

# CRIOPRESERVAÇÃO PROLONGADA DA MICROFILÁRIA DE **MANSONELLA OZZARDI** EM CONCENTRADO DE SANGUE PERIFÉRICO HUMANO

Dale N. Lawrence (1)

## Resumo

Microfilária de **Mansonella ozzardi**, concentrada em sangue humano, congelado com um crioprotetor químico, e estocada a temperaturas de nitrogênio líquido ou líquido na fase vapor eram móveis quando descongeladas após 2 1/2 anos de conservação.

## INTRODUÇÃO

Houve uma considerável expansão na última década sobre o conhecimento das vantagens, aplicações e métodos de usar-se nitrogênio líquido para conservar indefinidamente vários microorganismos(1). Criopreservação prolongada de larvas contagiosas ou microfilárias de várias espécies de nematódeos parasitas, usando-se nitrogênio líquido têm sido registradas (2-6). Este trabalho apresenta informação sobre a viabilidade da microfilária de **Mansonella ozzardi** 2 1/2 anos após sua concentração em amostras de sangue humano periférico, contaminado.

## MÉTODOS

Como parte de um estudo genético do antígeno leucócito huma-

no (HLA) durante julho-agosto, 1976, entre os moradores de três vilas de índios Ticuna brasileiros ao longo do Amazonas, uma única amostra de 20ml de sangue periférico "heparinized" foi coletado, durante as horas do dia de cada dos 92 índios. Técnica estéril foi usada do começo ao fim. Cada amostra de sangue foi diluída a 1:4 com a solução salina balanceada de Hanks dentro do prazo de 12 hs após a coleta. O sangue diluído era dividido em duas porções iguais, e cada porção era estendida sobre 10ml de uma mistura específica de 24 partes de Ficoll 9% (M. W. 400.000, Sigma Chemical Co., St. Louis Missouri) e 10 partes de Hypaque 34% (Winthrop Laboratories, New York, New York), para servir como um gradiente de densidade (7). Centrifugação a: 400 g por 30min resultou na separação de eritrócitos e leucócitos polimorfonucleares dos mononucleares linfócitos e macrófagos. A camada mononuclear, de densidade 1.077 g/ml, também continha microfilária nas amostras de alguns dos índios.

(1) Immunology Division, Bureau of Laboratories Center for Disease Control (CDC), Public Health Service, U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Atlanta, Georgia.

A camada de células mononuclear rica em microfilária foi removida de cada dois tubos individuais, combinadas, e levada duas vezes (200 g, 30 minutos) em solução de Hanks, e ressuspensa em 2ml de solução de Hanks. A "mistura congeladora" crioprotetora foi preparada, misturando-se 4 partes, por volume, de soro fetal de bezerro com uma parte de DMSO. Iguais porções de suspensão celular e mistura congeladora eram adicionadas juntas, e os resultantes 4ml de suspensão divididos e distribuídos igualmente em quatro frascos criogênicos de Wheaton de fundo espesso. Os frascos eram fechados com rolhas de borracha e tampas de alumínio dobradas. Aproximadamente 35 frascos colocados em cada uma das várias caixas isoladas (Jiffy Shipping Bags, Jiffy Manufacturing Co., Salen, Illinois). Cada caixa cheia foi colocada ainda dentro de outra caixa semelhante, e então colocada em um freezer a  $-50^{\circ}\text{C}$ . Após períodos de 5-30 dias a  $-70^{\circ}\text{C}$ , os frascos eram transferidos para nitrogênio líquido. Exceto por um intervalo de exposição de 5 dias ao  $\text{CO}_2$  sólido (aproximadamente  $-70^{\circ}\text{C}$ ) preciso pelo subsequente transporte das amostras, todas elas permaneceram continuamente em temperaturas de nitrogênio líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) ou na fase vapor ( $-125^{\circ}\text{C}$ ) por todo o período de estocagem de 2.5 anos.

