar internamente. Mas se o congelamento for rápido, a célula não será capaz de perder água suficiente tão rapidamente para manter o equilíbrio e, esta água, consequentemente, tornar-se-á super congelada *in situ* (Mazur *et al.*, 1968).

É importante lembrar que a velocidade óptima de congelamento varia para os diferentes tipos de células (Mazur e Schmidt, 1968; Leibo *et al.*, 1970; Callow e Farrant,

1973) e que, para um tipo particular de célula, a velocidade óptima de congelamento varia de acordo com o crioprotector e sua concentração (Leibo *et al.*, 1970).

2.4. Crioprotectores e suas concentrações

De uma forma geral, a exposição de células a temperaturas inferiores a 0°C implica o congelamento da água incluída em sua composição, podendo-se formar cristais de gelo e causar danos mecânicos aos componentes celulares (Mazur *et al.*, 1972). Procurando identificar estratégias para minimizar os efeitos nocivos advindos do processo de congelamento, descobriram-se os chamados crioprotectores. Estes aditivos, para além da propriedade de baixar o ponto de congelamento da água, podem aumentar-lhe o ponto de super congelamento e/ou remover núcleos de cristalização (Mutetwa e James, 1985; Friedler *et al.*, 1988 citados por Gúlias-Gomes *et al.*, 2003).

Os crioprotectores podem ser classificados de várias formas, mas a divisão mais tradicional (Meryman, 1971) depende do modo de penetração na célula: os que penetram rapidamente (usualmente dentro de 30 minutos), os que penetram lentamente e, os que são impermeáveis (Hubálek, 2003). Os crioprotectores que penetram rapidamente na célula incluem o dimetil sulfóxido, o metanol, o etanol, o etileno glicol (EG), o propileno glicol (PG), a dimetil formamida e a metil acetamida. O que penetra mais lentamente é o glicerol e, os impermeáveis incluem polivinilpirrolidona (PVP), os mono-, oligo-, e polissacarídeos, o manitol, o sorbitol, o dextrano, o hidroxietil amido (HES), a metil celulose, a albumina, a gelatina, o polietileno glicol (PEG), o óxido polietileno (PEO) ou, o álcool polivinil (Hubálek, 2003). Segundo Hubálek (2003), os crioprotectores mais usados e com resultados satisfatórios na conservação de microorganismos (vírus, bactérias, fungos, algas e protozoários) são: o dimetil sulfóxido (o mais universalmente usado), o glicerol, a polivinilpirrolidona, a albumina do soro, o leite desnatado, a peptona, extracto de leveduras, a sacarose, a glucose, o metanol, o sorbitol e o extracto de malte.

A concentração ideal dos diferentes tipos de crioprotectores usados na criopreservação de microorganismos varia de espécie para espécie (Silva *et al.*, 2003). Por exemplo, a condição óptima para a criopreservação de *T. b. gambiense* foi usando o

dimetil sulfóxido na concentração de 10% (Miyake *et al.*, 2004). A taxa máxima de sobrevivência de *Entamoeba histolytica* foi obtida quando criopreservada em presença de 7.5% de dimetil sulfóxido (Farri *et al.*, 1983), enquanto que a taxa máxima de sobrevivência de *Giardia lamblia* foi obtida quando usada a 6.5% (Lyman e Marchin, 1984). Por outro lado, 12.5% foi a concentração óptima de dimetil sulfóxido usada na criopreservação de *Toxoplasma gondii* (Booth *et al.*, 1996) e, para *Trichomona vaginalis* a concentração óptima foi de 5-10% (Miyake *et al.*, 2004).

2.5. Vantagens e desvantagens da criopreservação

De uma forma geral, os microorganismos podem danificar-se em diferentes etapas do processo de criopreservação: (i) durante o arrefecimento a baixa temperatura positiva (choque frio); (ii) durante o arrefecimento a temperaturas baixas (dano de congelação); (iii) durante a manutenção a temperatura negativa (armazenamento); (iv) durante o aquecimento do local de criopreservação e recuperação (dano do descongelamento) (Hubálek, 1996).

Apesar destes constrangimentos, o processo de criopreservação supera as desvantagens dos métodos convencionais de preservação de parasitas (Weathersby e McCall, 1981; Mutetwa e James, 1984). Segundo Mutetwa e James (1984) e Gill e Redwin (1995), os métodos convencionais para a propagação e preservação de microorganismos parasitas *in vivo*, ou *in vitro*, têm algumas limitações que incluem a necessidade de laboratórios, isolamento inicial e perda de linhagem, contaminação bacteriana e fúngica e mudanças nas características originais biológicas e metabólicas.

A criopreservação, para além de oferecer uma simples alternativa conveniente para a conservação de populações de tripanossomas durante longos períodos de tempo, constitui também, uma simples forma de transferência de tripanossomas dum laboratório para o outro. Oferece ainda, notavelmente, uma forma de interrupção da reprodução contínua de populações que ocorre quando estes são mantidos por passagem em série em animais ou cultura. Esta é a vantagem fundamental, já que evita a selecção contínua da população de tripanossomas originalmente isolada, adaptada ao hospedeiro original e a

transmissão cíclica, para um hospedeiro de laboratório e, frequentemente, a transmissão não cíclica. Esta alteração poderá acontecer nas características biológicas da população de tripanossomas durante uma passagem em série em animais experimentais. Por exemplo: a capacidade da cultura reproduzir-se no ágar-sangue, ou de infectar o vector *Glossina* ou o hospedeiro humano, pode ser perdida; a susceptibilidade a drogas anti-tripanosomais pode ser grandemente aumentada (Lumsden, 1972). As vantagens da criopreservação discutidas em relação aos tripanossomas podem aplicar-se também aos outros protozoários parasitas (Lumsden, 1972).

3. OBJECTIVOS

3.1. Objectivo geral

- Avaliar a eficácia de diferentes métodos de criopreservação de *T. congolense* em nitrogénio líquido (-196°C).

3.2. Objectivos específicos

- Avaliar *in vitro* a viabilidade dos tripanossomas antes e após a adição dos crioprotectores por quantificação e comparação do número de indivíduos vivos (móveis).
- Criopreservar isolados de *T. congolense* a duas velocidades de congelamento (2 e 27,5°C/min) variando tipos diferentes de crioprotectores (glicerol, DMSO e PVP) e duas concentrações para cada crioprotector (8 e 10%).
- Avaliar *in vitro* a viabilidade dos tripanossomas após a criopreservação por quantificação e comparação do número de indivíduos vivos (móveis) com a parasitémia das amostras antes da criopreservação.
- Testar *in vivo* a infectividade dos tripanossomas após a criopreservação por inoculação em murganhos e determinação do período pré-patente.

4. LOCAL DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO

O presente trabalho foi realizado entre os meses de Agosto a Dezembro de 2007 no Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Veterinária da UEM, sito em Maputo, Avenida de Moçambique Km 1,5.

O laboratório é essencialmente destinado ao ensino, pesquisa e prestação de serviço nas seguintes áreas de parasitologia veterinária: coprologia, dermatologia, urologia e, hematologia.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Animais e parasitas

No presente trabalho usou-se como animais experimentais, machos e fêmeas de ratos branco (murganhos) com 6-7 semanas de vida e um peso médio de 25-30g. Estes murganhos foram adquiridos no INIVE, em Maputo.

Os parasitas usados foram formas sanguíneas de dois isolados de *T. congolense* Broden, 1904; obtidos de culturas *in vivo* em murganhos na secção de Parasitologia da Faculdade de Veterinária da UEM. Os isolados foram: isolado 5 (I-5) e isolado 6 (I-6), cada um colectado originalmente de um bovino no distrito de Matutuine (Província de Maputo).

5.2. Controlo de parasitémia

O controlo de parasitémia dos murganhos nos dois isolados foi feito diariamente até que estes apresentassem alta parasitémia (mais de 5.10^5 tripanossomas/ml de sangue).

