

## CRIOPRESERVAÇÃO DO *TRYPANOSOMA CRUZI* EM EXEMPLARES DE *TRIATOMA INFESTANS* EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS

Leny S. FILARDI e Z. BRENER (1)

### RESUMO

Exemplares de *Triatoma infestans* experimentalmente infectados com 5 diferentes cepas de *T. cruzi* foram preservados em nitrogênio líquido por períodos que variavam entre 17 e 144 dias. Dos triatomíneos infectados, 94,4% apresentavam, após a descongelação, flagelados móveis no conteúdo do aparelho digestivo; entre 27 camundongos inoculados com flagelados obtidos de igual número de insetos criopreservados, 21 apresentaram fase aguda com alta parasitemia. As curvas de parasitemia obtidas nos animais inoculados revelam que, aparentemente, as características das cepas não foram significativamente alteradas pelo processo de criopreservação. Esse método pode ser útil na estocagem de cepas já adaptadas ao laboratório, assim como triatomíneos naturalmente infectados coletados em a natureza.

### INTRODUÇÃO

A possibilidade da preservação de tripomastigotas metacíclicos foi pela primeira vez demonstrada por CUNNINGHAM & HARLEY<sup>6</sup> através da manutenção a  $-79^{\circ}\text{C}$  de sangue bovino no qual exemplares de *Glossina* infectados com *Trypanosoma brucei* se alimentaram artificialmente. MINTER & GOEDBLOED<sup>10</sup> preservaram em nitrogênio líquido insetos hematófagos dos gêneros *Glossina* e *Sergentomya* naturalmente infectados com tripanosomatídeos. DAR & col.<sup>7</sup> preservaram em nitrogênio líquido formas infectantes de *T. vivax*, *T. congolense* e *T. brucei* em próboscidas e glândulas salivares de vetores natural e experimentalmente infectados. BRENER & col.<sup>5</sup> realizaram preservação viável de formas metacíclicas de *Trypanosoma rangeli* de hemolinfa e glândulas salivares de triatomíneos infectados.

Aparentemente, a única observação sobre criopreservação de formas infectantes de *T.*

*cruzi* é a de FLÜCK<sup>9</sup> que congelou a  $-79^{\circ}\text{C}$  exemplares de *Triatoma infestans*, experimentalmente infectados e observou a viabilidade dos parasitas após 6 meses de preservação. No presente trabalho relatamos os resultados obtidos de criopreservação a  $-196^{\circ}\text{C}$  em nitrogênio líquido de exemplares de *T. infestans* experimentalmente infectados com 5 diferentes cepas de *T. cruzi*, assim como as características da infecção em camundongos inoculados com o material preservado.

### MATERIAL E MÉTODOS

Cepas de *T. cruzi* — CL, FL e MR, isoladas de triatomíneos naturalmente infectados coletados no Rio Grande do Sul, Brasil<sup>3</sup>; Y, isolada de um caso agudo humano<sup>11</sup>, Gilmar, isolada de um caso agudo humano em 1974. Essas cepas vem sendo mantidas,

Trabalho realizado com auxílio do Conselho Nacional de Pesquisas

(1) Departamento de Zoologia e Parasitologia, I.C.B., U.F.M.G. e Instituto Nacional de Endemias Rurais, Belo Horizonte, Brasil

desde o seu isolamento, por passagens sucessivas em camundongos albinos.

*Triatomíneos usados* — ninfas de IV e V estadios de *T. infestans* criados em laboratório foram alimentados em camundongos infectados com *T. cruzi* e então mantidos a cerca de 26°C e 70% de humidade. A congelação foi realizada entre 15 e 47 dias após o repasto sanguíneo, escolhendo-se exemplares apresentando tripomastigotas ou alta densidade de outras formas flageladas.

*Congelação dos triatomíneos* — 3 ml de uma mistura contendo 70% de meio LIT ("liver-infusion tryptose") e 30% de glicarina foram colocados em tubos de polipropileno (75 x 12 mm) nos quais eram então introduzidos 1 a 2 triatomíneos infectados. Os tubos eram colocados em um "deep-freezer" a -73°C por 24 horas e então transferidos diretamente para o nitrogénio líquido contido em recipientes "LR-30 Linde", de acordo com técnica anteriormente descrita<sup>8</sup>. A descongelação era realizada colocando-se os tubos contendo insetos em "banho-maria" a 37°C por 5 minutos.