O descongelamento começou pela exposição de um frasco ao ar em uma sala. Após cerca de 3-4min., a rolha de borracha estava macia o suficiente para permitir a passagem de uma agulha calibre 20; isto aconteceu quando a temperatura interna era aproximadamente  $-50^{\circ}\text{C}$ . O descongelamento foi então completado esguichando o conteúdo do frasco com 8ml de um diluente consistindo de meio de cultura de tecido RPMI 1640 (90% do volume total), acrescido de 100 unidade de penicilina, e 50  $\mu\text{g}$  de estreptomicina por ml de meio e 10% de soro fetal de bezerro (10% do volume total). Esta suspensão foi centrifugada a 45 G por 7 min e resuspensa em 150  $\mu\text{l}$  do meio diluente. A contagem das microfilárias e a determinação do percentual móvel, foi efetuada com esta suspensão, ou uma diluição posterior dela, 3 h mais tarde. Doze amostras com microfilária foram mantidas a  $20^{\circ}\text{C}$  durante à noite e o percentual móvel determinado novamente 24 horas após o descongelamento. No período da coleta original, um esfregaço de sangue espesso correspondente, como usado na detecção de malária, foi feito e processado de maneira convencional.

## RESULTADOS

Vinte e sete das noventa e duas amostras de sangue examinadas da maneira descrita acima conti-

nham microfilária de **M. ozzardi**. Contagens de microfilária foram feitas em 18 (67%) das 27 suspensões que continham mais de 1.000 microfilárias total nos 150  $\mu$ l do diluente. Nenhuma informação é disponível de nossas amostras sobre o número de microfilárias no volume de sangue inicial (20ml), ou sobre que percentagem destes foi concentrada pelo gradiente de densidade. Uma estimativa grosseira do grau de melhoramento preciso, com respeito ao selecionamento de um gradiente de densidade ideal para discriminar entre a microfilária e outros elementos formados, pode ser deduzida da observação de que proporção de pessoas determinadas para serem microfilária-positiva pelo método descrito aqui foi somente 1,2 vezes aquele obtido do exame dos esfregaços de sangue correspondentes. Um estudo epidemiológico da dinâmica de mansonelose nas três vilas Ticuna registradas aqui (Umariçu, Vendaal, Campo Alegre), assim como também outras vilas Ticuna e não Ticuna de índios amazônicos, é o assunto de uma publicação separada (8).

Viabilidade imediata e de 3 h, avaliada pela mobilidade, foi maior que 95% em todas. Avaliação da microfilária na suspensão novamente 24h após o descongelamento mostrou que a percentagem de microfilárias que estavam móveis

tinha permanecido acima de 80% em todas, menos em uma das 12 amostras reexaminadas.

## DISCUSSÃO

Dificuldades de introduzir **Mansonella ozzardi** em um animal de laboratório tem limitado as pesquisas com filaríasis de **M. ozzardi**. A **M. ozzardi** é altamente dominante entre habitantes de certas áreas da América do Sul, mas a inacessibilidade para pesquisas laboratoriais tem impedido estudos que requerem microfilárias viáveis. Este trabalho sugere um caminho alternativo para obterem-se e conservarem-se quantidades de microfilárias concentradas. Não é atualmente conhecido se as microfilárias de **M. ozzardi** móveis conservadas da maneira descrita aqui se desenvolverão em vetores hospedeiros apropriados.

O gradiente de densidade usado resultou, conforme se pretendia, na visível demarcação de uma faixa contendo os linfócitos e também a retenção de muitas microfilárias. Os linfócitos podem ser usados para uma variedade de subsequentes testes imunológico-celular e genético, mas poderiam ser removidos, se assim se desejar. Uma vez que a maioria esmagadora dos outros elementos formados da amostra original de sangue já foi retirado, tratamentos severos — para retirar eritrócitos, por exemplo — são desnecessários.

TABELA 1 — Distribuição de Haplotipo HLA (N=81), amostra ao acaso de índios Ticuna brasileiros não aparentados \*

	A2	A3	Aw24	Aw31	Gene Frequency	Standard Error
B7	—	.0123 $\Delta = .0122$	—	—	.0123	.0122
Bw52	.0247 $\Delta = .0223$	—	—	—	.0247	.0172
B15.1	.0247 $\Delta = .0101$	—	.1111 $\Delta = .0233$	.0123 $\Delta = .0257$	.1481	.0395
Bw35	.0370 $\Delta = .0224$	—	.0617 $\Delta = .0261$	.0494 $\Delta = .0114$	.1481	.0395
Bw53	.0123 $\Delta = .0099$	—	—	.0123 $\Delta = .0050$	.0247	.0172
Bw16 (w39)	—	—	.1111 $\Delta = .0645$	.1852 $\Delta = .0974$	.2963	.0507
Bw44	—	—	.0247 $\Delta = .0101$	—	.0247	.0172
B40	—	—	.2840 $\Delta = .0937$	.0370 $\Delta = .0581$	.3210	.0519
Freqüência de gene	.0988	.0123	.5926	.2963		
Erro padrão	.0331	.0122	.0546	.0507		

\* Em nenhum caso, uma única entrada ( $1/81 = 0,0123$ ) em uma célula desta matriz representa o único exemplo daquela combinação haplotipo particular nas vilas; antes aquele haplotipo foi encontrado em outras pessoas mas somente uma vez na amostra ao acaso.