O método de controlo usado foi descrito por Boyt (1991). Com uma tesoura, corta-se a extremidade da cauda dos murganhos e colecta-se o sangue de cada murganho em tubos capilares de microhematócrito heparinizados, preenchendo no máximo 75% do

volume. Os tubos capilares são então selados numa das extremidades com plasticina e levados a centrifugar durante 5 minutos a 12000 rpm numa centrífuga (neste trabalho usou-se uma centrífuga de microhematócrito Hawksley – England). Posteriormente, os tubos são removidos e, através do exame da camada leucocitária, analisa-se o sangue. Neste exame, o tubo capilar é riscado 1 mm abaixo da linha de junção da camada leucocitária/glóbulos vermelhos e depois quebrado. Todo o conteúdo superior do tubo é cuidadosamente vertido numa lâmina limpa, coberto com uma lamela e observado ao microscópio óptico a uma ampliação de 400x.

A quantificação dos tripanossomas para a estimativa da parasitémia no sangue foi feita segundo Paris *et al.* (1982) (Tabela 1). Todo o sangue usado apresentava parasitémia estimada em mais de cinco milhões de tripanossomas/ml (veja figuras 2a e 3a nos resultados).

Tabela 1. Quantificação de tripanossomas no controlo de parasitémia (Fonte: Paris *et al.*, 1982).

Tripanossomas por campo (ampliação 400x)	Número de cruzes	Parasitémia estimada (triptanosomas/ml)
>100	6+	$>5.10^6$
>10	5+	$>5.10^5$
1-10	4+	$10^4-5.10^5$
1 por 2 campos a 1 por 10 campos	3+	$5.10^3-5.10^4$
1-10 por preparação	2+	10^3-10^4
1 por preparação	1+	10^2-10^3

5.3. Crioprotectores e diluente

Neste trabalho usou-se três crioprotectores diferentes: Glicerol (Amresco[®], Ohio USA), Dimetil sulfóxido (n^o 389530, Hopkins e Willians LTD, England) e Polivinilpirrolidona 40 (PVP) (Sigma Chemicals, St. Louis USA).

O diluente usado foi o PBS a pH=8. A sua preparação foi feita de acordo com Lanham e Godfrey (1970) (Anexo A).

5.4. Colecta e preparação do sangue parasitado

Quando se obtinham murganhos altamente parasitados (mais de 5.10^5 tripanossomas/ml) em cada isolado, o sangue do animal era colectado e preparado para a criopreservação.

Neste processo, cada murganho foi anestesiado por éter embebido em algodão e, através da punção cardíaca o sangue parasitado foi colectado através de seringas de 5ml com agulhas de 25G para os tubos heparinizados de 4ml (BD Vacutainer[®], Becton, Dickinson and Company, UK). O sangue foi mantido em banho de gelo.

Em condições assépticas na câmara de fluxo laminar e com o sangue de cada isolado sempre mantido em gelo, distribuiu-se igual volume de sangue (800 μ l) nas ampolas criogénicas de 2ml (Corning[®], Corning Costar Corporation, Canada), previamente identificadas. Essa distribuição foi feita através de uma pipeta automática eppendorf de 1000 μ l (Gilson, France).

A cada ampola criogénica adicionou-se através de uma pipeta automática eppendorf de 100 μ l (Gilson, France), um crioprotector apenas a 8 ou 10% do volume de sangue (Figura 1).

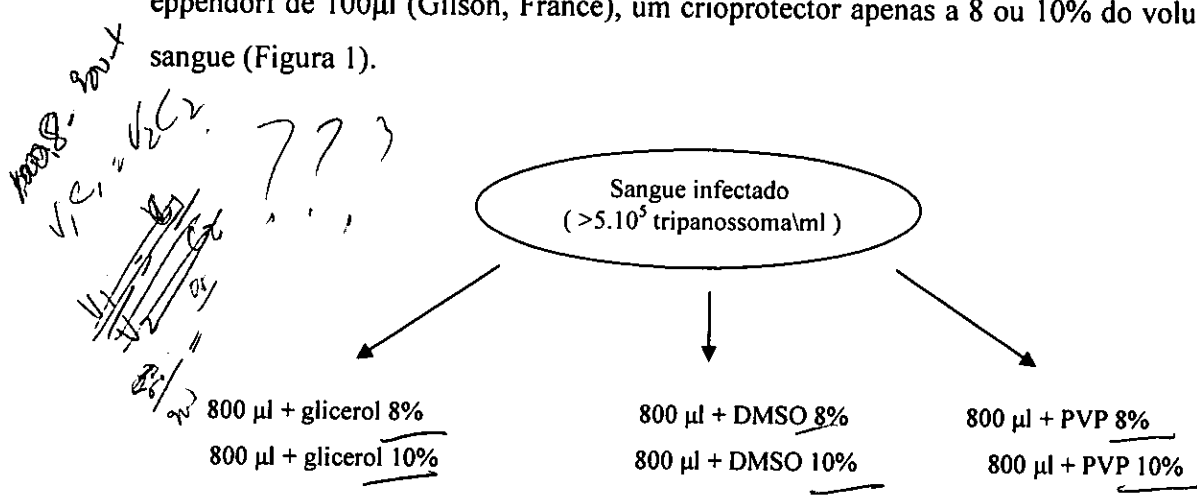


Figura 1. Representação esquemática da distribuição de sangue dum isolado e os tipos e concentrações dos crioprotectores nos tubos criogénicos.

Após a adição dos crioprotectores, o sangue foi homogeneizado e deixado em equilíbrio durante 15 minutos. De seguida, através de uma pipeta automática eppendorf de 10 μ l (Gilson, France), pipetou-se 2 μ l de cada amostra para diferentes tubos eppendorf

A percentagem é da soma de todos os crioprotector ou do volume total crioprotector no volume total do sangue

identificados e diluiu-se 100 vezes em solução de PBS. Essas amostras diluídas foram usadas para o primeiro teste de viabilidade dos tripanossomas.

Uma vez que os murganhos não adoeciam ao mesmo tempo, o trabalho foi feito em partes, isto é, sempre que houvesse murganhos altamente parasitados.

5.5. Avaliação *in vitro* da viabilidade dos tripanossomas após a adição dos crioprotectores

Em todos os casos, os testes de viabilidade *in vitro* consistiram em fazer preparações microscópicas temporárias no hematocítmetro (Neubaur), nas quais, foram observados e quantificados todos os tripanossomas móveis no microscópio óptico (ampliação de 400x). Neste teste, o número de tripanossomas móveis permitiu estimar a parasitemia do sangue parasitado, após a adição dos crioprotectores.

5.6. Congelamento e armazenamento em nitrogénio líquido

Após 15 minutos de equilíbrio, cada 800µl de sangue dum isolado, contido nas ampolas criogénicas a um dado tipo e concentração de crioprotector, foi submetido a uma das duas velocidades de congelamento desenvolvidos por Dar *et al.* (1972):

Velocidade rápida: As ampolas criogénicas foram colocadas num papel de cartolina, enroladas e agrafadas nas extremidades. Posteriormente foram totalmente cobertos por algodão. O "rolo" de algodão foi atado por uma fita e suspenso na fase vapor do refrigerador de nitrogénio líquido durante 15 minutos. Segundo Dar *et al.* (1972), a velocidade de congelamento neste caso é de 27.5°C/min. O rolo foi depois descoberto dentro da boca do refrigerador de nitrogénio e o papel que continha as ampolas foi transferido para dentro duma das caixas do refrigerador.

Velocidade lenta: As ampolas criogénicas foram colocadas em papéis de cartolina, enroladas e agrafados nas extremidades. Estas, foram depois introduzidas em tubos de vidro duro e, por sua vez, cobertos por plasticina com 8 mm de espessura. Este tubo foi então suspenso na fase vapor do refrigerador de nitrogénio líquido e congelado durante 45 minutos a uma velocidade de 2°C/min (Dar *et al.*, 1972). De seguida, o papel contendo as ampolas criogénicas foi removido do tubo de vidro por um longo par de forceps e transferido para uma das caixas de armazenamento do refrigerador de nitrogénio líquido.

