

## NOTA DE PESQUISA

### VIABILIDADE DE *Tritrichomonas foetus* APÓS CONGELAMENTO COM DIFERENTES CRIOPROTETORES

NELSON ÉDER MARTINS<sup>1</sup>; FRANCISCO CARLOS F. LOBATO<sup>1</sup>; FELIPE M. SALVARANI<sup>1</sup>; RODRIGO OTÁVIO S. SILVA<sup>1</sup>; GERALDO MÁRCIO DA COSTA<sup>2</sup>; CATARINA G.R.D. LIMA<sup>1</sup>; PRHISCYLLA S. PIRES<sup>1</sup>; RONNIE A. DE ASSIS<sup>3</sup>

**ABSTRACT:**- MARTINS, N.E.; LOBATO, F.C.F.; SALVARANI, F.M.; SILVA, R.O.S.; COSTA, G.M. DA; LIMA, C.G.R.D.; PIRES, P.S.; ASSIS, R.A. DE. [Viability of *Tritrichomonas foetus* after freezing with diferents cryoprotectors.] Viabilidade de *Tritrichomonas foetus* após congelamento com diferentes crioprotetores. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, n. 3, p. 161-162, 2008. Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Caixa Postal 567, Av. Antônio Carlos, 6.627, Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brasil. E-mail: flobato@vet.ufmg.br

The aim of this work was to evaluate the viability of *Tritrichomonas foetus* cryopreserved with glycerol and dimethylsulphosyde (DMSO) at -196°C. Samples of the protozoa were thaw two days and 6, 12, 18, and 26 months after freezing to be evaluated. In the time analyzed, the freezing was viable in 60% and 90% of freeze samples with glycerol at 10% and DMSO at 12%, respectively.

KEY WORDS: Trichomoniasis, glycerol, dimethylsulphosyde (DMSO).

#### RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade de um isolado de *Tritrichomonas foetus* criopreservada com glicerol e dimetilsulfóxido (DMSO) a -196°C. Isolados do protozoário foram descongeladas dois dias após o congelamento e 6, 12, 18 e 26 meses, para avaliação de sua viabilidade. Em todos os tempos analisados, o congelamento foi viável em 60% e 90% das amostras congeladas com glicerol a 10% e DMSO a 12%, respectivamente.

PALAVRAS-CHAVE: Tricomoníase, glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO).

A tricomonose é uma doença sexualmente transmissível dos bovinos causada por um protozoário flagelado denominado *Tritrichomonas foetus*, cujo habitat é o trato genital. A transmissão ocorre do macho para a fêmea através da monta ou pelo uso de sêmen contaminado (BONDURANT, 2005). A patologia tem como principais manifestações clínicas a repetição de cios a in-

tervalos irregulares e o aborto, com maior frequência até os cinco meses de gestação (SCHWEBKE; BURGESS, 2004).

Apesar de laborioso, por requerer dois a três repiques semanais, *T. foetus* pode ser mantido com certa facilidade em culturas contaminadas e/ou axênicas, mas não pode ser estocado sob refrigeração (4-8°C) ou liofilizado, pois tende a morrer em um curto período de tempo (RAE; CREWS, 2006).

Técnicas de preservação pelo congelamento têm sido usadas com sucesso em diferentes espécies para manutenção de organismos vivos. Agentes crioprotetores tais como glicerol e dimetilsulfóxido (DMSO), os quais protegem células eucariotas contra os efeitos deletérios do congelamento e descongelamento, têm sido usadas para criopreservação de amostras de *T. foetus* (DIAMOND, 1957; LEVINE et al., 1962; LEVINE; ANDERSEN, 1966; KULDA; HONIGBERG, 1969; CAMPERO, 1989).

Com o intuito de manter isolados de *T. foetus* viáveis por um maior período de tempo no laboratório, este trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade de um isolado de *T. foetus* após processo de criopreservação com glicerol e dimetilsulfóxido (DMSO) a -196°C.

Foi utilizada uma amostra de *T. foetus* isolada de um touro da raça Nelore do município de Divinópolis, Minas Gerais, obtida por meio de lavado prepucial com solução fisiológica estéril a 0,85% acrescido do meio de Rieck modificado (GUIDA, 1960). Uma alíquota de 100mL do lavado prepucial foi repicada em caldo TYI-S-33 (DIAMOND et al., 1978) e

<sup>1</sup>Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Caixa Postal 567, Av. Antônio Carlos, 6.627, Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brasil. E-mail: flobato@vet.ufmg.br

<sup>2</sup>Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Campus Universitário, Caixa Postal 37. CEP.: 37.200-000 Lavras, MG.

<sup>3</sup>Setor de Clostridioses, Lanagro-MG, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Pedro Leopoldo, MG.

incubada a 37°C em aerobiose por 48 horas. Em seguida, a amostra foi examinada em microscópio óptico e apresentou-se positiva para *T. foetus*, porém contaminada com leveduras e bactérias, tornando-se necessário a realização da axenização.