Figura 1 — Distribuição de antígenos de HLA em índios Ticuna do Brasil: Resultados de tipificação de uma família com lepra (No. prelo: **Tissue Antigens**)

Estudo superior para aumentar a seleção de um gradiente de densidade específico poderia resultar em isolamento mais puro de microfilária para congelamento.

Em retrospecto o autor também aconselha a substituição por criotubos plástico estéril de 1,2ml (Nunc Intermed N.º 1077-1, Vanguard International, IIIA Green Grove, Neptune, New York 07753), em vez dos frascos de vidro descritos, de maneira a melhorar a segurança do laboratório, facilitar a

evacuação dos conteúdos, e trabalhar com uma forma e dimensão de frasco mais convencional.

A técnica descrita aqui requer muitas vantagens de laboratório. Identificação prévia, por esfregaço de sangue, de pessoas altamente microfilarêmicas poderia permitir aos pesquisadores arranjar para que o sangue periférico fosse coletado de uns poucos indivíduos e transportado para um laboratório regional onde poderia ser centrifugado e a microfilária congelada. A viabilidade a longo prazo do concentrado, microfilária viável poderia facilitar estudos de contagiosidade e do ciclo de vida de **M. ozzardi**.

#### AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi subvencionado, em parte, pela National Science Foundation (NSF) sob a subvenção BMS-74-11823.

Agradecemos à National Science Foundation por tornar possíveis as facilidades no Navio de Pesquisas **Alpha Helix** durante julho e agosto de 1976 pela assistência dos Doutores James V. Neel, William Oliver, e James V. Neel, Jr., na coleta de amostras de sangue periférico; somos também gratos pelo apoio das Divisões de Parasitologia e Immunologia, CDC, e do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

O uso dos nomes comerciais é para identificação somente e não se constitui endosso pelo Serviço de Saúde Pública ou pelo U.S. Department of Health, Education, and Welfare.