A tabela 2 mostra como foram distribuídas as ampolas criogénicas durante o processo de criopreservação dos tripanossomas de cada isolado.

Tabela 2. Forma de distribuição dos tubos criogénicos durante a criopreservação

Numero total de ampolas criogénicas para cada concentração do crioprotector	Volume de sangue e concentração do crioprotector em cada ampola criogénica	Distribuição das ampolas criogénicas no processo de criopreservação
Duas ampolas	800 µl de sangue em glicerol 8%	Ampola para a velocidade rápida
		Ampola para a velocidade lenta
Duas ampolas	800 µl de sangue em glicerol 10%	Ampola para a velocidade rápida
		Ampola para a velocidade lenta
Duas ampolas	800 µl de sangue em DMSO 8%	Ampola para a velocidade rápida
		Ampola para a velocidade lenta
Duas ampolas	800 µl de sangue em DMSO 10%	Ampola para a velocidade rápida
		Ampola para a velocidade lenta
Duas ampolas	800 µl de sangue em PVP 8%	Ampola para a velocidade rápida
		Ampola para a velocidade lenta
Duas ampolas	800 µl de sangue em PVP 10%	Ampola para a velocidade rápida
		Ampola para a velocidade lenta

interesse a percentagem (concentração) do crioprotector no volume final que é a verdade de que sua totalidade em que se encontra o

ferreira

5.7. Descongelamento das amostras

Após 25 dias de armazenamento em nitrogénio líquido, as ampolas criogénicas foram submetidas a um descongelamento rápido, isto é, foram retiradas do refrigerador e colocadas em banho-maria a 37°C, durante 5-7min. De seguida, 2µl de cada amostra foram pipetados e diluídos 100 vezes em PBS, nos tubos eppendorf, para posterior teste de viabilidade.

5.8. Teste de viabilidade *in vitro* dos tripanossomas após a criopreservação

O segundo teste de viabilidade *in vitro* dos tripanossomas foi feito para todas as amostras criopreservadas, como descrito anteriormente no ponto 5.5. Ao contrário do primeiro, o segundo teste de viabilidade serviu para estimar a parasitémia do sangue após a criopreservação.

5.9. Teste de infectividade dos tripanossomas

A infectividade dos tripanossomas foi avaliada pela inoculação em murganhos e pela observação do período pré-patente, isto é, o tempo entre a inoculação e o aparecimento de uma infecção no sangue (Overdulve e Antonisse, 1970a, b). Neste teste foram usados 78 murganhos, dos quais 6 como grupo controlo e os restantes para os dois isolados (36 para I-5 e 36 para I-6).

Para o grupo controlo, distribuiu-se igual volume de PBS (800µl) em seis ampolas criogénicas. Em seguida, misturou-se em cada ampola um tipo e concentração de crioprotector. Usando-se seringas de insulina de 1ml, a cada murganho de controlo foi administrado intraperitonealmente ~75µl da mistura do PBS com único tipo de crioprotector a uma dada concentração. Os murganhos foram marcados na cauda e colocados numa gaiola.

No grupo de teste (para ambos isolados), usou-se para cada velocidade de congelamento e cada tipo e concentração de crioprotector, três murganhos. Cada

murganho foi inoculado intraperitonealmente com igual volume (~75µl) do mesmo sangue criopreservado, marcado na cauda e, colocado na mesma gaiola com os outros dois.

Tanto no grupo controlo, assim como no grupo teste, o controlo de parasitémia começou a ser feito um dia após a inoculação. Os murganhos que desenvolveram a parasitémia morreram pela doença e os que não desenvolveram dentro de 40 dias foram sacrificados.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi referido anteriormente que o período pré-patente (em dias) foi usado como base para a avaliação da infectividade dos tripanossomas, nos murganhos. O menor período pré-patente indica maior eficácia do método, tipo e concentração do crioprotector usado, enquanto que o maior período pré-patente, ou a sua simples ausência, indica o contrário.

Os dados colhidos diariamente durante o controlo de parasitémia no teste de infectividade foram analisados estatisticamente através do pacote SPSS na versão 15. A comparação entre as duas velocidades de congelamento, as duas concentrações de crioprotectores e os dois isolados foi feita através do Teste-*t* para amostras independentes, a um nível de significância de 5%. A eficácia entre os três crioprotectores usados foi comparada através da análise de variância (ANOVA *oneway*) e da diferença significativa mínima (LSD), a um nível de significância de 5%. A interação entre todas as variáveis (isolados, velocidades, crioprotectores e concentração dos crioprotectores) foi feita através da ANOVA *oneway*.

P < 0.05

7. RESULTADOS

7.1. Viabilidade *in vitro* dos tripanossomas após a adição dos crioprotectores

Em todas as amostras os tripanossomas mostraram-se viáveis após a adição dos crioprotectores. A partir dessa viabilidade, estimou-se a parasitémia em cada amostra e comparou-se com as respectivas parasitémias iniciais (figuras 2a e 3a). Observou-se que não houve aumento de parasitémia em nenhuma amostra dos dois isolados e, na maioria delas a parasitémia não se alterou. Porém, a parasitémia baixou nas amostras do I-5 que foram adicionadas o DMSO a 10% e nas amostras do I-6 adicionadas o DMSO a 8 e a 10%, no congelamento rápido (27.5°C/min) (figura 2b). Para o congelamento lento (2°C/min), a parasitémia somente baixou nas amostras do I-5 que foram adicionadas o PVP a 8 e a 10% (figura 3b).

Numa das
tabelas:

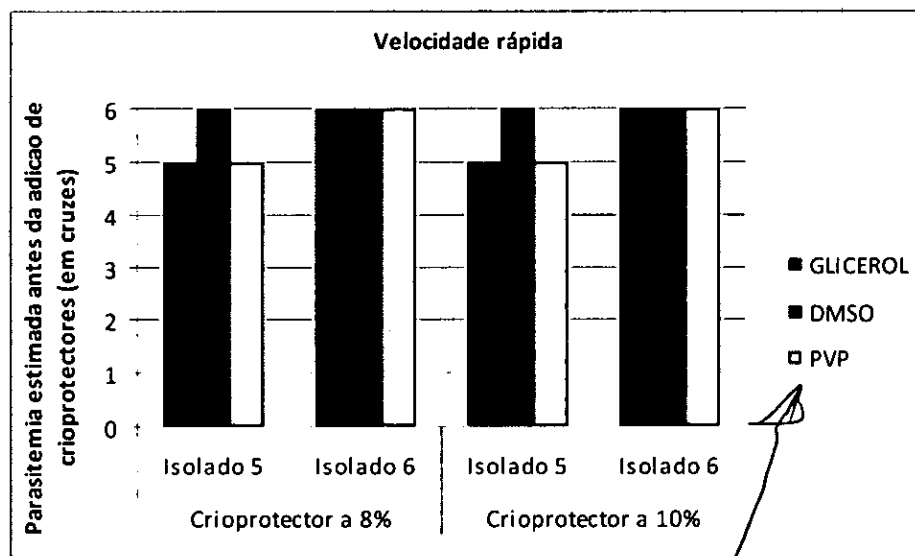


Figura 2a. Parasitémia estimada no sangue de cada amostra antes da antes da adição dos crioprotectores e da criopreservação. Estas amostras foram criopreservadas pelo congelamento rápido.

Como assim ??
 Como é que se diz "antes de ..." e aqui
 se referem os crioprotectores?

