



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

TEREZA D'ÁVILA DE FREITAS AGUIAR

**CRIOPRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS DO VÍRUS DA RAIVA A MÉDIO
PRAZO**

FORTALEZA

2014

TEREZA D'ÁVILA DE FREITAS AGUIAR

CRIOPRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS DO VÍRUS DA RAIVA A MÉDIO
PRAZO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução e sanidade de carnívoros, onívoros, herbívoros e aves.

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira.

FORTALEZA
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Aguiar, Tereza D'ávila de Freitas .

Criopreservação de Amostras do Vírus da Raiva a
Médio Prazo [recurso eletrônico] / Tereza D'ávila de
Freitas Aguiar. – 2014.

1 CD-ROM: il.; 4 ¾ pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do
trabalho acadêmico com 122 folhas, acondicionado em
caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm).

Tese (doutorado) – Universidade Estadual do Ceará,
Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2014.

Área de concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Orientação: Prof.^a Dra. Maria Fátima da Silva
Teixeira.

1. Vírus da Raiva. 2. Agentes crioprotetores. 3.
Criopreservação. 4. Médio prazo. 5. RT-PCR. I. Título

TEREZA D'ÁVILA DE FREITAS AGUIAR

CRIOPRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS DO VÍRUS DA RAIVA A
MÉDIO PRAZO

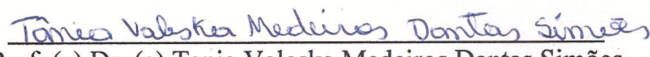
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Veterinárias da Faculdade de
Veterinária da Universidade Estadual do Ceará,
como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutora em Ciências Veterinárias.

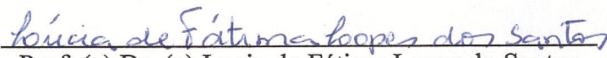
Aprovadaem: 14/07/2014

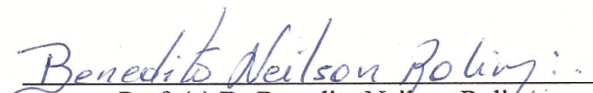
BANCA EXAMINADORA


Prof. (a) Dr. (a) Maria Fátima da Silva Teixeira(Orientador(a))
Universidade Estadual do Ceará


Prof. (a) Dr. (a) Edmara Chaves da Costa
UNILAB - Redenção


Prof. (a) Dr. (a) Tania Valeska Medeiros Dantas Simões
EMBRAPA Tabuleiros Costeiros


Prof. (a) Dr. (a) Lucia de Fátima Lopes dos Santos
Universidade Estadual do Ceará


Prof. (a) Dr Benedito Neilson Rolin
Laboratório Central de Saúde Pública - LACEN

A Deus, pela minha vida e por ser o responsável por tudo acontecer da melhor forma.

Aos meus pais, Maria Jesus Batista de Freitas Aguiar, melhor mãe - pai do mundo, e, Amilton Melo de Aguiar (*in memorian*), pela minha vida.

A minha sobrinha Sarinha que nasceu no decorrer desse trabalho e que amo demais.

Aos meus queridos animais, Che Guevara, Lua e Pererê, pelo companheirismo e grande amor.

E em especial a todos os animaizinhos utilizados nesse estudo.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À *Universidade Estadual do Ceará* por viabilizar minha formação integral e continuada, fornecer subsídios para a execução desse trabalho e contribuir decisivamente à construção de novos conhecimentos. Fazer parte dessa realidade acadêmica é antes de tudo um privilégio e uma conquista.

A *Fundação Cearense de Apoio a Pesquisa – FUNCAP* por me conceder durante os quatro anos do doutorado estabilidade financeira, mediante concessão de bolsa de pesquisa.

Ao *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq* pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho, mediante concessão de bolsa de pesquisa e taxas de bancada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), em particular aos professores *Davide Rondina* e *Dárcio Ítalo*, pela competência e propiciar a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Virologia da UECE, por ser minha segunda família e pela possibilidade de execução deste projeto.

À professora doutora *Maria Fátima da Silva Teixeira*, minha querida orientadora, que há mais de dez anos é minha segunda mãe. Por ser um exemplo de fibra, guerreira, por ter sido uma mão amiga, com direito a muitos puxões de orelha, banhos de sal grosso e muito mais. Obrigada por me oferecer a grande oportunidade de desenvolvimento acadêmico. Valeram o aprendizado, a convivência e a liberdade para buscar soluções. Muito obrigada por fazer parte da minha vida de uma forma tão importante e por ser um grande exemplo de pessoa!

À doutora *Phyllis Catharina Romijn*, pelo trato quanto às questões ligadas a esse trabalho. Pelas manifestações de solidariedade dedicadas a esse trabalho.

Ao Laboratório de Manipulação de Folículos Ovarianos Pré-Antrais – LAMOFOPA, em particular ao professor *José Ricardo de Figueiredo*, pela importante contribuição nesse trabalho, possibilitando o uso de equipamentos pertencentes ao seu laboratório.

Aos professores *Paulo Michel Roehe*, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e *Paulo Eduardo Brandão*, da Universidade de São Paulo, e aos alunos de doutorado *Esmale Sales* e *Aryana Lushese*, pela grande ajuda em uma parte ímpar do trabalho.

À professora doutora *Lúcia de Fátima Lopes dos Santos*, por ser essa pessoa tão doce, muito cativante e por ter contribuído sempre na minha formação, fazendo parte das minhas bancas desde o mestrado.

Aos *professores* do PPGCV/UECE, por compartilharem seus conhecimentos e experiências, por estimularem nossa curiosidade científica e nos apresentarem as ferramentas para a construção de novos saberes.

À secretária do PPGCV/UECE, *Adriana Maria Sales Albuquerque*, Adrianinha, pela grande simpatia e atenção, por sempre me ajudar e até me aconselhar em muitas situações de dificuldades da minha vida.

À *Edmara Chaves Costa*, que foi a precursora desse estudo e me permitiu dar continuidade ao seu excelente trabalho de doutorado. Obrigada por toda sua atenção, sugestões e ensinamentos, que foram cruciais para a realização desse projeto.

Ao *Neilson* por ser esse “raivoso” tão entusiasmado e que, assim, nos incentiva a ter muita determinação nessa área.

À *Taninha*, Tania Valeska, por ser uma das pessoas mais importantes pra mim no laboratório desde que ingressei. Por sempre me incentivar nessa jornada científica e muitas vezes me colocar pra cima em momentos difíceis. Sinto muitas saudades!!!

À Lorena Mayana, por contribuir para o crescimento do Labovir, participando sempre das nossas bancas.

À UECE, em particular ao Diretor do Instituto de Ciências Biomédicas da UECE, *José Henrique Leal Cardoso*, e ao funcionário *Franck* por serem responsáveis pelo fornecimento de ração e maravalha para os animais do experimento.

À minha mamãe, *Maria Jesus*, por ser a pessoa mais importante da minha vida, ser meu ego auxiliar, me dar cobertura, fonte de inspiração, porto seguro e maior amor infinito. Obrigada mãezinha por ser a melhor mãe do mundo!

À minha irmã, *Maria Princesa*, por todos os ensinamentos e amor. E muito obrigada também por ter me dado a sobrinha mais gostosa de todas! Você é chatinha comigo, mas te amo muito.

A toda minha família, que mesmo distante fisicamente na maioria dos dias, me apoiou demais nessa escolha e sempre me deu força para seguir em frente. Em especial aos meus priminhos *Amaurilio*, *Patynha* e *Tilhinha*, por terem me dado uma forcinha a mais, mesmo que só perguntando como estavam os preparativos pra minha tão esperada defesa.

Ao *Ivan Melo*, tia *Fátima* e tio *Arnaldo* que foram uma família pra mim durante grande parte dessa caminhada, muito obrigada por toda amizade, apoio e amor. Diante tantos problemas enfrentados juntos Deus nos aproximou sempre mais. Cada abraço e mensagens de bom dia foram muito importantes para que meu dia fosse melhor.

À minha família LABOVIR: *Taninha* (faz falta demais no Lab, fundamental!) *Valeskinha*, *Jean Berg* (meu pai quando eu era IC!), *Suzana*, esses sempre serão do labovir, pois foram os alunos que me receberam no lab. *Edmara* (meu braço direito na elaboração da minha dissertação e precursora desse trabalho de doutorado), *Júnior Júnior* (o autor de todos os designs mais legais do lab. Meu amiguinho que morro de saudade!), *Carlos*, *Luís*, *Ronaldo*, *Aryana*, *Neilson*, *Cinthinha* (minha amiga que sinto muita falta no lab. Amo muito!), *Iguinho* (pela ajuda nesse trabalho! Vc também faz falta demais no lab!), *Gabrielle*, *Esmaille*, *Alfredo*, *Renan*, *Sammily*, *Raquel*, *Allan*, *Marília*, *Antoniél*, *Paloma* e a todos que passaram pelo nosso laboratório, pelo apoio,

incentivo e convívio. Obrigada por tornarem a caminhada menos árdua. Muito obrigada pela amizade de vocês, que fica para sempre.

Às minhas amigas *Samilly*, *Raquel* e *Gabi*, por toda ajuda nesse trabalho, pela amizade, toda a paciência e conselhos dados quanto a minha novela amorosa mexicana.

Ao *Allan*, meu querido IC e amigo confidente que tanto me aconselhou dentro daquela “salinha” (mini biotério) sempre cuidando dos camundongos! Toda sua dedicação também foi muito importante para a realização desse trabalho.

Ao *Iguinho*, *Jr Jr* e *Ronaldo*, pela amizade, por cada palavra e mensagem de conforto e por toda a ajuda nesse trabalho.

À grande amiga *Henna Roberta Quinto* pelo convívio, quase todos os almoços juntas, irmandade, amor, conselhos e apoio, sempre. Obrigada por ser a irmã que pude escolher, por sempre me ouvir e por ter tanta paciência em minhas inúmeras indecisões básicas. Nessa reta final, obrigada também por ter ido comigo sempre comer uns churrasquinhos deliciosos.

À minha sempre amiga *Natália Pereira* pela amizade e amor, por sempre estar presente nos momentos decisivos da minha vida.

A todas as “gatinhas” e “gatinhos” da minha vida *Annnnja*, *Livia*, *Helena*, *Ana Kelen*, *Leonel*, *Marcio* (Esse “manéu” foi também meu companheiro em tantas aulas, tutoramentos e muito mais coisas envolvidas no doutorado) pela amizade, por nossos encontros, por fazerem parte da minha vida.

Às minhas amigas *Cinthinha*, *Marleninha* e *Aninha* pela amizade e amor, pelos nossos almoços e por todos os conselhos dados nessa minha caminhada.

Aos meus animais amados, meu cachorrinho *Che Guevera de Freitas Aguiar*, pelo companheirismo e por sempre querer brincar e pedir carinho e dessa forma me distrair um pouco nos momentos mais estressantes em casa, minha gatinha *Lua* e meu passarinho *Pererê*.

À vida de todos os animaizinhos utilizados neste trabalho, elas não foram tiradas em vão e sim para um bem maior.

A todos aqueles que, mesmo à distância, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A efetivação de trabalhos no campo das ciências biológicas, agrárias, biomédicas e indústria farmacêutica voltados à pesquisa com o vírus da Raiva baseia-se, primariamente, na aquisição e manutenção de amostras biológicas. Contudo, não existe uma fórmula singular, ideal ou universal que determine a eficiência da estocagem e preservação desse microrganismo a médio e longo prazos, fazendo da criobiologia um campo de amplo potencial para o desenvolvimento de pesquisas nessa área. Assim, o objetivo desse estudo foi conservar amostras de vírus da Raiva a médio prazo mediante diferentes protocolos de criopreservação. Para o desenho metodológico, as amostras submetidas à criopreservação foram provenientes de camundongos (*Mus musculus*) inoculados com a cepa viral CVS 31.2 por via intracerebral. Os protocolos de criopreservação do vírus da Raiva à temperatura de -20°C foram divididos em função das variáveis tempo e aplicação de crioprotetores. Foram utilizados dois crioprotetores penetrantes ou intracelulares (dimetilsulfóxido e glicerol) e dois crioprotetores não penetrantes ou extracelulares (sacarose e polietilenoglicol). Elegeram-se a partir da literatura especializada as concentrações medianas e máximas de cada agente crioprotetor. Quanto ao tempo de conservação das amostras, foram estabelecidos intervalos regulares de tempo (360, 720 e 1080 dias) para a execução de testes laboratoriais (titulação viral, imunofluorescência direta, inoculação intracerebral de camundongos e Reação em Cadeia da Polimerase com Transcriptase Reversa), no sentido de avaliar o comportamento das amostras virais mediante as distintas técnicas de preservação instituídas, bem como, analisar a acurácia dos testes aplicados. Após um ano de criopreservação, foram observadas divergências quanto à intensidade da fluorescência dos corpúsculos intracelulares de vírus da Raiva e no tempo médio de sobrevida dos camundongos entre as amostras dos controles positivo e os demais tratamentos com os crioprotetores. Após dois anos, quase nenhuma amostra submetida aos protocolos de criopreservação induziu reação de fluorescência, incluindo os controles. À exceção da amostra exposta ao crioprotetor sacarose (68%), que respondeu positivamente à imunofluorescência direta e à inoculação intracerebral de camundongos. Por conseguinte, após três anos de criopreservação todas as amostras de vírus da Raiva conservadas a -20°C se apresentaram negativa, inclusive a amostra exposta ao crioprotetor sacarose 68%. Por outro lado, a técnica molecular RT-PCR detectou o RNA viral em 100% das amostras de vírus da Raiva criopreservadas por um ano (T₃₆₀) e em 80% das amostras criopreservadas por dois anos (T₇₂₀). Dessa forma, a criopreservação de vírus da Raiva a -20°C a médio prazo comprometeu a viabilidade das amostras virais. Contudo, o agente crioprotetor sacarose, 68%, produziu um efeito conservante nas amostras de vírus da Raiva criopreservadas por até dois anos, no entanto foi ineficaz após a conservação por um período de três anos. Adicionalmente, a técnica molecular RT-PCR foi capaz de detectar o RNA do vírus da Raiva em amostras criopreservadas a -20°C com viabilidade viral comprometida.

Palavras-chave: Vírus da Raiva. Agentes crioprotetores. Criopreservação. Médio prazo. RT-PCR.

ABSTRACT

The effectiveness of works in the field of biological sciences, agricultural, biomedical and pharmaceutical industry focused on research with the rabies virus is based primarily on the acquisition and maintenance of biological samples. However, there isn't a natural, ideal or universal formula that determines the efficiency of storage and preservation of this microorganism in the medium and long term, making of cryobiology a potential field for the development of research in this area. Thus, the aim of this study was to conserve samples of rabies virus in the medium term by different cryopreservation protocols. For the methodological design, the samples subjected to cryopreservation were from mice (*Mus musculus*) inoculated with the virus strain CVS 31.2 intracerebrally. The cryopreservation protocols of the rabies virus at -20°C were divided into variable time function and use of cryoprotectants. There were used two intracellular or penetrating cryoprotectants (dimethylsulfoxide and glycerol) and two non-penetrating or extracellular cryoprotectants (sucrose and polyethylene glycol), were elected median and maximum concentrations of each cryoprotectant agent. As for the shelf life of the samples, regular time intervals (360, 720 and 1080 days) were established to carry out laboratory tests (virus titration, direct immunofluorescence, intracerebral inoculation of mice and Polymerase Chain Reaction with Reverse Transcriptase) to assess the behavior of viral samples by the different preservation techniques imposed, as well as to analyze the accuracy of the tests. After a year of cryopreservation, differences were observed in terms of fluorescence intensity of intracellular corpuscles of rabies virus and the median survival time of the mice between the samples of the positive controls and other treatments with cryoprotectants. After two years, almost all samples submitted to cryopreservation protocols did not induce any reaction fluorescence, including the controls. Except for the sample exposed to the cryoprotectant sucrose (68%) who responded positively to direct immunofluorescence and intracerebral inoculation of mice. Therefore, after three years of cryopreservation all rabies virus samples stored at -20°C were tested negative, including the sample exposed to the cryoprotectant sucrose 68%. On the other hand, the RT-PCR detected the viral RNA in 100% of samples of rabies virus cryopreserved for one year (T_{360}) and 80% of the cryopreserved samples for two years (T_{720}). Thus, the cryopreservation of rabies virus at -20°C in the medium-term affect on the viability of viral samples. However, the agent cryoprotectant sucrose, 68%, produced a preservative effect on the rabies virus samples of cryopreserved for up to two years, however was ineffective after storage for a period of three years. Additionally, the RT-PCR was capable of detecting rabies virus RNA in samples cryopreserved at -20°C with impaired viral viability.

Keywords: Rabies virus. Cryoprotectants. Cryopreservation. Medium-term. RT-PCR.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1 – Vírus da Raiva visualizado ao microscópio eletrônico. A - Formato de projétil. B - Estrias de ribonucleoproteína. C - Espículas de glicoproteína.....	21
Figura 2 – Proteínas do genoma dos vírus da Raiva.....	21
Figura 3 – Genoma dos Rhabdovirus.....	22
Figura 4 – Replicação do vírus da Raiva na célula.....	24
Figura 5 – Trajeto dos vírus da Raiva a partir do ponto de inoculação.....	26

Capítulo 2

Figura 1 – Photomicrographs of direct immunofluorescence reactions in the presence (A and B) of rabies virus antigens in the brain tissue samples subjected to cryopreservation at -20°C for up to 2 years (immunofluorescence microscope equipped with 40x objective lens; Carl Zeiss, Germany). A: 68% SUC, cryopreservation for 1 year demonstrating very abundant antigens in all fields of view, “uncountable” (++++), B: 68% SUC, cryopreservation for 2 years demonstrating few antigens, 1 or more particles in less than 100% but more than 50% of the fields of view (++).....	74
--	----

Capítulo 3

Figura 1 – Amplification products obtained by PCR from cDNA of the rabies virus genome in samples cryopreserved at -20°C for one year. Positive samples: 10% glycerol (GLY10), 55% glycerol (GLY55), 10% polyethylene glycol (PEG10), 45% polyethylene glycol (PEG45), 10% sucrose (SUC10), pure positive control (PC-CVS), 32% dimethyl sulfoxide (DMSO32), 10% dimethyl sulfoxide (DMSO10), PBS positive control (PC-PBS), 68% sucrose (SUC68). Negative sample: negative control (NC).....	100
---	-----

Capítulo 4

Figura 1 – Camundongo com sinais de descoordenação, tetania e paralisia 6 dias após inoculação intracerebral de amostra de vírus da Raiva exposta ao crioprotetor sacarose 68% conservada por 1 ano a -20°C.....	109
--	-----

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1 – Effects of cryopreservation at -20°C on rabies virus samples evaluated by viral viability tests, intracerebral inoculation of mice and direct immunofluorescence after exposure to internal and external cryoprotectants..... 73

Capítulo 3

Tabela 1 – Results of the viral viability, intracerebral inoculation and direct immunofluorescence tests, as well as the RT-PCR molecular test, in rabies virus samples cryopreserved at -20°C for one (T₃₆₀) and two years (T₇₂₀)..... 99

LISTA DE QUADROS

Capítulo 1

Quadro 1 – Exemplos dos principais crioprotetores empregados na preservação de algumas espécies de micro-organismos..... 41

Capítulo 4

Quadro 1 – Efeitos da criopreservação a -20°C por até três anos em amostras de vírus da Raiva avaliadas pelo teste de inoculação intracerebral de camundongos, após a exposição ao crioprotetor sacarose..... 108

Quadro 2 – Efeitos da criopreservação a -20°C a médio prazo em amostras de vírus da Raiva avaliadas pelo teste de Imunofluorescência Direta, após a exposição ao crioprotetor sacarose..... 108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABLV - *Australian Bat Lyssavirus*

a.C. – Antes de Cristo

BD - Becton Dickinson

cDNA – DNA complementar

CEUA - Comissão de Ética para o Uso de Animais

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CN – Controle Negativo

CNS - Central Nervous System

CP – Controle Positivo

CVS - Challenge Standard Virus

DIF - Direct Immunofluorescence

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Deoxyribonucleic Acid. Sigla em inglês para Ácido Desoxirribonucleico

DUVV - Vírus *Duvenhage*

EBLV-1 - *European Bat Lyssavirus 1*

EBLV-2 - *European Bat Lyssavirus 2*

FUNCAP - Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico

GLI - Glicerol

GLY - Glycerol

HaV - vírus *Heterosigma akashiwo*

IFD - Imunofluorescência Direta

IC - Intracerebral

LABMAS – Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia

LAMOFOPA – Laboratório de Manipulação de Folículos Ovarianos Pré - Antrais

LBV - Vírus *Lagos Bat*

MOKV - Vírus *Mokola*

MTS - Média do tempo de sobrevida

mRNA – RNA mensageiro

NC – Negative Control

NCA - Número de camundongos afetados

NCT - Número de camundongos testados

PBS - Phosphate Buffered Saline. Sigla em inglês para Tampão Fosfato-Salino.

PC – Positive Control

PEG – Polietilenoglicol

pH – potencial Hidrogeniônico

RNA – Ribonucleic Acid. Sigla em inglês para Ácido Ribonucleico.

RNAr – RNA ribossômico

RNP - Ribonucleoproteína

RT-PCR - Reação em Cadeia pela Polimerase com Transcrição Reversa

SAC – Sacarose

SNC - Sistema Nervoso Central

SUC - Sucrose

OMS - Organização Mundial de Saúde

UECE - Universidade Estadual do Ceará

UFC - Universidade Federal do Ceará

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

USP – Universidade de São Paulo

WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 A RAIVA.....	19
2.2 O AGENTE ETIOLÓGICO DA RAIVA.....	19
2.3 ESTRUTURA DA PARTÍCULA VIRAL.....	20
2.4 CICLO INFECCIOSO DO VÍRUS NA CÉLULA.....	24
2.5 PATOGENIA DA RAIVA.....	26
2.6 CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS DE VÍRUS DA RAIVA.....	27
3 JUSTIFICATIVA	30
4 HIPÓTESES CIENTÍFICAS.....	31
5 OBJETIVOS	32
5.1 Objetivo Geral	32
5.2 Objetivos Específicos	32
6 CAPÍTULO 1	33
7 CAPÍTULO 2	62
8 CAPÍTULO 3	82
9 CAPÍTULO 4	101
10 CONCLUSÕES	110
11 PERSPECTIVAS	111
12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
ANEXOS	118
ANEXO 1 - Parecer do Comitê de Ética para Uso de Animais em Pesquisa da UECE	118
ANEXO 2 - Artigo de revisão publicado no periódico Acta Veterinária Brasilica – Capítulo 1.....	119
ANEXO 3 - Artigo publicado no periódico Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical – Capítulo 2	120
ANEXO 4 - Email de confirmação de submissão de artigo no periódico Veterinary Microbiology – Capítulo 3.....	121
ANEXO 5 - Email de confirmação de submissão de artigo no periódico Pesquisa Veterinária Brasileira – Capítulo 4.....	122

1 INTRODUÇÃO

A Raiva é uma encefalite viral de caráter agudo, progressivo e incurável, enquanto enfermidade reemergente, é responsável por um contingente de mortes humanas que supera o índice de mortalidade de infecções como febre amarela, dengue e encefalite japonesa. Analisando-se numa perspectiva ampla, a Raiva pode ser considerada a mais importante zoonose viral conhecida, em virtude da sua ampla distribuição, conseqüências à saúde pública e implicações econômicas (HEMACHUDHA et al., 2002; RUPPRECHT et al., 2002).

A efetivação de trabalhos no campo das ciências biológicas, agrárias, biomédicas e indústria farmacêutica voltados à pesquisa com o vírus da Raiva baseia-se, primariamente, na aquisição e manutenção de amostras biológicas. Assim, o reconhecimento da grande relevância dos microrganismos para o desenvolvimento humano tem conduzido ao aprimoramento de técnicas destinadas à conservação de diversos espécimes microbiológicos. Devido à emergente importância atribuída à estocagem de amostras que muitas instituições, públicas e privadas, têm investido na constituição de estoques (biobancos), implementando inúmeras técnicas de preservação, com a implementação de protocolos próprios e de avançadas tecnologias de controle dos dados (FIGUEIREDO, 2001; HOLLAND et al., 2003; PAOLI, 2005).

O armazenamento de amostras de variadas origens apresenta propósitos diagnósticos e de pesquisa, abrangendo aplicações tanto em laboratórios médicos quanto veterinários. Contudo, ainda não existe uma fórmula singular, ideal ou universal que determine a eficiência da estocagem e preservação de microrganismos a longo-prazo, levando-se em consideração que essa preservação deve garantir a viabilidade, a isenção de contaminações e a estabilidade genética das células microbianas (QUINN et al., 2005; COSTA, 2010).

Portanto, a escolha do método mais adequado à conservação de amostras deve ser orientada pelas características do espécime em estudo e pelas vantagens e desvantagens das técnicas disponíveis. A criopreservação, aspecto aplicado da criobiologia, é o resultado da aplicação de métodos que permitem a manutenção de uma variedade de tipos celulares ou organismos em condições de baixas temperaturas (BROCKBANK et al, 2007).

O vírus da Raiva, assim como, muitas células, tecidos e outros microrganismos, para os quais há uma crescente demanda, ainda esperam pelo desenvolvimento de metodologias adequadas à sua conservação a médio e longo prazos, fazendo da criobiologia um campo de amplo potencial para o desenvolvimento de pesquisas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A RAIVA

A Raiva é uma doença infectocontagiosa, causada por vírus neurotrópicos que atuam no sistema nervoso central (SNC), produzindo uma encefalomielite aguda e quase sempre fatal, decorrente de sua replicação, com consequente destruição de células do sistema nervoso (TORDO et al., 1998), provocando frequentemente alterações comportamentais e motoras, tais como: inquietação, fúria, agressividade, paralisia dos membros posteriores, da mandíbula e da epiglote (PENA, 1998).

Os primeiros relatos sobre a Raiva humana ocorreram no século XXIV a.C., tornando-se rapidamente conhecida por sua apresentação clínica e letalidade, porém, os primeiros estudos científicos sobre o agente datam do início do século XVII com a demonstração da natureza infecciosa da saliva de animais raivosos. Ainda nesse século, Louis Pasteur realizou importantes descobertas sobre a doença e sua prevenção mediante protocolo de vacinação. Desde então, a doença tem sido exaustivamente estudada, permitindo assim, o desenvolvimento de medidas eficientes de prevenção e controle (MORENO, 2002).

2.2 O AGENTE ETIOLÓGICO DA RAIVA

O agente etiológico da Raiva consiste em um vírus envelopado, pertencente à ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae* e gênero *Lyssavirus* (FENNER, 1993, ICTV, 2013). Esse gênero inclui o vírus rábico protótipo e os relacionados com o vírus da Raiva. Mediante provas sorológicas, demonstraram-se relações antigênicas entre distintos vírus, permitindo a classificação em quatro sorotipos (KING, TURNER, 1993; OLIVEIRA, 1994), mas igualmente adaptados à replicação no SNC de mamíferos (RUPPRECHT, HANLON, HEMACHUDHA, 2002; FOOKS, 2004).

A cepa clássica de vírus da Raiva é considerada o arquétipo do gênero *Lyssavirus* (FOOKS, 2004), ou seja, é tido como o padrão original ou modelo universalizado da doença, bem como, de sua representação e impacto no inconsciente coletivo. Na verdade, até o desenvolvimento de técnicas capazes de revelar sua diversidade em genótipos, a Raiva permaneceu sendo atribuída à manifestação de um único exemplar viral (RUPPRECHT, HANLON e HEMACHUDHA, 2002).

O desenvolvimento de painéis de anticorpos monoclonais anti-nucleocapsídeo (nAbs), empregados em análises sorológicas para a detecção de antígenos virais, possibilitou a classificação dos lissavírus em quatro sorotipos distintos. Com o incremento das técnicas moleculares, o gênero *Lyssavirus* foi diferenciado em sete linhagens geneticamente divergentes denominadas genótipos (BADRANE et al., 2001; FOOKS, 2004; SCHNELL et al., 2010).

O sorotipo 1 compreende o vírus da Raiva tipo “clássico” (de rua) e suas cepas vacinais. Os demais representantes do gênero *Lyssavirus* são o vírus *Lagos Bat* (LBV, sorotipo 2/ genótipo 2), o vírus *Mokola* (MOKV, sorotipo 3/genótipo 3), o vírus *Duvenhage* (DUVV, sorotipo 4/genótipo 4), o *European Bat Lyssavirus 1* (EBLV-1, sorotipo 4/genótipo 5), o *European Bat Lyssavirus 2* (EBLV-2, sorotipo 4/genótipo 6) e o *Australian Bat Lyssavirus* (ABLV, sorotipo 1/genótipo 7) (TORDO, 1996; BLACK et al., 2000; FOOKS, 2004).