## Distribuição de antígenos de HLA em índios Ticuna do Brasil: Resultados de tipificação de uma família com lepra

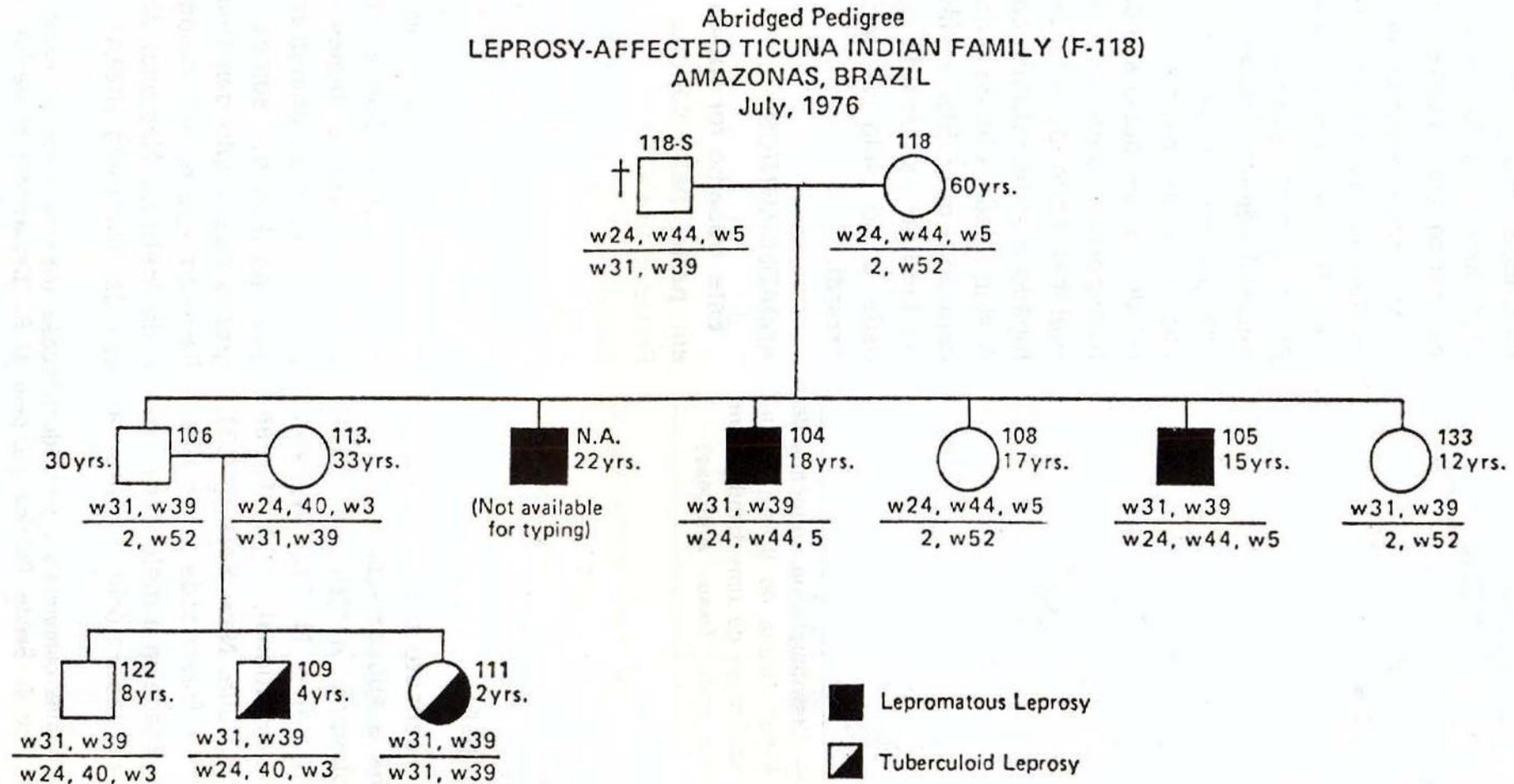


Figura 2 — Distribuição de antígenos de HLA em índios Ticuna do Brasil: Resultados de tipificação de uma família com lepra

## SUMMARY

Microfilariae of *Mansonella ozzardi*, concentrated from human blood, frozen with a cryoprotectant chemical, and stored at liquid or vaporphase liquid nitrogen temperatures were motile when thawed after 2<sup>1</sup>/<sub>2</sub> years of preservation.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAMPBELL, W.C.; BLAIR, L.S.; EGERTON, J.R.

- 1973 — Unimpaired infectivity of the nematode *Haemonchus contortus* after freezing for 44 weeks in the presence of liquid nitrogen. In: *J. Parasitology*, 59 : 425-427.

CENTER for Disease Control.

- 1978 — Preparation of peripheral blood lymphocytes: Part A. In: **Quantitation and Functional Assay of T and B Cells: Immunology Series N.º 8 — Procedural Guide**. Center for Disease Control, Public Health Service, U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Atlanta, pp. 1-10.

LAWRENCE, D.; ERDTMANN, B.; PEET, J.; NUNES DE MELLO, J.; HEALY, G.; NEEL, J.; SALZANO, F.

- 1979 — Epidemiologic studies among Amerindian populations of Amazonia. II. Prevalence of *Mansonella ozzardi*. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 28(6):991-996.

McCALL, J.W.; JUN, Jung; THOMPSON, P.E.

- 1975 — Cryopreservation of infective larvae of *Dipetalonema viteae*. *J. Parasitology*, 61:340-342.

OBIAMIWE, B.A. & MACDONALD, W.W.

- 1971 — The preservation of *Brugia pahangi* microfilariae at sub-zero temperatures and their subsequent development to the adult stage. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 65:547-554.

OGUNBA, E.O.

- 1969 — Preservation of frozen *Brugia pahangi* using dimethyl sulfoxide. *J. Parasitology*, 55 : 1101-1102.

RINFRET, A.P. & LaSALLE, B (Eds.)

- 1975 — **Round Table Conference on the Cryogenic Preservation of Cell Cultures**. National Academy of Sciences, Washington D.C.

VETTER, J.C.M. & KLAVER-WESSELING, J.C.M.

- 1977 — Unimpaired infectivity of *Ancylostoma ceylanicum* after storage in liquid nitrogen for one year. *J. Parasitol.*, 63 : 700.

(Aceito para publicação em 24/3/80)