

Criopreservação do Fungo Quitrídio: *Batrachochytrium dendrobatidis*

Carolina Lambertini^{1,2,3}, Ana Beatriz Carollo^{1,2,3}, Paula Morão², Domingos da Silva Leite², Luís Felipe Toledo³

¹ Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Campinas, SP, Brasil. E-mail: lambertini.carol@gmail.com

² Laboratório de Antígenos Bacterianos, Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Avenida Bertrand Russel, s/n, Cidade Universitária, CEP 13083-865, Campinas, SP, Brasil.

³ Laboratório de História Natural de Anfíbios Brasileiros, Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Rua Monteiro Lobato, 255, Cidade Universitária, CEP 13083-862, Campinas, SP, Brasil. E-mail: toledolf2@yahoo.com

Anfíbios ao redor do mundo estão sofrendo declínios e extinções, sendo a quitridiomiose, causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), referida como um dos principais fatores responsáveis (Berger *et al.* 1998; Daszak *et al.* 1999). O *Bd* já foi detectado em praticamente todos os continentes, e cepas provenientes de diversas regiões do planeta estão sendo isoladas. Após o isolamento, o *Bd* pode ser mantido em laboratório através de inóculos em meios de cultura (Vieira e Toledo 2012), porém há evidências de que a patogenicidade do *Bd* seja atenuada ao longo do tempo conforme cultivado *in vitro* (Berger *et al.* 2005; Brem *et al.* 2013; Langhammer *et al.* 2013). Sendo assim, é de extrema relevância que cepas de *Bd* recém-isoladas sejam criopreservadas, garantido assim que mantenham suas características originais de patogenicidade, e que experimentos de suscetibilidade possam ser realizados minimizando-se os efeitos da seleção artificial sobre o patógeno (Berger *et al.* 2005; Brem *et al.* 2013; Langhammer *et al.* 2013).

TÉCNICAS PARA CRIOPRESERVAÇÃO DO BD

Apresentamos aqui dois métodos para a criopreservação de cepas de *Bd*, adaptados de Boyle *et al.* (2013), com algumas modificações, sendo o primeiro método para preservação em ultrafreezer (a -80°C), e o segundo para preservação em nitrogênio líquido (NL2).

1. Procedimentos iniciais

1.1. Preparo dos cultivos

Após o isolamento, os cultivos de *Bd* a serem criopreservados devem ser inoculados em placas contendo meio de cultura Triptona 1% (Vieira e Toledo 2012). Os inóculos devem ser incubados em estufa a 23°C de 3 a 5 dias, visando plena atividade dos zoósporos (Fig. 1A).

Para a criopreservação em ultrafreezer (Método 1), após o crescimento dos cultivos, deve-se adicionar 10 mL de caldo Triptona 1% estéril nas placas com cultivo, e raspar todo o conteúdo com o auxílio de alças plásticas estéreis (Fig. 1B). Para a criopreservação em NL2 (Método 2), após o crescimento, deve-se recortar 2 pedaços de aproximadamente 1 cm² (Fig. 1C) do

meio de cultura com crescimento do inóculo, e adicioná-los em tubo tipo Falcon contendo 25 mL de caldo Triptona 1% previamente preparado e esterilizado, e incubar os inóculos a 23°C de 3 a 5 dias.

1.2. Crioprotetores

Para a preparação do *mix* de criogenia, são utilizados os seguintes materiais: Glicerol, Soro fetal bovino (FBS), Dimetilsulfóxido (DMSO), Leite em pó desnatado (de preferência Molicco®), caldo Triptona 1% estéril. Todo o procedimento deve ser realizado em ambiente estéril.

2. Processo de congelamento

2.1. Criopreservação em ultrafreezer

O *mix* de criogenia deve ser preparado em tubos tipo Falcon de 15 mL, previamente esterilizados, utilizando as seguintes quantidades de reagentes para cada cepa a ser congelada: 1000 µL de glicerol, 1000 µL de FBS, 1000 µL de DMSO e 13 g de leite em pó desnatado. Homogeneizar a mistura e transferir 5 mL do cultivo previamente raspado na placa para o *mix* de criogenia. Homogeneizar novamente e distribuir 1 mL por criotubo previamente esterilizado.

Os criotubos devem ser devidamente identificados com o nome da cepa e data de congelamento, e alocados em caixas de criogenia de papelão ou plástico. As caixas devem ser armazenadas diretamente em ultrafreezer a -80°C.

2.2. Criopreservação em nitrogênio líquido

O *mix* de criogenia deve ser preparado em tubos tipo Falcon de 15 mL estéreis, no fluxo laminar, utilizando as seguintes quantidades para cada cepa: 1000 µL de FBS, 1000 µL de DMSO e 8 mL de caldo triptona 1%. Os tubos contendo os inóculos de *Bd* devem ser centrifugados a 12.000 RPM por 12 minutos. Deve-se descartar o sobrenadante e os pedaços de meio de cultivo que foram adicionados previamente, adicionar 5 mL de *mix* de criogenia ao pellet com auxílio de pipetas tipo Pasteur previamente esterilizadas, homogeneizar a mistura e distribuir 1 mL por criotubo.