Os sorotipos e os genótipos desses vírus compartilham um alto grau de similaridade entre as seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos, apesar disso, acarretam o desenvolvimento de manifestações clínicas diferentes da encefalite manifestada pelas cepas de vírus clássicos da Raiva. A identificação específica de cada um somente é realizada com o emprego de painéis de anticorpos monoclonais, do teste de neutralização com soro vírus específico e pela tipificação genética (SMITH, 1996; BLACK et al., 2000).

2.3 ESTRUTURA DA PARTÍCULA VIRAL

O vírus da Raiva é considerado protótipo dos vírus neurotrópicos. A partícula viral ou virion apresenta uma morfologia baciliforme de contorno cilíndrico, sendo uma extremidade arredondada e a outra plana (configuração semelhante a um projétil de arma de fogo), diâmetro de 75 nm (60 a 110nm) e comprimento de 180nm (100 a 300 nm), variando de acordo com a amostra considerada (Figura 1A) (KAPLAN, TURNER, WARREL, 1986; TORDO & POCH, 1988; TORDO, 1996). É também composto por um envoltório formado por uma dupla membrana fosfolipídica na qual emergem espículas de aproximadamente 9 nm, de composição glicoproteica (Figura 1C). Esse envoltório envolve o nucleocapsídeo de conformação helicoidal, rígido, composto de um filamento único de RNA de polaridade negativa, linear e não segmentado (TORDO & POCH, 1988; HIRSH & ZEE, 1999).

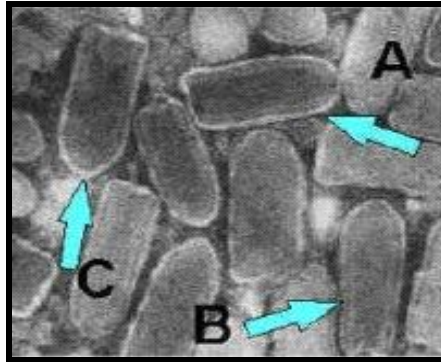


Figura 1. Vírus da Raiva visualizado ao microscópio eletrônico. A - Formato de projétil. B - Estrias de ribonucleoproteína. C - Espículas de glicoproteína. Fonte: Centers for Disease Control and Prevention-CDC, Atlanta, 2004.

O genoma, com aproximadamente 12.000 bases, codifica cinco proteínas estruturais: a glicoproteína (G), a fosfoproteína (P), a nucleoproteína (N), a proteína da matriz (M) e a polimerase (L) (Figura 2). As proteínas N, P e L compõem o complexo ribonucleoproteína (RNP) (Figura 1B) junto com a molécula de RNA genômico que está firmemente associada à nucleoproteína (N). A proteína N se liga ao RNA viral para constituir um molde funcional à transcrição e replicação, enquanto as proteínas P e L são responsáveis por atividades enzimáticas. A proteína M, por sua vez, localiza-se na superfície interna do envelope e está envolvida na montagem da progênie de vírions. A proteína G apresenta-se ancorada no envelope e participa da ligação com os receptores, fusão da membrana e indução da síntese de anticorpos neutralizantes (Figura 3) (SHIMIZU et al., 2007).

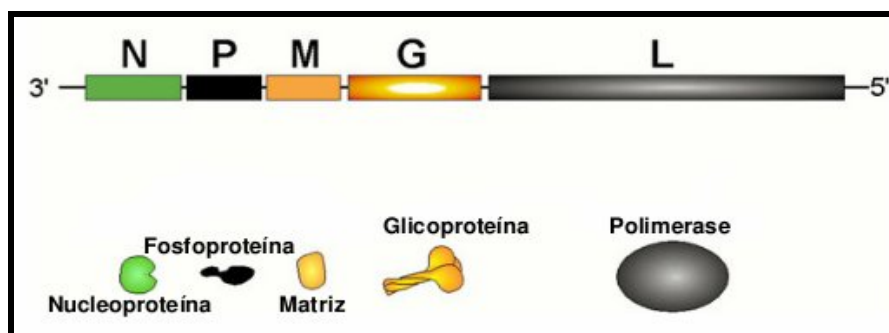


Figura 2. Proteínas do genoma dos vírus da Raiva. Fonte: Tordo, 2006. Instituto Pasteur, Paris.

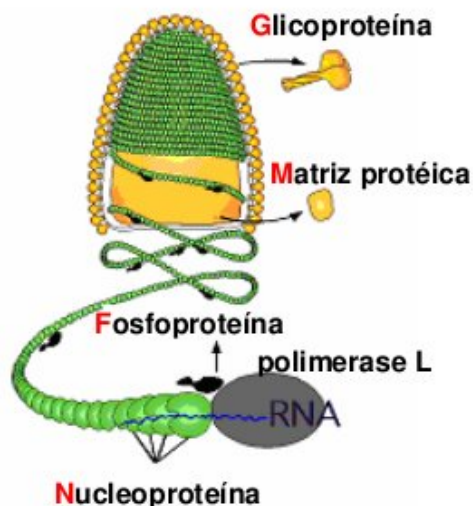


Figura 3. Genoma dos Rhabdovirus. Fonte: Tordo, 2006. Instituto Pasteur, Paris

A glicoproteína (G) (525 aminoácidos, 65-70KDa) é uma proteína transmembranar na forma de espículas que se projetam na superfície viral. É responsável pela fusão do envelope viral à membrana citoplasmática e pela ligação do vírus à superfície celular do hospedeiro definindo, desta forma, o neurotropismo do vírus pela interação com os receptores da célula na adsorção. É a principal responsável pela indução de anticorpos neutralizantes, especialmente por sua porção externa ao envelope, denominada domínio antigênico ou ectodomínio. O domínio extracitoplasmático da proteína G é a porção mais imunogênica. Variações na sequência de aminoácidos, em algumas regiões da proteína G podem alterar as propriedades patogênicas e imunológicas do vírus. É capaz de estimular, junto às proteínas N e P, células T auxiliares e células citotóxicas específicas, gerando uma resposta imune celular, além de participar do processo de brotamento de novos vírions. A expressão da glicoproteína G parece estar inversamente associada à indução de apoptose e à inibição de atividade da proteína N no transporte axoplásmico, ou seja, quanto maior a expressão da proteína G em determinada amostra viral, mais apoptose e maior inibição do transporte viral nos neurônios, resultando em menor patogenicidade (KAPLAN; TURNER e WARREL, 1986; BUNSCHOTEN et al., 1989; WUNNER, 1991; KAWAI e MORIMOTO, 1994; MARTORELLI et al., 1995; MORIMOTO et al., 1999; VAN REGENMORTEL *et al*, 2000; WUNNER, 2002).

A núcleoproteína (N) (450 aminoácidos, 58-62 KDa) é a mais conservada dentre as proteínas dos lissavírus. É também capaz de induzir anticorpos neutralizantes, apesar da proteína G ser imunodominante. A proteína N forma o capsídeo e está intimamente associada ao RNA viral, protegendo-o da ação de ribonucleases. É fundamental na regulação da transcrição do RNA viral, participando ativamente na encapsidação de novas moléculas de RNA genômico sintetizadas na transcrição do genoma viral e no transporte axoplásmico intraneuronal. Além disso, essa proteína apresenta regiões que são importantes epítomos para o reconhecimento de linfócitos T (TORDO et al., 1986; BANERJEE, 1987; DIETZSCHOLD et al., 1987; WUNNER, 1991; MORIMOTO et al., 1999; MARSTON et al., 2007).

A proteína L (2128 aminoácidos, 190 KDa), maior proteína do vírion, é uma subunidade do complexo que forma a RNA polimerase, que juntamente com P e N formam o conglomerado que transcreve o genoma viral. Além dessa, desenvolve várias outras atividades enzimáticas, como a formação do “cap”, metilação, poliadenilação, atividade de proteína quinase, além de estar envolvida na inicialização da cadeia de RNA. A proteína L necessita interagir com P para tornar-se ativa (TORDO et al., 1986; BANERJEE, 1987; MARSTON et al., 2007).

A fosfoproteína (P) (298 aminoácidos, 35-40 KDa) é uma proteína interna, não estrutural, sendo a menos conservada entre os lissavírus. Encontra-se associada ao ribonucleocapsídeo e interage com a proteína L. A proteína P liga-se à dineína intracitoplasmática e está envolvida no transporte axonal do vírus. Tem também como função prevenir a fosforilação da núcleoproteína, funcionando como uma dama de companhia capaz de reduzir ligações não específicas, ao manter-se ligada a proteína N promove uma mudança conformacional que impede sua fosforilação (DELAGNEAU; PERRIN e ATANASIU, 1981; TORDO et al., 1996, SCHNELL, 2010).

A proteína da matriz (M) (203 aminoácidos, 22-25 KDa), a nível estrutural, funciona como uma ponte entre o complexo ribonucleoproteína (RNP) e a membrana viral, localiza-se na face interna do envelope lipídico. A proteína M interage com a RNP e se condensa, mantendo a ligação entre o envelope e o complexo RNP, bem como, conferindo ao vírion a forma helicoidal típica. Apresenta importante papel na regulação da replicação viral. Essa proteína promove a montagem das partículas, aproximando membranas, RNP e G, exercendo um papel ativo no brotamento de novos vírions (SOKOL, STANCEK e KOPROWSKI, 1971; DELAGNEAU, PERRIN

e ATANASIU, 1981; TORDO et al., 1986; MEBATSION et al., 1996; SCHNELL, 2010).

2.4 CICLO INFECCIOSO DO VÍRUS NA CÉLULA

Quando um vírion da família *Rhabdoviridae* encontra uma célula hospedeira susceptível, uma série de eventos é desencadeada, podendo-se classificá-los como: adsorção, penetração, desnudamento, transcrição, tradução, replicação, montagem e brotamento. Tais eventos resultam na liberação da progênie viral (Figura 4) (WAGNER & ROSE, 1996).

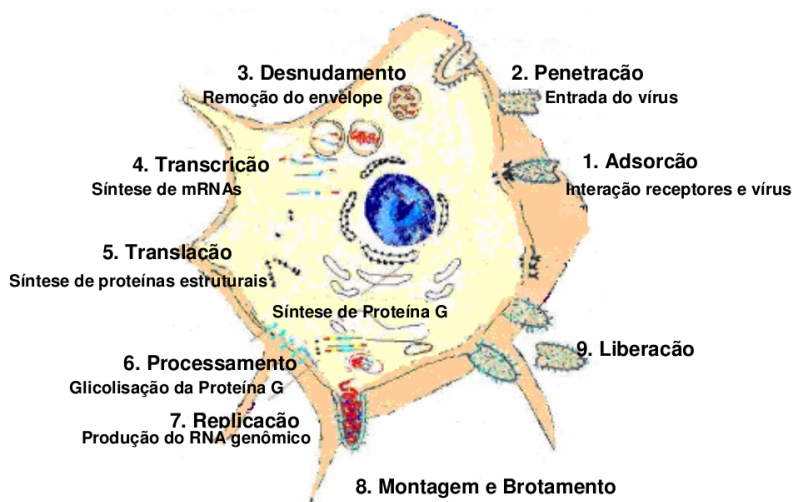


Figura 4 - Replicação do vírus da Raiva na célula. Fonte: Centers for Disease Control and Prevention, 2004.

A adsorção do vírus à célula hospedeira é mediada pela proteína G. Trímeros de G interagem com os receptores celulares e levam à fusão e internalização dos vírions. Não parece haver um receptor específico para o vírus da Raiva, além disso, possivelmente, diferentes células utilizam diferentes tipos de receptores para permitir a penetração do vírus. Alguns estudos evidenciaram a adsorção à receptores de acetilcolina; outros observaram que oligossacarídeos e lipoproteínas, como o ácido siálico de gangliosídeos, podem também ter participação na adsorção (COLL, 1995; COX, DIETZSCHOLD & SCHNEIDER, 1977; TORDO, 1996). Após a adsorção à célula hospedeira, o vírion penetra na célula por fagocitose, sendo englobado por uma vesícula formada a expensas da membrana celular. Eventualmente, lisossomos fundem-se à vesícula contendo o vírion, liberando a RNP no citoplasma celular e

permitindo que seja iniciado o processo de replicação (THOULOUZE et al., 1998; TORDO, 1996).

Uma vez no interior da célula, o genoma de polaridade negativa deve ser inicialmente transcrito para dar início a produção de proteínas. Para tanto, a RNA polimerase viral transcreve o genoma em um RNA líder e cinco mRNAs. A transcrição diminui sua eficiência em cerca de 30% nas junções dos genes N-NS, NS-M e M-G, resultando em um efeito cumulativo na expressão gênica, ou seja, a expressão é mais eficiente na extremidade 3' do genoma (IVERSON & ROSE, 1981). Estes, por sua vez, são traduzidos nas proteínas N, P, M, G e L, em ribossomos livres no citoplasma. A proteína G, que requer glicosilação, recebe seus carboidratos no retículo endoplasmático rugoso e é então transportada via aparelho de Golgi para a membrana citoplasmática (THOULOUZE et al., 1998; TORDO, 1996).

Por outro lado, é necessário que ocorra a replicação do genoma viral para formar os novos vírions. Isso se dá somente após a tradução dos mRNAs. A proporção entre a quantidade de RNA e da proteína N no interior do citoplasma regulam o processo de passagem do processo de transcrição para replicação. Dessa forma, se houver muita proteína produzida, o processo é parado e a replicação do genoma é iniciada. O primeiro passo na replicação é a síntese de cópias de polaridade positiva (anti-genoma) de todo genoma viral. Para que estas sejam geradas, os sinais de transcrição representados por códons de parada e continuação de leitura são ignorados; a RNA polimerase reconhece a extremidade 3' e sintetiza uma cópia complementar ao mesmo, em todo o seu comprimento. Essas cópias positivas servirão de molde para a síntese de novos genomas (de polaridade negativa) que irão fazer parte dos novos vírions a serem formados (BATISTA, FRANCO & ROEHE, 2007).

Durante a montagem, um complexo formado pelas proteínas N, P e L promove a encapsidação dos novos genomas. A proteína M envolve a RNP; esse complexo vai para uma área da membrana plasmática e M inicia o “enovelamento” da partícula, conferindo-se o formato de “mola” que caracteriza a disposição helicoidal da RNP. A seguir, as partículas ligam-se a membrana celular, que dará origem ao envelope no qual serão inseridas moléculas de glicoproteína G; tem início o brotamento que irá liberar novos vírions. Esse processo não causa lise das células infectadas; em cultivos *in vitro*, as células infectadas podem permanecer por longos períodos viáveis e liberando novos vírions. Por outro lado, alerta para o papel do

sistema imune do hospedeiro, que parece desempenhar função importante na evolução da infecção (SUGAMATA et al., 1992; BATISTA, FRANCO & ROEHE, 2007)

2.5 PATOGENIA DA RAIVA

A transmissão do vírus da Raiva ocorre, comumente, por meio de mordeduras e contato de mucosas e/ou pele lesada com a saliva de um animal infectado. O período de incubação varia entre três a doze semanas, podendo chegar a anos, dependendo, principalmente, da concentração do inóculo viral, da maior ou menor distância do trajeto neural que vai do ferimento ao cérebro e da espécie acometida. O vírus pode alcançar diretamente as terminações nervosas sensoriais e/ou motoras, ou permanecer algumas horas nas células musculares estriadas, onde acontece uma amplificação viral, que propiciará a infecção dos nervos periféricos. O genoma viral é transportado no interior do axoplasma dos neurônios, centripetamente, provocando, posteriormente, um quadro clínico característico de encefalomielite aguda. Com a progressão do quadro clínico, ocorre a disseminação para vários órgãos e a morte do indivíduo (Figura 5) (COSTA et al., 2000; XAVIER, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

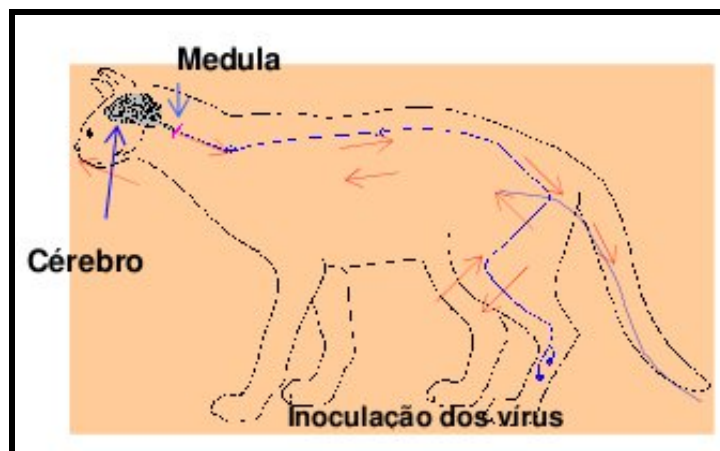


Figura 5. Trajeto dos vírus da Raiva a partir do ponto de inoculação. Fonte: Bingham, 2002

Uma vez inoculado no novo hospedeiro, o vírus da Raiva pode replicar-se nas células musculares, próximas ao local da inoculação, antes de invadir o sistema nervoso central (SNC). Esta replicação representa um passo de multiplicação necessário à invasão do sistema nervoso (MORIMOTO et al., 1999). Contudo, ocasionalmente, pode ocorrer a invasão direta do vírus no SNC, sem replicação prévia no músculo (SHANKAR, DIETZSCHOLD & KOPROWSKI, 1991). A seguir, o vírus é conduzido via terminações nervosas motoras, aos nervos periféricos,

provavelmente pela combinação de fluxo axoplásmico retrógrado, transmissão célula-célula via junções sinápticas e passagem direta do vírus através de conexões intercelulares e atinge o sistema nervoso central (IWASAKI, 1991; TSIANG, 1993; JACOB et al., 2000).

Após a infecção do SNC, o vírus se dissemina via nervos periféricos de forma centrífuga para os tecidos não neuronais, distribuindo-se por todo o organismo. Antígenos virais já foram detectados em células da epiderme, folículos pilosos, retina, córnea, glândulas lacrimais, glândulas salivares, pulmões, músculo cardíaco, mucosa gástrica e intestinal, pâncreas, parênquima renal, glândulas adrenais, tecidos neuro-epiteliais dos ureteres, bexiga e uretra. O vírus replica-se nas glândulas salivares e sua excreção através da saliva é o principal mecanismo de disseminação e perpetuação do mesmo na natureza (CHARLTON, 1988; SCHNEIDER, 1991).

Os sinais clínicos se manifestam somente após o envolvimento do SNC. A morte é consequência do comprometimento de centros nervosos vitais. É sabido que amostras de vírus da Raiva apresentam potenciais diferentes de neuroinvasividade. Amostras adaptadas a cultivos celulares e amostras de “vírus de rua” podem apresentar potenciais patogênicos diferentes. A glicoproteína G parece desempenhar o papel mais importante na determinação da neurovirulência, embora associada a outros fatores (FABER et al., 2004).

2.6 CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS DE VÍRUS DA RAIVA

Os vírus da Raiva, quanto as suas propriedades, são sensíveis a solventes lipídicos (sabão, éter, clorofórmio e acetona), ao etanol a 45-70%, aos preparados iodados e aos compostos de amônio quaternário. Outras propriedades relevantes são a resistência à dessecação e a procedimentos repetidos de congelação e descongelação, apresentando relativa estabilidade a um pH entre 5-10 e sensibilidade às temperaturas de pasteurização e à luz ultravioleta (MESLIN, KAPLAN, KOPROWSKI, 1996). Sua infecciosidade mantém-se estável em extratos de tecidos submetidos a protocolos de congelação ou liofilização (DULBECCO & GINSBERG, 1980).

Os protocolos empregados na conservação de amostras de vírus da Raiva têm sido descritos de forma sucinta na literatura científica, sendo que a maioria das pesquisas dedicadas a esse campo de estudo tem como foco a investigação e o aprimoramento do diagnóstico viral em amostras submetidas à decomposição

(VALENTINI et al., 1991, ALBAS et al., 1999; DAVID et al, 2002; BISWAL et al., 2007; ARAÚJO et al, 2008; COSTA, 2010, LOPES et al., 2010).

Em um estudo conduzido por Valentini et al. (1991) os autores buscaram avaliar o efeito do estado de conservação das carcaças de camundongos submetidos à prova de vírus residual (verificação da inativação viral) e sua possível interferência na prova de imunofluorescência direta (IFD). O teste consiste na inoculação, pela via intracerebral, de vacinas contra a Raiva de uso humano no intuito de detectar a presença de vírus não inativados, detectáveis mediante a manifestação de sinais de Raiva pelos camundongos inoculados. Assim, camundongos mortos após a inoculação do vírus rábico tinham as carcaças submetidas a diferentes condições de conservação – tempo (de 6 a 720h) e temperatura (25°, 4° e -20°C) – com subsequente avaliação dos cérebros pela IFD.

Os autores evidenciaram que os cérebros de carcaças expostas à temperatura de 25°C apresentaram intensidade máxima de fluorescência dos corpúsculos por um período aproximado de 10h. Após 12 horas, essa intensidade ia decrescendo até a ocorrência de 100% de negatividade ao teste no intervalo de 20 a 96h. O armazenamento dos espécimes a 4°C propiciou a detecção da intensidade máxima de fluorescência por 48h, com declínio gradativo da eficiência do teste após esse intervalo de tempo. A partir de 72h, os resultados passaram à condição de negativos em 100% dos materiais examinados. Contudo, cérebros oriundos de carcaças congeladas a -20 °C permaneceram viáveis à prova, com intensidade máxima de fluorescência por todo o período de 720h (30 dias) quando foram realizadas as últimas observações.

No estudo realizado por Albas et al., 1999, foi avaliada a viabilidade de amostras de vírus da Raiva mantidas à temperatura ambiente por 48 e 72 horas. Após 48h, o teste de inoculação intracerebral começou a ser prejudicado, detectando-se resultados falso negativos. Já após 72h, 100% dos resultados dos testes de viabilidade viral, IFD e inoculação intracerebral, foram negativos. Concluiu-se que o período limite para o estabelecimento de um diagnóstico seguro deve ser de 24 e 48h antes da putrefação se instalar.

Em outro estudo, realizado por Costa et al. (2011), foram testados diferentes protocolos de criopreservação a -20 °C em amostras de vírus da Raiva. Esse estudo englobou a execução de oito protocolos experimentais em função da aplicação de

agentes crioprotetores a curto prazo. As amostras virais foram conservadas por 30 dias com a adição de quatro tipos de crioprotetores (glicerol, dimetilsulfóxido, polietilenoglicol e sacarose). Os autores observaram que após 30 dias de congelamento, a intensidade da fluorescência das partículas virais nas amostras criopreservadas foi menor do que a observada em amostras frescas. Contudo, o uso da sacarose produziu um efeito conservante nas amostras.

De acordo com Centers for Disease Control and Prevention (2006) e Greene & Rupprecht (2006) o armazenamento de amostras virais da Raiva em refrigeradores domésticos que atingem uma temperatura mínima de -20 °C, sem a adição de agentes crioprotetores, e o processo de congelamento/descongelamento podem causar danos aos tecidos tornando impossível a detecção futura do antígeno viral pelos testes laboratoriais de rotina da Raiva.

Por sua vez, David et al. (2002) chamam a atenção para o número significativo de amostras da Raiva em estado de decomposição submetidas anualmente para a avaliação diagnóstica, assinalando esse tipo de ocorrência como fator de risco para o incremento de resultados falso negativos pelo teste de IFD. Com base nessa evidência, os autores utilizaram a técnica de reação em cadeia pela polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) para detectar vírus da Raiva em cérebros naturalmente infectados em estado de decomposição. Foram obtidos resultados positivos para RT-PCR em espécimes que se apresentaram negativas para os testes de IFD, isolamento em cultura de células e inoculação intracerebral em camundongos.

Segundo Valentini et al. (1991), os laboratórios que oferecem serviços de diagnóstico para Raiva, freqüentemente recebem materiais suspeitos que são muitas vezes mantidos em condições inadequadas de conservação. A ocorrência de amostras em decomposição, decorrente de falhas na execução dos procedimentos de coleta, acondicionamento, transporte e/ou conservação, deve ser considerada, visto que vários autores comprovaram que o início do processo de decomposição das amostras marca o declínio gradativo da sensibilidade dos testes diagnósticos para os vírus da Raiva.

Este tópico da revisão de literatura será melhor explorado no primeiro capítulo dessa tese, referente ao artigo de revisão intitulado “Princípios básicos da criomicrobiologia: enfoque nos tipos de micro-organismos e nos principais agentes crioprotetores”.

3 JUSTIFICATIVA

Na rotina laboratorial em pesquisa, diversas situações podem inviabilizar a obtenção de amostras quando as mesmas são susceptíveis à mudança de condições. Por conseguinte, é imprescindível a manipulação e armazenamento cuidadosos, empregando-se técnicas e protocolos que tenham sido validados a priori, pois o processo de estocagem, em si, pode afetar a qualidade dos exemplares e definir sua perspectiva de uso posterior. Desse modo, a maior preocupação quanto aos métodos de preservação reside nos efeitos sobre a estabilidade dos espécimes.

Por outro lado, a lacuna existente quanto às publicações científicas relacionadas à preservação de amostras de vírus da Raiva, junto à expressiva importância da estocagem microbiológica, aponta a quantidade reduzida de trabalhos produzidos em torno da problemática e, portanto, torna evidente o potencial para o desenvolvimento de pesquisas nessa área.

Assim, a conservação de amostras virais da Raiva em médio prazo assegura, sobremaneira, a possibilidade de utilização posterior das mesmas, promovendo o incremento de estudos capazes de superar barreiras cronológicas e geográficas. Dessa forma, a manutenção de estoques de amostras criopreservadas possibilita futuras análises mediante novos questionamentos.

4 HIPÓTESES CIENTÍFICAS

- A criopreservação a -20 °C a médio prazo é eficaz para a conservação de amostras de tecido nervoso infectadas pelos vírus da Raiva;
- A criopreservação a -20 °C de amostras do vírus da Raiva a médio prazo não interfere nos títulos virais, bem como, nos resultados dos testes de viabilidade, Imunofluorescência Direta e Prova Biológica, e do teste molecular, Reação em Cadeia da Polimerase com Transcriptase Reversa (RT-PCR);
- O uso de agentes crioprotetores penetrantes (dimetilsulfóxido e glicerol) e não penetrantes (sacarose e polietilenoglicol) possibilitam uma melhor conservação das amostras do vírus da Raiva a uma temperatura de -20°C a médio prazo.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Conservar amostras de vírus da Raiva a médio prazo a -20 °C mediante diferentes protocolos de criopreservação.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os efeitos da criopreservação a médio prazo de espécimes de vírus da Raiva a -20 °C, sobre os títulos virais e os resultados dos testes de Imunofluorescência Direta e Prova Biológica, em função de variáveis preestabelecidas de tempo;
- Avaliar o uso de agentes crioprotetores penetrantes (dimetilsulfóxido e glicerol) e não penetrantes (sacarose e polietilenoglicol) na criopreservação a médio prazo de amostras de vírus da Raiva a uma temperatura de -20 °C;
- Analisar a influência da criopreservação a médio prazo de amostras de vírus da Raiva a -20 °C sobre a eficiência da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase com Transcriptase Reversa (RT-PCR).
- Comparar os resultados da técnica molecular RT-PCR com os dos testes de viabilidade viral (IFD e Prova Biológica) em amostras de vírus da Raiva submetidas a diferentes protocolos de criopreservação a médio prazo a -20 °C.

6 CAPÍTULO 1

PRINCÍPIOS BÁSICOS DA CRIOMICROBIOLOGIA: ENFOQUE NOS TIPOS DE MICRO-ORGANISMOS E NOS PRINCIPAIS AGENTES CRIOPROTETORES

*[Basic principles of criomicrobiologia: focus in kind of microorganisms and
principals cryoprotectants agents]*

**Tereza D`ávila de Freitas Aguiar, Maria Fátima da Silva Teixeira, Carlos Henrique de Andrade
Teles, Gabrielle Rosembli Martins, Rosivaldo Quirino Bezerra Júnior, Edmara Chaves Costa**

Periódico: Acta Veterinária Brasilica (Publicado em Setembro de 2012)

PRINCÍPIOS BÁSICOS DA CRIOMICROBIOLOGIA: ENFOQUE NOS TIPOS DE MICRO-ORGANISMOS E NOS PRINCIPAIS AGENTES CRIOPROTETORES

RESUMO - O reconhecimento da grande relevância da biodiversidade microbiana para o desenvolvimento humano tem conduzido ao aprimoramento de técnicas destinadas à conservação dos mais diversos espécimes microbiológicos. Contudo, ainda não existe uma fórmula singular, ideal ou universal que possibilite a eficiência da estocagem e preservação microbiana a longo prazo. Consequentemente, diversos micro-organismos para os quais há uma crescente demanda, ainda esperam pelo desenvolvimento de metodologias adequadas à sua conservação, fazendo da criobiologia um campo de vasto potencial para o desenvolvimento de pesquisas. Nesse contexto, a proposta dessa revisão é discutir os princípios básicos da criomicrobiologia, com enfoque na preservação dos variados tipos de micro-organismos e nos principais agentes crioprotetores, tomando como base estudos disponíveis na literatura científica.