Inicialmente a amostra foi repicada em dois tubos com caldo TYI-S-33, acrescido de 250 mg/ml de Procin e 333 UI de nistatina e incubada a 37°C em aerobiose por 48 horas. Para assegurar ausência de fungos e/ou bactérias, as culturas foram subcultivadas cinco vezes, mantendo a mesma concentração das drogas utilizadas anteriormente. Em seguida, a amostra foi também repicada em caldo Tioglicolato (Dignolab, Barcelona, Espanha) e incubada a 37°C em aerobiose por 48 horas para teste de esterilidade.

A amostra previamente axênizada em caldo TYI-S-33, denominada DIV-95, foi misturada separadamente com glicerol a 10% e a DMSO 12% (SCHWEBKE, 2004). Foram utilizados 25 criotubos com glicerol e 25 com DMSO. Os criotubos foram passados da temperatura ambiente até a 4°C em cinco minutos e de 0°C a -45°C em 45 minutos usando vapor de nitrogênio e, finalmente de -45°C para o nitrogênio líquido a -196°C. Para avaliação da viabilidade do congelamento dois dias seguinte ao mesmo, foi realizado o descongelamento de cinco tubos de cada crioprotetor, os quais foram examinados ao microscópio óptico para verificação de formas viáveis. Uma alíquota de 100mL foi repicada em caldo TYI-S-33 a 37°C em aerobiose por 48 horas para observação da presença de crescimento. Por fim, os mesmos parâmetros de avaliação da amostra foram realizados aos 6, 12, 18 e 26 meses após o congelamento.

O efeito do antibiótico e do fungicida foi altamente positivo logo no primeiro tratamento. Nos demais subcultivos para axenização das amostras, nenhum crescimento de fungos e/ou bactérias foi observado. No teste de esterilidade observou-se ausência de microrganismos contaminantes e crescimento satisfatório de *T. foetus*.

Na avaliação, realizada dois dias após o descongelamento e aos 6, 12, 18 e 26 meses, foi observado um grande número de formas vivas e com boa movimentação ao exame microscópico, bem como após o cultivo das amostras, o que sugere que o microrganismo continuava viável nos intervalos de tempo testados. O congelamento foi viável em 60% e 90% dos criotubos congelados com glicerol a 10% e DMSO a 12%, respectivamente.

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. Levine e Andersen (1966) recuperaram amostras de *T. foetus* após estocagem por 5,6 anos a -95°C, verificando a redução da viabilidade dos organismos congelados. Diamond (1957) relatou a recuperação do *T. foetus* após armazenamento à -170°C em vapor de nitrogênio líquido por 1013 dias. Campero (1989) manteve criopreservado a -196°C uma amostra durante sete meses e três amostras durante seis me-

ses utilizando DMSO a 10%, recuperando 65 a 85% dos parasitos, respectivamente.

A recuperação das amostras de *T. foetus* até 26 meses após o congelamento a -196°C demonstra que longos períodos de estocagem são possíveis a baixas temperaturas, corroborando com estudos anteriores (DIAMOND, 1957; CAMPERO, 1989; MATSUO, 2007). O presente estudo demonstrou ainda que a estocagem em DMSO a 10% é melhor que a em glicerol a 12%, nos períodos de tempos testados. Conforme mencionado anteriormente, a manutenção de amostras axênizadas de *T. foetus* por meio de cultivo, é um processo laborioso que requer sub-cultivos constantes, em torno de duas a três por semana, além de existir a possibilidade de variação antigênica ou perda da patogenicidade original devido a contínuas passagens em meio de cultura (CAMPERO, 1989).

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BONDURANT, R.H. Venereal diseases of cattle: natural history, diagnosis, and the role of vaccines in their control. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 21, n. 2, p.383-408, 2005.
- 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.
- 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.
- DIAMOND, L.S.; HARLOW, D.R.; CUNNICK, C.C. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.72, n.4, p.431-432, 1978.
- GUIDA, H.G.; MEDEIROS, P.M.; PIZELLI, G.N. *Conservação do Tritrichomonas foetus no meio de Rieck modificado*. Rio de Janeiro: DNPA-MA, 1960.7p. (Publicação n.35)
- KULDA, J.; HONIGBERG, B.M. Behavior and pathogenicity of *Tritrichomonas foetus* in chick liver cell cultures. *Journal of Protozoology*, v.16, n.3, p. 479-95, 1969.
- LEVINE, N.D.; ANDERSEN, F.L. Frozen storage of *Tritrichomonas foetus* for 5.6 years. *Journal of Protozoology*, v.13, n.2, p.199-202, 1966.
- LEVINE, ND.; ANDERSEN, F.L.; LOSCH, M.B.; NOTZOLD, R.A.; MEHRA K.N. Survival of *Tritrichomonas 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.
- MATSUO, J. A simple and rapid method for cryopreservation of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology Research*, v.101, n. 4, p.907-911, 2007.
- RAE, D.O.; CREWS, J.E. *Tritrichomonas foetus*. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 22, n.3, p.595-611, 2006.
- SCHWEBKE, J.R.; BURGESS, D. Trichomoniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, v.17, n.4, p.794-803, 2004.

Recebido em 25 de outubro de 2007.

Aceito para publicação em 09 de dezembro de 2008.