Os resultados ²⁰⁰²⁵ deveriam estar combinados
 numa única tabela com a "antes" e
 "depois" facilitando a leitura

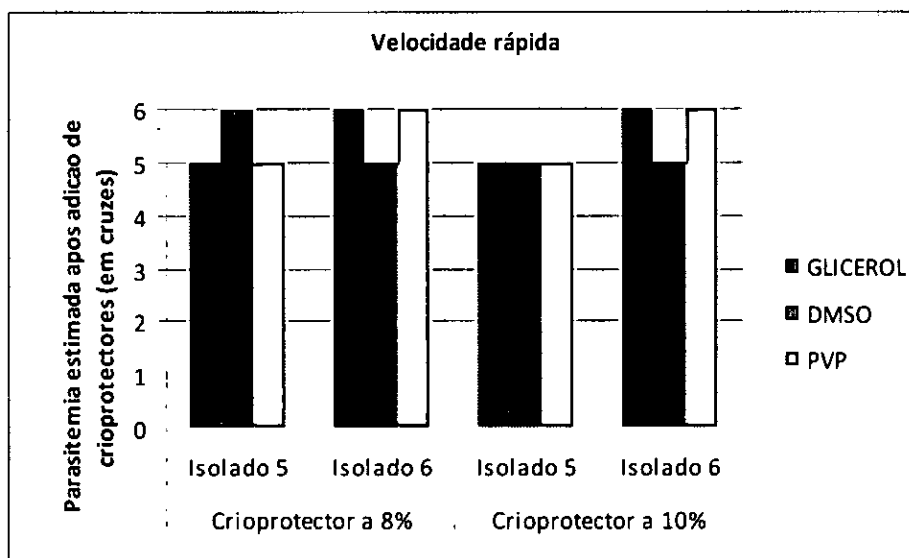


Figura 2b. Parasitémia estimada nas amostras dos dois isolados após a adição dos diferentes tipos e concentrações de crioprotectores. Todas as amostras foram criopreservadas pelo congelamento rápido.

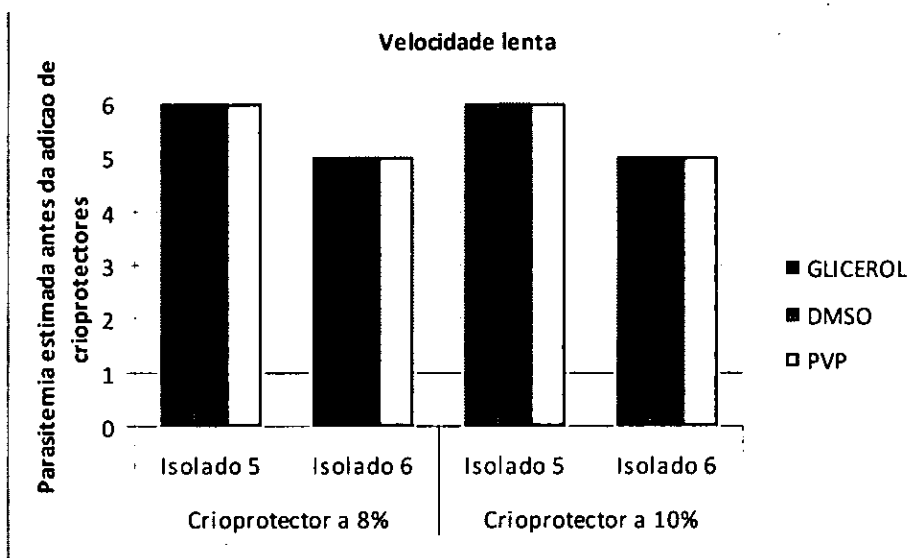


Figura 3a. Parasitémia estimada no sangue de cada amostra antes da adição dos crioprotectores e da criopreservação. Estas amostras foram criopreservadas pelo congelamento lento.

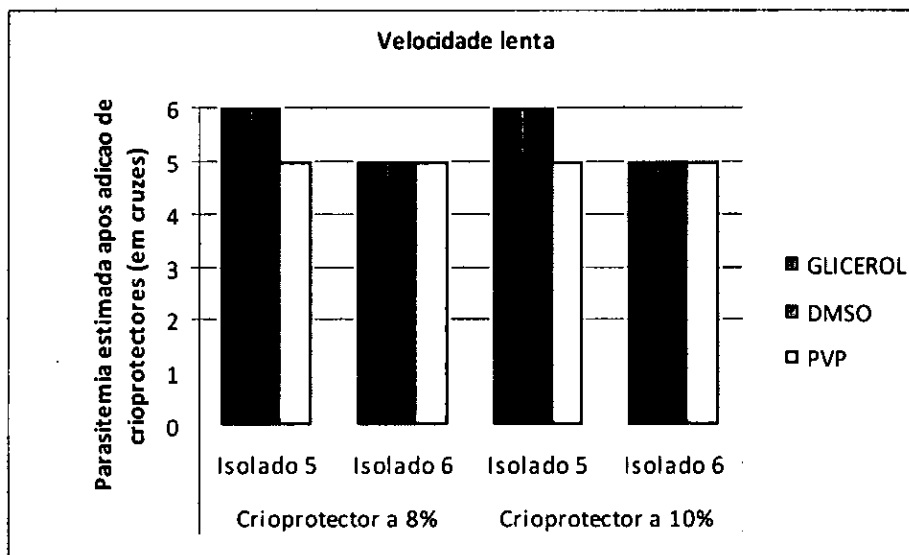


Figura 3b. Parasitemia estimada nas amostras dos dois isolados após a adição dos diferentes tipos e concentrações de crioprotectores. Todas as amostras foram criopreservadas pelo congelamento lento.

7.2. Viabilidade *in vitro* dos tripanossomas após a criopreservação

Após a criopreservação estimou-se a parasitemia de cada amostra e comparou-se com as respectivas parasitemias após adicionados os crioprotectores (antes da criopreservação). De acordo com a figura 4a, que ilustra os resultados da criopreservação pelo congelamento rápido, houve diminuição de parasitemia em todas as amostras do I-5 que continham os crioprotectores a 8% e o glicerol e PVP a 10%, enquanto que, as criopreservadas com o PVP a 8 e a 10% não apresentaram tripanossomas vivos. No mesmo isolado (I-5), a amostra criopreservada com o DMSO a 10% não sofreu alteração de parasitemia. Por outro lado, as amostras do I-6 criopreservadas com o PVP a 8 e a 10% mostraram uma diminuição de parasitemia, enquanto que com o glicerol, nas duas concentrações, a parasitemia não se alterou. A figura 4b mostra que no congelamento lento, as amostras do I-5 mantiveram a parasitemia quando criopreservadas com o PVP a 10% e glicerol a 8 e a 10%. Porém, a parasitemia baixou nas amostras criopreservadas com o PVP a 8% e o DMSO a 8 e a 10%. Neste método, a parasitemia do I-6 manteve-se nas amostras criopreservadas com o glicerol a 8 e a 10% e o DMSO a 10%, enquanto que na amostra criopreservada com o DMSO a 8% a parasitemia "aumentou".

Como é possível?
Multiplicação *in vitro*
nitrogénio?

Estes parasitas como que se comportam?
Res: O que se espera < confirmação?

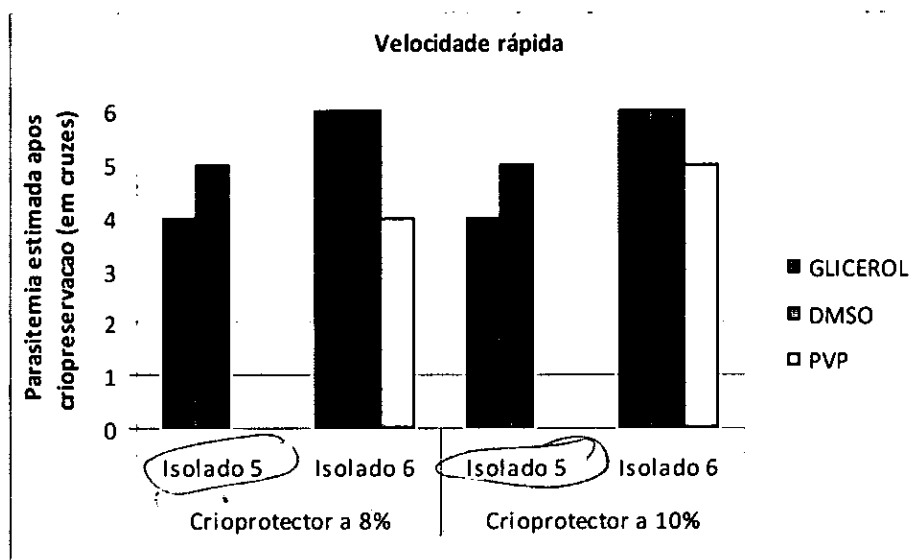


Figura 3a. Parasitémia estimada nas amostras dos dois isolados criopreservados pelo congelamento rápido.