Palavras-Chave: Criopreservação; Crioprotetor; Micro-organismos.

ABSTRACT - The recognizing the great importance of microbial biodiversity for human development has led to the improvement of techniques for the conservation of diverse microbiological specimens. However, there isn't a singular, ideal or universal method to provide the efficiency of the long-term microorganisms stock and preservation. Many microorganisms for which there is a growing demand still wait for the development of satisfactory methodologies to their conservation, making the cryobiology a field of vast potential for the development of researches. Then, the proposal of this review is to discuss the basic principles of cryomicrobiology, focusing the preservation of kinds microorganisms and principals agents cryoprotectants, using the available studies in the contemporary scientific literature as base.

Keywords: Cryopreservation; Cryoprotective agent; Microorganisms.

INTRODUÇÃO

Estudos sobre a patogênese microbiana, etiologia e epidemiologia de doenças infecciosas e microbiologia ambiental são, em sua maioria, baseados na obtenção de amostras biológicas e, em muitos casos, na sua posterior preservação (Paoli, 2005).

Nesse contexto, o reconhecimento da grande relevância da biodiversidade microbiana para o desenvolvimento humano e animal tem conduzido ao aprimoramento de técnicas destinadas à conservação dos mais diversos espécimes microbiológicos. E devido à emergente importância atribuída à estocagem de amostras, muitas instituições têm investido na constituição de estoques (biobancos), implementando inúmeras técnicas de preservação, como a criopreservação e a liofilização, com a adoção de protocolos próprios e avançadas tecnologias no controle de dados (Figueiredo, 2001; Holland et al., 2003; Paoli, 2005).

O armazenamento de amostras das mais variadas origens apresenta propósitos diagnósticos e de pesquisa, abrangendo aplicações tanto em laboratórios médicos quanto veterinários (Paoli, 2005). Contudo, ainda não existe uma fórmula padrão e universal que determine a eficiência da estocagem e preservação de micro-organismos a longo prazo (Costa, 2010), levando-se em consideração que essa preservação deve garantir a viabilidade, a isenção de contaminações e a estabilidade genética das células microbianas (Quinn et al., 2005).

Assim, a eleição do procedimento mais adequado à conservação de amostras deve ser norteada pelas características do espécime em estudo, bem como, pelas vantagens e desvantagens das técnicas disponíveis. A criopreservação, aspecto aplicado da criobiologia, é o resultado do emprego de métodos que permitem a manutenção de uma variedade de tipos celulares ou organismos em condições de baixas temperaturas. Muitas células, tecidos e micro-organismos para os quais há uma crescente demanda, ainda esperam pelo desenvolvimento de metodologias adequadas à sua conservação, fazendo da Criobiologia uma área da ciência com significativo potencial para o desenvolvimento de pesquisas (Costa, 2010).

Nesse sentido, a presente revisão tem como objetivo discutir os princípios básicos da Criomicrobiologia, com enfoque na preservação dos variados tipos de micro-organismos e nos principais agentes crioprotetores, tomando como base estudos disponíveis na literatura científica.

CONSERVAÇÃO DE ESPÉCIMES MICROBIOLÓGICOS

Os micro-organismos são as entidades bióticas mais numerosas e antigas, capazes de colonizar com sucesso cada nicho ecológico possível do planeta. Sua presença e atividade são essenciais para o funcionamento e equilíbrio dos ecossistemas. Aliado a isso, os micro-organismos representam uma importante fonte de recursos genéticos para o avanço biotecnológico e para o desenvolvimento econômico sustentável, contribuindo para a descoberta de novos fármacos e aplicações na saúde, agricultura, indústria e meio ambiente, através de estratégias tradicionais de isolamento e seleção microbianos (Oliveira et al., 2006).

A estocagem de micro-organismos é um processo complexo, em virtude do quase inexpressivo conhecimento que se tem à respeito das reações e modificações morfo-fisiológicas processadas nestes organismos, no intuito de sobreviver e se adequar às novas condições, quando submetidos a mudanças de habitat. Estes obstáculos estimulam e elevam a quantidade de pesquisas desenvolvidas em laboratórios de todo mundo, sobretudo, pela importância que algumas espécies vêm ganhando em virtude de enfermidades e outros prejuízos ocasionados, tanto na Medicina Veterinária quanto Humana (Brilhante et al., 2004; Girão et al., 2004).

Em muitas situações de pesquisa, é comum que as oportunidades de acesso às amostras sejam limitadas e susceptíveis a mudanças de condições capazes de inviabilizar definitivamente a obtenção das mesmas. Por conseguinte, é imprescindível a manutenção e armazenamento cuidadosos, empregando-se técnicas e protocolos que tenham sido validados previamente, pois o processo de estocagem ou composição de bancos de amostras, em si, pode afetar a qualidade dos exemplares e definir sua perspectiva de utilização posterior. Dessa forma, a maior preocupação quanto aos métodos de preservação, como por exemplo a criopreservação, reside nos efeitos sobre a estabilidade dos espécimes (Holland et al., 2003).

Com a finalidade de garantir a reprodução e a continuidade dos processos de investigação biomédica, os cientistas encaram a tarefa de estabilizar geneticamente as células. Subculturas seriadas consomem tempo e podem levar a contaminações ou tendem geneticamente a diminuir porções da população selecionada. No entanto, a população de células pode ser estabilizada, quando expostas a temperaturas criogênicas, técnica conhecida como criopreservação. Avanços científicos têm levado ao desenvolvimento de métodos que permitem manter viável, em baixas temperaturas, diferentes tipos celulares. Muitas técnicas de criopreservação vêm sendo utilizadas para a preservação de micro-organismos, células teciduais isoladas, pequenos organismos multicelulares e, alguns organismos mais complexos, como, por exemplo, embriões (Simione, 1998).

As novas técnicas de estocagem visam adequar o melhor método de preservação para cada micro-organismo, possibilitando metodologias espécie-específicas e vislumbrando a preservação de cepas a longo prazo, seja em temperatura ambiente ou

em freezer. Objetivam, ainda, a manutenção do seu padrão genético, morfológico, bioquímico ou fisiológico, impedindo alterações nos componentes da parede celular e perda de virulência. Atualmente, boa parte dos bancos de coleções faz uso de pelo menos duas metodologias de estocagem, visando garantir a viabilidade e manutenção das cepas (Silva et al., 1994; Brilhante et al., 2004; Girão et al., 2004).

A remoção da água de materiais biológicos viáveis por meio de liofilização proporciona um meio de retardar o relógio biológico estabelecido pela natureza. A técnica de liofilização é bastante utilizada em metodologias científicas que visam manter a atividade celular intacta por meio da diminuição do seu metabolismo, ou seja, induzir dormência ao máximo possível. As principais vantagens dessa técnica são a facilidade na manutenção e armazenamento das culturas e garantia da estabilidade das características morfológicas e bioquímicas das células estocadas (Croan, 2000; Lima, 2011). No entanto, algumas células podem sofrer danos irreversíveis durante a liofilização, fenômeno este denominado lioinjúria (Daemen & Van Der Stege, 1982; Horaczek & Viernstein, 2004).

Considerando que a tecnologia de refrigeração promove um significativo retardo nas taxas de deterioração de bens perecíveis, o uso de temperaturas muito mais baixas, como ocorre na criopreservação, tem favorecido a estocagem de organismos vivos por extensos períodos. A criopreservação é uma das técnicas mais largamente empregadas na conservação da biodiversidade microbiana. Essa é uma das chaves para a realização dos serviços de coleção de culturas microbiológicas (Day & Mclellan, 1995; Myamoto-Shinohara et al., 2000; Paoli, 2005).

CRIOPRESERVAÇÃO

A criopreservação compreende a estocagem de material a baixas (-20 °C a -80 °C em freezer) e a ultra-baixas temperaturas (-150 °C em nitrogênio líquido). No último caso, o processo ocorre na fase líquida ou de vapor do nitrogênio. Os sistemas de nitrogênio líquido permitem o armazenamento a temperaturas totalmente constantes, enquanto o freezer mecânico está sujeito a variações de temperatura capazes de comprometer a qualidade das amostras estocadas (Su et al., 1996; Wolfe & Bryant, 2001; Paoli, 2005). Vysekantsev e colaboradores (2005) demonstraram que, mesmo em sistemas de criopreservação a temperaturas ultra-baixas, uma mudança cíclica da temperatura de -196 °C até -130 °C ou -100 °C implica na morte dos micro-organismos armazenados. Este fato deve ser levado em consideração ante a movimentação e transporte de exemplares criopreservados.

O objetivo maior dessa técnica é minimizar o dano a materiais biológicos, incluindo tecidos, células animais e vegetais, bactérias, fungos e vírus, reduzindo a taxa metabólica, durante o processo de congelação e estocagem a frio. A técnica de

criopreservação é a metodologia de escolha em muitos bancos de micro-organismos, pois oferece uma contínua fonte de tecidos e células vivas geneticamente estáveis para uma variedade de fins, incluindo pesquisas e processos biomédicos (Brockbank et al., 2007).

À proporção que a temperatura se aproxima de 0 °C, a atividade metabólica celular é reduzida e a viabilidade das células se eleva. Portanto, a criopreservação interrompe a atividade celular, retornando suas funções após o descongelamento (Barbas & Mascarenhas, 2009). A célula e o meio externo atingem um estado de super-resfriamento e, em seguida, ocorre a formação de cristais de gelo no meio extracelular. O conteúdo da célula super-resfriada permanece descongelado, possivelmente, porque a membrana plasmática e a parede celular impedem que os cristais de gelo presentes nos espaços intercelulares penetrem à célula e promovam o congelamento do citoplasma (Santos, 2001).

Múltiplos fatores podem afetar a efetividade da criopreservação de micro-organismos. Como os mais citados, podemos destacar a espécie a qual o exemplar pertence, o tipo de cepa, o tamanho e a forma da estrutura celular, a taxa e a fase de crescimento, o pH, a osmolaridade e a aeração, o teor de água da célula, a densidade do congelamento, a composição do meio de congelamento, a taxa de resfriamento, a temperatura e o tempo de estocagem, a taxa de descongelamento e o meio de recuperação (Day & Mclellan, 1995; Kirsop & Doyle, 1991; Hubálek, 2003). Uma das condições mais importantes para o sucesso da criopreservação é a composição do meio usado para o congelamento (Hubálek, 2003).

O processo de criopreservação também exerce efeitos deletérios aos materiais biológicos, com ênfase à membrana celular e à parede celular, chamado de crioinjúria (Hubálek, 2003; Costa, 2010). Este evento letal está relacionado à formação de cristais de gelo intracelular, ao fluxo de água para fora da célula (desidratação) e ao aumento da concentração intracelular de solutos. Vale salientar que o congelamento é um processo probabilístico e, na maioria dos casos, a solução extracelular apresenta maior volume que a intracelular. Por essa e outras razões, o congelamento extracelular tende a ocorrer primeiro. Quando isso acontece, os solutos contidos no meio externo se concentram numa pequena fração de água em estado líquido, que passa a exibir maior pressão osmótica. Esse mecanismo promove o efluxo de água, promovendo o aumento de soluto intracelular e inibindo a formação de gelo. No entanto, a desidratação e a elevada contração de íons podem ser severas o bastante para causar danos à célula (Wolfe & Bryant, 2001; Acker & McGann, 2003; Hubálek, 2003).

Um dos maiores desafios da criopreservação é realizar um congelamento sem a formação de cristais de gelo no interior das células. A formação de gelo no meio intracelular causa ruptura do sistema de membranas, resultando em perda da

permeabilidade com consequente morte da célula. A injúria mecânica sofrida pelas células advém de dois fenômenos da expansão e congelamento da água e da conformação dos cristais de gelo. Em virtude das células, especialmente as microbianas, necessitarem de um elevado teor de água no citoplasma, inibir a formação de cristais de gelo durante a criopreservação torna-se um desafio (Wolfe & Bryant, 1999). Como tentativa de reduzir ou até eliminar os danos decorrentes do congelamento aos materiais biológicos, tem sido frequente a inclusão de substâncias protetoras aos sistemas de criopreservação, conhecidas como agentes crioprotetores. Tais substâncias tem como principal função prevenir a cristalização via redução da atividade da água (COSTA, 2010).

AGENTES CRIOPROTETORES

Grandes avanços no campo da criopreservação foram permitidos a partir da descoberta das propriedades crioprotetoras do glicerol por Polge em 1949 (Woods et al., 2004). Gradativamente, várias substâncias foram adicionadas à lista de crioprotetores efetivos, como o dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol, metanol dentre outros (Day & Mclellan, 1995).

Agentes crioprotetores reduzem o estresse físico e químico derivado do congelamento e do degelo das células. As características físico-químicas ideais para um crioprotetor devem abranger baixo peso molecular, alta solubilidade em água e baixa toxicidade celular (Lima, 2011). A presença de um agente crioprotetor apropriado, na composição do meio utilizado para o congelamento, geralmente aumenta a sobrevivência de micro-organismos mantidos a temperaturas abaixo de 0°C. Esses compostos podem ser adicionados durante o crescimento do micro-organismo ou anterior ao congelamento (Hubálek, 2003).

Os agentes crioprotetores têm sido classificados de formas variadas. Uma das mais tradicionais divisões aplicadas consiste na classificação desses aditivos quanto à capacidade de penetração em materiais biológicos: crioprotetores penetrantes ou intracelulares, como metanol, etilenoglicol, propilenoglicol, dimetilformaldeído, metilacetamida, DMSO e glicerol; e crioprotetores não penetrantes ou extracelulares, como os mono, oligo e polissacarídeos, manitol, sorbitol, dextrana, metilcelulose, polietilenoglicol entre outros (Meryman, 1971). As diferenças de permeabilidade dos crioprotetores afetam os mecanismos pelos quais ocorre a proteção ao material biológico. Os crioprotetores que apresentam permeabilidade efetiva são altamente hidrofílicos devido à presença de grupos químicos que formam pontes de hidrogênio com a água, como hidroxilas, amidas, sulfóxidos, carboxilas e aminas (Nash, 1966).

Os crioprotetores não penetrantes ou extracelulares são capazes de induzir o aumento da osmolaridade do meio externo, gerando a passagem da água do interior da célula

para o meio extracelular, prevenindo a formação de cristais de gelo durante o congelamento. São particularmente apropriados à preservação de micro-organismos por se fixarem à superfície microbiana formando uma camada viscosa capaz de proteger mais efetivamente suas paredes celulares e membranas (Meryman, 1974; Hubálek, 2003). Entre os crioprotetores penetrantes ou intracelulares destaca-se a propriedade de realizar ligações com as moléculas de água, minimizando a formação e o tamanho dos cristais de gelo, bem como, reduzindo as concentrações de soluto tanto no meio extracelular quanto no intracelular. Também se caracterizam por apresentarem baixo peso molecular, alta solubilidade em meio aquoso e baixa toxicidade celular (Nash, 1966; Hubálek, 2003).

De uma forma geral, muitas substâncias com propriedades crioprotetoras elevam a permeabilidade da membrana celular, diminuem o ponto de congelamento da água e de fluidos biológicos por meio de ações coligativas. Portanto, reduzem a concentração de sais dissolvidos em solução e evitam assim o choque osmótico. Além dos efeitos coligativos, a ação crioprotetora de determinados compostos pode estar relacionada com a capacidade de defender a superfície da célula do estresse hiperosmolar. Crioprotetores também podem proteger micro-organismos e suas proteínas contra desidratação, destruição térmica e radiação (Hubálek, 2003).

Apesar dos crioprotetores serem essenciais para o congelamento seguro da maioria dos sistemas biológicos, essas substâncias não permitem a sobrevivência de todas as células, o que pode ser explicado por apresentarem efeitos tóxicos que dependem principalmente da concentração do crioprotetor utilizado bem como do tempo de exposição da célula ao mesmo (Oliveira, 2003).

Discutiremos a seguir uma outra classificação que também pode ser empregada aos crioprotetores, quanto a sua estrutura química. Na criomicrobiologia, os grupos de crioprotetores mais utilizados e que merecem destaque incluem os álcoois e seus derivados, os açúcares e os sulfóxidos (Hubálek, 2003).

Álcoois e derivados

Na criomicrobiologia, o principal álcool utilizado com sucesso na preservação dos mais diversos micro-organismos é o glicerol. No entanto, os álcoois de açúcares, como o etilenoglicol e o polietilenoglicol, também podem ser utilizados. Já o uso de álcoois monovalentes, como o metanol e o etanol, é pouco frequente em decorrência da elevada toxicidade a diversos sistemas biológicos (Hubálek, 2003).

O glicerol ($\text{CH}_3\text{H}_8\text{O}_3$) é um álcool polihídrico altamente permeável com peso molecular 92,10 g mol⁻¹ (Silva et al., 2003). Sua atividade de crioproteção foi

inicialmente aplicada em 1913, quando Keith observou que a sua adição em variadas concentrações (5-42%) em suspensão de *Escherichia coli* permitiu mantê-la viável por seis meses à temperatura de -20 °C. O glicerol penetra à membrana celular através da difusão passiva, permanecendo tanto na membrana quanto no citoplasma (Parks & Graham, 1992). Sua difusão é de 30 a 60 vezes mais lenta que a da água (Graham, 1996). Os efeitos protetores do glicerol são representados por propriedades coligativas, diminuição do ponto de congelamento com conseqüente redução das concentrações de eletrólitos na fração não-congelada da amostra (Lovelock & Polge, 1954).

O glicerol é o crioprotetor mais utilizado na preservação por congelamento. Antes dos anos 50 já se utilizava glicerol não-diluído ou na concentração de 50% para a preservação de bactérias e vírus em temperaturas entre -4 e -20 °C (Keith, 1913; Hubálek, 2003). Posteriormente, ele começou a ser utilizado nas concentrações de 2 a 55% na criopreservação de diversos vírus, como por exemplo, o bacteriófago T2 (Meyle & Kempf, 1964), bactérias, incluindo riquetsias e micoplasmas, bem como, a espécie *Leptospira interrogans* (Joyner & Bennett, 1956; Stalheim, 1966; Summers, 1968), mixomicetos (Davis, 1965), fungos filamentosos (Davis et al., 1966), leveduras, como algumas espécies dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* e *Rhodotorula* sp. (Silva et al., 2007), algas, como por exemplo, *Tetraselmis suecica* (Fenwick & Day, 1992) e protozoários, como *Theileria parva* e *Trichomonas foetus* (Levine & Marquardt, 1955; Kimbita et al., 2001) (Quadro 1).

Quadro 1. Exemplos dos principais crioprotetores empregados na preservação de algumas espécies de micro-organismos.

Espécie do micro-organismo	Agente (s) crioprotetor (es)	Referência (s)
<i>Actinomyces noursei</i>	Etilenoglicol, PEG	Hubálek, 2003, Konev et al., 1975
<i>Aerobacter aerogenes</i>	PEG	Nash, 1963
<i>Babesia</i> sp.	DMSO	Hentrich & Bose, 1993, Hubálek, 2003
<i>Babesia rodhaini</i>	Sacarose	Dalgliesh et al., 1980, Hubálek, 2003
<i>Candida bogoriensis</i>	DMSO	Mikata & Banno, 1987
<i>Candida</i> sp.	Glicerol	Silva et al., 2007
<i>Chlamydia</i> sp.	Sacarose	Prentice & Farrant, 1977
<i>Cryptococcus</i> sp.	Glicerol	Silva et al., 2007
<i>Eisenia bicyclis</i>	Etilenoglicol	Hubálek, 2003
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Sacarose	Postgate & Hunter, 1961
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	DMSO	Kono et al., 1997
<i>Escherichia coli</i>	Glicerol, sacarose, DMSO	Keith, 1913, Ray et al., 1975, Sharp, 1984
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	Sacarose	Chavarri et al., 1988

<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Trealose	Antoni et al., 1989
<i>Leishmania tropica</i>	DMSO	Callow & Farrant, 1973
<i>Leptospira interrogans</i>	Glicerol	Stalheim, 1966
<i>Lipomyces starkeyi</i>	DMSO	Mikata & Banno, 1987
<i>Mycoplasma</i> sp.	Sacarose	(Jurmanová & Machatková, 1974)
<i>Neurospora crassa</i>	DMSO	Smith, 1983
<i>Physarella oblonga</i>	Etilenoglicol	Hubálek, 2003
<i>Piromyces communis</i>	Etilenoglicol	Hubálek, 2003
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Trealose	Diniz-Mendes et al., 1999
<i>Saccharomyces exiguus</i>	DMSO	Mikata & Banno, 1987
Salmonella enténica	Sacarose	Sola et al, 2012
<i>Sclerospora sorghi</i>	DMSO	Smith, 1983
<i>Spirillum volutans</i>	DMSO	Pauley & Krieg, 1974
<i>Tetraselmis suecica</i>	Glicerol	Fenwick & Day, 1992
<i>Theileria parva</i>	Glicerol, PEG	Kimbita et al., 2001
<i>Toxoplasma gondii</i>	DMSO	Dumas, 1974
<i>Trichomonas foetus</i>	Glicerol	Levine & Marquardt, 1955
<i>Trichosporon</i> sp.	Glicerol	Silva et al., 2007
<i>Rhodotorula</i> sp.	Glicerol	Silva et al., 2007
Vírus Bacteriófago T2	Glicerol	Meyle & Kempf, 1964
Vírus Heterosigma akashiwo (HaV)	DMSO	Nagasaki & Yamaguchi, 1999
Vírus Respiratório Sincicial	Sacarose, trealose	Steele, 1976, Gupta et al., 1996

Por outro lado, alguns autores relataram que o glicerol pode exercer efeitos tóxicos sobre as células, como alterações físico-químicas que podem levar à ruptura da membrana plasmática, à remoção de importantes proteínas membranárias, bem como, induzir modificações na estabilidade da estrutura lipídica (Watson, 1995; Curry, 2000).

O etilenoglicol (1,2-etanodiol) é um crioprotetor de baixo peso molecular (62,07 g/mol), que poderia apresentar uma baixa toxicidade e uma maior capacidade de penetração às células (Silva, 2007). É utilizado como crioprotetor na concentração média de 10%, podendo variar de 2 a 40%. Apresenta boa atividade crioprotetora na preservação de mixomicetos como *Physarella oblonga*, actinomicetos como *Actinomyces noursei*, fungos do rúmen, como *Piromyces communis*, algas como *Eisenia bicyclis* e protozoários como dinoflagelados marinhos (Hubálek, 2003)

(Quadro 1).

O polietilenoglicol, também conhecido como PEG, é o polímero formado a partir do etilenoglicol. É um crioprotetor ao qual é comercializado em diferentes pesos moleculares, podendo variar de 200 a 40000. Os primeiros resultados satisfatórios apresentados na literatura com o polietilenoglicol foi com peso molecular de 1500 a 3000 na criopreservação do *Actinomyces noursei* em ciclos repetidos de congelamento e descongelamento (Konev et al., 1975). Posteriormente, o PEG foi sendo testado na criopreservação de diversos micro-organismos, obtendo-se sucesso na criopreservação da bactéria *Aerobacter aerogenes* e do protozoário *Theileria parva* (Nash, 1963; Kimbita et al., 2001) (Quadro 1).

Um problema geral dos dióis, etilenoglicol e PEG, é o fato dos mesmos agirem como solventes de alguns polissacarídeos microbianos, podendo assim ser tóxicos no processo de preservação de certos micro-organismos (Nash, 1966; Hubálek, 2003).

Açúcares

Alguns açúcares mostraram ser capazes de evitar os danos causados pela desidratação celular, devido ao processo de congelamento, através da estabilização da bicamada lipídica, promovendo alterações na permeabilidade e na separação lateral dos componentes da membrana plasmática. Acredita-se que alguns açúcares como a sacarose e a trealose estabilizem a bicamada de fosfolipídios, mantendo sua capacidade de transporte de cálcio, inibição da fusão de membranas e a manutenção dos lipídios numa fase fluida na ausência de água (Crowe et al., 1987; Woelders et al., 1997).

A sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) tem sido frequentemente utilizada para a criopreservação de micro-organismos em concentrações de 1-68% (média 10%). O efeito crioprotetor desse dissacarídeo foi descrito por Keith (1973), quando utilizou uma solução de cana de açúcar para a preservação de bactérias a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ e as manteve por oito meses. A partir de então, a sacarose foi utilizada na preservação de muitos micro-organismos, exercendo ação crioprotetora em várias concentrações para alguns vírus, tais como o Vírus Respiratório Sincicial e o Vírus Mosaico do Feijão (Steele, 1976), bactérias, como *E. coli* (Ray et al., 1975; Sola et al., 2012), *Enterobacter aerogenes* (Postgate & Hunter, 1961), *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (Chavarri et al., 1988), *Salmonella* entérica (Sola et al., 2012), *Chlamydia* spp. (Prentice & Farrant, 1977; Hubálek, 2003), *Mycoplasma* spp. (Jurmanová & Machatková, 1974) e protozoários, como *Babesia rodhaini* (Dalglish et al., 1980; Hubálek, 2003), dentre outros (Quadro 1).

No entanto, a sacarose também foi ineficiente para preservação de outros micro-organismos, tais como a cianobactéria *Spirulina platensis* (Takano et al., 1973).

Excepcionalmente, 5% de sacarose foi relatado por proteger cepas de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* melhor do que glicerol a 10%, quando armazenadas entre -20 °C e -70 °C (Chavarri et al., 1988). Por outro lado, a sacarose foi tóxica para os *T. pyriformis* à temperatura ambiente (Osborne & Lee, 1975).

A trealose é um agente crioprotetor natural, presente em células de plantas e leveduras. É um dissacarídeo que apresenta duas moléculas de água em sua fórmula química (Hubálek, 2003). Ela tem sido usada nas concentrações de 5 a 19% (média 10%) na criopreservação de certos vírus, como o Vírus Respiratório Sincicial (Gupta et al., 1996), e outros agentes como o *Saccharomyces cerevisiae* (Diniz-Mendes et al., 1999), leveduras psicrófilas (Breierová, 1994), *Lactobacillus bulgaricus* (Antoni et al., 1989) e fungos micorrízicos (Declerck & Angelo-Van Coppenolle, 2000) embora os resultados com organismos eucarióticos não sejam muito satisfatórios (Hubálek, 2003) (Quadro 1).

De uma forma geral, açúcares não são capazes de se difundir através da membrana plasmática, pois atuam criando uma pressão osmótica que induz a desidratação celular, portanto, agem como agentes osmóticos externos, removendo o excesso de água intracelular através de um gradiente osmótico, e conduzindo a uma baixa incidência de formação de cristais de gelo dentro da célula. Também elevam a sobrevivência de espécies no processo de criopreservação, pois podem exercer a função de solutos reduzindo o ponto de congelamento e minimizando a formação de gelo extracelular (Lima, 2011). Outro fator muito relevante ao uso de açúcares como crioprotetor é que normalmente esses aditivos apresenta baixa ou nenhuma toxicidade, mesmo adicionados em grande quantidade aos materiais biológicos (Crowe et al., 1987).

Sulfóxidos

Os sulfóxidos são tioéteres oxidados contendo um átomo de oxigênio por molécula e, ao contrário dos outros tioéteres, são solúveis em água. A oxidação dos sulfóxidos resultam em sulfonas com dois átomos de oxigênio por molécula: a dimetilsulfona, que apresenta grande habilidade crioprotetora (McGann & Walterson, 1987).

O dimetilsulfóxido (DMSO) é um composto polar, com fórmula química $(CH_3)_2SO$ e que apresenta peso molecular 78.13 g/mol. Foi introduzido na criobiologia de forma muito eficaz e rapidamente foi utilizado como agente crioprotetor universal. O DMSO também apresenta propriedades radioprotetoras aos organismos. Classificado como sulfóxido, o grupamento S-O presente em sua molécula é quimicamente inerte, e é caracterizado por sua elevada eficiência e rápida penetração celular. Os primeiros estudos mostrando a atividade crioprotetora do DMSO foram desenvolvidos com eritrócitos e espermatozóides e, gradualmente, essa substância foi utilizada na

criopreservação dos mais diversos micro-organismos, tanto eucariotos como procariotos (Masumoto, 1997; Hubálek, 2003).

