

Protocolo MAT

Protocolo Rodrigo Costa da Silva /2005

Produção de Antígeno

Inocular 20 camundongos, via intraperitoneal, com 1 ml das suspensões da cepa RH, previamente selecionada.

Colher o exsudato peritoneal, 3 dias após, com 5 ml de solução fisiológica 0,9% estéril, por animal.

Observar ao microscópio se os parasitas estão livres de contaminação bacteriana, hemácias e leucócitos, homogeneizar, volume a volume, com líquido ascítico tumoral (células de sarcoma murino TG180), previamente diluído a 1/8 em solução fisiológica 0,9% estéril, para obter um volume final de 60 ml de suspensão.

Com esta suspensão de taquizoítos e células tumorais, inocular 60 camundongos Swiss, com 40 dias de idade (2 ml para cada). Dois dias após a inoculação, colher o exsudato, com 5 ml de solução fisiológica 0,9% estéril (DESMONTS & REMINGTON, 1980).

Preparação de antígeno fixado pela formalina (AF)

Adicionar volume a volume solução de formalina-12% (formaldeído-6%), diluída em solução fisiológica 0.9%, à suspensão com parasitas, mantendo-se *overnight* a 4°C.

No dia seguinte, centrifugar a 600g por 10 minutos e, o sedimento, ressuspender em 50ml solução fisiológica 0.9%.

Repetir mais três vezes, para remover o formaldeído, e finalmente ressuspender em solução tampão borato pH 8,7.

A suspensão final, contendo 2×10^4 parasitas por μl , será conservada a 4°C (DESMONTS & REMINGTON, 1980).

Solução Tampão Borato 8,7

REAGENTES	200ml	500ml	1000ml
Cloreto de Sódio	1,4g	3,51g	7,02g
Ácido Bórico	0,62g	1,55g	3,09g
Hidróxido de Sódio 1 N	4,8ml	12ml	24ml
Albumina Bovina	0,8g	2g	4g
Água Deionizada estéril ou ultra-pura	195,2ml	488ml	976ml

Hidróxido de Sódio 1 N

0,4g Hidróxido de Sódio para 10ml de Água Deionizada estéril ou ultra-pura