ha

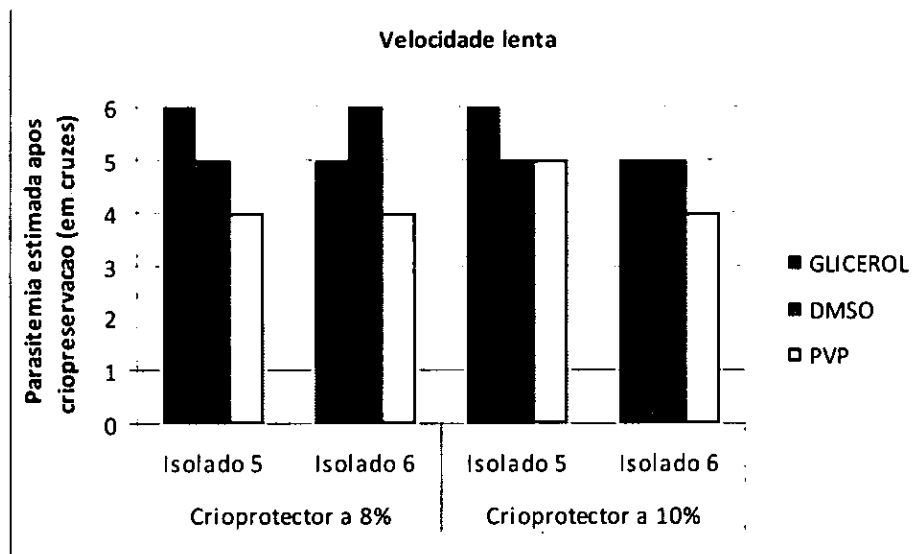


Figura 3b. Parasitémia estimada nas amostras dos dois isolados criopreservados pelo congelamento lento.

hb

7.3. Infectividade dos tripanossomas em murganhos

No grupo controlo do teste de infectividade todos os murganhos apresentaram-se negativos, isto é, não desenvolveram a parasitémia. Dentre os murganhos de teste, para os dois isolados, uns desenvolveram a parasitémia e outros não (tabela 3).

Tabela 3. Infectividade de *T. congolense* criopreservado por diferentes velocidades de congelamento, tipos e concentrações de crioprotectores.

Tipo e concentração de crioprotector	Velocidades de congelamento	Periodo de criopreservação (dias)	No. animais que desenvolveram parasitemia/ No infectados	
			Isolado 5	Isolado 6
Glicerol 8%	rápido	25	3/3	3/3
	lento	25	3/3	3/3
Glicerol 10%	rápido	25	3/3	3/3
	lento	25	3/3	3/3
DMSO 8%	rápido	25	3/3	3/3
	lento	25	3/3	2/3
DMSO 10%	rápido	25	3/3	3/3
	lento	25	3/3	3/3
PVP 8%	rápido	25	0/3	2/3
	lento	25	3/3	1/3
PVP 10%	rápido	25	2/3	1/3
	lento	25	3/3	1/3

a) Velocidades de congelamento:

Para um nível de significância de 5%, não existiram diferenças significativas entre as duas velocidades de congelamento ($P > 0.05$), porém, as amostras congeladas lentamente ($2^{\circ}\text{C}/\text{min}$) tiveram menor período pré-patente médio do que as amostras congeladas rapidamente ($27.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$) (6.33 dias para o método B e 9.39 dias para o método A) (Anexo B1).

b) Crioprotectores:

Para as duas velocidades de congelamento não existiram diferenças significativas entre o glicerol e o DMSO ($P > 0.05$), mas estes diferiram significativamente do PVP ($P < 0.05$) (Anexo B2).

c) Concentrações dos crioprotectores:

Para um nível de significância de 5%, não existiram diferenças significativas entre as diferentes concentrações de crioprotectores utilizadas ($P > 0.05$) e, o período médio pré-patente em cada concentração foi aproximadamente o mesmo (7.92 dias para a concentração de 8% e 7.81 dias para a concentração de 10%) (Anexo B3).

d) Isolados:

A um nível de significância de 5%, não existiram diferenças significativas entre os isolados, mas o isolado 5 teve menor período pré-patente médio em relação ao isolado 6 (6.72 dias para o I-5 e 9.00 dias para o I-6) (Anexo B4).

e) Interacção das variáveis analisadas:

No que respeita as interacção entre as velocidades de congelamento e os isolados, os isolados e os crioprotectores, os crioprotectores e as concentrações, somente existiu diferença significativa entre os métodos e os isolados ($P < 0.05$). Uma interacção geral envolvendo velocidades de congelamento, isolado, crioprotector e concentração mostrou a não existência de diferenças significativas ($P = 0.059$) (Anexo B5). No entanto, a estatística descritiva mostrou que para ambas as velocidades de congelamento o glicerol (nas duas concentrações) teve, na maioria das vezes, menor período pré-patente médio em relação ao DMSO e PVP (Anexo B6).

8. DISCUSSÃO

8.1. Efeitos da adição de crioprotectores na viabilidade dos tripanossomas

A maioria dos estudos não se refere aos efeitos dos crioprotectores na sobrevivência dos protozoários antes do congelamento. Standfast e Jorgensen (1997) criopreservaram *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma centrale* usando o PVP a uma concentração final de 10%. Miyake *et al.* (2004) indicaram o DMSO e o glicerol como sendo crioprotectores mais efectivos na criopreservação de vários tipos de protozoários, incluindo o *T. brucei gambiense*. Segundo estes autores, a condição óptima para a utilização do dimetil sulfóxido é uma concentração de 10%, sem equilíbrio, enquanto que para o glicerol é a 15%, com 2 horas de equilíbrio.

No presente trabalho, os três crioprotectores citados foram misturados às amostras a uma concentração final de 8 e 10%. Estas foram então deixadas em equilíbrio durante 15min e avaliada a viabilidade, através da motilidade dos parasitas. Os resultados mostraram que todas as amostras que seriam criopreservadas continham tripanossomas vivos, isto é, após a adição dos diferentes tipos e concentrações dos crioprotectores os tripanossomas continuaram viáveis. Contudo, nalgumas amostras observou-se uma redução do nível de parasitemia. Essa redução foi considerada insignificante, porque não se verificou em todas as amostras de sangue sujeitas ao mesmo tipo e concentração de crioprotector. Além disso, a redução foi muito ínfima, como se viu, de seis para cinco cruzes. Por exemplo, ocorreu uma ligeira redução do nível de parasitemia quando se adicionou o PVP a 8 e a 10% ao sangue do I-5 que seria criopreservado pelo congelamento lento, mas o mesmo não aconteceu quando se adicionou o PVP a 8 e a 10% ao sangue do I-5 que seria criopreservado pelo congelamento rápido. Isto, ocorreu provavelmente devido ao facto do volume da amostra observada ter sido muito reduzido (2µl) e/ou não apresentar muitos tripanossomas, uma vez que estes não estão uniformemente distribuídos no sangue.

fls

8.2. Viabilidade dos tripanossomas após a criopreservação

Duma forma geral, a concentração e o tipo de crioprotector, bem como as velocidades de congelamento e descongelamento, são tidos como factores que afectam a viabilidade após a criopreservação (Miyake *et al.*, 2004).

Segundo Lumsden (1972), a motilidade é um critério inadequado para confirmar a sobrevivência após a criopreservação, porque não oferece a garantia de que os tripanossomas móveis sejam capazes de divisão, contribuindo para uma nova população. Assim sendo, a viabilidade pode ser determinada pela transferência dos tripanossomas descongelados para um sistema de cultura *in vitro*, ou pela sua inoculação em hospedeiros susceptíveis (Maina *et al.*, 2006).