*Exame de triatomíneos descongelados e inoculação em camundongos* — os insetos eram dissecados, os intestinos médio e posterior rompidos em pequena quantidade de uma solução de citrato de sódio a 3,8%

sendo em seguida investigada a presença de flagelados vivos. O material positivo era inoculado em camundongos albinos machos pesando 15-16 gramas. A partir do 4.º dia de inoculação procedia-se à contagem de tripomastigotas sanguíneos. Eram realizadas hemoculturas dos camundongos que apresentavam, repetidamente, exames a fresco negativos até o 30.º dia de inoculação, usando-se meio monofásico LIT.

## RESULTADOS

Dos 36 triatomíneos preservados em nitrogénio líquido, 34 apresentaram-se positivos após a descongelação (Tabela I), embora a densidade de parasitas nas fezes tenha sido aparentemente menor que no exame prévio à congelação. Os dois exemplares negativos apresentavam-se com o intestino praticamente destituído de conteúdo. Nos triatomíneos descongelados e positivos os flagelados se apresentavam com forma e movimento normais após períodos de preservação que variavam de 17 a 144 dias.

Na Tabela I pode ser observado que entre 27 camundongos inoculados com suspensão de flagelados obtida após descongelamento dos insetos, 21 animais se infectaram e apenas 6, todos inoculados com amostra Y, apre-

TABELA I

Cepa	Tempo de preservação (dias)	N.º triatomíneos congelados	N.º triatomíneos positivos após descongelação	N.º camundongos inoculados	N.º camundongos positivos	Período pré-patente (dias)
CL	17	1	1	2	2	9, 10
CL	86	7	7	3	3	8, 10
CL	144	1	1	—	—	—
MR	28	2	2	3	3	9, 10
MR	32	6	6	3	3	12, 15
FL	33	2	2	—	—	—
FL	36	6	6	7	7	10, 11, 13
Y	32	3	3	4	0	—
Y	90	3	1	2	0	—
GILMAR	36	5	5	3	3	14, 18
TOTAL		36	34	27	21	

sentaram-se negativos ao exame de sangue a fresco e hemocultura.

Nos animais que apresentaram parasitemia patente, o curso da infecção foi variável. Dos 5 camundongos inoculados com a cepa *CL*, 2 morreram em plena fase aguda e 3 evoluíram, depois do período agudo, para uma fase crônica; na Fig. 1 está representada uma das curvas de parasitemia obtida após inoculação com a cepa *CL*. De 7 animais inoculados com a cepa *FL* e que apresentaram fase aguda, apenas 2 sobreviveram e apresentaram fase crônica; na Fig. 2 estão representadas curvas de parasitemia obtidas nos animais inoculados com essa cepa. Os 6 camundongos inoculados com a cepa *MR*

morreram em plena fase aguda, apresentando alta parasitemia. Finalmente, os 3 animais inoculados com a cepa *Gilmar* igualmente apresentaram nitidamente fase aguda e 2 animais sobreviveram.

#### DISCUSSÃO

Como foi referido em trabalho anterior<sup>8</sup>, a criopreservação de *T. cruzi* apresenta várias vantagens tais como propiciar condições para estudos comparativos de cepas de várias procedências; prevenir modificações das características biológicas sofridas pelos parasitas no curso da manutenção prolongada em laboratório; finalmente, diminuir os riscos