Algumas espécies de micro-organismos são melhor criopreservadas com o uso do DMSO em comparação a outros agentes crioprotetores, como, por exemplo, o vírus Heterosigma akashiwo (HaV) (Nagasaki & Yamaguchi, 1999), as bactérias *Spirillum volutans* (Pauley & Krieg, 1974) e *Escherichia coli* (Sharp, 1984), as leveduras *Lipomyces starkeyi*, *Saccharomyces exiguus* e *Candida bogoriensis* (Mikata & Banno, 1987); os fungos filamentosos *Neurospora crassa* e *Sclerospora sorghi* (Smith, 1983), a alga *Enteromorpha intestinalis* (Kono et al., 1997) e os protozoários *Toxoplasma gondii* (Dumas, 1974), *Leishmania tropica* (Callow & Farrant, 1973) e *Babesia* spp. (Hentrich & Bose, 1993; Hubálek, 2003) (Quadro 1).

A literatura relata amplo uso do DMSO como crioprotetor em concentrações que variam de 1 a 32%. No entanto, devido a sua alta solubilidade em água, o DMSO apresenta como inconveniente a capacidade de causar alterações à membrana celular, as quais danificam e inviabilizam as células. E, assim, mesmo em concentrações muito baixas, pode ser tóxico a alguns sistemas biológicos, principalmente quando mantidos por longo período em temperaturas acima de 5 °C (Hubálek, 2003).

Uma concepção errônea frequentemente atribuída à Criobiologia tem sido a prerrogativa de que o sucesso dos métodos de criopreservação para uma cepa ou espécie é transferível a células ou a organismos similares. Apesar dessa afirmação ser, por vezes, verdadeira, está longe de ser uma regra. Um exemplo que retrata bem essa afirmação é o emprego de crioprotetores para a preservação de micro-organismos, que para certas espécies favorece a conservação, enquanto para outras tem efeito tóxico, como o crioprotetor sacarose que favorece a conservação da bactéria *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, no entanto, apresenta toxicidade para a bactéria *Spirulina platensis*. As diferenças biológicas implicam respostas divergentes aos sistemas de congelamento e utilização de crioprotetores, reforçando a necessidade de se tecer ajustes ou mesmo reestruturar os critérios de preservação de acordo com o material a ser estudado (Day & McLellan, 1995).

CRIOPRESERVAÇÃO DE BACTÉRIAS

Técnicas de congelamento tornaram-se o método padronizado para a manutenção a longo prazo de culturas bacterianas. Esse método de preservação proporciona graus variados de sucesso em diferentes espécies de bactérias, não existindo ainda um método universalmente aplicável para o sucesso da preservação de todas as bactérias (Holland et al., 2003).

Os métodos de criopreservação de bactérias podem ser amplamente classificados de

acordo com a temperatura de armazenamento. Temperaturas de -20 a -30 °C são possíveis com a utilização de freezer padrão de laboratório; temperatura de -70 °C, em freezer com temperatura ultra-baixa; e temperaturas no intervalo entre -140 a -196 °C, em nitrogênio líquido. O armazenamento de células em nitrogênio na fase vapor (-140 °C) ou na fase líquida (-196 °C) está cada vez mais sendo utilizado. Em temperaturas muito baixas, a viabilidade celular é quase independente do tempo de armazenamento, e acredita-se que os sistemas biológicos permaneçam geneticamente estáveis (Heckly, 1978; Paoli, 2005).

A maioria das bactérias é recuperada em clínicas médicas, no meio ambiente ou de outros espécimes (Reimer & Carroll, 2004). Após o crescimento, as culturas bacterianas são suspensas em meio líquido e processadas para armazenamento. Por causa de sua organização celular e capacidade de divisão, células bacterianas procarióticas podem ser criopreservadas ou liofilizadas (Moore et al., 2001).

Dentre os isolados bacterianos, a grande maioria pode ser facilmente mantida a -80 °C, embora o material de suspensão, a concentração do inóculo inicial e o tipo de crioprotetor usado tenham um impacto significativo na sobrevivência bacteriana e capacidade de crescimento posterior ao descongelamento (Moore et al., 2001; Siberry et al., 2001). Tem sido demonstrada que após 12 a 18 meses, a patogenicidade de espécies comuns de bactérias armazenadas sem conservantes caiu até menos que 20% do inóculo inicial, enquanto após a adição de substâncias crioprotetoras a viabilidade aumentou 80 a 90% (Hubálek, 2003).

Após o armazenamento, é recomendado realizar um rápido descongelamento das culturas e uma rápida transferência das bactérias para um meio de crescimento adequado ao tipo bacteriano. Em geral, as bactérias podem ser armazenadas em -20 °C por um período de um a três anos, a -70 °C até 10 anos, enquanto o congelamento em nitrogênio líquido preserva bactérias por até 30 anos (Reimer & Carroll, 2004).

Infecções experimentais, utilizando bactérias armazenadas têm mostrado que as propriedades de virulência são geralmente mantidas após a liofilização ou congelamento a -70 °C (Michel & Garcia, 2003). Após o armazenamento e descongelamento, entretanto, algumas espécies bacterianas “exigentes” podem apresentar problemas em termos de viabilidade e estabilidade antigênica, molecular e propriedades bioquímicas. *Neisseria gonorrhoeae* é uma espécie de bactéria difícil de cultivar, cujas características foram estudadas após preservação. Nesses estudos, foi observado que estirpes dessa espécie podem ser armazenadas com sucesso a -20 °C ou a -70 °C usando criogênicos específicos (Harbec & Turcotte, 1996).

Helicobacter pylori é outra espécie bacteriana muito sensível às condições de armazenamento. Para preservar adequadamente a viabilidade e a característica

genética e fisiológica dessa espécie bacteriana, Shahamat e colaboradores (1992) sugeriram que, para criopreservá-la, o inóculo inicial deve ser superior a 5×10^6 células/ml e pelo menos 90% das células devem estar em estado vegetativo, ou seja, células em forma de espiral à observação microscópica. Esses mesmos autores, também testaram os efeitos dos diferentes meios crioprotetores para armazenamento de bactérias a -70 °C ou em nitrogênio líquido. Embora se consiga recuperar a maioria das cepas no período de 24 meses, períodos mais longos de armazenamento reduziram significativamente o percentual de cepas viáveis após o descongelamento (cerca de 60%). Estes dados confirmam que as espécies selecionadas de bactérias são particularmente frágeis após o armazenamento a longo prazo e que protocolos específicos objetivando a melhoraria da sua sobrevivência ainda são necessários.

Micoplasmas e clamídias diferem das bactérias comumente encontradas em espécimes biológicos e ambientais em virtude da sua composição celular, ausência de marcação com a coloração de Gram e suas características de crescimento especiais in vivo e in vitro. Alguns trabalhos científicos têm demonstrado que, apesar do seu crescimento peculiar e exigências metabólicas, micoplasmas e clamídias podem ser armazenadas com sucesso em frascos criopreservados ou liofilizados por até 10 anos (Furr & Taylor-Robinson, 1990; Theunissen et al., 1993). No entanto, a criopreservação de espécies de clamídia pode reduzir significativamente a recuperação após o período de armazenamento, sugerindo que a criopreservação destas espécies podem exigir ajustes quanto ao inóculo inicial e otimização dos protocolos de congelamento (Theunissen et al., 1993).

A técnica de liofilização também é recomendada para a conservação de bactérias. A taxa de sobrevivência pós-liofilização de algumas bactérias foi mensurada por Miyamoto-Shinohara e colaboradores (2000). Esses autores mostraram que a taxa de sobrevivência após dez anos de armazenamento variou significativamente de acordo com a espécie testada. A taxa de sobrevivência de bactérias Gram-positivas foi geralmente superior do que a de bactérias Gram-negativas, provavelmente por causa da sua maior resistência à secagem, devido à composição estrutural de sua superfície.

CRIOPRESERVAÇÃO DE FUNGOS

Infecções fúngicas pouco comuns estão emergindo como importantes causas de morbidade e mortalidade em hospedeiros humanos e animais imunocomprometidos e, assim, representam problemas especiais para laboratórios de diagnóstico. Outra importância dada aos fungos são que eles possuem um enorme potencial para fornecer soluções na agricultura, meio ambiente, medicina humana e veterinária. Estas razões explicam o grande interesse na preservação desses micro-organismos. Inúmeros protocolos têm sido sugeridos por serem adequados na preservação de fungos, embora nenhuma técnica de preservação individual tenha sido aplicada com sucesso para todos os fungos (Crespo et al., 2000; Deshmukh, 2003; Smith & Ryan, 2003; Espinel-

Ingroff et al., 2004).

Das diversas metodologias de estocagem fúngica utilizadas nos centros de pesquisa em todo o mundo, algumas têm maior destaque por motivos variados, como a praticidade ou resultados satisfatórios para determinadas espécies. A escolha de um método mais adequado deve considerar parâmetros, como o objetivo do estoque e da coleção e a manutenção das estabilidades genética, fisiológica e morfológica (Bueno & Gallardo, 1998).

Como primeiro passo para a preservação, culturas fúngicas são obtidas por técnicas de amostragem convencionais e são normalmente cultivadas em Agar Sabouraud, porém outros meios de crescimento também estão amplamente descritos na literatura (Murray et al., 1999). Normalmente, é obtida uma quantidade celular suficiente para estabelecer um biobanco de leveduras após incubação de 48-72 horas na atmosfera aeróbica, enquanto fungos filamentosos podem requerer 7-12 dias de incubação. Embora alguns agentes crioprotetores tenham sido utilizados para facilitar a dispersão de fungos, a dificuldade na obtenção de suspensões homogêneas após cultura pode comprometer a possibilidade de preparação de uma suspensão fúngica adequada para o congelamento (Crespo et al., 2000).

Para formação de biobancos de fungos, a literatura referencia métodos como estocagem em solo, em óleo mineral, em água destilada estéril, congelamento (criopreservação) em temperaturas variadas (-20, -70 e -196 °C) e a liofilização, todos com uso ou não de agentes crioprotetores nas mais diversas concentrações e tipos (Bueno & Gallardo, 1998). No entanto, a criopreservação em nitrogênio líquido e a liofilização são os métodos recomendados por vários centros de estudo para manutenção de coleções de culturas incluindo The American Type Culture Collection (ATCC) e National Collection of Types Cultures (American Type Culture Collection, 1991; Morgan et al., 2006).

A criopreservação utilizando temperaturas ultra-baixas permite que a maioria das culturas permaneça estável por um grande período, podendo chegar até a 30 anos, devido à baixa ocorrência de atividade metabólica nestas temperaturas. Esse é um dos principais motivos que justifica ser esta a técnica mais utilizada na maioria dos biobancos microbianos (Smith & Ryan, 2003). Por outro lado, nos protocolos de criopreservação a temperaturas abaixo de 0 °C, o estresse causado aos fungos pode ser ainda maior, tendo em vista que, a temperatura na qual estes seres normalmente crescem e se multiplicam encontra-se bem acima destes parâmetros, sofrendo, os mesmos, processos de adaptação para sobrevivência ainda mais exacerbados, podendo chegar até a modificações do seu material genético (Santos, 2001; Hubálek, 2003; Girão et al., 2004). Na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, genes de indução ao congelamento severo foram identificados, um deles (NSR1) codifica uma proteína relacionada ao processamento do RNAr e biossíntese ribossomal (Kondo et al., 1992).

Outros genes são induzidos pelo choque térmico ao frio (Kondo & Inouye, 1991; Kowalski et al., 1995).

Para algumas espécies de Ascomycota, Zigomycota e Basidiomycota, a técnica de liofilização é mais adequada, proporcionando uma boa sobrevivência por até 30 anos para alguns isolados (Smith & Ryan, 2003). A principal vantagem dessa técnica é que ampolas seladas oferecem uma proteção consistente aos fungos contra a dispersão no ar durante o armazenamento ou durante o acondicionamento e transporte para laboratórios distantes. Em contrapartida, a liofilização apresenta uma grande desvantagem que é a lioinjúria, podendo causar danos genéticos durante as etapas de resfriamento e secagem (Tan, 1997; Ryan et al., 2001).

Devido as técnicas de criopreservação e liofilização para a preservação de culturas fúngicas poderem causar problemas de viabilidade após a reconstituição, é de grande importância verificar a viabilidade antes e depois do armazenamento, independentemente da técnica utilizada. Protocolos experimentais de armazenamento de culturas de fungos têm estabelecido que a viabilidade aceitável para fungos é a germinação e desenvolvimento dos propágulos/células a uma taxa acima de 75% (Smith & Ryan, 2003).

Embora a maioria dos fungos possa ser preservados com a utilização das técnicas anteriormente mencionadas, alguns não apresentam resultados satisfatórios. Exemplos desse caso frequentemente incluem fungos que não esporulam em cultura, como o Oomycota, ou possuem esporos excessivamente delicados e grandes, e outros que são difíceis de manutenção em cultura (Diplocarpon) ou são patógenos facultativos (Figueiredo, 2001; Smith & Ryan, 2003).

CRIOPRESERVAÇÃO DE VÍRUS

Os vírus são acelulares, muito menores e menos complexos bioquimicamente que os mais simples organismos unicelulares. Eles consistem de uma única molécula de RNA ou DNA, ou, em alguns casos, de um genoma segmentado, envolvido por uma ou mais proteínas. Esta relativa simplicidade estrutural dos vírus tem sido em parte o segredo do sucesso dos mesmos coexistirem com todas as formas de vida conhecidas (Gould, 1995).

Existe uma variedade de procedimentos que objetivam manter estoques de vírus e, estes, dependem, de certo modo, das propriedades peculiares do vírus em particular (Gould, 1995). Em geral, os vírus DNA são mais estáveis que os vírus RNA, porém ambos são extremamente estáveis e podem ser preservados de forma relativamente simples. Muitos vírus podem ser mantidos por meses em temperaturas de refrigeração

e armazenados por anos em temperaturas muito baixas, sem a necessidade da utilização de substâncias protetoras ou de técnicas de congelação lenta. A estrutura simples, o pequeno tamanho e a ausência de água livre dos vírus são em grande parte responsáveis por essa estabilidade (Day & McLellan, 1995; Gould, 1999). Há uma tendência dos vírus com envelopes lipídicos serem menos estáveis que os vírus não envelopados à temperatura ambiente, no entanto, eles sobrevivem bem em temperaturas ultra-baixas ou no estado liofilizado (Gould, 1995).

As infecções virais e sua natureza patogênica, bem como, a ausência de opções terapêuticas capazes de erradicar muitas infecções virais, requerem precauções especiais de biossegurança para manipulação das amostras biológicas. Primeiro, os laboratórios de manipulação de vírus devem adotar nível de biossegurança II ou III em suas instalações dependendo do tipo de vírus a ser manipulado, em segundo lugar, biobancos com estoques virais exigem pessoal experiente adotando orientações, internacionalmente aceitas no guia de biossegurança (Paoli, 2005).

Importantes regras gerais necessárias para a preservação adequada de vírus foram pontuadas por Gould (1999). Preparações virais liofilizadas podem ser mantidas por décadas a 4 °C. No entanto, pode ser detectada considerável infectividade residual em modelos virais experimentais de liofilização tanto entre vírus envelopados quanto não-envelopados (Uhlenhaut, 2005). Vírus armazenados em nitrogênio líquido mantém suas propriedades patogênicas. As condições de armazenamento dos vírus podem variar de acordo com o destino final do material preservado. Se a manutenção da infectividade do vírus não é essencial, por exemplo, quando a amostra é usada para obter preparações antigênicas, ela pode ser armazenada com segurança à temperatura de -20 °C (Gould, 1999). Proteínas adicionadas ao biobanco de estoque viral, como por exemplo a albumina, podem fornecer proteção à infectividade do vírus em amostras armazenadas. No entanto, os mecanismos responsáveis por tal proteção ainda não são completamente conhecidos. Uma hipótese sugere que as proteínas fornecem capacidade de tampão contra mudanças de pH e reduz os processos que danificam os ácidos nucleicos. A infectividade viral mantém-se melhor quando as amostras são criopreservadas em pequenos volumes, pois o congelamento e descongelamento das amostras ocorrem muito mais rápido e os vírus são menos danificados quando preparações contêm alta titulação viral (Gould, 1999).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O isolamento, a identificação, a seleção, a caracterização, a conservação e a posterior utilização de micro-organismos são práticas imprescindíveis para o desenvolvimento de processos e obtenção de produtos de interesse econômico, bem como, para prática laboratorial com fins diagnósticos e de pesquisa.

No entanto, apesar de existir uma variedade de protocolos de estocagem e preservação com aplicação específica a diversos micro-organismos, proposto por muitos autores,

persiste a necessidade de se aperfeiçoar os já existentes e de se criar novos protocolos capazes de promover maior proteção a cada micro-organismo, em particular no que se refere à criopreservação.

Importante destacar a escassez de trabalhos específicos publicados na área de criopreservação de muitos micro-organismos, aliado à expressiva importância da estocagem microbiológica. Essa realidade evidencia a importância de estudos sobre o tema e mostra a necessidade urgente de investimento de pesquisa sobre o tema.

REFERÊNCIAS

Acker, J. P. & McGann, L. E. 2003. Protective Effect Of Intracellular Ice During Freezing? *Cryobiology*. 46:197-202.

American Type Culture Collection. 1991. Preservation methods: freezing and freeze-drying. 2 ed., American Type Culture Collection, Rockville, MD.

Antoni, G.L.; Perez, P.; Abraham, A.; Anón M.C. 1989. Trehalose, A Cryoprotectant For *Lactobacillus Bulgaricus*, *Cryobiology*. 26:149–153.

Barbas, J.P. & Mascarenhas, E.R.D. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank*. 10: 49-62.

Breierová, E. 1994. Cryoprotection of psychophilic yeast species by the use of additives with cryoprotective media, *Cryo-Letters*. 15: 191–197.

Brilhante, R.S.N; Cavalcante, C.S.P.; Soares-Junior, F.A.; Monteiro, A.J.; Brito, E.H.S.; Cordeiro, R.A.; Sidrim, J.J.C.; Rocha, M.F.G. 2004. Evaluation of *Microsporum canis* in different methods of storage. *Medical Mycology*. 42: 499-504.

Brockbank, K. G. M.; Covault, J. C.; Taylor, M. J. 2007. Guide Cryopreservation. Part 1: Cryobiology and Cryopreservation. Thermo Fisher Scientific Inc. p. 1-9.

Bueno, L. & Gallardo, R. 1998. Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. *Revista Iberoam. Micol*. 15: 166-168.

Callow, L.L. & Farrant. J. 1973. Cryopreservation of the promastigote form of *Leishmania tropica* var. major at different cooling rates. *Int. J. Parasitol.* 3: 77–88.

Chavarri, F.J.; Paz, M.; Nueez, M.M. 1988. Cryoprotective agents for frozen concentrated starters from non-bitter *Streptococcus lactis* strains, *Biotechnol. Lett.* 10, 11–16.

Colwell, R.R. 1992. Selected cryopreservatives for long-term storage of *Helicobacter pylori* at low temperatures. *J. Clin. Pathol.* 45: 735–736.

Costa, E.C. 2010. Conservação de amostras do vírus da Raiva mediante diferentes protocolos de criopreservação. 115p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará.

Crespo, M.J.; Abarca, M.L.; Cabañes, F.J. 2000. Atypical Lipid-Dependent *Malassezia* Species Isolated from Dogs with Otitis Externa. *Journal of Clinical Microbiology.* 38 (6): 2383- 2385.

Croan, S.C. 2000. Lyophilization of hypha-forming tropical wood-inhabiting Basidiomycotina. *Mycologia.* 92: 810-817.

Crowe, J.H.; Crowe, L.M.; Carpenter, J.F. 1987. Stabilization using dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem. J.* 242: 1-10.

Curry, M.R. 2000. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev Reprod.* 5: 46-52.

Daemen, A.L.H. & Van Der Stege, H.J. 1982. 1 - The destruction of enzymes and bacteria during the spray drying of milk and whey. 2 - The effect of the drying conditions. *Neth. Milk Dairy J.* 36: 211–229.

Dalglish, R.J.; Mellors, L.T.; Blight, G.W. 1980. Comparison of glucose, sucrose and dimethylsulfoxide as cryoprotective agents for *Babesia rodhaini*, with estimates of survival rates, *Cryobiology.* 17: 410–417.

Davis, E.E. 1965. Preservation of myxomycetes, *Mycologia*. 57: 986–988.

Davis, E.E. Hodges, F.A., Goos, R.D. 1966. Effect of suspending media on the survival of *Puccinia graminis* urediospores during freezing, *Phytopathology*. 56:1432–1433.

Day, J. G. & McLellan, M. R. 1995. Cryopreservation and Freezing-Drying Protocols. New Jersey: Humana Press.

Declerck, S. & Angelo-Van Coppenolle, M.G. 2000. Cryopreservation Of Entrapped Monoxenically Produced Spores Of An Arbuscular Mycorrhizal Fungus, *New Phytol*. 148: 169–176.

Deshmukh, S.K. 2003. The maintenance and preservation of keratinophylic fungi and related dermatophytes. *Mycoses*. 46: 203–207.

Diniz-Mendes, L.; Bernardes, E.; Araujo, P.S.; Panek, A.D.; Paschoalin, V.M.F. 1999. Preservation of frozen yeast cells by trehalose, *Biotechnol. Bioengin*. 65: 572–578.

Dumas, N. 1974. Conservation aux basses tempeeratures de *Toxoplasma gondii* Nicolle et Manceaux, 1909: action du diméthyl-sulfoxyde. *Ann. Parasitol. Hum. Comp*. 49: 1–40.

Espinel-Ingroff, A., Montero, D.; Martin-Mazuelos, E. 2004. Long-term preservation of fungal isolates in commercially prepared cryogenic microbank vials. *J. Clin. Microbiol*. 42: 1257–1259.

Figueiredo, M. B. 2001. Métodos de preservação de fungos patogênicos. *Biológico*. 63 (1/2): 73-82.

Fenwick, C. & Day, J. G. 1992. Cryopreservation of *Tetraselmis suecica* cultured under different nutrients regimes, *J. Appl. Phycol*. 4: 105–109.

Furr, P.M. & Taylor-Robinson, 1990. D. Long-term viability of stored mycoplasmas and ureaplasmas. J. Med. Microbiol. 31: 203–206.

Girão, M.D.; Prado, M.R.; Brilhante, R.S.N.; Cordeiro, R.A.; Monteiro, A.J.; Sidrim, J.J.C.; Rocha, M.F.G. 2004. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 37 (3): 229-233.

Graham, J.K. 1996. Cryopreservation of stallion spermatozoa. Vet Clin North Am, 12: 131-147.

Gould, E. A. 1995. Vírus Cryopreservation and Storage. In: Day, J.G., Mclellan, M. R. Cryopreservacion and Freezing-Drying Protocols. New Jersey: Humana Press, p. 7-20.

Gould, E. A. 1999. Methods for long-term vírus preservation. Mol. Biotechnol. 13: 57–66.

Gupta, C.K.; Leszczynski, J.; Gupta, R.K.; Siber, G.R. 1996. Stabilization Of respiratory syncytial virus (rsv) against Thermal inactivation and freeze-thaw cycles for development and control of rsv vaccines and immune globulin, Vaccine. 14: 1417–1420.

Heckly, R. J. 1978. Preservation of micro-organisms. Adv. Appl. Microb. 3: 1-76.

Harbec, P. S. & Turcotte, P. 1996. Preservation of *Neisseria gonorrhoeae* at -20 °C. J. Clin. Microbiol. 34: 1143–1146.

Hentrich, B. & Bose. R. 1993. Cryopreservation of *Babesia divergens* from jirds as a live vaccine for cattle. Internat. J. Parasitol. 23: 771–776.

Horaczek, A. & Viernstein, H. 2004. Comparison of three commonly used drying technologies with respect to activity and longevity of aerial conidia of *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. Biological Control. 31: 65–71.

Hubálek, Z. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*. 46: 205-229.

Holland, N. T.; Smith, M. T.; Eskenazi, B.; Bastaki, M. 2003. Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies. *Mutation Research*. 543: 217-234.

Joyner, L.P. & Bennett, G.H. 1956. Observations on the viability of *Trichomonas foetus* during the process of freezing to -79 °C and thawing in presence of glycerol, *J. Hyg.* 54: 335–341.

Jurmanová, K. & Machatková, M. 1974. Preservation of Mycoplasma strains by freezing in solid carbon dioxide, liquid nitrogen and at -10 °C, *In Vitro v CSSR* 3, n. 2: 213–216.

Keith, S.C. 1913. Factors influencing the survival of bacteria at temperatures in the vicinity of the freezing point of water, *Science*. 37: 877–879.

Kimbita, E.N. Silayo, R.S. Dolan, T.T. 2001. Comparison of cryoprotectants in the preservation of *Theileria parva* sporozoites using an in vitro infectivity assay, *Trop. Anim. Hlth. Prod.* 33: 29–41.

Kirsop, B. E. & Doyle, A. 1991. Maintenance of microorganisms and cultured cells. 2.ed. London: Academic Press.

Kondo, K. & Inouye, M. 1991. TIP1, a cold shock-inducible gene of [Saccharomyces cerevisiae](#). *J. Biol. Chem.* 266: 17537–17544.

Kondo, K.; Kowalski, L.R.; Inouye, M.J. 1992. Cold shock induction of yeast NSR1 protein and its role in pre-rRNA processing. *J. Biol. Chem.* 267: 16259–16265.

Konev, J.E.; Zhilina, Z.A.; Chamin, N.H. 1975. Some aspects of polyalcohols used as cryoprotective agents in the storage of *Actinomyces noursei* LIA-0471 (in Russian), *Antibiotiki*. 20: 342–345.

Kono, S.; Kuwano, K.; Ninomyia, M.; Onishi, J.; Saga, N. 1997. Cryopreservation of *Enteromorpha intestinalis* (Ulvaes, Chlorophyta) in liquid nitrogen, *Phycologia*. 36: 76– 78.

Kowalsky, L.R.Z.; Kondo, K.; Inouye, M. 1995. Cold-shock induction of a family of TIP1-related proteins associated with the membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 15: 341–353.

Kudokotseva, E. V.; Koshchiy, S. V.; Groshevoy, M. I. 2005. Probability of lethal damages of cryopreserved biological objects during storage. *Cryo Letters*. 26 (6): 401- 408.

Levine, N.D. & Marquardt, W.C. 1955. The effect of glycerol and related compounds on survival of *Trichomonas foetus* at freezing temperatures, *J. Protozool.* 2: 100–107.

Lima, D. T. 2011. Efeito crioprotetor de lactose e glicose em células fúngicas imobilizadas em alginato de sódio como método de preservação de culturas. 120p. Tese (Doutorado em Microbiologia Médica) – Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará.

Loveloock, J.E. & Polge, C. 1954. The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol. *Byochem J.* 58: 318-322.

Massumoto, C. M.; Mizukami, S.; Campos, M.F.; Silva, L. A. G.; Mendrome, J. R. A.; Sakashita, A.; Zambon, E.; Ostronoff, M.; Macedo, M. C. A; Medeiros, R.; Dorlhiac, P.; Chamone, D.; Dulley, F. 1997. Criopreservação de medula óssea e células pluripotentes periféricas utilizando um congelador programável: experiência em 86 congelamentos. *Revista da Associação Médica*, 43: 93-98.

Mcgann, L. E. & Walterson, M. L. 1987. Cryoprotection by dimethylsulfoxide and dimethylsulfone, *Cryobiology*. 24: 11–16.

Meryman, H. T. 1971. Cryoprotective agents. *Cryobiology*. 8: 173-183.

Meryman, H.T. 1974. Freezing injury and its prevention in living cells, *Annu. Rev. Bioph. Bioeng.* 3: 341–363.

Meyle, J.S. & Kempf, J.E. 1964. Preservation of T2 bacteriophage with liquid nitrogen, *Appl. Microbiol.* 12: 400–402.

Michel, C. & Garcia, C. 2003. Virulence stability in *Flavobacterium psychrophilum* after storage and preservation according to different procedures. *Vet. Res.* 34: 127–132.

Mikata, K. & Banno, I. 1987. Preservation of yeast cultures by freezing at -80 °C, *IFO Res. Commun. (Osaka)*, 13: 59–68.

Miyamoto-Shinohara, Y., Imaizumi, T., Sukenobe, J., Murakami, Y., Kawamura, S. And Komatsu, Y. 2000. Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage. *Cryobiology.* 41: 251-255.

Moore, J.E., Shaw, A.B., Stanley, T., Crowe, M.J.; Elborn, J.S. 2001. Long-term preservation of strains of *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas* spp. and *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from patients with cystic fibrosis. *Lett. Appl. Microbiol.* 33: 82–83.

Morgan, C.A.; Heerman, N.; White, P.A.; Vesey, G. 2006. Preservation of microorganisms by drying: a review, *journal of microbiological methods.* 66: 183-193.

Murray, P., Baron, E.J., Pfaller, M., Tenover, F.; Tenover, R., (Eds) 1999. *Manual of Clinical Microbiology.* ASM Press: Washington.