No presente trabalho, verificou-se que nem todos os murganhos inoculados, com as amostras contendo tripanossomas móveis *in vitro*, se tornaram infectados. Este resultado está de acordo com os argumentos de Lumsden (1972) e os resultados de Maina *et al.* (2006), que ao criopreservarem *T. b. gambiense*, usando o Triladil como crioprotector, verificaram que os parasitas móveis, após a criopreservação não foram capazes de se propagarem durante o cultivo *in vitro* subsequente. Além disso, é provável que os murganhos que não desenvolveram a parasitémia tenham tido boa resistência imunológica, uma vez que a capacidade dos tripanossomas infectarem ou não os hospedeiros dependem também da resposta imunológica do hospedeiro.

Alguns murganhos inoculados com amostras que não continham tripanossomas móveis *in vitro*, desenvolveram a parasitémia. É provável que a amostra inoculada tivesse tripanossomas vivos, e que a sua não visualização tenha ocorrido pelo facto do volume da amostra observada ter sido muito reduzido (2µl) e/ou não apresentar muitos tripanossomas, uma vez que estes não estão uniformemente distribuídos no sangue. O aparente "aumento" de parasitémia na amostra do I-6 criopreservado com o DMSO a 8%, também pode ser explicado pelo mesmo facto.

8.3. Velocidade de congelamento

As velocidades de congelamento disponíveis para a criopreservação de microorganismos parasitas são: rápida e lenta (Miyake *et al.*, 2004). Segundo Mazur *et al.* (1972), as células congeladas rapidamente são mortas pela formação intracelular de gelo e subsequente formação de cristais durante o descongelamento (especialmente durante o descongelamento lento), enquanto que as células congeladas lentamente são mortas pela longa exposição a alterações produzidas nas soluções extracelulares, e intracelulares, devido à conversão de água em gelo. Estas alterações, ou efeitos, da solução incluem a concentração dos solutos, desidratação, mudanças no pH e precipitação dos solutos.

A maioria dos protozoários, como o *T. gondii* (Booth *et al.*, 1996), a *E. histolytica* (Farri *et al.*, 1983), a *G. lamblia* (Lyman e Marchin, 1984), o *P. chabaudi* (Mutetwa e James, 1984), a *B. rodhaini* (Dalgeish *et al.*, 1980), o *T. b. gambiense* (Maina *et al.*, 2006), entre outros, têm sido preservados usando a velocidade lenta de congelamento.

Dar *et al.* (1972), criopreservaram *T. vivax*, *T. brucei* e *T. congolense* usando as mesmas velocidades de congelamento avaliadas no presente trabalho e verificaram que a 27.5°C/min, os tripanossomas apresentaram um declínio progressivo de infectividade, mas quando criopreservados a 2°C/min não perderam a capacidade de infectar. Da comparação feita entre estas velocidades de congelamento no presente trabalho, verificou-se que não houve diferença significativa entre elas, porém, as amostras congeladas a 2°C/min tiveram menor período pré-patente médio em relação as amostras congeladas a 27.5°C/min.

8.4. Crioprotector e concentração ideal

A escolha do agente crioprotector é dependente do tipo de célula a ser preservada. Para a maioria das células o glicerol é o agente de escolha porque ele é, geralmente, menos tóxico do que o DMSO. Porém, o DMSO é mais penetrante na célula e, geralmente, é o agente de escolha para células mais complexas como os protistas (Silva *et*

al., 2003). Por outro lado, o PVP é impermeável, sendo um dos mais utilizados e apresentando resultados satisfatórios na conservação de microorganismos (Hubálek, 2003).

A concentração óptima dos crioprotectores varia com o tipo celular (Silva *et al.*, 2003). Duma forma geral, o DMSO e o glicerol são geralmente usados a concentrações que variam de 5-10% e, não são utilizados juntos na mesma solução, com excepção para células de plantas (Silva *et al.*, 2003). Em criomicrobiologia, o PVP é frequentemente utilizado em concentrações que variam de 2-20%, em média 10% (Hubálek, 2003).

No presente trabalho, o glicerol e o DMSO foram os melhores agentes crioprotectores, seguidos pelo PVP. As concentrações ideais para cada crioprotector foram de 8 e 10% para o glicerol e DMSO e de 10% para o PVP. Resultados similares foram obtidos por Dar *et al.* (1972), que criopreservaram com sucesso o *T. vivax*, *T. brucei* e *T. congolense* usando o glicerol a 8%; Maina *et al.* (2006) que criopreservaram o *T. b. gambiense* usando o glicerol a 10%; Miyake *et al.* (2004) que criopreservaram o *T. b. gambiense* usando o DMSO a 10%.

Muitos trabalhos relatam a criopreservação dos protozoários usando o PVP como agente crioprotector, mas poucos, ou mesmo nenhum, aborda o uso deste crioprotector na criopreservação dos tripanossomas. Neste trabalho, os resultados da criopreservação usando o PVP estão de acordo com os de Standfast e Jorgensen (1997), que criopreservaram com sucesso a *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. centrale* usando o PVP a uma concentração final de 10%. Vega *et al.* (1985) e Palmer *et al.* (1982) utilizando o PVP a 10%, também criopreservaram com sucesso a *B. bigemina* e *B. bovis*, respectivamente.

É importante salientar que o sucesso da criopreservação não depende somente do tipo e concentração dos crioprotectores, mas sim de vários factores como a espécie a ser preservada, o tamanho e a forma da célula, a temperatura de incubação, o pH, o conteúdo de água na célula, o conteúdo lipídico da célula, a velocidade de congelamento, a temperatura e tempo de armazenamento, a velocidade de descongelamento e o meio de recuperação (Hubálek, 1996).

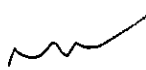


9. CONCLUSÃO

Do presente trabalho conclui-se que:

- A velocidade lenta de congelamento usando o glicerol, tanto a 8 como a 10%, é o método mais eficaz para a criopreservação do *T. congolense* em nitrogénio líquido.
- Os crioprotectores e as concentrações testadas não afectaram a viabilidade dos tripanossomas, porém, o factor crítico na sobrevivência destes parasitas pode ter sido a velocidade de congelamento.

10. RECOMENDAÇÕES

Face ao trabalho, recomenda-se que:

- Sejam utilizados métodos mais rápidos de contagem dos tripanossomas, de modo a que as amostras sejam quantificadas ao mesmo tempo e com maior precisão. 
- Sejam feitos ensaios desta natureza combinando outros factores que afectam a viabilidade dos tripanossomas após a criopreservação, como o tempo de equilíbrio, a velocidade de descongelamento, entre outros. 
- Nos próximos estudos se crie um meio de cultura ideal para a combinar com o PVP, de modo a se obter melhores resultados. 

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Benson E. E. (1999). Plant conservation biotechnology. 309 pp. London, Taylor & Francis.
2. Bilgrami K. S. e A. K. Pandey (1998). Introduction to biotechnology. First Edition. 190 pp. India, CBS Publishers & Distributors.
3. Booth K .S., E. R. James e I. Popiel (1996). Cryopreservation of an attenuated vaccine strain of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Cryobiology*, 33: 330-337.
4. Boyt, W. P. (1991) Tripanossomoses animais em África. Diagnóstico, Tratamento e Prevenção – Manual Prático. 199 pp. Portugal, FAO, CTA.
5. Callow L. L. e J. Farrant (1973). Cryopreservation of the promastigote form of *Leishmania tropica* var *major* at different cooling rates. *International Journal of Parasitology*, 3: 77-88.
6. Connor R. J. (1994). African animal tripanosomiasis. In: Coetzer, J. A. W., G. R. Thomson e R. C. Tustin (editores). *Infectious diseases of livestock with special reference to Southern Africa*, Volume 1, pp 167-205. Cape Town, Oxford University Press.
7. Dalgleish R. J., L. T. Melors e G. W. Blight (1980). Comparisons of glucose, sucrose, and dimethyl sulfoxide as cryoprotective agents for *Babesia rodhaini*, with estimates of survival rates. *Cryobiology*, 17: 410-417.
8. Dar F. K., G. S. Lightart e A. J. Wilson (1972). Cryopreservation of pathogenic african trypanosomes *in situ*: metacyclic and bloodstream forms. *J. Protozool*, 19 (3): 494-497.