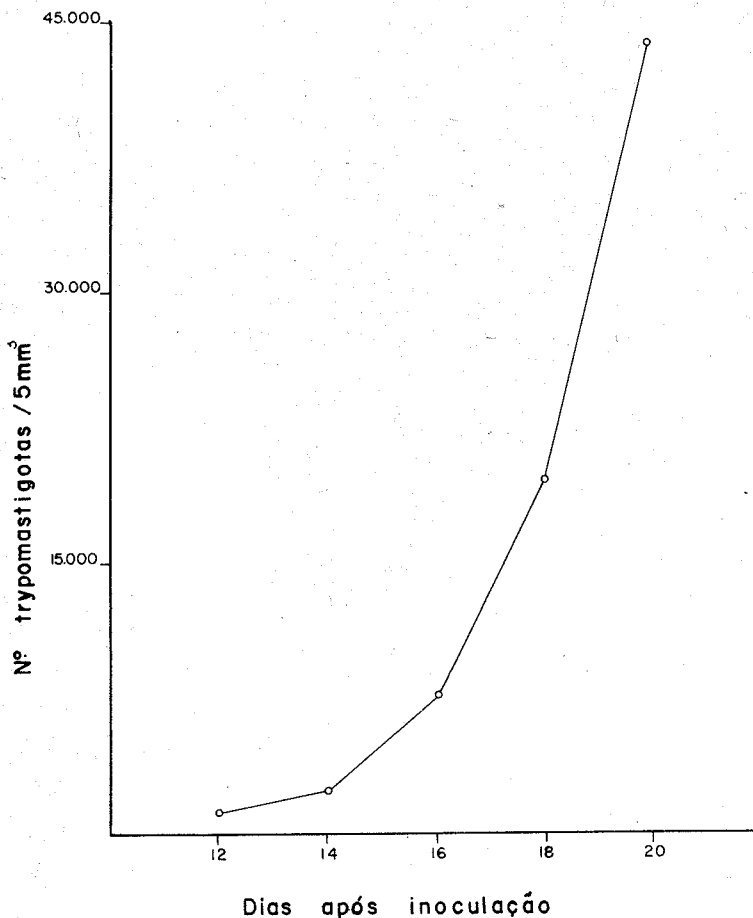


Fig. 1 — Curva de parasitemia obtida em camundongo inoculado com fezes de triatomíneo obtidas após congelamento do inseto em nitrogênio líquido (cepa *CL*)

de infecção acidental decorrentes do manuseio experimental de grande número de populações do parasita. A criopreservação, em nitrogênio líquido, de cepas de *T. cruzi* evoluindo em triatomíneos representa uma alternativa para a preservação de formas sanguíneas a baixa temperatura e constitui um meio de estocar, inalterados, parasitas de triatomíneos naturalmente infectados coletados em a natureza.

Em nossa experiência, 94,4% dos triatomíneos mantiveram-se infectados após o processo de congelamento. As características das cepas aparentemente não foram alteradas já que as configurações das curvas de parasitemia de algumas das cepas congeladas, descritas em trabalhos anteriores<sup>1,4</sup> permaneceram inalteradas nos animais inoculados. Não dispomos de uma explicação segura para o fato de que alguns triatomíneos infectados com a cepa *Y* não tenham mantido a sua infecção após o congelamento, assim como para a negatividade dos animais inoculados com conteúdo intestinal de insetos parasitados pela mesma cepa. Cumpre mencionar, entretanto, que temos observado uma

crecente dificuldade em obter infecções por *T. cruzi* em triatomíneos alimentados em camundongos inoculados com a cepa *Y*, mesmo na presença de altas parasitemias, apresentando-se os insetos negativos ou com escasso parasitismo. Essa observação, que está de acordo com trabalho anterior<sup>2</sup> no qual descrevemos uma menor suscetibilidade de triatomíneos as cepas *Y* e *Berenice*, pode ajudar a explicar os dados apresentados no presente trabalho em relação à cepa *Y*.

A técnica descrita no presente trabalho pode ser útil na preservação de populações de *T. cruzi* já adaptadas às condições experimentais de laboratório ou evoluindo em triatomíneos coletados em a natureza, permitindo obter dados sobre as alterações do comportamento biológico do parasita após prolongada manutenção em laboratório.