Myamoto-Shinohara, Y., Imaizumi, T.; Sukenobe, J.; Marakami, Y.; Kawamura, S.; Komatsu, Y. 2000. Survival rate of microbes after freeze-drying and long- term storage. *Cryobiology.* 41: 251-255.

Nagasaki, K. & Yamaguchi. M. 1999. Cryopreservation of a virus (HaV) infecting a harmful bloom causing microalga, *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae), *Fish. Sci.* 65: 319–320.

Nash, T. 1966. Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells agein damage due to freezing and thawing. In: Meryman, H. T. Cryobiology. London- New York: Academic Press.

Nash, T.; Postgate, J.R.; Hunter, J.R. 1963. Similar effects of various neutral solutes on the survival of *Aerobacter aerogenes* and of red blood cells after freezing and thawing, *Nature*. 199: 1113.

Oliveira, E.C.S. 2003. Efeito de diferentes diluidores sobre a congelação do sêmen canino. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)-Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 61p.

Oliveira, V.M.; Sette, L.D.; Fantinatti-Garboggini, F. 2006. Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos. Divisão de Recursos Microbianos. Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, p. 1-19.

Osborne, J.A. & Lee, D. 1975. Studies on the conditions required for optimum recovery of *Tetrahymena pyriformis* strain S (phenoset A) after freezing to, and thawing from, -196 °C, *J. Protozool.* 22: 233–237.

Paoli, P. 2005. Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research. *FEMS Microbiology Reviews*. 29: 897-910.

Parks, E.J. & Graham, J.K. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 38: 209-222.

Pauley, E.H. & Krieg, N.R. 1974. Long-term preservation of *Spirillum volutans*. *Int. J. Syst. Bact.* 24: 292–293.

Postgate, J.R. & Hunter, J.R. 1961. On the survival of frozen bacteria, *J. Gen. Microbiol.* 26: 367–378.

Prentice, M.J. & Farrant, J. 1977. Survival of chlamydiae after cooling to -196 °C, *J.*

Clin. Microbiol. 6: 4–9.

Quinn, P.J. Markey, B.K.; Carter, M.E.; Donnelly, W.J.; Leonard, F.C. 2005. Microbiologia E Doenças Infecciosas, Porto Alegre, Artmed.

Ray, B.; Souzu, H.; Speck, M.L. 1975. Cryoprotection of *Escherichia coli* by penetrating and nonpenetrating cryopreservatives, Cryobiology. 12: 553.

Reimer, L. & Carroll, K. 2004. Procedures for the storage of microorganisms In: Manual of Clinical Microbiology (Murray, E., Baron, E., Pfaller, M., Tenover, F. and Tenover, R., Eds.), ASM Press, Washington, DC, p. 67–73.

Ryan, M.J., Je□ries, P., Bridge, P.D. and Smith, D. 2001. Developing cryopreservation protocols to secure fungal gene function. Cryo Lett. 22: 115–124.

Santos, I.R.I. 2001. Criopreservação de germoplasma vegetal: a alternativa para a conservação a longo prazo. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. 20: 60-65.

Shahamat, M., Paszko-Kolva, C., Mai, U.E.H., Yamamoto, H.; Theunissen, J.J., Stolz, E.; Michel, M.F. 1992. The effects of medium and rate of freezing on the survival of chlamydias after lyophilization. J. Appl. Bacteriol. 75: 473–477.

Sharp, R.J. 1984. The preservation of genetically unstable microorganisms and the cryopreservation of fermentation seed cultures, Adv. Biotechnol. Progr. 3: 81–109.

Siberry, G., Brahmadathan, K.N., Pandian, R., Lalitha, M.K., Steinhoff, M.C.; John, T.J. 2001. Comparison of different culture media and storage temperatures for the long-term preservation of *Streptococcus pneumoniae* in the tropics. Bulletin of the World Health Organization. 79: 43–47.

Silva, A.M.M.; Borba, C.M.; Oliveira, P.C. 1994. Viability and morphological alterations of *Paracoccidioides brasiliensis* strains preserved under mineral oil for long periods of time. Mycoses. 37: 165-169.

Silva, A.R. 2007. Atualidades sobre a criopreservação do sêmen de cães. *Rev Bras Reprod Anim.* 31 (1): 119-127.

Silva, A.R, Cardoso, R.C.S, Uchoa, D.C, Silva, L.D.M. 2003. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology*, 59: 821-829.

Silva, J.O, Costa, P.P, Reche, S.H.C. 2008. Manutenção de leveduras por congelamento a -20 °C. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 40 (1): 73-74.

Simione, F.P. Cryopreservation Manual. Nalge International Coop, 1998. Capturado em 19 de agosto de 2011. Online. Disponível na Internet <http://www.nalgenelabware.com/techdata/technical/cryo.pdf>.

Smith, D. 1983. Cryoprotectants and the cryopreservation of fungi, *Trans. Br. Mycol. Soc.* 80: 360–363.

Smith, D. & Ryan, M.J. 2003. Current status of fungal collections and their role in biotechnology In: *Handbook of fungal biotechnology*, Ed., Marcel Dekker, New York, p. 527–538.

Stalheim, O.H.V. 1971. Viable, avirulent *Leptospira interrogans* serotype pomona vaccine: preservation in liquid nitrogen, *Appl. Microbiol.* 22: 726–727.

Steele, P.R.M. 1976. Prevention of low temperature denaturation injury in T4Bo phage by low concentrations of traditional cryoprotective additives, *J. Hyg.* 76: 453–458.

Su, S.C.; Garbers, S.; Rieper, T.D. Toniolo, P. 1996. Temperature variations in upright mechanical freezers. *Cancer Epidemiologic Biomarkers.* 5: 139-140.

Summers, W.A. 1968. Preservation of infectivity of *Anaplasma marginale*, *Am. J. Vet. Res.* 29: 1489–1490.

Tan, C.S. 1997. Preservation of fungi. *Cryptogamic Mycol.* 18: 157–163.

Takano, M; Sado, J.I.; Ogawa, T.; Terui, G. 1973. Freezing and freeze-drying of *Spirulina platensis*, Cryobiology. 10: 440–444.

Theunissen, J.J., Stolz, E. and Michel, M.F. 1993. The effects of medium and rate of freezing on the survival of chlamydias after lyophilization. J. Appl. Bacteriol. 75: 473–477.

Uhlenhaut, C.; Dörner, T.; Pauli, G.; Pruss, A. 2005. Effect of lyophilization on the infectivity of enveloped and non-enveloped viruses in bone tissue. Biomaterials, 26: 6558-6564.

Vysekantsev, I. P.; Gurina, T. M.; Martsenyuk, V. F.; Petrenko, T. F.; Kudokotseva, E. V.; Koshchiy, S. V.; Groshevoy, M. I. 2005. Probability of lethal damages of cryopreserved biological objects during storage. Cryo Letters. 26: 401- 408.

Watson, P.F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. Reprod Fertil Dev. 7: 871-891.

Woelders, H.; Mathijis, A.; Engel, B. 1997. Effects of trealose, and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intractness of sperm after freezing and thawing. Cryobiol. 35: 93-195.

Wolfe, J. & Bryant, G. 1999. Freezing, drying and/or vitrification of membrane-solute-water systems. Cryobiology. 39: 103-129.

Wolfe, J. & Bryant, G. 2001. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. International Journal of Refrigeration. 24: 438-450.

Woods, E.J.; Benson, J.D.; Agca, Y., Critser, J.K. 2004. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. Cryobiology. 48: 146-156.

7 CAPÍTULO 2

Criopreservação de amostras de vírus da Raiva a médio prazo

[Medium-term cryopreservation of rabies virus samples]

Tereza D'ávila de Freitas Aguiar, Maria Fátima da Silva Teixeira, Edmara Chaves

Costa, Allan Bezerra Vitaliano, Carlos Henrique de Andrade Teles, Igor Ciríaco

Barroso, Ronaldo Pereira Dias, Nélío Batista de Moraes

Periódico: Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (Publicado em novembro de 2013)

Criopreservação de amostras de vírus da Raiva a médio prazo

RESUMO

Introdução: A criopreservação de vírus da Raiva tem sido descrita de forma sucinta na literatura científica. Até o momento, poucas informações encontram-se disponíveis sobre o uso de agentes crioprotetores na conservação a frio desse vírus, e estas informações existentes ditam apenas sobre a conservação do vírus a curto prazo. O objetivo deste trabalho foi de criopreservar amostras de vírus da Raiva a médio prazo mediante diferentes protocolos de criopreservação. **Métodos:** Os protocolos de criopreservação de vírus da Raiva à temperatura de - 20°C dividiram-se em função das variáveis tempo e tipo de crioprotetor aplicado. Foram estabelecidos intervalos temporais regulares (360 e 720 dias) para a execução dos testes laboratoriais (inoculação intracerebral de camundongos, titulação viral e imunofluorescência direta), no sentido de avaliar a viabilidade das amostras virais mediante as distintas técnicas de conservação instituídas. **Resultados:** Após um ano de criopreservação, foram observadas divergências quanto à intensidade da fluorescência dos corpúsculos intracelulares de vírus da Raiva e no tempo médio de sobrevivência dos camundongos entre as amostras dos controles positivo e os demais tratamentos com os crioprotetores. Após dois anos, quase todas as amostras submetidas aos protocolos de criopreservação não induziram nenhuma reação de fluorescência, incluindo os controles. À exceção da amostra exposta ao crioprotetor sacarose (68%), que respondeu positivamente à imunofluorescência direta e à inoculação intracerebral de camundongos. **Conclusões:** A criopreservação de vírus da Raiva a médio prazo inviabiliza as amostras virais. Contudo, o agente crioprotetor sacarose, 68%, produz um efeito conservante nas amostras de vírus da Raiva criopreservadas.

Palavras - chave: Criopreservação; vírus da Raiva; médio prazo.

ABSTRACT

Introduction: The cryopreservation of the rabies virus has been described in detail in the literature. To date, little information is available on the use of cryoprotective agents for the cold preservation of this virus, and the data available focus only on short-term virus preservation. In this study, we investigated the medium-term cryopreservation of samples of rabies virus using different cryopreservation protocols.

Methods: The cryopreservation protocols for the rabies virus samples were performed at -20 °C and were divided according to the variables of time and the type of cryoprotectant used. The laboratory tests (intracerebral inoculation of mice, viral titration and direct immunofluorescence) were performed at regular intervals (360 and 720 days) to assess the viability of the viral samples according to the different preservation techniques used. **Results:** After 1 year of cryopreservation, the fluorescence intensity of intracellular corpuscles of the rabies virus and the median survival time of the mice differed between the positive controls and the treatments with the cryoprotectants. After 2 years, most of the samples subjected to the cryopreservation protocols (including the controls) did not produce fluorescence in the mice. However, the virus sample exposed to the cryoprotectant sucrose (68% solution) responded positively in the direct immunofluorescence assay and the intracerebral inoculation of mice. **Conclusions:** The medium-term cryopreservation of the rabies virus inactivates the viral sample. However, the cryoprotectant agent sucrose (68%) produces a preservative effect in cryopreserved rabies virus samples.

Keywords: Cryopreservation; Rabies virus; Medium-term.

INTRODUCTION

Rabies typically presents as an acute, progressive and incurable viral encephalitis, and the reemergence of the disease has been responsible for a number of deaths in humans. Given the wide distribution, effect on public health and economic implications of the disease, from a broad perspective, rabies can be considered the most important viral zoonosis known^{1,2}.

The fields of biological, agricultural and biomedical sciences and the pharmaceutical industry have focused on rabies virus research based primarily on the acquisition and maintenance of biological samples. Currently, the recognition of the importance of microorganisms for human development has led to the improvement of techniques for the conservation of diverse microbiological specimens^{3,4}. However, few studies have investigated the preservation of rabies virus samples.

Because cooling methods significantly delay the deterioration rate of perishable goods, the use of low temperatures favors the storage of living organisms in a state of suspended animation for long periods. Therefore, cryopreservation is one of the most widely used techniques for the conservation of microbial biodiversity^{4,5}.

Cryopreservation involves the storage of material at low (between -20 °C and -80 °C in freezers) and ultra-low temperatures (-150 °C in liquid nitrogen), allowing the preservation of a variety of cellular types or organisms^{4,6}. Cryopreservation methods can be divided according to the maximum preservation time as follows: medium-term method (cryopreservation at -20 °C) and long-term method (cryopreservation at -80 °C or in liquid nitrogen)⁷.

However, the cryopreservation process can also have deleterious effects on biological materials, especially cell membranes, a phenomenon termed cryoinjury^{8,9}.

Cryoinjury is a lethal event linked to the formation of intracellular ice, water-flow out of the cell (dehydration) and increased intracellular concentrations of solutes⁸.

The primary purpose of the protective substances, known as cryoprotective agents, is to prevent crystallization through the decrease in water activity. Cryoprotective agents are frequently included in cryopreservation systems to reduce or even prevent the damage resulting from the freezing of biological materials⁹. These cryoprotective additives provide extracellular protection (non-penetrating agents such as polyethylene glycol and sucrose) or intracellular protection (penetrating agents such as dimethyl sulfoxide and glycerol)¹⁰.

Biological differences produce different responses to freezing systems and different cryoprotectants; therefore, there is a need to adjust or even restructure the preservation criteria according to the material under investigation⁵.

There are numerous procedures for maintaining viral stocks, which depend largely on the particular properties of the individual virus. In a study by Costa et al.¹¹, different cryopreservation protocols were investigated for rabies virus samples incubated for short periods at -20 °C. The study demonstrated that after freezing for 30 days, the fluorescence intensity of the rabies virus particles in the cryopreserved samples was lower than in the fresh samples. However, the use of sucrose as a cryoprotectant had a preservative effect in the short-term.

However, there is no single, optimal or universal formula to assess the efficiency of the medium- and long-term storage and preservation of the rabies virus. Therefore, in this study, the medium-term cryopreservation of rabies virus samples using different cryopreservation protocols was investigated.

METHODS

Experimental Animals

The Swiss albino mice (*Mus musculus*), aged 3-to-4 weeks and weaned, were obtained from a conventional colony maintained at the Central Vivarium (Biotério Central, BIOCEN) at the Ceará Federal University (Universidade Federal do Ceará, UFC) in Brazil.

Viral Samples

The fixed rabies strain, Challenge Standard Virus (CVS 31.2), was used in the experiments and was maintained through passaging in mouse brains and stored in a lyophilized state.

Cryoprotective Agents

A selection of the cryoprotective agents most commonly used in freezing protocols for microorganisms was used⁸. In the literature, the concentration of dimethyl sulfoxide (DMSO) used ranges from 1% to 32%, glycerol (GLY) is used at concentrations of 2% to 55%, polyethylene glycol (PEG) 6000 has been used at concentrations of 5% to 45% and sucrose (SUC) is used at concentrations of 1% to 68%⁸. The median and maximum concentrations of cryoprotective agents used in this study were as follows: 10% and 32% DMSO, respectively; 10% and 55% GLY, respectively; 10% and 45%, PEG, respectively; and 10% and 68% SUC, respectively.

The cryoprotectants were diluted in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) (Laborclin®, Campo Novo do Parecis, State of Mato Grosso, Brazil) and were sterilized by filtration through a syringe filter containing a 0.22- μ m pore size polyethersulfone membrane (Millipore®).

Cryopreservation Protocols

The following procedure, developed by Costa et al.¹¹, was used:

The intracerebral (IC) inoculation of Swiss albino mice (aged 3-to-4 weeks) was performed using 0.03 mL of the viral strain CVS 31.2 (10% suspension). The animals exhibiting symptoms typical of rabies were euthanized in an agonal state, starting on the fifth day post-inoculation. The central nervous system (CNS) samples were collected immediately after euthanasia, and the brain tissue samples and 10% suspensions of the brain tissue samples were used in the experiments.

In total, 350 brains from mice infected with CVS 31.2 were used. To minimize the variability of the individual samples, the brain material was collected, combined and homogenized to form a composite (pooled) sample.

The pooled brain sample was infected with the rabies virus and was split into 0.5-g aliquots. The experimental protocol consisted of 8 samples, 2 concentrations of the 4 cryoprotectants, as well as the positive and negative controls. For the positive controls, 1 sample was not exposed to cryoprotectants (pure positive control, PC-CVS), and a second sample was subjected to freezing in PBS at pH 7.2 (PBS positive control, PC-PBS). The negative control (NC) consisted of pooled brain tissue samples from mice intracerebrally inoculated with 0.03 mL PBS (pH 7.2).

The cryopreservation protocols were performed at -20 °C and were divided according to the variables of time and the different cryoprotectants used. The laboratory tests (viral titration, direct immunofluorescence and biological tests) were performed at regular intervals (360 and 720 days) to assess the performance of the rabies virus samples preserved using different techniques as described in Costa et al.¹¹.

Freezing and Thawing Process

The aliquots containing the brain samples infected with the rabies virus were equilibrated in 10% and 32% DMSO, 10% and 55% GLY, 10% and 45% PEG, 10%

and 68% SUC or PBS for 20 minutes at 20 °C. After the equilibration period, the samples were transferred to a -20 °C freezer and were maintained in accordance with the experimental schedule.

The thawing process entailed exposing the samples to room temperature for 1 minute, followed by incubation in a water bath at 37 °C until thawed. Immediately following thawing, the samples were removed from the water bath and were maintained at 4 °C for a short period until use.

The cryoprotectant must be removed immediately after the thawing of the material. Therefore, the aliquots stored in the cryoprotective agents were subjected to 2 consecutive washes, averaging 5 minutes per wash, in PBS (pH 7.2) at room temperature as follows: the suspensions containing the viral samples were diluted in 2 mL PBS, equilibrated for 5 minutes at room temperature and centrifuged at 150-200 G for 5 minutes, and the supernatants were discarded. The process was repeated a second time, and the pellet was resuspended in viral diluent and transferred to a sterile microcentrifuge tube for the viability tests.

Viral Titration

The viral titration was performed based on 10-fold serial dilutions in viral diluent (PBS) using a 10% (w/v) initial suspension of the mouse brain sample as the starting point¹². Each viral dilution was intracerebrally (IC) inoculated into litters consisting of 6 weaned mice (aged 3 weeks) in a volume of 0.03 mL, and the dilutions ranged from 10^{-1} to 10^{-6} . The process of viral titration was also performed in the control PC–CVS samples.

The inoculated mice were monitored daily for 21 days for symptoms of rabies, and the mortality rate was assessed. Starting on the fifth day post-inoculation, the dead animals exhibiting pathognomonic neurological signs of the disease were

considered positive for rabies. At the end of the observation period, the viral titers were calculated in accordance with the method described by Reed & Muench¹³ and the method developed by Kuehne¹⁴ and were expressed as log DL₅₀/0.03 mL/IC (50% lethal dose using 0.03 mL via IC administration in mice).

Direct Immunofluorescence Assay

For the direct immunofluorescence (DIF) assay, the slides were prepared in accordance with the guidelines recommended by Dean et al.¹⁵, and modifications to the incubation period for the conjugate (as proposed by Roehe et al.¹⁶) were used to obtain improved fluorescence.

The smears of the infected brain cross-sections were prepared by pressing the cross-sections onto slides suitable for immunofluorescence and fixing the samples in acetone for 30 minutes in a freezer at -20 °C. The slides were dried at room temperature and were stored at -20 °C until use.

For the direct immunofluorescence assay, the slides were placed at room temperature for 5 minutes and were incubated with 30 µL fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-rabies antibody for 2 hours at 37 °C in a wet chamber . Next, the slides were washed in PBS (pH 8.5) and were rinsed in distilled water. The slides were then mounted in 90% glycerol in PBS (pH 8.5), covered with a cover slip and used for readout.

The readout was performed using a Zeiss immunofluorescence binocular microscope equipped with a HBO 50 mercury vapor lamp, VGI exciter filter and Zeiss 43barrier filter, at 400X magnification in dark-field. The fluorescence intensity observed in the smear was evaluated based on a subjective scale of intensity, ranging from 0 to 4, in accordance with the method described by Bingham & Merwe¹⁷. The following classification system was used to rate the fluorescence: (-), absence of

antigens on the smear; (+), very few antigens, 1 or more particles in less than 50% of the microscopic fields of view; (++), few antigens, 1 or more particles in less than 100% but more than 50% of the microscopic fields of view; (+++), abundant antigens, 1 or more particles in each microscopic field of view, and the number of particles per microscopic field is “countable”; (++++), very abundant antigens in all fields of view, and the number of particles per field of view is “uncountable”.

Each smear was examined independently by 2 individuals and was classified using a double-blind system. In the event of disagreement with the classification criteria, the respective cases were re-examined towards reaching a consensus.

Intracerebral Inoculation Test in Mice

The test suspension in a volume of 0.03 mL (30 µl) was intracerebrally inoculated using insulin syringes (BD Ultra-fine IITM, short needle, 31 gauge, 8 mm (5/16”) for 30 units or less). Groups of 6 weaned Swiss albino mice (aged between 3 and 4 weeks) were used per sample for the mouse intracerebral inoculation test and the biological tests.

The daily monitoring of the animals was performed for up to 21 days after the inoculation. The negative controls were inoculated with PBS (pH 7.2). The inoculated mice were maintained in cages in the quarantine area of the Virology Laboratory at the Ceará State University (Laboratório de Virologia da Universidade Estadual do Ceará, Brazil) during the entire observation period. The animals were maintained at an average temperature of 20 °C, with a 12-hour light-dark cycle and were supplied with water and feed *ad libitum*.

The clinical signs were identified and reported using a system of numerical codes as follows: 1, reduced water and feed intake; 2, apathy and goosebumps; 3,

incoordination; 4, tremors and/or episodes of tetany; 5, paralysis and 6, prostration (agonal state preceding animal death) (adapted from Koprowski¹²).

The biological test was performed on all samples of the mouse brain tissue subjected to the cryopreservation protocols (DMSO, GLY, SUC and PEG), the positive and negative controls and considering the predetermined time intervals.

Ethical considerations

This Ethics Committee on Animal Use at the Ceará State University (Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará, CEUA/UECE, Brazil) approved this study (protocol number 08185881-7).

RESULTS

The viral titers were decreased in the PC-CVS sample subjected to the medium-term cryopreservation procedure at -20 °C. After cryopreservation for 1 year (360 days; T₃₆₀) the viral titer of the sample pool was reduced from 4.69 to 1.50 Log₁₀ 50% LD₅₀ compared to the sample preserved for 30 days (T₃₀). The sample preserved for 2 years (720 days; T₇₂₀) demonstrated no titer.

Table 1. Effects of cryopreservation at -20 °C on rabies virus samples evaluated by viral viability tests, intracerebral inoculation of mice and direct immunofluorescence after exposure to internal and external cryoprotectants.

amples	Intracerebral inoculation test in mice						DIF Assay	
	MST ¹ (days)		Mortality				Results (degree of fluorescence intensity ⁴)	
			NMA ² /NMT ³		%	NMA ² /NMT ³		
	T ₃₆₀	T ₇₂₀	T ₃₆₀		T ₇₂₀	%	T ₃₆₀	T ₇₂₀
NC	21	21	0/6	0	0/6	0	-	-
PC-CVS	8.2	21	6/6	100	0/6	0	+++	-
PC-PBS	8.7	21	6/6	100	0/6	0	+	-
DMSO 10%	9.8	21	6/6	100	0/6	0	+	-
DMSO 32%	7.3	21	6/6	100	0/6	0	+	-
GLY 10%	7.4	21	6/6	100	0/6	0	+++	-
GLY 55%	6.0	21	6/6	100	0/6	0	+++	-
PEG 10%	21	21	0/6	0	0/6	0	-	-
PEG 45%	21	21	0/6	0	0/6	0	-	-
SUC 10%	6.8	21	6/6	100	0/6	0	++	-
SUC 68%	6.7	14.3	6/6	100	6/6	100	++++	++

¹MST: Mean survival time; ²NMA: Number of mice affected; ³NMT: Number of mice tested; ⁴ Degree of fluorescence intensity: -, +, ++, +++, and +++++.

The results of the viability tests for the rabies virus samples after medium-term cryopreservation (up to two years, T₃₆₀ and T₇₂₀) based on the use of internal and external cryoprotective agents are shown in **Table 1**. At T₃₆₀, significant differences were observed in the fluorescence intensity of the rabies virus intracellular corpuscles between the PC-CVS, PBS-PC and the treatments with cryoprotectants. The sample exposed to 68% SUC demonstrated the maximum degree of fluorescence intensity (+++++) (**Figure 1A**), followed by samples PC-CVS, 10% GLY and 55% GLY

(fluorescence intensities of +++) and the sample exposed to 10% SUC (fluorescence intensity of ++). The samples exposed to 10% DMSO and 32% DMSO demonstrated a minimum degree of fluorescence intensity (+). In contrast, the samples exposed to 10% PEG and 45% PEG did not demonstrate fluorescence intensity and were designated negative for the presence of viable virus.

Table 1 also shows that according to the viability test, biological tests and direct immunofluorescence, the viability of the rabies virus was compromised after 2 years (T_{720}) of cryopreservation at -20 °C. There was a significant decrease in fluorescence at T_{720} for all cryopreservation protocols; the majority of the samples were negative, including the positive controls. However, the sample exposed to 68% SUC continued to exhibit fluorescent intracellular corpuscles at a ++ degree of intensity (**Figure 1B**).

Throughout the experiment, the samples of normal mouse brain (NC) demonstrated negative results as expected.

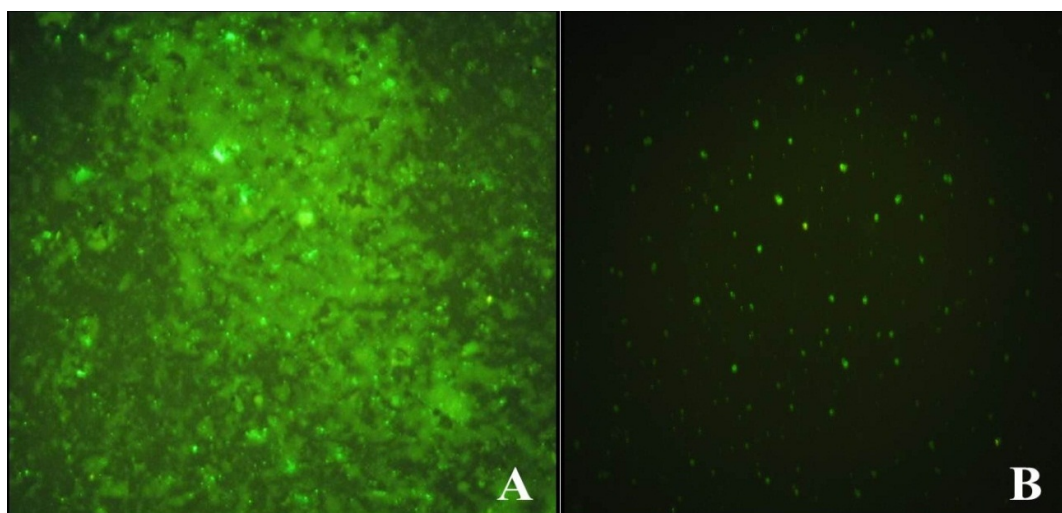


Figure 1. Photomicrographs of direct immunofluorescence reactions in the presence (A and B) of rabies virus antigens in the brain tissue samples subjected to cryopreservation at -20 °C for up to 2 years (immunofluorescence microscope

equipped with 40x objective lens; Carl Zeiss, Germany). A: 68% SUC, cryopreservation for 1 year demonstrating very abundant antigens in all fields of view, “uncountable” (++++), B: 68% SUC, cryopreservation for 2 years demonstrating few antigens, 1 or more particles in less than 100% but more than 50% of the fields of view (++). Source: LABOVIR-UECE, 2012.

DISCUSSION

The viral titer measurements provided key data on the viral viability before and after the cryopreservation of the rabies virus samples for up to 2 years. After 1 year of cold preservation, the titer of the pooled sample demonstrated a decrease compared to the sample preserved for 30 days, and was undetectable after 2 years of cryopreservation. These data are consistent with a report by Costa et al.¹¹ in which the viability of rabies virus samples was compromised after freezing/thawing in the absence of cryoprotective agents. Furthermore, according to Costa et al.¹¹, periodic titration is a crucial step for the evaluation of cryopreserved viral samples.

Most laboratories offering diagnostic services for rabies frequently receive suspicious materials, and the materials are often maintained under inadequate conditions of preservation. However, according to Kissling¹⁸, diagnosis is still possible. Indeed, Winkler & Adams¹⁹ reported that the direct immunofluorescence assay demonstrates the presence of rabies antigen even in decomposed materials. However, the data in our study failed to corroborate the findings of these previous reports. Indeed, the direct immunofluorescence assay demonstrated a significant decrease in titer in the rabies virus samples preserved in the absence of cryoprotectant at -20 °C for 1 year, and the samples were negative after preservation for 2 years.