9. Dgedge M. e J. Arroz (1995). Manual de tripanossomíase humana rhodesiense. 86 pp. Moçambique. Instituto Nacional de Saúde-Ministério da Saúde.
10. Diamond L. S. (1964). Freeze-preservation of protozoa. *Cryobiology*, 1 (2): 95-102.
11. Farri T. A., D. C. Warhust e T. F. de C. Marshall (1983). The use of infectivity titrations for measurement of the viability of *Entamoeba histolytica* after cryopreservation. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77 (2): 259-266.
12. Gill J. H. e J. M. Redwin (1995). Cryopreservation of the first stage larvae of *Trichostrongylid* nematode parasites. *International Journal for Parasitology*, 25: 1421-1426.
13. Gulias-Gomes C. C., C. O. Soares e E. M. V. Milward-d-Azevedo (2003). Pupas de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera, Calliphoridae) criopreservadas em soluções de glicerol e dimetil sulfóxido como substrato de criação de *Nasonia vitripennis* (Walker, 1836) (Hymenoptera, Pteromalidae). *Revista brasileira Zootecias*, 5: 101-120.
14. Herbert W. J., W. H. R. Lumsden e A. McK. French (1968). Surviva of trypanosomes after rapid cooling and storage at -196°C. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 62 (2): 209-212.
15. Hubálek Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology* 46: 205-229.
16. Hubálek Z. (1996). Cryopreservation of microorganisms at ultra-low temperatures. Academia, Prague.

17. Jamal, S. A. J. (2005). The susceptibility of *Trypanosoma congolense* isolated in Zambézia Province (Mozambique) to isometamidium chloride, homium chloride and diminazene aceturate. Dissertation of the degree Master of Science. 79 pp. Pretoria, University of Pretoria.
18. Kettle D. S. (1995) Medical and veterinary entomology. Second Edition. 725 pp. United Kingdom, CAB INTERNATIONAL.
19. Lanham S. M. e D. G. Godfrey (1970). Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. Experimental Parasitology, 28: 521-534.
20. Leibo S. P., J. Farrant, P. Mazur, M. G. Hanna JR. e L. H. Smith (1970). Effects of freezing on marrow stem cell suspensions: interactions of cooling and warming rates in the presence of PVP, sucrose, or glycerol. Cryobiology, 6 (4): 315-332.
21. Lumsden W. H. R. (1972). Principles of viable preservation of parasitic protozoa. International Journal for Parasitology, 2: 321-332.
22. Lyman J. R. e G. L. Marchin (1984). Cryopreservation of *Giardia lamblia* with dimethyl sulfoxide using a Dewar flask. Cryobiology 21, 170-176.
23. Maina N. W. N., C. Kunz e R. Brun (2006). Cryopreservation of *Trypanosoma brucei gambiense* cryomedium developed for bul semen. Acta Tropica, 98: 207-211.
24. Malik K. A. (1995). A miniaturized method for freeze-drying of microorganisms in glass capillary tubes. Journal of Microbiological Methods, 21: 75-82.

25. Manson-Bahr P. E. C. e D. R. Bell (1987). Manson's tropical diseases. Nineteenth Edition. 1557 pp. England, Baillière Tindall.
26. Mazur P., S. P. Leibo, E. H. Y. Chu (1972). A two-factor hypothesis of freezing injury. *Experimental Cell Reseach*, 71: 345-355.
27. Mazur P. E J. J. Schmidt (1968). Interactions of cooling velocity, temperature, and warming velocity on the survival of frozen and thawed yeast. *Cryobiology*, 5 (1): 1-17.
28. Meryman H. T. (1971). Cryoprotective agents. *Cryobiology*, 8 (2): 173-183.
29. Miyake Y, P. Karanis e S. Uga (2004). Cryopreservation of protozoan parasites. *Cryobiology*, 48: 1-7.
30. Mutetwa S. M. e E. R. James (1984). Cryopreservation of *Plasmodium chabaudi* II. Cooling and Warming Rates. *Cryobiology*, 21: 552-558.
31. Overdulve J. P. e Antonisse H. W. (1970). Measurement of the effect of low temperature on protozoa by titration I. A mathematical model for titration, using prepatent period or survival time; with a discussion of the method of the ID6. *Experimental Parasitology*, 27: 310-322.
32. Overdulve J. P. e Antonisse H. W. (1970). Measurement of the effect of low temperature on protozoa by titration II. Titration of *Babesia rodhaini*, using prepatent period and survival time, before and after storage at -76°C. *Experimental Parasitology*, 27: 323-341.
33. Palmer D. A., G. M. Buening e C. A. Carson (1982). Cryopreservation of *Babesia bovis* for *in vitro* cultivation. *Parasitology*, 84: 567-572.

34. Paris J., M. Murray e F. McOdimba (1982). A comparative evaluation of the parasitological techniques currently available for the diagnosis of african trypanosomiasis. Acta Tropica, 39: 307-316.
35. Polge C. e M. A. Soltys (1957). Preservation of trypanosomes in the frozen states. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 51 (6): 519-526.
36. Rey L. (2002) Bases da parasitologia médica. Segunda edição. 379 pp. Brasil, Editora Guanabara Koogan S.A.
37. Rosen, N. L., M. Onodeha, C. L. Patton, M. B. Lipaian e F. F. Richards (1979). *Trypanosoma congolense*: Isolation and purification. Experimental Parasitology, 47: 378-383.
38. Silva, R. A. M. S., V. Sanchez e Dávila A. M. R. (2003) Metodologia da criopreservação dos *Trypanosomas evansi* e *Trypanosoma vivax*. Circular técnica, 40. Brasil, Embrapa Pantanal.
39. Silva R. A. M. S., A. Seidl, L. Ramirez e A. M. R. Dávila (2002). *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: biologia, diagnóstico e controle. 137 pp. Brasil, Embrapa Pantanal.
40. Standfast N. F. e Jorgensen W. K. (1997). Comparison of the infectivity of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* and *Anaplasma centrale* fofo cattle after cryopreservation in either dimethylsulphoxide (DMSO) or polyvinylpyrrolidone (PVP). Australian Veterinary Journal, 75 (1): 62-69.
41. Uilenberg G. (1998). A field guide for the diagnosis, treatment and prevention of african animal trypanosomosis. 108 pp. Rome, FAO.

42. Vega C. A., G. M . Buening, S. D. Rodriguez, C. A. Carson e K. Mcaughlin (1985). Cryopreservation of *Babesia bigemina* for *in vitro* cultivation. Journal Veterinary Research, 46 (2): 421-423.

43. Weathersby A. B. e J. W. McCall (1981). Cryopreservation of *Plasmodium gallinaceum* Brumpt sporozoites for 16 years at -196°C. Cryobiology, 18: 313-314.

12. ANEXOS

Anexo A. Preparação de PBS (Lanham e Godfrey, 1970)

a) Preparação do *stock* do tampão básico (PS):

Na₂HPO₄ (Anidro).....13.48g

NaH₂PO₄.2H₂O.....078g

NaCl.....4.25g

H₂O para 1000ml

b) O PBS é feito adicionando água ao PS na proporção de 6:4ml (PS:H₂O).