#### S U M M A R Y

*Cryopreservation of Trypanosoma cruzi in Triatoma infestans strains experimentally infected*

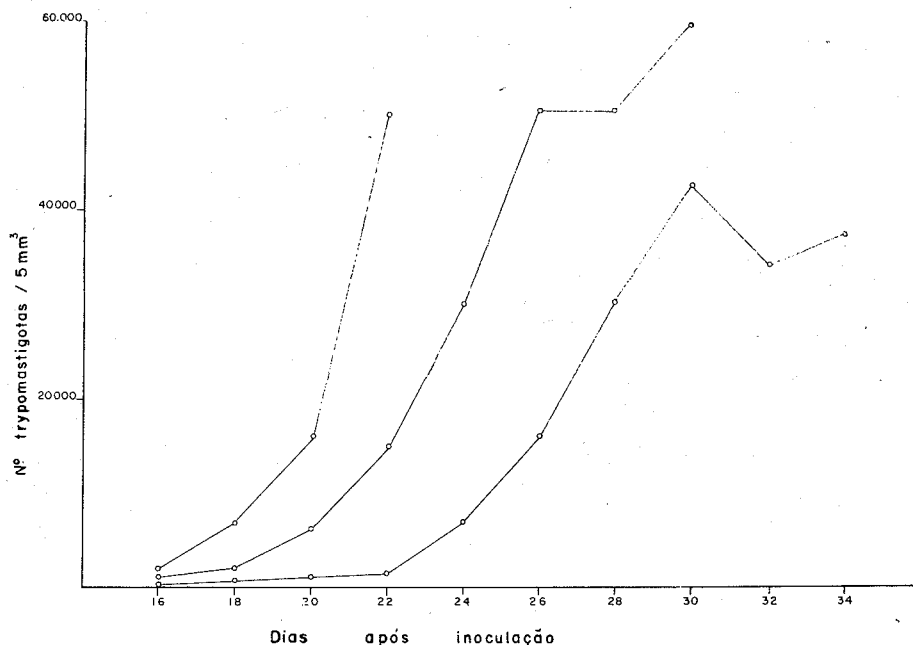


Fig. 2 — Curva de parasitemia obtida em camundongos inoculados com fezes de triatomíneos obtidas após congelamento dos insetos em nitrogênio líquido (cepa FL)

Laboratory-reared *Triatoma infestans* experimentally infected with 5 different *T. cruzi* strains were preserved in liquid nitrogen for 17 to 144 days. After being thawed at 37°C, 94.4% of the insects presented motile flagellates in their digestive tract; 21 out of 27 mice inoculated with flagellates obtained from frozen vectors developed typical acute phase with high parasitemia. The curves of parasitemia observed in the inoculated mice showed that the strain characteristics have not been apparently affected by preservation in liquid nitrogen. Cryopreservation of *T. cruzi* infective stages within the intact vector may prove useful for storing laboratory-adapted strains as well as naturally infected vectors collected in endemic areas.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRENER, Z. — Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 59:19-26, 1965.
2. BRENER, Z. — Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 13: 171-178, 1971.
3. BRENER, Z. & CHIARI, E. — Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 13:220-224, 1971.
4. BRENER, Z. — Observations on *Trypanosoma cruzi* strains maintained over an 8-year period in experimentally inoculated mice. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 16: 32-38, 1974.
5. BRENER, Z.; FILARDI, L.S. & CUBA, C. — Cryopreservation of *Trypanosoma rangeli* infective stages from experimentally-infected *Rhodnius ecuadoriensis*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 17:16-19, 1975.
6. CUNNINGHAM, M. P. & HARLEY, V.M. B. — Preservation of living metacyclic forms of the *Trypanosoma brucei* sub-group. *Nature* (London) 194:1186, 1962.
7. DAR, F.K.; LIGHTARD, G.S. & WILSON, A.V. — Cryopreservation of pathogenic African trypanosomes *in situ*: metacyclic and bloodstream forms. *J. Protozool.* 19: 494-497, 1972.
8. FILARDI, L.S. & BRENER, Z. — Cryopreservation of *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms. *J. Protozool.* 22:398-403, 1975.
9. FLÜCK, V. — Tiefkühl-Konservierung von *Trypanosoma cruzi* in einem der natürlichen Überträger (*Triatoma infestans*). *Acta Tropica* 19:355-357, 1962.
10. MINTER, D.M. & GOEDBLOED, E. — The preservation in liquid nitrogen of tsetse flies and phlebotomine sandflies naturally infected with trypanosomatid flagellates. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 65:175-181, 1971.
11. SILVA, L.H.P. & NUSSENZWEIG, V. — Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol.* 20:191-207, 1953.

Recebido para publicação em 15/9/1975.