In this study, based on the assessment of viral viability using the direct immunofluorescence assay and the intracerebral inoculation of mice using the

cryopreserved rabies virus samples (with or without cryoprotectant) for up to 2 years, the viral viability was compromised significantly by freezing at -20 °C. These data are consistent with the findings of Costa et al.¹¹, demonstrating that the fluorescence intensity of rabies virus particles in samples subjected to short-term cryopreservation (30 days) at -20 °C was lower than in fresh samples. These observations likely reflect mechanical damage caused by the formation of ice crystals during freezing at this temperature. A study performed by Olson et al.²⁰ demonstrated increased viral loss at -20 °C, emphasizing that viral samples should not be stored at -20 °C because of the formation of ice crystals and the consequent possibility of damage to the viral structure.

Furthermore, according to Greene & Rupprecht²¹, the storage of rabies virus samples in domestic freezers at a minimum temperature of -20 °C and repeated freeze-thaw cycles causes damage to the tissues; therefore, these practices should be avoided because they may preclude future viral detection by affecting the sensitivity of diagnostic tests because of viral antigen degradation and loss of viability. For the long-term maintenance of rabies virus samples for use as epidemiological files for future studies and other purposes, rabies-positive samples should be maintained at very low temperatures (-30 to -80 °C) to preserve the viral activity for several years (Mizuno et al.²²; Biswal et al.²³).

Regarding the intracerebral inoculation results, there was a significant increase in the mean survival time of inoculated mice (14.3 to 21 days) that correlated with the cryopreservation time at -20°C in both the presence and absence of a cryoprotective agent. According to Lopes and colleagues²⁴ and Costa and colleagues¹¹, the increase in the mean animal survival time is due to a lower virulence of the viral sample caused by the storage period and/or preservation conditions, given that the mean

survival time of mice inoculated with the rabies virus preserved in an appropriate manner varies from 7 to 10 days and the mean survival time for animals inoculated with the positive control (Challenge Virus Standard strain) ranges from 5 to 7 days.

In this study, sucrose at the maximum concentration of 68% exerted a significant protective effect on the rabies virus particles following cryopreservation at -20 °C for 1 to 2 years. The rabies virus samples preserved in the sucrose cryoprotectant at this concentration demonstrated a maximum degree of fluorescence intensity after 1 year of cold preservation and were the only samples to contain fluorescent rabies virus antigens after 2 years of cryopreservation. These data are consistent with the findings of Costa et al.¹¹ in which the efficacy of sucrose for the short-term cryopreservation of rabies virus was demonstrated. According to Crowe et al.²⁵ and Woelders et al.²⁶, a number of sugars, including sucrose, prevent the damage caused by the cellular dehydration that occurs during the freezing process by stabilizing the lipid bilayer and promoting changes in the plasma membrane permeability and lateral separation of components.

Furthermore, Chen et al.²⁷ suggested that the increase in sucrose concentration generates an osmotic gradient throughout the cellular membrane that draws water out of cells and causes the cells to become sufficiently dehydrated before and during the freezing process, which has a protective effect on the viral particles.

CONCLUSIONS

The medium-term cryopreservation of the rabies virus inactivates the viral samples; the viral sample titers were negative after 2 years of preservation. However, the cryoprotective agent sucrose, at a concentration of 68%, produces a preservative effect on the rabies virus, allowing the detection of intracellular fluorescent corpuscles, even after 2 years of cryopreservation.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Ceará State University (Universidade Estadual do Ceará) for the institutional support and to Dr. Phyllis Catharina Romijn, researcher at the Agricultural Research Company of the State of Rio de Janeiro (Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro, PESAGRO-RIO) for kindly providing the viral sample used in the study.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare there are no conflicts of interest.

FUNDING

The Ceará State Foundation for Support in Scientific and Technological Development (Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico, FUNCAP) and the National Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq) supported these studies.

REFERENCES

1. Hemachudha T, Laothamatas J, Rupprecht CE. Human rabies: a disease of complex neuropathogenetic mechanisms and diagnostic challenges. *Lancet Infect Dis* 2002;1: 101-109.
2. Rupprecht CE, Hanlon CA, Hemachudha T. Rabies re-examined. *Lancet Infect Dis* 2002; 2:327-343.
3. Holland NT, Smith MT, Eskenazi B, Bastaki M. Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies. *Mutat Res* 2003;543:217-234.
4. Paoli P. Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research. *FEMS Microbiol Rev* 2005;29:897-910.

5. Day JG, Mclellan MR. Cryopreservation and freeze-drying protocols. New Jersey: Humana Press; 1995.
6. Wolfe J, Bryant G. Freezing, drying and/or vitrification of membrane-solute-water systems. *Cryobiol* 1999;39:103-129.
7. Sette LD. Técnicas de preservação de microrganismos [Methods of preservation of microorganisms; Internet]. Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria – CBMAI, CPQBA – UNICAMP; February 2005 [Accessed on September 27, 2011]. Available at: <http://www.cria.org.br/eventos/confmt/presentations/Preservacao.ppt>.
8. Hubálek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiol* 2003;46:205-229.
9. Costa EC. Conservação de amostras do vírus da Raiva mediante diferentes protocolos de criopreservação [Conservation of rabies virus samples using different protocols of cryopreservation]. Doctorate thesis [Fortaleza]: Universidade Estadual do Ceará; 2010. 115p.
10. Meryman HT. Cryoprotective agents. *Cryobiol* 1971; 8:173-183.
11. Costa EC, Teixeira MFS, Aguiar TDF, Rolim BN, Romijn PC, Rocha MFG. Rabies virus viability after short-term cryopreservation using cryoprotectant agents. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2011;70(2):106-12.
12. Koprowski H. The mouse inoculation test. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H (Eds). *Laboratory Techniques in Rabies*. 4ed. Geneva: World Health Organization; 1996. p. 80-86.
13. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg.* 1938;27:493-497.

14. Kuehne RW. Rapid determination of Log₁₀ 50% Lethal Doses or 50% Infective Doses. *J Clin Microbiol.* 1983; 17(4):702-703.
15. Dean DJ, Abelseth MK, Atanasiu P. The fluorescent antibody test. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H (Eds). *Laboratory Techniques in Rabies.* 4ed. Geneva: World Health Organization; 1996. p. 88-95.
16. Roehe PM, Schaefer R, Pereira AS. Otimização da imunofluorescência direta para diagnóstico de Raiva [Optimization of the direct fluorescent antibody test for rabies diagnosis]. *Acta Sci Vet* 2002; 30(1):53-57.
17. Bingham J, Merwe M. Distribution of Rabies antigen in infected brain material: determining the reliability of different regions of the brain for the Rabies fluorescent antibody test. *J Virol Methods.* 2002;101:85-94.
18. Kissling RE. The fluorescent antibody test in rabies. In: Baer GM. *The natural history of rabies.* New York: Academic Press; 1975. p. 401-416.
19. Winkler WG, Adams DB apud Kissling RE. The fluorescent antibody test in rabies. In: Baer GM. *The natural history of rabies.* New York: Academic Press; 1975. p. 401-416.
20. Olson MR, Axler RP, Hicks RE. Effects of freezing and storage temperature on MS2 viability. *J Virol Methods.* 2004;122:147-152.
21. Greene C, Rupprecht C. Rabies and other Lyssavirus infections. In: Greene C. (Ed.), *Infectious Diseases of the Dog and Cat.* St Louis; 2006. p. 167-183.
22. Mizuno N, Nagamura H, Iwamoto K. RNA from decades-old archival tissue blocks for retrospective studies. *Diagn Mol Pathol* 1998;7:202-208.
23. Biswal M, Ratho R, Mishra B. Usefulness of reverse transcriptase-polymerase chain reaction for detection of rabies RNA in archival samples. *J Infect Dis.* 2007;60:298-299.

24. Lopes MC, Venditti LLR, Queiroz LH. Comparison between RTPCR and the mouse inoculation test for detection of rabies virus in samples kept for long periods under different conditions. *J Virol Methods*. 2010; 164:19-23.
25. Crowe JH, Crowe LM, Carpenter JF. Stabilization using dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem J*. 1987;242:1-10.
26. Woelders H, Mathijis A, Engel B. Effects of trehalose, and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiol* 1997; 35:93-195.
27. Chen ZJ, Li M, Li Y, Zhao LX, Tang R, Sheng Y et al. Effects of sucrose concentration on the developmental potential of human frozen-thawed oocytes at different stages of maturity. *Hum Reprod* 2004;10:2345-9.

8 CAPÍTULO 3

RABIES VIRAL RNA DETECTION BY THE RT-PCR TECHNIQUE IN CRYOPRESERVED SPECIMENS

Tereza D'ávila de Freitas Aguiar, Maria Fátima da Silva Teixeira, Edmara
Chaves Costa, Francisco Esmale de Sales Lima, Allan Bezerra Vitaliano, Ronaldo
Pereira Dias, Gabrielle Rosembli Martins, Aryana Lushese Vasconcelos Lima
Feitosa

Periódico: Veterinary Microbiology (Submetido em fevereiro de 2014)

RABIES VIRAL RNA DETECTION BY THE RT-PCR TECHNIQUE IN CRYOPRESERVED SPECIMENS

RESUMO

A técnica de Imunofluorescência Direta é o método diagnóstico padrão para a Raiva, em associação com a Inoculação Intracerebral em Camundongos. Essas técnicas objetivam avaliar a viabilidade viral, que pode ser perdida após preservação prolongada do vírus, associada a variações de temperatura, prejudicando, assim, a acurácia desses testes. Contudo, ferramentas moleculares, como a técnica RT-PCR, podem superar esse problema. O objetivo desse trabalho foi detectar o RNA viral da Raiva por RT-PCR e analisar a viabilidade viral utilizando os testes de Imunofluorescência Direta e Inoculação Intracerebral em Camundongos, a partir de amostras conservadas a médio prazo mediante diferentes protocolos de criopreservação a -20 °C. Os protocolos de criopreservação de vírus da Raiva à temperatura de -20°C dividiram-se em função das variáveis tempo e tipo de crioprotetor aplicado. Foram estabelecidos intervalos temporais regulares (360 e 720 dias) para a execução dos testes laboratoriais (inoculação intracerebral de camundongos, imunofluorescência direta e RT-PCR), no sentido de avaliar a acurácia dos testes. Foi observado a partir dos testes de viabilidade aplicados em amostras do vírus da Raiva criopreservadas por até dois anos um grande comprometimento na positividade das amostras (80% - T₃₆₀ e 10% - T₇₂₀ para ambos os testes). Enquanto a RT-PCR detectou o RNA viral em 100% das amostras criopreservadas por um ano (T₃₆₀) e em 80% das amostras criopreservadas por dois anos (T₇₂₀). A técnica molecular RT-PCR é capaz de detectar o RNA do vírus da Raiva em amostras criopreservadas a médio prazo a -20 °C com viabilidade viral comprometida.

Palavras-chave: Vírus da Raiva; criopreservação; RT-PCR

ABSTRACT

The direct immunofluorescence technique in association with intracerebral inoculation in mice constitutes the gold standard for diagnosis of Rabies. These techniques aim to evaluate the viral viability, but this can be lost after prolonged preservation of the virus associated with temperature variations, thus impairing the accuracy of these tests. However, molecular tools, such as the RT-PCR technique, can overcome this problem. The aim of this study was to detect rabies viral RNA by RT-PCR and to analyze the viral viability using the direct immunofluorescence assay and intracerebral inoculation test in mice, from samples preserved at -20 °C over medium-range intervals by different cryopreservation protocols. These protocols can be divided in function of the time and type of cryoprotectant employed. The laboratory tests (intracerebral inoculation in mice, direct immunofluorescence and RT-PCR) were carried out at two time intervals (360 and 720 days), to assess the accuracy of these tests. The viability tests with virus samples preserved for up to two years showed severe impairment of positivity of the samples (80% - T₃₆₀ and 10% - T₇₂₀ for both tests), while RT-PCR detected viral RNA in 100% of the samples preserved for one year (T₃₆₀) and 80% of those preserved for two years (T₇₂₀). The molecular RT-PCR technique is thus able to detect rabies viral RNA in samples reserved at -20 °C over the medium term with impaired viability.

Keywords: Rabies virus; cryopreservation; RT-PCR

1. Introduction

Rabies is an infectious-contagious disease that affects all warm-blooded animals. It is caused by neurotropic viruses that affect the central nervous system (CNS), causing acute encephalitis that is nearly always fatal. The virus is mainly transmitted by being bitten by an infected animal (Tordo et al., 1998; Acha and Szyfres, 2003). The etiological agent is an enveloped virus, composed of a single RNA strand with negative polarity, belonging to the family *Rhabdoviridae* and genus *Lyssavirus* (Tordo et al., 1986, Fenner, 1993; Paez et al., 2002).

Rabies is a notifiable disease in most countries, and its confirmation is by laboratory diagnosis (WHO, 2004). According to the Pan-American Health Organization (2005), the standard diagnostic method to detect the rabies virus is direct immunofluorescence testing associated with intracerebral inoculation in mice (Dean et al., 1996; Koprowski, 1996).

A serious problem that occurs in tropical counties like Brazil is that the high temperature can cause rapid decomposition of samples during their transport and storage, particularly when stored at low temperatures (-20 °C) without previous fixation (Biswal et al., 2007). These conditions can affect the sensitivity of the direct immunofluorescence assay (Ito et al., 2001; Dantas et al., 2004) and intracerebral inoculation test in mice due to the degradation of the viral antigen and loss of viability (Martorelli, 2004). This can be observed in samples stored at room temperature for 48 and 72 hours, when the results are negative (Albas et al., 1999).

The storage of rabies virus samples in household freezers, which only reach a minimum temperature of -20 °C, without the addition of cryoprotective agents, along

with the freezing/thawing process, can cause damage to the tissues, making future detection of the viral antigen impossible by routine laboratory tests for rabies (Centers for Disease Control and Prevention, 2006; Greene and Rupprecht, 2006). The presence of an appropriate cryoprotective agent in the medium used for freezing generally enhances the survival of microorganisms maintained at temperatures below 0 °C, because these substances prevent crystallization by depressing the activity of water (Hubálek, 2003).

Molecular techniques, such as polymerase chain reaction (PCR), are useful in many diagnostic and retrospective studies (Dantas et al., 2004). The PCR products can be sequenced and submitted to phylogenetic analysis, leading to highly precise identification of the virus (Heaton et al., 1997). For viral RNA, such as that from the rabies virus, RT-PCR and heminested RT-PCR are important diagnostic tools, and can be useful in retrospective studies (Heaton et al., 1997; Favoretto et al., 2005; David et al., 2002; Soares et al., 2002; Araújo et al., 2008; Lopes et al., 2010). The RT-PCR technique allows detecting rabies viral RNA in samples stored over long periods and in different stages of decomposition. It is more sensitive than traditional laboratory techniques such as intracerebral inoculation in mice and direct immunofluorescence, whose sensitivity is impaired when applied in decomposed and/or low-virulence material (Albas et al., 1999).

Therefore, the aim of this study was to detect rabies viral RNA by RT-PCR and to analyze the viral viability by the direct immunofluorescence assay and intracerebral inoculation test in mice, using samples stored at -20 °C for one or two years under different cryopreservation protocols.

2. Material and methods

2.1. Processing the viral samples

The virus sample used in this study consisted of the Challenge Standard Virus (CVS 31.2), maintained by passage in mouse brains and stored in freeze-dried state.

The samples were subjected to cryopreservation protocols, which involved initial inoculation in Swiss albino mice (*Mus musculus*) with ages of three to four weeks, with 0.03mL of the viral strain CVS 31.2 in 10% suspension by the intracerebral (IC) route. All the animals that showed signs of rabies were euthanized by use of the inhalatory anesthetic isoflurane, in an agonal state, as of the fifth day after inoculation. Just after death, the central nervous system (CNS) was removed and the brain tissues and 10% suspensions there of were submitted to the experimental protocols.

A total of 350 brains from the mice infected with CVS 31.2 were used. This material was pooled, by which the material was combined and homogenized, to minimize the variability of the individual samples. The pool of samples was distributed uniformly in 0.5 g aliquots, which were then submitted to eight experimental protocols (two concentrations of the four cryoprotectants most commonly used in experiments involving frozen microorganisms – 10% and 32% dimethyl sulfoxide (DMSO), 10% and 45% polyethylene glycol (PEG), 10% and 55% glycerol (GLY), and 10% and 68% sucrose (SUC) (Hubálek, 2003). There were two positive control groups, one not exposed to cryoprotectants, called the pure positive control (PC-CVS), and the other frozen with PBS pH 7.2, called the PBS positive control (PC-PBS). The negative control (NC) was formed by pooled cerebral material from mice IC inoculated with 0.03 mL of phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2).

The cryopreservation protocols were divided in function of the variables time (up to two years of preservation – medium term) and application of cryoprotectants.

Two regular time intervals (360 and 720 days) were established for performance of the laboratory tests (direct immunofluorescence assay, intracerebral inoculation test in mice and the molecular RT-PCR technique), to compare the accuracy of these tests.

2.2. Direct immunofluorescence assay

The procedure used to prepare and read the slides submitted to the direct immunofluorescence (DIF) assay was basically that described by Dean et al. (1996), with modification of the incubation period for the conjugate proposed by Roehe et al. (2002), seeking to obtain better fluorescence.

Smears of the infected mouse brain cross-sections were prepared by pressing the sections onto slides suitable for immunofluorescence and were then fixed in acetone for 30 minutes in a freezer at -20 °C to obtain the smear of the antigen. The slides were dried at room temperature and stored at -20 °C until use in the experiments.

In the direct immunofluorescence assay, the slides were taken out of the freezer and left at room temperature for 5 minutes, covered with 30 µL of the anti-rabies antibody marked with fluorescein isothiocyanate (conjugate) and incubated for 2 hours at 37 °C in a wet chamber, in the dark. Then they were washed in PBS (pH 8.5) and rinsed with distilled water, after which the slides were mounted in 90% glycerol in PBS (pH 8.5) and covered with a cover slip for reading.

The reactions were read with a Zeiss immunofluorescence binocular microscope equipped with an HBO 50 mercury vapor lamp, VGI exciter filter and Zeiss 43 barrier filter, at 400x magnification in dark-field mode. The fluorescence intensity in the smear was evaluated on a subjective intensity scale, varying from 0 to 4, as described by Bingham & Merwe (2007), and adapted to the following symbols: (-), absence of antigens on the entire smear; (+), very scarce antigens, one or more

particles in at least 50% of the microscopic fields; (++) , scarce antigens, one or more particles in more than 50% of the fields; (+++) , abundant antigens, one or more particles in each field, but the number in each field could be counted; and (++++), very abundant antigens in all fields, to the point of being impossible to count.

Each smear was examined independently by two individuals and classified using a double-blind system. If the examiners disagreed on the classification, the cases were re-examined to reach consensus.

2.3. Intracerebral inoculation test in mice

The test suspension in a volume of 0.03 mL (30 µl) was IC inoculated using insulin syringes (Becton Dickinson (BD) ultrafine IITM, short needle, 31 gauge, 8 mm [5/16"] for 30 units or less). Groups of six weaned Swiss albino mice (aged between 3 and 4 weeks) were used per sample for the mouse IC inoculation test and the biological tests.

The mice were then observed daily for up to 21 days after inoculation. The negative controls were inoculated with PBS (pH 7.2). The inoculated mice were maintained in cages in the quarantine area of the Virology Laboratory of Ceará State University (Laboratório de Virologia da Universidade Estadual do Ceará, Brazil) during the entire observation period, at an average temperature of 20 °C under a 12-hour light-dark cycle, and were supplied with water and feed *ad libitum*.

The clinical signs were identified and reported using a system of numerical codes as follows: 1, reduced water and food intake; 2, apathy and goose bumps; 3, poor coordination; 4, tremors and/or episodes of tetany; 5, paralysis; and 6, prostration (agonal state preceding death), as adapted from Koprowski (1996).

The biological test was performed on all samples of the mouse brain tissue subjected to the cryopreservation protocols (DMSO, GLY, SUC and PEG) and the positive and negative controls at the predetermined time intervals.

2.4. Polymerase chain reaction with reverse transcriptase (RT-PCR)

Total RNA was extracted from 100 mg of brain tissue with TRIzol (Invitrogen™). The extracted RNA was eluted in 50 µL of RNase-free water and stored at -80 °C. Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and random hexamers were used in 20 µL reactions to generate cDNAs from 10 µL of the extracted RNA suspension, according to the manufacturer's instructions. The cDNAs so obtained were screened for the presence of CoV RNA as follows: 200 ng of cDNA was submitted to amplification in a 25 µL reaction containing 1 mM of MgCl₂ (Invitrogen), 0.2 µM of each primer (IDT), 1.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen), 10% PCR buffer (Invitrogen) and 0.6 mM dNTPs (ABgene). The cycling conditions were: 5 min at 94 °C followed by 40 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 47 °C and 1 min at 72 °C, followed by a final extension time of 7 min at 72 °C. The PCR was carried out with primers targeting the N gene for comparative analyses, corresponding to positions 66-82 (sense primer: 5' CTACAATGGATGCCGAC-3') and 385-365 (anti-sense primer 5'- TGGGGTGATCTTRTCTCCTTT-3') (Tordo, 1986). Standard precautions were taken to avoid PCR contamination; blank controls without template were included in every set of five RT-PCR assays. Five µL of each PCR product was electrophoresed in 1.5% agarose gel and the products were visualized under UV light after staining with ethidium bromide.

2.5. Ethics

This research project was approved by the Committee on Ethical Use of Animals of Ceará State University (CEUA/UECE), under number 08185881-7.

3. Results

The results of the viability tests (intracerebral inoculation in mice and direct immunofluorescence) of the rabies virus samples, as well as of the RT-PCR test, after cryopreservation for one or two years (T_{360} and T_{720}) with the various cryoprotective agents are shown in **Table 1**. The results of the viability tests agree fully, but the results of the RT-PCR test for the most part disagree with the outcomes of those two tests, mainly in the samples preserved for two years, with greater positivity among the samples.

Regarding the viability tests, after one year of cryopreservation (T_{360}) there were discrepancies in the fluorescence intensity of the intracellular corpuscles of the rabies virus among the pure positive control samples (PC-CVS), the positive control exposed to PBS pH 7.2 (PC-PBS) and the other treatments with cryoprotectants. The sample exposed to 68% sucrose (SUC 68%) presented the strongest viral particle fluorescence (++++), followed by PC-CVS, 10% glycerol (GLY 10%) and 55% glycerol 55% (GLY 55%), with intensity of (+++), and the sample exposed to 10% sucrose (SUC 10%), with intensity of (++). The samples exposed to dimethyl sulfide (DMSO 10% and DMSO 32%) presented the lowest intensity (+). On the other hand, the samples exposed to polyethylene glycol at both concentrations (PEG 10% and PEG 45%) did not present fluorescent antigens, so they were negative.

After two years (T_{720}) of cryopreservation, the intracerebral inoculation and direct immunofluorescence tests revealed a substantial deterioration in viability.

There was a steep decline in fluorescence in all the cryopreservation protocols investigated, with the majority of samples being negative, even the positive control samples. However, the sample exposed to 68% sucrose continued to show fluorescent intracellular corpuscles, with intensity of (++).

With respect to the RT-PCR test, RNA from the rabies virus was detected in all the samples after one year (T_{360}) of cryopreservation (PEG 10 and 45%, DMSO 10 and 32%, GLY 10 and 55%, SUC 10 and 68%, PC-CVS and PC-PBS) (**Figure 1**). However, after two years (T_{720}), RNA was not detected in the samples preserved in polyethylene glycol (PEG 10 and 45%), the same as found in the negative control, while RNA was detected in all the other samples (DMSO 10 and 32%, GLY 10 and 55%, SUC 10 and 68%, PC-CVS and PC-PBS).

During the entire experiment, the tests with normal mouse brain samples (negative controls) presented negative results, as expected.

4. Discussion

The viability tests (intracerebral inoculation in mice and direct immunofluorescence) applied in samples of the rabies virus cryopreserved at -20 °C for up to two years showed significantly impaired positivity (80% – T_{360} and 10% – T_{720} for both tests). Additionally, the use of the cryoprotective agents enhanced the viral viability, with the best agent being sucrose at the concentration of 68%. This was the only protocol in which we observed the presence of fluorescent intracellular corpuscles in the viral samples after two years of preservation at -20 °C. These findings corroborate those of Costa et al. (2011), who observed the efficacy of sucrose for cryopreservation of rabies virus samples in the short term. According to Crowe et al. (1987) and Woelders et al. (1997), some sugars, such as sucrose, are able to prevent damage caused by cell dehydration in the freezing process, by stabilizing the

lipid bilayer and promoting changes in the plasma membrane permeability and lateral separation of its components.

In intracerebral inoculation test showed that after cryopreservation at -20 °C, both in the presence and absence of a cryoprotective agent, the mean survival time of the inoculated mice increased significantly (14.3-21.0 days). According to Lopes et al. (2010) and Costa et al. (2011), the increase in the average animal survival time is due to weaker virulence of the viral sample caused by the storage period and/or preservation conditions, since the mean survival time of mice inoculated with rabies virus samples after adequate conservation varies from 7 to 10 days, versus 5 to 7 days for those inoculated with the positive control (CVS strain).

The RT-PCR test produced better results than the other two assays, because it was able to detect viral RNA in 100% of the rabies virus samples cryopreserved for one year (T_{360}) and in 80% of those preserved for two years (T_{720}). These results corroborate those of Biswal et al. (2007), who investigated the rabies virus genome in six human brain samples that had been conserved in glycerol for five to six years, with inconclusive diagnosis from the viability tests but 100% positivity by the RT-PCR technique. Furthermore, Lopes et al. (2010) observed a higher positive percentage by the RT-PCR (65.3%) technique compared to intracerebral inoculation in mice (33.6%) in rabies virus samples maintained for long periods, without cryoprotective agents and under different preservation conditions.

The only rabies virus samples that showed negative for RT-PCR were exposed to cryoprotectant polyethyleneglycol (PEG) at the concentrations used (10 and 32%). According to Nash (1966) and Hubalek (2003), a general problem of diols, such as PEG, is the fact that they act as solvents for some microbial polysaccharides and thus can be toxic to certain microorganisms preservation process.

Various studies have demonstrated the advantage of using molecular techniques to detect the rabies virus genome, including in decomposing cerebral tissue, such as nested RT-PCR in dogs and humans (Kamolvarin et al., 1993) and wolves (Whitby et al., 1997); heminested RT-PCR in mice (Heaton et al., 1997), and from regular RT-PCR tests of samples from bats and various herbivores (Dantas et al., 2004) and from humans exhumed 8 to 30 days after burial (Favoretto et al., 2005; Oliveira et al., 2006).

Although the viability of the rabies virus was impaired after medium-term cryopreservation (two years) at -20 °C, it was possible to detect the presence of RNA by RT-PCR in nearly all the samples analyzed in this study, indicating the importance of this technique for use in retrospective rabies studies. According to Albas et al. (1999) and Lopes et al. (2010), the RT-PCR technique has a huge advantage compared to intracerebral inoculation in mice when testing rabies virus samples kept for long periods under different preservation conditions, even in brain tissue samples in advanced decomposition. Hence, this technique can make a substantial contribution to retrospective epidemiological studies of rabies.

5. Conclusion

The RT-PCR technique is able to detect rabies viral RNA in samples cryopreserved for up to two years at -20 °C with impaired viral viability, so it can be an important tool in retrospective epidemiological studies of rabies.

Acknowledgments

We thank the Virology Laboratory of Rio Grande do Sul Federal University (UFRGS), the Applied Molecular Biology and Serology Laboratory (LABMAS) of the University of São Paulo (USP) and the Laboratory for Manipulation of Preantral

Follicles (LAMOFOPA) of Ceará State University (UECE), in particular professors Paulo Michel Roehe, Paulo Eduardo Brandão and José Ricardo de Figueiredo, for the important contribution to this study. Funding was provided by the Ceará Development Foundation (FUNCAP) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

References

Acha, P.N., Szyfres, B., 2003. Rabia. In: Acha, P.N., Szyfres, B. (Eds.), *Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales*, 3rd ed. Organización Panamericana de la Salud. Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud, Washington, pp. 351–383.

Albas, A., Ferrari, C., Queiroz da Silva, L., Bernardi, F., Ito, F., 1999. Influence of canine brain decomposition on laboratory diagnosis of rabies. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 32, 19–22.

Araújo, D., Langoni, H., Almeida, M., Megid, J., 2008. Heminested reverse-transcriptase polymerase chain reaction (hnRT-PCR) as a tool for rabies virus detection in stored and decomposed samples. *BMC Reas. Notes.* pp. 1-6.

Biswal, M., Ratho, R., Mishra, B., 2007. Usefulness of reverse transcriptase polymerase chain reaction for detection of rabies RNA in archival samples. *J. Infect. Dis.* 60, 298–299.

