Criopreservação do Fungo Quitrídio: *Batrachochytrium dendrobatidis*

Carolina Lambertini[1,2,3], Ana Beatriz Carollo[1,2,3], Paula Morão[2], Domingos da Silva Leite[2], Luís Felipe Toledo[3]

[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 quitridiomicose, 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 cm^2 (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), Dimetilsulfoxido (DMSO), Leite em pó desnatado (de preferência Molico®), 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 auxilio de pipetas tipo Pasteur previamente esterilizadas, homogeneizar a mistura e distribuir 1 mL por criotubo.

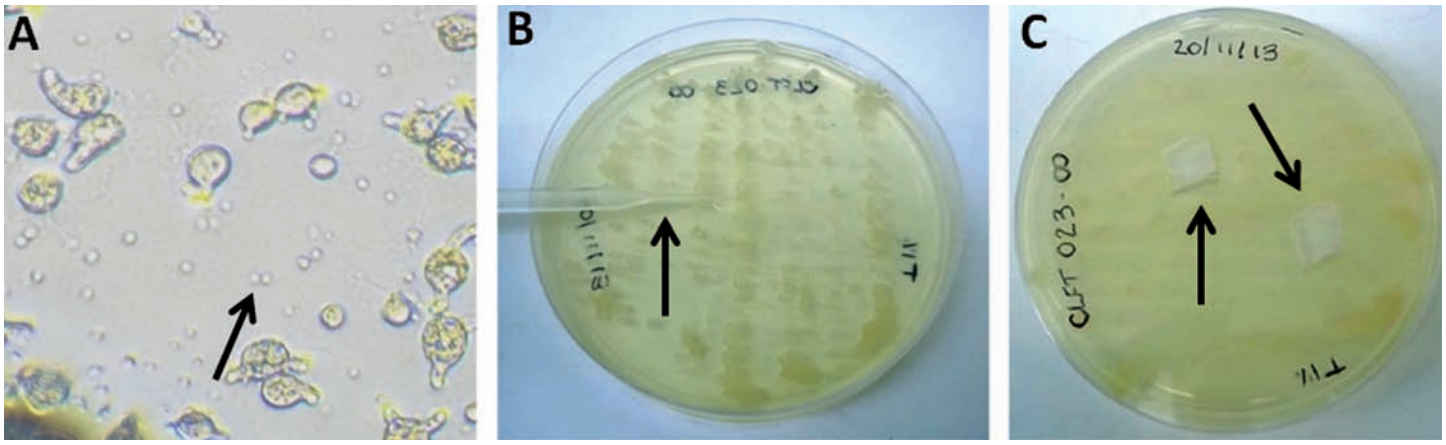

Figura 1: Placa com cultivo de *Batrachochytrium dendrobatidis,* em aumento de 100X, evidenciando a presença de zoósporos (indicados por seta) no meio de cultura como indicativo de cultura ativa (A). Procedimento de raspagem de placa com cultivo de *B. dendrobatidis,* com auxílio de alça plástica estéril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



Tropidurus jaguaribanus, São João do Jaguaribe, CE (Foto: Daniel Passos).