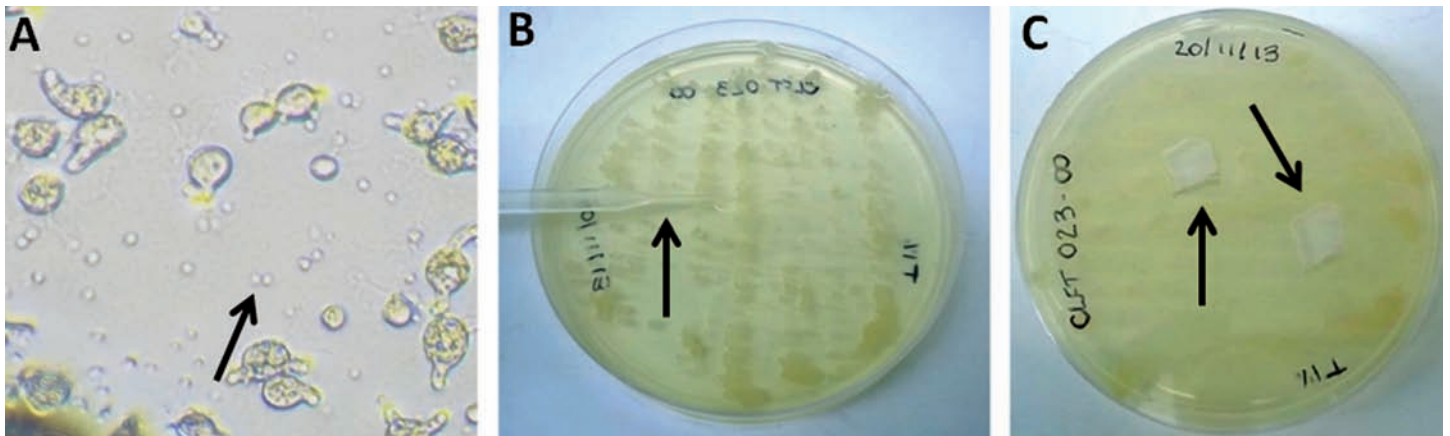


Figura 1: Placa com cultivo de *Batrachochytrium dendrobatidis*, em aumento de 100X, evidenciando a presença de zoósporos (indicados por seta) no meio de cultura como indicativo de cultura ativa (A). Procedimento de raspagem de placa com cultivo de *B. dendrobatidis*, com auxílio de alça plástica estéril (indicada por uma seta) (B). Recortes do meio de cultura (indicados por setas) com cultivo de *B. dendrobatidis* (C).

Os criotubos devem ser devidamente identificados, alocados em caixas especiais para congelamento gradual (Mr. Frosty®) e mantidos em ultrafreezer a -80°C durante uma noite. Após esse procedimento, os criotubos devem ser transferidos para o NL2.

3. Reativação

Para a reativação das cepas, os criotubos devem ser aquecidos em Banho Maria a 43°C durante 45 segundos. Após esse procedimento, com auxílio de pipeta e ponteiras estéreis, transferir 200 μL da amostra descongelada para uma placa contendo meio de cultura Triptona 1% com adição de antibióticos (Vieira e Toledo 2012). As placas devem ser seladas com Parafilm® para evitar o ressecamento do meio de cultivo e incubadas a 21°C até o crescimento.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ambos os métodos foram testados em nosso laboratório e obtivemos sucesso na reativação. Recomendamos a utilização dos dois métodos, minimizando assim as chances de perda das amostras criopreservadas. Esperamos que os métodos aqui descritos auxiliem nas pesquisas realizadas com *Bd*, garantindo seu efeito de patogenicidade *in vitro*, o que possibilita o entendimento dos efeitos dessa doença e contribui para o desenvolvimento de estudos relacionados à conservação dos anfíbios.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Dra. Joyce E. Longcore pelo auxílio na adaptação dos métodos, à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, processos: 2008/50325-5, 2011/51694-7 e 2012/04160-0), ao NSF (National Science Foundation), e ao USFWS (U.S. Fish and Wildlife Service) por fornecerem financiamento e bolsas de estudo.

REFERÊNCIAS

- Berger, L., R. Speare, P. Daszak, D. E. Green, A. A. Cunningham, C. L. Goggin, R. Slocombe, M. A. Ragan, A. D. Hyatt, K. R. McDonald, H. B. Hines, K. R. Lips, G. Marantelli e H. Parkes. 1998.** Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(15): 9031-9036.
- Berger, L., G. Marantelli, L. F. Skerratt e R. Speare. 2005.** Virulence of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* varies with the strain. *Diseases of aquatic organisms*, 68: 47-50.
- Boyle, D. G., A. D. Hyatt, P. Daszak, L. Berger, J. E. Longcore, D. Porter, S. G. Hengstberger e V. Olsen. 2003.** Cryo-archiving of *Batrachochytrium dendrobatidis* and other chytridiomycetes. *Diseases of Aquatic Organisms*, 56(1): 59-64.
- Brem, F. M. R., M. J. Parriss e G. E. Padgett-Flohr. 2013.** Re-isolating *Batrachochytrium dendrobatidis* from an amphibian host increases pathogenicity in a subsequent exposure. *PloS one*, 8(5): e61260.
- Daszak, P., L. Berger, A. A. Cunningham, A. D. Hyatt, D. E. Green e R. Speare. 1999.** Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerging infectious diseases*, 5(6): 735.
- Langhammer, P. F., K. R. Lips, P. A. Burrowes, T. Tunstall, C. M. Palmer e J. P. Collins. 2013.** A fungal pathogen of amphibians, *Batrachochytrium dendrobatidis*, attenuates in pathogenicity with *in vitro* passages. *PloS one*, 8(10): e77630.
- Vieira, C. A. e L. F. Toledo. 2012.** Isolamento, cultivo e armazenamento do fungo quitrídio: *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Herpetologia Brasileira*, 1: 18-19.



Podocnemis unifilis, Oiapoque, AP (Foto: Fábio Maffei).