Anexo B1. Teste-t para a comparação entre as velocidades de congelamento

T-Test

Group Statistics

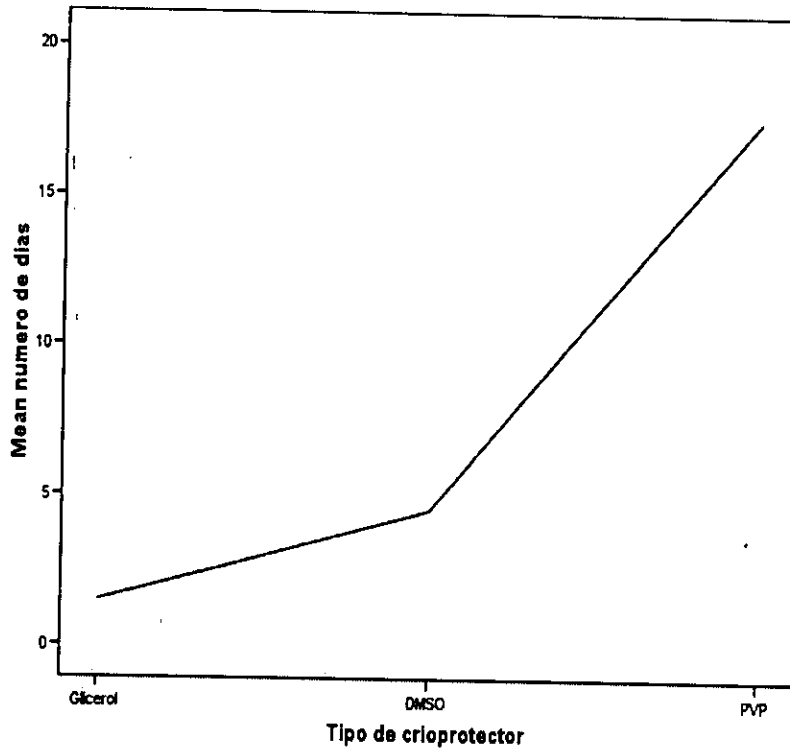
Metodo de criopreservacao	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
numero de dias Metodo A	36	9,39	10,966	1,828
Metodo B	36	8,33	9,818	1,636

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
numero de dias	Equal variances assumed	1,444	,234	1,246	70	,217	3,056	2,453	-1,837	7,948
	Equal variances not assumed			1,246	69,162	,217	3,056	2,453	-1,838	7,949

Anexo B2: ANOVA e LSD na eficácia entre os três crioprotectores.

Graph



Oneway

ANOVA

numero de dias

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3510,778	2	1755,389	28,568	,000
Within Groups	4239,833	69	61,447		
Total	7750,611	71			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: numero de dias

LSD

(I) Tipo de crioprotector	(J) Tipo de crioprotector	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Glicerol	DMSO	-3,000	2,263	,189	-7,51	1,51
	PVP	-16,083*	2,263	,000	-20,60	-11,57
DMSO	Glicerol	3,000	2,263	,189	-1,51	7,51
	PVP	-13,083*	2,263	,000	-17,60	-8,57
PVP	Glicerol	16,083*	2,263	,000	11,57	20,60
	DMSO	13,083*	2,263	,000	8,57	17,60

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Anexo B3: *Teste-t* na comparação entre as duas concentrações dos crioprotectores.

T-Test

Group Statistics

nivel de concentracao		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
numero de dias	8%	36	7,92	11,277	1,879
	10%	36	7,81	9,710	1,618

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
numero de dias	Equal variances assumed	1,079	,303	,045	70	,964	,111	2,480	-4,835	5,058
	Equal variances not assumed			,045	68,489	,964	,111	2,480	-4,837	5,060

Anexo B4: *Teste-t* na comparação entre os isolados.

T-Test

Group Statistics

Tipo de Isolado		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
numero de dias	Isolado 5	36	6,72	8,946	1,491
	Isolado 6	36	9,00	11,779	1,963

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
numero de dias	Equal variances assumed	4,343	,041	-,924	70	,359	-2,278	2,465	-7,194	2,639
	Equal variances not assumed			-,924	65,298	,359	-2,278	2,465	-7,201	2,645

Anexo B5: ANOVA na interacção entre as variáveis

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Metodo de criopreservacao	1	Metodo A	36
	2	Metodo B	36
Tipo de Isolado	1	Isolado 5	36
	2	Isolado 6	36
Tipo de crioprotector	1	Glicerol	24
	2	DMSO	24
	3	PVP	24
nivel de concentracao	1	8%	36
	2	10%	36

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: numero de dias

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Model	10060,667 ^a	24	419,194	9,405	,000
Metodo * Isol.	690,778	2	345,389	7,749	,001
Isol * Criop	225,444	2	112,722	2,529	,090
Criop * Conc	10,333	3	3,444	,077	,972
Metodo * Isol * Criop * Conc	1080,556	13	83,120	1,865	,059
Error	2139,333	48	44,569		
Total	12200,000	72			

a. R Squared = ,825 (Adjusted R Squared = ,737)

Anexo B6: Estatística descritiva mostrando menor período pre patente médio com glicerol

Descriptives

Descriptive Statistics

Metodo	Tipo de Isolado	Tipo de crioprotector	nível de concentraçao		N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Metodo A	Isolado 5	Glicerol	8%	numero de dias	3	3	4	3,67	,577
			Valid N (listwise)	3					
		10%	numero de dias	3	2	8	4,33	3,215	
			Valid N (listwise)	3					
		DMSO	8%	numero de dias	3	1	7	3,00	3,464
			Valid N (listwise)	3					
	10%	numero de dias	3	2	12	6,33	5,132		
		Valid N (listwise)	3						
	PVP	8%	numero de dias	3	30	30	30,00	,000	
			Valid N (listwise)	3					
		10%	numero de dias	3	10	30	18,33	10,408	
			Valid N (listwise)	3					
Isolado 6	Glicerol	8%	numero de dias	3	0	0	,00	,000	
			Valid N (listwise)	3					
		10%	numero de dias	3	0	0	,00	,000	
			Valid N (listwise)	3					
		DMSO	8%	numero de dias	3	1	1	1,00	,000
			Valid N (listwise)	3					
	10%	numero de dias	3	5	10	6,67	2,887		
		Valid N (listwise)	3						
	PVP	8%	numero de dias	3	9	30	18,33	11,846	
			Valid N (listwise)	3					
		10%	numero de dias	3	9	30	23,00	12,124	
			Valid N (listwise)	3					

Avaliação de diferentes métodos de criopreservação de *Trypanosoma congolense* em nitrogénio líquido

Descriptives

Metodo B	Isolado 5	Glicerol	8%	numero de dias	3	1	1	1,00	,000
			Valid N (listwise)	3					
			10%	numero de dias	3	1	1	1,00	,000
				Valid N (listwise)	3				
		DMSO	8%	numero de dias	3	1	1	1,00	,000
				Valid N (listwise)	3				
	10%		numero de dias	3	3	4	3,33	,577	
			Valid N (listwise)	3					
	PVP	8%	numero de dias	3	3	5	4,33	1,155	
			Valid N (listwise)	3					
		10%	numero de dias	3	3	5	4,33	1,155	
			Valid N (listwise)	3					
Isolado 6	Glicerol	8%	numero de dias	3	0	1	,33	,577	
			Valid N (listwise)	3					
		10%	numero de dias	3	0	5	1,67	2,887	
			Valid N (listwise)	3					
		DMSO	8%	numero de dias	3	2	30	12,33	15,373
				Valid N (listwise)	3				
	10%		numero de dias	3	2	3	2,33	,577	
			Valid N (listwise)	3					
	PVP	8%	numero de dias	3	6	30	22,00	13,856	
			Valid N (listwise)	3					
		10%	numero de dias	3	7	30	22,33	13,279	
			Valid N (listwise)	3					

Data written to D:\Documents and Settings\...\Biologia\base_de_dados.xls.

5 variables and 72 cases written to range: SPSS.

Variable: Metodo Type: Number Width: 3 Dec: 0

Variable: tipoI Type: Number Width: 2 Dec: 0

Variable: tipoC Type: Number Width: 2 Dec: 0

Variable: nivel Type: Number Width: 2 Dec: 0

Variable: ndias Type: Number Width: 2 Dec: 0

v