Centers for Disease Control and Prevention, 2006. Protocol for Postmortem Diagnosis of Rabies in Animals by Direct Fluorescent Antibody Testing. A Minimum Standard for Rabies Diagnosis in the United States [updated 2006 April 16; cited 2008 September 17]. Available from: http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/rabies/Professional/publications/DFA_diagnosis/DFA_protocolb.htm.

- Costa, E.C., Teixeira, M.F.S., Aguiar, T.D.F., Rolim, B.N., Romijn, P.C., Rocha, M.F.G., 2011. Rabies virus viability after short-term cryopreservation using cryoprotectant agents. *Rev. Inst. Adolfo. Lutz.* 70(2), 106-112.
- Crowe, J.H., Crowe, L.M., Carpenter, J.F., 1987. Stabilization using dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem. J.* 242, 1-10.
- Dantas, J., Kimura, L., Ferreira, M., Fialho, A., Almeida, M., Grégio, C., Romijn, P., Leite, J., 2004. Reverse transcription-polymerase chain reaction assay for rabies vírus detection. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 56, 398–400.
- David, D., Yakobson, B., Rotenberg, D., Dveres, N., Davidson, I., Stram, Y., 2002. Rabies virus detection by RT-PCR in decomposed naturally infected brains. *Vet. Microbiol.* 87, 111–118.
- Dean, D.J., Abelseth, M.K., Atanasiu, P., 1996. The fluorescent antibody test. In: Meslin, F.X., Kaplan, M.M., Koprowski, H. (Eds). *Laboratory Techniques in Rabies.* 4ed. Geneva: World Health Organization, pp. 88-95.
- Favoretto, S.R., Martorelli, L., Elkhoury, M., Zargo, A., Durigon, E., 2005. Rabies vírus detection and phylogenetic studies in samples from an exhumed human. *Clin. Infect. Dis.* 41, 413–414.
- FENNER, F., 1993. *Veterinary Virology.* 2 ed. San Diego: Ac Press, pp. 531-548.
- Greene, C., Rupprecht, C., 2006. Rabies and other Lyssavirus infections. In: Greene, C. (Ed.), *Infectious Diseases of the Dog and Cat.* St Louis, pp. 167–183.
- Heaton, P., Johnstone, P., McElhinney, L., Cowley, R., O’Sullivan, E., Whitby, J., 1997. Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies related viruses. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2762–2766.
- Hubálek, Z. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology.* 46, 205-229.

- Ito, M., Itou, T., Sakai, T., Santos, M., Arai, Y., Takasaki, T., Kurane, I., Ito, F., 2001. Detection of rabies virus RNA isolated from several species of animals in Brazil by RT-PCR. *J. Vet. Med. Sci.* 63, 1309–1313.
- Kamolvarin, N., Tirawatnpong, T., Rattanasiwamoke, R., Tirawatnpong, G., Panpanich, T., Hemachudiha, T., 1993. Diagnosis of rabies by polymerase chain reaction with nested primers. *J. Infect. Dis.* 167, 207–210.
- Koprowski, H., 1996. The mouse inoculation test. In: Meslin, F. X.; Kaplan, M. M.; Koprowski, H. (Eds). *Laboratory Techniques in Rabies*, 4ed. Geneva: World Health Organization, pp. 80-86.
- Lopes, M.C., Venditti, L.L.R., Queiroz, L.H., 2010. Comparison between RT-PCR and the mouse inoculation test for detection of rabies virus in samples kept for long periods under different conditions. *J. Virol. Methods.* 164, 19-23.
- Martorelli, L., 2004. Diagnóstico laboratorial e diversidade genética do vírus rábico, isolado no Estado de São Paulo, de 1989 a 2000 [Laboratory diagnosis and genetic diversity of rabies virus isolated in São Paulo, 1989-2000]. Doctorate thesis (Doctor in Microbiology) – Biomedical Science Institute, Sao Paulo University, São Paulo, 104 pp.
- Nash, T., 1966. Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells agein damage due to freezing and thawing. In: Meryman, H. T. *Cryobiology*. London- New York: Academic Press.
- Oliveira, R., Takaoka, N., Brandão, P., Carnieli, P., Macedo, C., Castilho, J., Carrieri, M., Kotait, I., 2006. Postmortem confirmation of human rabies source. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 867–869.
- Organización Panamericana De La Salud (OPAS), 2005. Eliminación de la rabia humana transmitida por perros en América Latina: Análisis de la situación, ano 2004.

Washington, D.C: OPS.

Paez, A., Garcia, C., Boshell, J., 2002. Standardization of rabies virus genome amplification for molecular epidemiology studies. *Biomédica*. 22, 71–75.

Roehe, P.M., Schaefer, R., Pereira, A.S., 2002. Otimização da imunofluorescência direta para diagnóstico de Raiva [Optimization of the direct fluorescent antibody test for rabies diagnosis]. *Acta. Sci. Vet.* 30(1), 53-57.

Soares, R., Bernardi, F., Sakamoto, S., Heinemann, M., Cortes, A., Alves, L., Meyer, A., Lichtzenhain, L., 2002. A heminested chain reaction for the detection of Brazilian rabies isolates from vampires bats and herbivorous. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 97, 109–111.

Tordo, N.; Charlton, K.; Wandeler, A. I., 1998. Rhabdoviruses: Rabies. *Microbiology and microbial infections*, 1, 665 - 692.

Tordo N., Poch O., Ermine A.; Keith G. 1986. Primary structure of leader RNA and nucleoprotein genes of the rabies genome: segmented homology with VSV. *Nucleic Acids Research*. 14, 2671–2683.

Whitby, J., Johnstone, P., Sillero-Zubiri, C., 1997. Rabies virus in the decomposed brain of an Ethiopian wolf detected by nested reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Wildlife Dis.* 33, 912–915.

WHO - World Health Organization. 2004. Expert Consultation on Rabies. 1° Report. (Technical Report Series, 931). World Health Organization, Geneva.

Woelders H, Mathijis A, Engel B. 1997. Effects of trealose, and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intractness of sperm after freezing and thawing. *Cryobiol.* 35, 93-195.

Table 1. Results of the viral viability, intracerebral inoculation and direct immunofluorescence tests, as well as the RT-PCR molecular test, in rabies virus samples cryopreserved at -20 °C for one (T₃₆₀) and two years (T₇₂₀).

Samples	Intracerebral inoculation test in mice						DIF Assay		RT-PCR		
	MST ¹ (days)		Mortality				Results (degree of fluorescence intensity ⁴)		Results (detection of rabies viral RNA ⁵)		
			NMA ² / NMT ³	%	NMA ² /N						
					MT ³	%					
	T ₃₆₀	T ₇₂₀	T ₃₆₀		T ₇₂₀		T ₃₆₀	T ₇₂₀	T ₃₆₀	T ₇₂₀	
NC	21	21	0/6	0	0/6	0	-	-	neg	neg	
PC-CVS	8.2	21	6/6	100	0/6	0	+++	-	pos	pos	
PC-PBS	8.7	21	6/6	100	0/6	0	+	-	pos	pos	
DMSO 10%	9.8	21	6/6	100	0/6	0	+	-	pos	pos	
DMSO 32%	7.3	21	6/6	100	0/6	0	+	-	pos	pos	
GLY 10%	7.4	21	6/6	100	0/6	0	+++	-	pos	pos	
GLY 55%	6.0	21	6/6	100	0/6	0	+++	-	pos	pos	
PEG 10%	21	21	0/6	0	0/6	0	-	-	pos	neg	
PEG 45%	21	21	0/6	0	0/6	0	-	-	pos	neg	
SUC 10%	6.8	21	6/6	100	0/6	0	++	-	pos	pos	
SUC 68%	6.7	14.3	6/6	100	6/6	100	++++	++	pos	pos	
Positivity (%)	80	10						80	10	100	80

¹MST: Mean survival time; ²NMA: Number of mice affected; ³NMT: Number of mice tested; ⁴Degree of fluorescence intensity: -, +, ++, +++ and +++++; ⁵Presence (pos) or absence (neg) of rabies viral RNA.

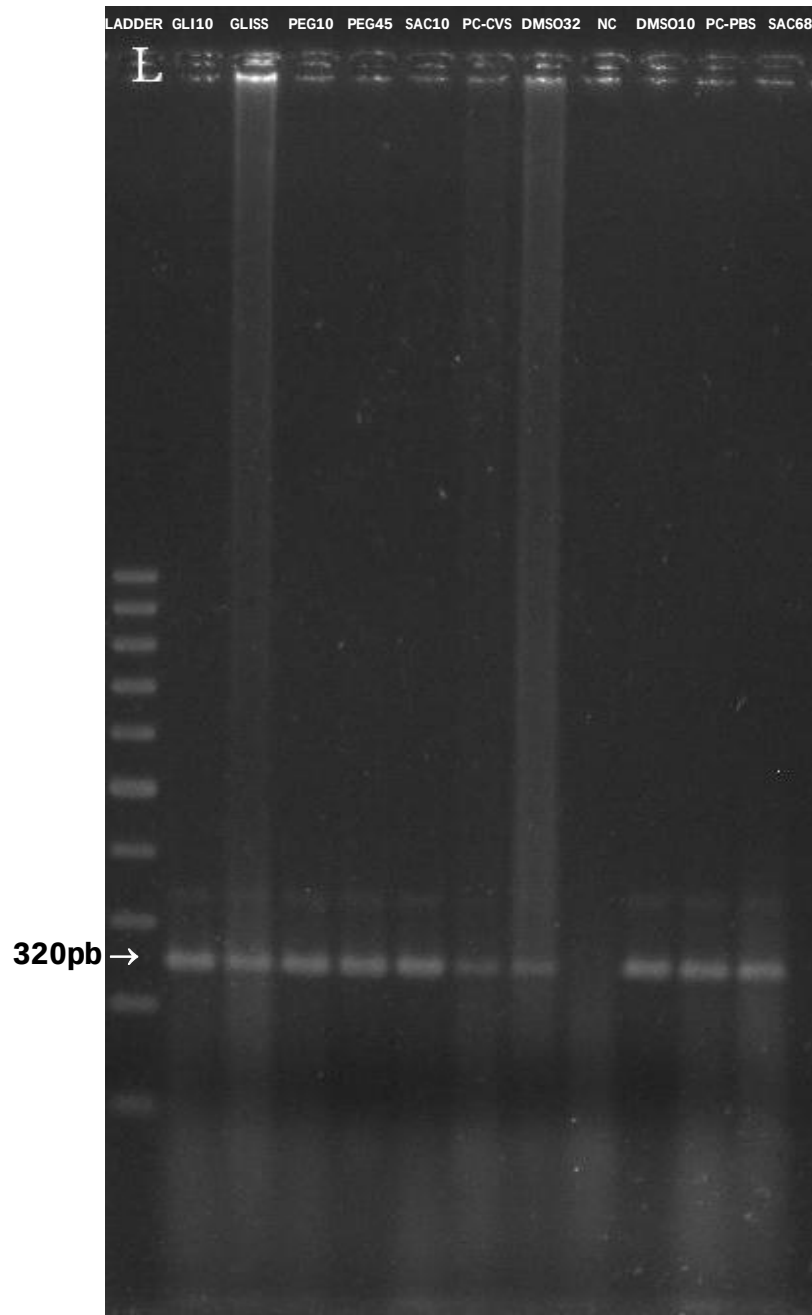


Figure 1. Amplification products obtained by PCR from cDNA of the rabies virus genome in samples cryopreserved at -20 °C for one year. Positive samples: 10% glycerol (GLY10), 55% glycerol (GLY55), 10% polyethylene glycol (PEG10), 45% polyethylene glycol (PEG45), 10% sucrose (SUC10), pure positive control (PC-CVS), 32% dimethyl sulfoxide (DMSO32), 10% dimethyl sulfoxide (DMSO10), PBS positive control (PC-PBS), 68% sucrose (SUC68). Negative sample: negative control (NC).

9 CAPÍTULO 4

Uso da sacarose na criopreservação de amostras de vírus da Raiva

Tereza D'ávila F. Aguiar, Maria Fátima S. Teixeira, Allan V. Bezerra, Edmara C. Costa, Gabrielle R. Martins, Ronaldo P. Dias

Periódico: Pesquisa Veterinária Brasileira (Submetido em maio de 2014)

Uso da sacarose na criopreservação de amostras do vírus da Raiva

ABSTRACT.- Aguiar T. D. F., Teixeira M. F. S., Bezerra A. V., Costa E. C., Martins, G. R. & Dias, R.P. 2014 **[Use of sucrose in cryopreservation of rabies virus samples.]** Uso da sacarose na criopreservação de amostras do vírus da Raiva. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Av. Dr. Silas Munguba, 1700, Campus do Itaperi, Fortaleza-CE CEP: 60.714.903, Brasil. E-mail: labovirfavetuece@yahoo.com.br.

Sucrose has often been used for cryopreservation of microorganisms. It has been shown that sucrose produces a preservative effect in samples of rabies virus for a short period. Thus, the aim of this study was to evaluate the power of sucrose cryoprotectant in conservation at -20 °C of samples of rabies virus for a period of three years. The cryopreservation protocols of rabies virus at -20 °C divided into variable time function and applying the sucrose cryoprotectant agent in two different concentrations (10 and 68%). Were established regular time intervals (360, 720 and 1080 days) for the execution of laboratory tests (intracerebral inoculation of mice and direct immunofluorescence), to assess the feasibility of viral samples by the use of sucrose as a cryoprotectant. After a year of cryopreservation the sample exposed to sucrose in its highest concentration, 68%, showed the highest degree (++++) fluorescence intensity, whereas the sample exposed to 10% sucrose with an intermediate degree (++) intensity fluorescence of viral particles. After two years of cryopreservation, only the sample exposed to 68% sucrose cryoprotectant continued presenting intracellular fluorescent in corpuscles rabies virus. Therefore, after three years of cryopreservation all rabies virus samples stored at -20 °C was negative, including sample exposed to sucrose cryoprotectant 68%. The sucrose disaccharide is effective in the conservation of viral viability in samples of rabies virus cryopreserved at -20 °C for up to two years, but was ineffective after cryopreservation for a period of three years.

INDEX TERMS: Rabies virus, cryopreservation, sucrose.

RESUMO.- A sacarose tem sido frequentemente utilizada para a criopreservação de microorganismos. Já foi demonstrado que em amostras de vírus da Raiva esse agente crioprotetor produz efeito conservante nas amostras por um curto período. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar o poder crioprotetor da sacarose na conservação a -20 °C de amostras do vírus da Raiva por um período de três anos. Os protocolos de criopreservação de vírus da Raiva à temperatura de -20 °C dividiram-se em função das variáveis tempo e aplicação do agente crioprotetor sacarose em duas concentrações distintas (10 e 68%). Foram estabelecidos intervalos temporais regulares (360, 720 e 1080 dias) para a execução dos testes laboratoriais (inoculação intracerebral de camundongos e imunofluorescência direta), no sentido de avaliar a viabilidade das amostras virais mediante o uso da sacarose como crioprotetor. Após um ano de criopreservação, a amostra exposta à sacarose na sua maior concentração, 68%, apresentou grau máximo (++++) de intensidade de fluorescência, já a amostra exposta à sacarose 10% com grau intermediário (++) de intensidade de fluorescência das partículas virais. Após dois anos de criopreservação, apenas as amostras expostas ao crioprotetor sacarose 68% continuou apresentando corpúsculos intracelulares fluorescentes de vírus da Raiva. Por conseguinte, após três anos de criopreservação todas as amostras de vírus da Raiva conservadas a -20 °C se apresentaram negativas, inclusive a amostra exposta ao crioprotetor sacarose 68%. O dissacarídeo sacarose se mostrou eficaz na conservação da viabilidade viral em amostras de vírus da Raiva criopreservadas a -20 °C por até dois anos, no entanto foi ineficaz após a criopreservação por um período de três anos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Vírus da Raiva, criopreservação, sacarose.

INTRODUÇÃO

A efetivação de trabalhos no campo das ciências biológicas, agrárias, biomédicas e indústria farmacêutica voltados à pesquisa com o vírus da Raiva baseia-se, primariamente, na aquisição e manutenção de amostras biológicas. De uma forma geral, na atualidade, o reconhecimento da grande relevância dos microrganismos para o desenvolvimento humano tem conduzido ao aprimoramento de técnicas destinadas à conservação dos mais diversos espécimes microbiológicos (Holland et al. 2003, Paoli 2005).

Considerando que a tecnologia de refrigeração promove um significativo retardo nas taxas de deterioração de bens perecíveis, o uso de baixas temperaturas tem favorecido a estocagem de organismos vivos em estado de animação suspensa por extensos períodos de tempo. Dessa forma, a criopreservação é uma das técnicas mais largamente empregadas na conservação da biodiversidade microbiana (Paoli 2005, Day & McLellan 1995).

No entanto, deve-se salientar que o processo de criopreservação também pode exercer efeitos deletérios à maioria dos materiais biológicos, com ênfase à membrana celular, fenômeno esse chamado de crioinjúria (Hubálek 2003; Costa 2010). A crioinjúria é um evento letal atrelado à formação de gelo intracelular, ao fluxo de água para fora da célula (desidratação) e ao incremento da concentração intracelular de solutos (Hubálek 2003).

Na tentativa de reduzir ou até eliminar esses danos decorrentes da congelação aos materiais biológicos, tem sido freqüente a inclusão de substâncias protetoras aos sistemas de criopreservação, conhecidas como agentes crioprotetores, que apresentam como objetivo principal prevenir a cristalização via depressão da atividade da água (Costa 2010).

Alguns açúcares mostraram ser capazes de evitar os danos causados pela desidratação celular, devido ao processo de congelação, através da estabilização da bicamada lipídica, promovendo alterações na permeabilidade e na separação lateral dos componentes da membrana plasmática (Crowe et al. 1987, Woelders et al. 1997). Esses agentes, como exemplo a sacarose, agem externamente à célula exercendo efeitos benéficos durante o processo de congelação, promovendo a desidratação celular através de mudanças na pressão osmótica, evitando assim a formação de cristais de gelo (Fabbri et al. 2001).

A sacarose (C₁₂H₂₂O₁₁) tem sido frequentemente utilizada para a criopreservação de micro-organismos em concentrações de 1-68% (média 10%). O efeito crioprotetor desse dissacarídeo foi descrito pela primeira vez por Keith (1973), quando utilizou uma solução de cana de açúcar para a preservação de bactérias a -10 °C e as manteve por oito meses. A partir de então, a sacarose foi utilizada na preservação de muitos micro-organismos, exercendo ação crioprotetora em várias concentrações para alguns vírus, bactérias, fungos e protozoários, dentre outros (Steele 1976, Sola et al. 2012, Chavarri et al. 1988, Hubálek 2003, Jurmanová & Machatková 1974).

Em virologia, existem inúmeros procedimentos para manutenção de estoques virais e estes dependem em grande parte de propriedades peculiares do vírus em particular. Em um estudo, realizado por Costa et al. 2011, foram testados diferentes protocolos de criopreservação a -20 °C em amostras de vírus da Raiva por um curto período de tempo. Os autores observaram que após 30 dias de congelação, a intensidade da fluorescência das partículas de vírus da Raiva nas amostras criopreservadas foi menor do que a observada em amostras frescas. Contudo, o uso da sacarose como crioprotetor produziu efeito conservante nas amostras em curto prazo.

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o poder crioprotetor da sacarose na conservação a -20 °C de amostras de vírus da Raiva por um período de três anos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais Experimentais

Os animais de escolha para a execução dos experimentos foram camundongos albinos suíços (*Mus musculus*) desmamados, de três a quatro semanas de idade, procedentes de uma colônia convencional mantida pelo Biotério Central (BIOCEN) da Universidade Federal do Ceará – UFC. Todo o experimento foi realizado de acordo com a Comissão de Ética para Uso de Animais em Pesquisa da UECE (Nº de protocolo: 08185881-7).

Amostra viral

A amostra viral utilizada no desenvolvimento do estudo consistiu no vírus fixo Challenge Standard Virus (CVS 31.2) mantida por passagens em cérebros de camundongos e armazenada em estado liofilizado.

Procedimento de criopreservação

Foi selecionado um dos agentes crioprotetores externos mais utilizados em protocolos de congelamento de microrganismos. Na literatura, as concentrações da sacarose (SAC) utilizadas variam de 1-68%, elegeram-se a concentração mediana e máxima desse agente (10% e 68%) (Hubálek 2003).

O crioprotetor foi diluído em tampão salina-fosfato (PBS pH 7,2 –Laborclin®) e foi esterilizado por filtração (filtro para seringa de membrana polietersulfônica com tamanho de poro de 0,22 µm de diâmetro – Millipore®).

Foi realizada, inicialmente, a inoculação de camundongos albinos suíços de duas a três semanas de idade com 0,03mL da cepa viral CVS 31.2 em suspensão a 10% pela via intracerebral (IC). Todos os animais que manifestaram sinais característicos da Raiva foram sacrificados, em estado agônico, a partir do 5º dia pós-inoculação. Logo após a eutanásia, foi realizada a coleta do Sistema Nervoso Central (SNC) sendo os tecidos cerebrais e a suspensões a 10% de tecido cerebral (Koprowski, 1996) destinados à execução dos protocolos experimentais (duas concentrações de sacarose 10% e 68% - SAC 10 e SAC 68).

Foram constituídos dois grupos controle positivo, um não exposto a crioprotetor, controle positivo puro (CP - CVS), e outro submetido à congelamento com PBS pH 7,2, controle positivo “PBS” (CP – PBS). O controle negativo (CN) foi formado pelo “pool” de amostras de tecido cerebral provenientes de camundongos inoculados com 0,03mL de solução salina tamponada (PBS) pH 7,2 pela via intracerebral.

Os protocolos de criopreservação de vírus da Raiva à temperatura de -20 °C se dividiram em função da variável tempo (até três anos de conservação). Foram estabelecidos intervalos temporais regulares (360, 720 e 1080 dias) para a execução dos testes laboratoriais (imunofluorescência direta e inoculação intracerebral em camundongos), no sentido de avaliar o poder crioprotetor da sacarose.

Teste de Imunofluorescência Direta

Os procedimentos que foram empregados no preparo e leitura das lâminas submetidas ao teste de Imunofluorescência Direta (IFD) seguiram, basicamente, as diretrizes preconizadas por Dean et al. 1996, com alterações no período de incubação do conjugado propostas por Roehe et al. 2002, visando obter uma melhor fluorescência.

Foram realizadas impressões de cortes transversais dos encéfalos de camundongos infectados as quais foram dispostas por pressão paralelamente em lâminas apropriadas para imunofluorescência e, subsequentemente, fixadas em acetona por 30 minutos em freezer a -20°C, para a obtenção da impressão do antígeno. A secagem se deu à temperatura ambiente, procedendo-se a estocagem a -20 °C, com vistas à posterior efetivação do processamento.

Para a execução da técnica de imunofluorescência direta, as lâminas foram colocadas à temperatura ambiente por 5 minutos, sendo cobertas com 30µL de anticorpo anti-rábico marcado com isotiocianato de fluoresceína (conjugado) e submetidas a um período de incubação de 2 horas, a 37 °C em câmara úmida, na ausência de luz. Em seguida, as mesmas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 8,5), procedendo-se um enxágue final com água destilada. As lâminas foram, por conseguinte, montadas com glicerol a 90% em PBS (pH 8,5), cobertas com lamínula e destinadas à leitura.

A leitura da reação foi executada em microscópio binocular de imunofluorescência da marca Zeiss, equipado com uma lâmpada de vapor de mercúrio HBO 50, filtro excitador VGI e filtro barreira Zeiss 43, no aumento de 400X em campo escuro. A intensidade de fluorescência observada na impressão foi submetida à avaliação, tomando-se por base uma escala subjetiva de intensidade, variando de zero a quatro, como descrito por Bingham & Merwe 2007, e adaptado aos seguintes componentes simbólicos: (-), ausência de antígenos em toda a impressão; (+), antígenos muito escassos, uma ou mais partículas em menos de 50% dos campos microscópicos;

(++), antígenos escassos, uma ou mais partículas em menos de 100% dos campos, porém em mais de 50% dos campos microscópicos; (+++), antígenos abundantes, uma ou mais partículas em cada campo, mas a quantidade por campo microscópico é “possível de ser contada”; (++++), antígenos muito abundantes em todos os campos e a quantidade por campo “impossível de ser contada”.

Teste de Inoculação Intracerebral em Camundongos

A suspensão teste foi inoculada por via intracerebral num volume de 0,03mL (30µl), utilizando-se seringas de insulina BD Ultra-fine IITM, agulha curta, calibre 31, 8mm (5/16”) para 30 unidades ou menos. Foram destinados ao teste de inoculação intracerebral em camundongos, prova biológica, grupos de seis camundongos albinos suíços desmamados (entre três e quatro semanas) por amostra a ser testada.

Executados os procedimentos de inoculação, procedeu-se o acompanhamento diário dos animais por um período de até 21 dias. Os controles negativos foram inoculados com PBS pH 7,2. Os camundongos inoculados foram mantidos em caixas apropriadas, no infectório do Laboratório de Virologia da Universidade Estadual do Ceará durante todo o período de observação, a uma temperatura média de 20 °C, com ciclo de 12 horas de claro e escuro, sendo oferecido água e ração em sistema *ad libitum*.

Ademais, os sinais clínicos foram identificados e relatados em fichas de acompanhamento utilizando um sistema de códigos numéricos: 1 – redução do consumo de água e ração; 2 – apatia e pelos arrepiados; 3 – descoordenação; 4 – tremores e/ou episódios de tetania; 5 – paralisia e 6 – prostração (estado agônico que precede a morte dos animais) (adaptado de Koprowski 1996).

O procedimento de prova biológica em camundongos foi efetuado nas amostras de tecido cerebral submetidas aos protocolos de criopreservação com a sacarose em duas concentrações distintas (10% e 68%) fazendo-se uso dos controles positivo e negativo e levando-se em conta os intervalos cronológicos pré-determinados.

RESULTADOS

Os resultados dos testes de viabilidade (inoculação intracerebral em camundongos e imunofluorescência direta) em amostras de vírus da Raiva, após a criopreservação a -20 °C por até três anos (T_{360} , T_{720} e T_{1080}), a partir do uso do agente crioprotetor sacarose, estão expostos nos **Quadros 1 e 2**. Após um ano de criopreservação (T_{360}), foram observadas grandes divergências quanto à intensidade da fluorescência dos corpúsculos intracelulares de vírus da Raiva entre as amostras do controle positivo puro (CP-CVS), controle positivo exposto ao PBS pH 7.2 (CP-PBS) e os tratamentos com o crioprotetor sacarose. A amostra exposta à sacarose na sua maior concentração, 68%, (SAC 68) apresentou grau máximo de intensidade de fluorescência (++++), seguida da amostra CP-CVS, com grau (+++) de intensidade de marcação, e da amostra exposta à sacarose 10% (SAC 10), com grau (++) de intensidade de fluorescência das partículas virais.

Após dois anos de criopreservação (T_{720}), foi observado um grande declínio na fluorescência em todos os protocolos de criopreservação instituídos, em que a maioria das amostras se apresentou negativa, até mesmo as amostras designadas como controle positivo. No entanto, a amostra exposta ao crioprotetor SAC 68 continuou apresentando corpúsculos intracelulares fluorescentes de vírus da Raiva, com grau (++) de intensidade.

Por conseguinte, após três anos de criopreservação todas as amostras de vírus da Raiva conservadas a -20 °C se apresentaram negativa, inclusive a amostra exposta ao crioprotetor sacarose 68%.

Os resultados dos dois testes de viabilidade viral aplicados mostraram plena concordância. De acordo com o **Quadro 1**, é possível observar que quanto maior o tempo de criopreservação das amostras de vírus da Raiva maior a média do tempo de sobrevivência dos camundongos inoculados. Merece destaque a amostra de vírus da Raiva exposta ao crioprotetor sacarose 68%, que foi a amostra que apresentou a menor média do tempo de sobrevivência dos animais após o primeiro ano (**Figura 1**) e segundo ano de criopreservação, no entanto se apresentou negativa após três anos de conservação.

DISCUSSÃO

De acordo com os dados do presente estudo, a criopreservação a -20°C por até três anos demonstrou ser uma técnica limitada no que diz respeito à conservação de amostras de vírus da Raiva em tecido nervoso, em função do comprometimento da viabilidade viral das amostras.

Segundo Farrant & Morris 1973 e Howell & Miller, 1983, muitos fatores podem afetar a manutenção da viabilidade dos vírus durante o processo de criopreservação, dentre eles: o tipo de vírus e a concentração; uso de crioprotetores; taxas de congelação e descongelação; temperatura de armazenamento; tempo de armazenamento; pH e osmolaridade. Esses fatores interagem de forma interdependente influenciando na infectividade viral, que é melhor preservada quando o ambiente em que os vírus são armazenados é cuidadosamente controlado.

Quando o vírus da Raiva atinge a célula nervosa (célula hospedeira) seu capsídeo fica envolto pela membrana da célula (Schnell et al. 2010), o que pode ser interpretado como um fator de susceptibilidade das partículas virais a danos mecânicos provocados pela formação de cristais de gelo, durante o processo de criopreservação, semelhantes aos danos causados nas células hospedeiras (Costa 2010). De acordo com Howell & Miller 1983, vírus envelopados apresentam uma maior labilidade durante o armazenamento do que vírus não envelopados. Como os vírus adquirem seus envelopes por brotamento através das membranas celulares, a dinâmica associada a alterações deletérias que ocorrem durante o congelamento e descongelamento pode afetar tanto o vírus como as células de uma forma semelhante. Os mecanismos dos danos da membrana e do envelope viral são causados aparentemente pela formação de gelo intra e extracelular, mudanças excessivas de pH e concentração de soluto, e recristalização de gelo, durante o processo de congelação e descongelação. De fato, o decréscimo do título viral está correlacionado com as mudanças demonstradas em áreas do envelope viral presumindo está associado com a infectividade viral (Smith 1964, Aguiar et al, 2013).

O uso de crioprotetores favorece a modificação das características físicas e químicas do ambiente externo e interno dos vírus de modo a favorecer sua sobrevivência (Howell & Miller 1983). No presente estudo, o agente crioprotetor sacarose, principalmente em sua concentração máxima, 68%, demonstrou ser um excelente conservante da viabilidade viral em amostras de vírus da Raiva armazenadas a -20°C por até dois anos. Segundo Crowe et al. 1987 e Woelders et al. 1997, acredita-se que alguns açúcares como a sacarose estabilizem a bicamada de fosfolípidios, mantendo sua capacidade de transporte de cálcio, inibição da fusão de membranas e a manutenção dos lípidios numa fase fluida na ausência de água.

Adicionalmente, segundo Chen et al. 2004, foi sugerido que o aumento na concentração de sacarose gera um gradiente osmótico através da membrana celular, o que atrai a água para fora da célula, fazendo com que a célula se desidrate suficientemente antes e durante o processo de congelação, exercendo também um efeito protetor para as partículas virais.

Por outro lado, após três anos de criopreservação todas as amostras de vírus da Raiva do presente estudo, mesmo as expostas ao crioprotetor sacarose, se apresentaram negativas, demonstrando que após esse período de criopreservação a -20°C a sacarose não foi capaz de conservar a viabilidade viral das amostras referidas.

CONCLUSÃO

O dissacarídeo sacarose se mostrou eficaz na conservação da viabilidade viral em amostras de vírus da Raiva criopreservadas a -20°C por até dois anos, no entanto foi ineficaz após a criopreservação por um período de três anos.

Agradecimentos.- À pesquisadora Dra. Phyllis Catharina Romijn, por ter cedido a amostra viral utilizada no estudo. Ao apoio financeiro fornecido pelas instituições de fomento FUNCAP e CNPq.

REFERÊNCIAS

- Aguiar T.D.F., Teixeira M.F.S., Costa E.C., Vitaliano A.B., Teles C.H.A., Barroso I.C., Dias R.P., Moraes N.B. 2013. Medium-term cryopreservation of rabies virus samples. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 46(6):678-683.
- Bingham J. & Merwe M. 2002. Distribution of Rabies antigen in infected brain material:

- determining the reliability of different regions of the brain for the Rabies fluorescent antibody test. *J Virol Methods*.101:85-94.
- Chavarri F.J.; Paz, M.; Nueez, M.M. 1988. Cryoprotective agents for frozen concentrated starters from non-bitter *Streptococcus lactis* strains, *Biotechnol. Lett.* 10: 11–16.
- Costa E.C. 2010. Conservação de amostras do vírus da Raiva mediante diferentes protocolos de criopreservação [tese]. [Fortaleza]: Universidade Estadual do Ceará; 115p.
- Costa E.C, Teixeira M.F.S., Aguiar T.D.F., Rolim B.N., Romijn P.C. & Rocha M.F.G. 2011. Rabies virus viability after short-term cryopreservation using cryoprotectant agents. *Rev Inst Adolfo Lutz* 70(2):106-112.
- Crowe J.H., Crowe L.M., Carpenter J.F. 1987. Stabilization using dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem J.* 242:1-10.
- Chen Z.J., Li M., Li Y., Zhao L.X., Tang R., Sheng Y., Gao X., Chang C.H. & Feng H.L.. Effects of sucrose Concentration on the developmental potential of human frozen-thawed oocytes at different stages of maturity. *Hum Reprod*;10:2345-2349.
- Day J.G. & McLellan M.R. 1995. Cryopreservation and freeze-drying protocols. New Jersey: Humana Press.
- Dean D.J., Abelseth M.K., Atanasiu P. 1996. The fluorescent antibody test, p. 88-95. In: Meslin F.X., Kaplan M.M., Koprowski H. (Eds). *Laboratory Techniques in Rabies*. 4ed. Geneva: World Health Organization.
- Fabbri R., Porcu E., Marsella T., Rocchetta G., Venturoli S. & Flamigni C. 2001. Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. *Hum Reprod.* 16: 411–416.
- Farrant, J. & Morris, G. J. 1973. Thermal shock and dilution shock as the causes of freezing injury. *Cryobiol.* 10:134-140.
- Jurmanová, K. & Machatková, M. 1974. Preservation of Mycoplasma strains by freezing in solid carbon dioxide, liquid nitrogen and at -10 °C, *In Vitro v CSSR* 3, 2: 213–216.
- Keith, S.C. 1913. Factors influencing the survival of bacteria at temperatures in the vicinity of the freezing point of water. *Science.* 37:877-879.
- Koprowski H. 1996. The mouse inoculation test, p. 80-86. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H (Eds). *Laboratory Techniques in Rabies*. 4ed. Geneva: World Health Organization.
- Paoli P. 2005. Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research. *FEMS Microbiol Rev.* 29:897-910.
- Holland N.T., Smith M.T., Eskenazi B. & Bastaki M. 2003. Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies. *Mutat Res.* 543:217-234.
- Howell CL & Miller MJ. 1983. Effect of sucrose phosphate and sorbitol on infectivity of enveloped viruses during storage. *J Clin Microbiol.* 3: 658-662.
- Hubálek Z. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiol.* 46:205-229.
- Roehe P.M., Schaefer R. & Pereira A.S. 2002. Otimização da imunofluorescência direta para diagnóstico de Raiva. *Acta Sci Vet.* 30(1):53-57.
- Schnell M.J., McGettigan J.P., Wirblich C. & Papaneri A. 2010. The cell biology of Rabies virus: using stealth to reach the brain. *Nat. Rev. Microbiol.* 8: 51-61.
- Smith, K. O. 1964. Relationship between the envelope and the infectivity of herpes simplex virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 115:814-816.
- Sola, M.C, Oliveira, A.P, Feistel, J.C. & Minafra e Rezende, C.S. 2012. Manutenção de microorganismos: conservação e viabilidade, *Enciclopédia Biosfera.* 8:1398-1418.
- Steele, P.R.M. 1976. Prevention of low temperature denaturation injury in T4Bo phage by low concentrations of traditional cryoprotective additives, *J. Hyg.* 76: 453–458.
- Woelders H., Mathijis A., Engel B. 1997. Effects of trealose, and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intractness of sperm after freezing and thawing. *Cryobiol.* 35:193-195.

Legenda da Figura

Fig. 1. Camundongo com sinais de descoordenação, tetania e paralisia 6 dias após inoculação intracerebral de amostra de vírus da Raiva exposta ao crioprotetor sacarose 68% conservada por 1 ano a -20 °C. (Fonte: LABOVIR, 2011)

Os Quadros

Quadro 1. Efeitos da criopreservação a -20 °C por até três anos em amostras de vírus da Raiva avaliadas pelo teste de inoculação intracerebral de camundongos, após a exposição ao crioprotetor sacarose

Amostra	Teste de Inoculação Intracerebral em Camundongos								
	MTS ^a (dias)			Mortalidade					
				NCA ^b /NCT ^c		NCA ^b /NCT ^c		NCA ^b /NCT ^c	
	T ₃₆₀	T ₇₂₀	T ₁₀₈₀	T ₃₆₀	%	T ₇₂₀	%	T ₁₀₈₀	%
CN	21	21	21	0/6	0	0/6	0	0/6	0
CP-CVS	8.2	21	21	6/6	100	0/6	0	0/6	0
CP-PBS	8.7	21	21	6/6	100	0/6	0	0/6	0
SAC 10	6.8	21	21	6/6	100	0/6	0	0/6	0
SAC 68	6.7	14.3	21	6/6	100	6/6	100	0/6	0

^a MTS: Média do tempo de sobrevivência; ^b NCA: Número de camundongos afetados; ^c NCT: Número de camundongos testados.

Quadro 2. Efeitos da criopreservação a -20 °C a médio prazo em amostras de vírus da Raiva avaliadas pelo teste de Imunofluorescência Direta, após a exposição ao crioprotetor sacarose

Amostra	Teste de Imunofluorescência Direta		
	Resultados (Grau de intensidade de marcação fluorescente ^a)		
	T ₃₆₀	T ₇₂₀	T ₁₀₈₀
CN	-	-	-
CP-CVS	+++	-	-
CP-PBS	+	-	-
SAC 10	++	-	-
SAC 68	++++	++	-

^a Grau de intensidade de marcação fluorescente: -, +, ++, +++, ++++



Figura 1

10 CONCLUSÕES

- O agente crioprotetor polietilenoglicol não foi capaz de manter a viabilidade viral de amostras de vírus da Raiva criopreservadas a -20 °C a médio prazo;
- Os agentes crioprotetores dimetilsulfóxido, glicerol e sacarose (10%) produziram efeito conservante em amostras de vírus da Raiva após a criopreservação a -20 °C por um período máximo de um ano. No entanto, após dois anos de criopreservação a viabilidade viral das amostras foi comprometida;
- A criopreservação a -20 °C demonstrou ser uma técnica limitada no que diz respeito à conservação de amostras de vírus da Raiva em tecido nervoso a médio prazo, em função do grande comprometimento da viabilidade viral das amostras;
- O uso da sacarose na concentração de 68% produziu um efeito conservante nas amostras de vírus da Raiva criopreservadas a -20 °C, possibilitando a presença de corpúsculos intracelulares fluorescentes, após a conservação por um período de dois anos. Contudo, esse dissacarídeo não foi capaz de conservar a viabilidade viral em amostras criopreservadas por três anos;
- Adicionalmente, a técnica molecular RT-PCR detectou o RNA do vírus da Raiva em amostras criopreservadas a -20 °C a médio prazo que apresentaram viabilidade viral comprometida, podendo contribuir como importante ferramenta em estudos epidemiológicos retrospectivos da Raiva.

10 PERSPECTIVAS

- É de grande valia a execução de um maior número de estudos sobre os aspectos básicos da criopreservação de amostras do vírus da Raiva, principalmente no que tange a diversificação de tipos de crioprotetores utilizados e dos tipos de temperatura empregados, dando ênfase às temperaturas ultrabaixas comumente utilizadas em protocolos de criopreservação;
- Estudos mais detalhados sobre a genética de amostras criopreservadas de vírus da Raiva poderiam ser realizados, por meio de técnicas moleculares como o sequenciamento genético. Visando à possibilidade da detecção de alguma mudança ou deleção na estrutura genética dos vírus em amostras submetidas à criopreservação quando comparados com os vírus em amostras frescas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, T. D. F., TEIXEIRA, M. F. S., COSTA E. C., VITALIANO A. B., TELES C. H. A., BARROSO, I. C., DIAS, R. P., MORAES, N. B. Medium-term cryopreservation of rabies virus samples. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 46(6):678-683. 2003.

ALBAS, A.; FERRARI, C. I. L.; SILVA, L. H. Q.; BERNARDI, F.; ITO, F. H. Influência da decomposição do cérebro de cães no diagnóstico laboratorial da Raiva. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 32, n.1, p. 19-22. 1999.

BADRANE, H.; BAHLOUL, C.; PERRIN, P.; TORDO, N. Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. *Journal of Virology*, v. 75, p. 3268-3276, 2001.

BANERJEE, A. K. Transcription and replication of rhabdoviruses. *Microbiology Reviews*. v. 52, p. 66-87. 1987.

BATISTA H. B. C. R.; FRANCO A. C.; ROEHE P. M. Raiva: uma breve revisão. *Acta Scientiae Veterinariae*. v. 35. n. 2, p. 125-144, 2007.

BLACK, E. M.; McELHINNEY, L. M.; LOWINGS, J. P.; SMITH, J.; JOHNSTONE, P.; HEATON, P. R. Molecular methods to distinguish between classical Rabies and the Rabiesrelated European bat lyssaviruses. *Journal of Virological Methods*, v.87, n.1-2, p.123-131, 2000.

BROCKBANK, K. G. M.; COVAULT, J. C.; TAYLOR, M. J. *Guide Cryopreservation*. Part 1: Cryobiology and Cryopreservation. Thermo Fisher Scientific Inc. p. 1-9, 2007.

BUNSCHOTEN, H.; KLAPMUTS, R. J.; CLAASSEN, I. J. T. M.; REYNEVELD, S. D.; OSTERHAUS, ALBERT D. M. E.; UYTDEHAAG, F. G. C. M. Rabies virus-specific human T cell clones provide help for an “in vitro” antibody response against neutralizing antibody inducing determinants of viral glycoprotein. *Journal of General Virology*, v.70, p.1513-1521, 1989.

CHARLTON, K. M. The pathogenesis of rabies. In: Rabies. CAMPBELL, J. B.; CHARLTON, K.M. (Eds.). Boston: Kluwer Academic Publishers, pp.101-150. 1988.

COLL, J. M. The glycoprotein G of rhabdoviruses. *Archives of Virology*. v.140, p. 827-851. 1995.

COSTA, E. C. B. *Conservação de amostras do vírus da Raiva mediante diferentes protocolos de criopreservação*. 115p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará. 2010.

COSTA, W. A.; ÁVILA, C. A.; VALENTINE, E. J. G.; REICHMANN, M. L. A. B. CUNHA, R. S.; GUIDOLIN, R.; PANACHÃO, M. R. I.; OMOTO, T. M. BOLZAN, V. L. *Profilaxia da Raiva Humana*. São Paulo: Instituto Pasteur, 2000.

COX, J. H.; DIETZSCHOLD, B.; SCHNEIDER, L. G. Rabies virus glycoprotein. II. Biological and serological characterization. *Infection and Immunity*. v.16, p. 754-759. 1977.

DELAGNEAU, J. F.; PERRIN, P.; ATANASIU, P. Struture of Rabies virus: spacial relationships of the proteins G, M1, M2 and N. *Annales de l'Institut Pasteur - Virologie*, v.132E, p.473-493, 1981.

DIETZSCHOLD, B.; LAFON, M.; WANG, H.; OTVOS, L. JR.; CELIS, E.; WUNNER, W. H.; KOPROWSKI, H. Localization and immunological characterization of antigenic domains of the rabies virus internal N and NS proteins. *Virus Research*. 8: 103-125. 1987.

DULBECCO, R.; GINSBERG, H. S. Os rabdovirus. In: _____. *Microbiologia de Davis*. 2. ed. São Paulo: Ed. Harbra, v. 4, 1980. p.1623-1633.

FABER, M.; PULMANAUSAHAKUL, R.; NAGAO, K.; PROSNIK, M.; RICE, A. B.; KOPROWSKI, H.; SCHNELL, M. J.; DIETZSCHOLD, B. Identification of viral genomic elements responsible for rabies virus neuroinvasiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. v.101, p. 16328-16332. 2004.

FENNER, F. *Veterinary Virology*. 2. ed. San Diego: Ac Press. p. 531-548. 1993.

FIGUEIREDO, M. B. Métodos de preservação de fungos patogênicos. *Biológico*. v.63, p. 73-82. 2001.

FOOKS, A. R. The challenge of new and emerging lyssaviruses. *Expert Review of Vaccines*, v. 3, n. 4, p. 333-336. 2004.

HEMACHUDHA, T.; LAOTHAMATAS, J.; RUPPRECHT, C.E. Human rabies: a disease of complex neuropathogenetic mechanisms and diagnostic challenges. *The Lancet Infectious Diseases*. v.1, p. 101-109. 2002.

HIRSH, D. C.& ZEE, Y.C. *Microbiologia Veterinária*. Rio de Janeiro: 2a. Ed. Editora Guanabara Koogan S.A. p. 294-295.1999.

HOLLAND, N. T.; SMITH, M. T.; ESKENAZI, B.; BASTAKI, M. Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies. *Mutation Research*. v.543, p. 217-234. 2003.

ICTV – International Commiitee on Taxonomy of Viruses. <<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>>. 2013. Acesso em 03 de junho de 2014.

IVERSON, L. E.; ROSE, J. K. Localized attenuation and discontinuous synthesis during vesicular stomatitis vírus transcription. *Cell*. v.23, p. 477-484. 1981.

IWASAKI, Y. Spread of virus within the central nervous system. In: The Natural History of Rabies. Boca Raton: CRC Press, p121-132. 1991.

JACOB, Y.; BADRANE, H.; CECCALDI, P. E.; TORDO, N. Cytoplasmic Dynein LC8 Interacts with Lyssavirus Phosphoprotein. *Journal of Virology*. v.74, p. 10217-10222. 2000.

KAPLAN, C. TURNER, G. S.; WARREL, D. A. *Rabies. The facts*. 2. ed. Oxford, Oxford University Press, 1986, 126p.

KAWAI, A.; MORIMOTO, K. Functional aspects of *Lyssavirus* proteins. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v.187, p.27-42, 1994.

KING, M. J.; TURNER, G S. Rabies. A review. *Journal of Comparative Pathology*, 1993. v. 108, n. 1, p. 1-39.

MARSTON, D. A.; MCELHINNEY, L. M.; JOHNSON, N.; MÜLLER, T.; CONZELMANN, K. K.; TORDO, N.; FOOKS, A. R. Comparative analysis of the full genome sequence of European bat lyssavirus type 1 and 2 with other lyssaviruses and evidence for a conserved transcription termination and polyadeylation motif in the G-L 3' non-translated region. *Journal of General Virology*. v.88, p. 1302-1314. 2007.

MARTORELLI, L. F.; AGUIAR, E. A.; ALMEIDA, M. F.; SILVA, M. M.; NOVAES, E. C. Isolation of rabies virus from the insectivorous bat *Myotis nigricans* Revista de Saúde Pública. v.29, p. 140-141. 1995.

MEBATSION, T.; KONIG, M.; CONZELMANN, K. K. Budding of rabies virus particles in the absence of the spike glycoprotein. *Cell*. v.84, p. 941-951. 1996.

MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Eds). Laboratory Techniques in Rabies, 4ed. Geneva: World Health Organization, 1996.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Manual de diagnóstico laboratorial da Raiva*. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2006.

MORENO, J. O. *O perfil epidemiológico da Raiva urbana em Fortaleza e os desafios ao seu controle*. 2002. 70p. Monografia (Conclusão de curso) – Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará – UECE, Fortaleza, 2002.

MORIMOTO, K.; HOOPER, D. C.; SPITSIN, S.; KOPROWSKI, H.; DIETZSCHOLD, B. Pathogenicity of different rabies virus variants inversely correlates with apoptosis and rabies virus glycoprotein expression in infected primary neuron cultures. *Journal of Virology*. v.73, p. 510-518. 1999.

OLIVEIRA, L. H. S. *Virologia Humana*. Rio de Janeiro: Cultura Médica, p. 160 – 177. 1994.

PAOLI, P. Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research. *FEMS Microbiology Reviews*. v.29, p. 897-910. 2005.

PENA, G. O. *Doenças infecciosas e parasitárias*. Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde, 2 ed. Brasília/DF, 220p. 1998.

QUINN, P.J. MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. *Microbiologia E Doenças Infecciosas*, Porto Alegre, Artmed. 2005.

RUPPRECHT, C. E.; HANLON, C. A.; HEMACHUDHA, T. Rabies re-examined. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 2, p. 327-343, 2002.

SCHNELL, M. J.; MCGETTIGAN, J. P.; WIRBLICH, C.; PAPANERI, A. The cell biology of Rabies virus: using stealth to reach the brain. *Nature Reviews Microbiology*, v.8, p.51-61, 2010.

SCHNEIDER, L. G. Spread of virus within the central nervous system. In: BAER, G.M. The Natural History of Rabies. 2nd ed. Boca Raton, USA. RCR Press. p. 199-216. 1991.

SHANKAR, V.; DIETZSCHOLD, B.; KOPROWSKI, H. Direct entry of rabies virus into central nervous system without prior local replication. *Journal of Virology*. v.65, p. 2736-2738. 1991.

SHIMIZU, K.; ITO, N.; MITA, T.; YAMADA, K.; HOSOKAWA-MUTO, J.; SUGIYAMA, M.; MINAMOTO, N. Involvement of nucleoprotein, phosphoprotein, and matrix protein genes of rabies virus in virulence for adult mice. *Virus Research*, 2007. v. 123, n. 2, p. 154-160.

SMITH, D. Culture collections over the world. *International Microbiology*, v.6, p.95-100, 2003.

SOKOL, F.; STANCEK, D.; KOPROWSKI, H. Structural proteins of Rabies virus. *Journal of Virology*, v.7, p.241-249, 1971.

SUGAMATA, M.; MIYAZAWA, M.; MORI, S.; SPANGRUDE, G. J.; EWALT, L. C.; LODMELL, D. L. Paralysis of street rabies virus-infected mice is dependent on T lymphocytes. *Journal of Virology*. v.66, p. 1252-1260. 1992.

TORDO, N. Characteristics and molecular biology of the rabies virus. In: Laboratory Techniques in Rabies. MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Eds). 4th edn. Geneva: World Health Organization, p. 28-51. 1996.

THOULOUEZ, M. I.; LAFAGE, M.; SCHACHNER, M.; HARTMANN, U.; CREMER, H.; LAFON, M. The Neural Cell Adhesion Molecule Is a Receptor for Rabies Virus. *Journal of Virology*. v.72, p. 7181-7190. 1998.

TSIANG, H. Pathophysiology of rabies virus infection of nervous system. *Advances in Virus Research*. v.42, p. 375-412. 1993.

TORDO, N. Characteristics and molecular biology of Rabies virus. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Eds). *Laboratory Techniques in Rabies*, 4ed. Geneva: World Health Organization. p. 28-51. 1996.

TORDO, N.; CHARLTON, K.; WANDELER, A. I. Rhabdoviruses: Rabies. *Microbiology and microbial infections*. v. 1, p. 665 - 692. 1998.

TORDO, N.; POCH, O.; ERMINE, A.; KEITH, G.; ROUGEON, F. Walking along the rabies genome: is the large G-L intergenic region a remnant gene? *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. v.83, p. 3914-3918. 1986.

TORDO, N.; POCH, O. Structure of rabies virus. In: CAMPBELL, J.B.; CHARLTON, K. M. Rabies. Boston. *Kluwer Academic Publishers*. p. 25-45. 1988.

VALENTINI, E. J. G.; ALBAS, A.; AUGUSTO, V. L. M.; ITO, F. H. Imunofluorescência realizada em cérebros de camundongos infectados com vírus rábico – cepa CVS, em diferentes estágios de decomposição. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.33, n.3, p.181-186, 1991.

VAN REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; CARSTENS, E.B.; ESTES, M. H.; LEMON, S. M.; MANILOFF, J.; MAYO, M. A.; MCGEOCH, D. J.; RINGLE, C. R.; WICKNER, R. B. Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Family *Rhabdoviridae*. In: _____. *Virus Taxonomy – Classification and Nomenclature of Viruses*. Ed. Academic Press, 2000. p. 563-583.

XAVIER, S. M. *Comparação dos métodos de inoculação intracerebral em camundongos (Mus musculus) e de inoculação em cultura de células BHK-21 (C13) no diagnóstico da Raiva*. 2005. 84p. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – INCQS/ FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2005.

WAGNER, R.; ROSE, J. K. Rhabdoviridae: The viruses and their replication. In: FIELDS, B. M.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M. A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. (Associate Editors). *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

WUNNER, H. W. Rabies Virus. In: JACKSON, C. A.; WUNNER, H. W. *Rabies*. New York: Academic Press, 2002. p. 23-77.

WUNNER, W. H. The chemical composition and molecular structure of rabies viruses. In: BAER, G. M. (Ed.). *The Natural History of Rabies*. Boca Raton: CRC Press, p. 31-67. 1991.

ANEXOS

ANEXO 1

(Parecer do Comitê de Ética para Uso de Animais em Pesquisa da UECE)

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
Comitê de Ética para o Uso de Animais
Av. Paranjana, 1700 - Itaperi
CEP 60740-903 - fone: 3101-9890
Email: ceua_uece@yahoo.com.br



PARECER

PROCESSO N°: 08185881-7

TÍTULO: "Conservação de amostras do vírus da raiva mediante diferentes protocolos de criopreservação".

PRINCIPAL PESQUISADOR: Maria Fátima da Silva Teixeira (FAVET - UECE)

FORMAÇÃO: Médica-Veterinária

DOCUMENTOS: Ofício de encaminhamento; Termo de compromisso; Cronograma de execução; Orçamento; Currículo Lattes do pesquisador principal.

O projeto está bem relatado e apresentado, contendo informações técnicas de acordo com o estado atual da matéria que fazem parte do capítulo de introdução.

O capítulo "material e métodos" encontra-se com detalhamento.

A proposta contempla os requisitos necessários de acordo com o Comitê de Ética para o Uso Animal e do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Consideramos que apesar da possibilidade de utilização de linhagens celulares, a situação está distante da realidade brasileira.

Os aspectos relacionados com a Biossegurança devem ser avaliados por Comitê competente e legalmente constituído.

Os objetivos propostos estão claros e coerentes, o que nos permite enquadrá-lo, no que diz respeito aos aspectos éticos e legais para o uso de animais na categoria de Aprovado.

Fortaleza, 23 de janeiro de 2009.


José Mario Girão-Abreu
Presidente CEUA-UECE

PRINCÍPIOS BÁSICOS DA CRIOMICROBIOLOGIA: ENFOQUE NOS TIPOS DE MICRO-ORGANISMOS E NOS PRINCIPAIS AGENTES CRIOPROTETORES

[Basic principles of criomicrobiology: focus in kind of microorganisms and principals cryoprotectants agents]

Tereza D'ávila de Freitas Aguiar^{1*}, Maria Fátima da Silva Teixeira¹, Carlos Henrique de Andrade Teles¹, Gabrielle Rosembli Martins¹, Rosivaldo Quirino Bezerra Júnior¹, Edmara Chaves Costa²

1 Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Laboratório de Virologia, Av. Paranjana, 1700 – Campus do Itaperi, CEP 60740-903, Fortaleza, CE, Brasil.

2 Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, LAMOFOPA.

RESUMO - O reconhecimento da grande relevância da biodiversidade microbiana para o desenvolvimento humano tem conduzido ao aprimoramento de técnicas destinadas à conservação dos mais diversos espécimes

Major Article

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 46(6):678-683, Nov-Dec, 2013
<http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0135-2013>



Medium-term cryopreservation of rabies virus samples

**Tereza D'ávila de Freitas Aguiar^[1], Maria Fátima da Silva Teixeira^[1],
Edmara Chaves Costa^[2], Allan Bezerra Vitaliano^[1], Carlos Henrique de Andrade Teles^[1],
Igor Ciriaco Barroso^[1], Ronaldo Pereira Dias^[1] and Nélío Batista de Moraes^{[1],[3]}**

[1]. Laboratório de Virologia, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE. [2]. Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Redenção, CE. [3]. Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE.

ABSTRACT

Introduction: The cryopreservation of rabies virus has been described in detail in the literature. To date, little information is available on the use of cryoprotective agents for cold preservation of this virus, and the available data focus only on short-term virus preservation. In this study, we investigated the medium-term cryopreservation of samples of rabies virus using different cryopreservation protocols. **Methods:** The cryopreservation protocols for the rabies virus samples were performed at -20°C and were divided according to the variables of time and cryoprotectant type used. The laboratory tests (intracerebral inoculation of mice, viral titration and direct immunofluorescence) were performed at regular intervals (360 and 720 days) to assess the viability of the viral samples according to the different preservation techniques used. **Results:** After 1 year of cryopreservation, the fluorescence intensity of intracellular corpuscles of the rabies virus and the median survival time of the mice differed between the positive controls and the treatments with the cryoprotectants. After 2 years, most of the samples subjected to the cryopreservation

ANEXO 5

(Email de confirmação de submissão de artigo no periódico Pesquisa Veterinária Brasileira – Capítulo 4)

