

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE LEVEDURAS DO GÊNERO *CRYPTOCOCCUS* ARMAZENADAS PELA TÉCNICA DE CRIOPRESERVAÇÃO HÁ 10 ANOS



<https://doi.org/10.22533/at.ed.630112526028>

Data de aceite: 21/05/2025

Stefanny Cristina Alves da Silva

Curso Técnico em Análises Clínicas,
Escola Técnica de Saúde, Universidade
Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG,
Brasil.

Reginaldo dos Santos Pedroso

Curso Técnico em Análises Clínicas,
Escola Técnica de Saúde, Universidade
Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG,
Brasil.

Ralciane de Paula Menezes

Departamento de Microbiologia, Instituto
de Ciências Biomédicas, Universidade
Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG,
Brasil.

RESUMO: **Introdução:** com o desenvolvimento biotecnológico e científico surge a necessidade da preservação de micro-organismos em laboratórios para fins educacionais, diagnóstico e de pesquisa.

Objetivo: avaliar a viabilidade de isolados de *Cryptococcus* spp. estocados em criopreservação por 10 anos. **Metodologia:** Foi avaliada a viabilidade de 166 isolados que estavam estocados em tubos criogênicos contendo caldo Brain Heart Infusion (BHI) acrescido de glicerol (20%) e mantidos em freezer a -20°C entre os anos de 2014 e

2023. Para reativação dos isolados, os tubos contendo as suspensões das leveduras foram descongelados totalmente em banho-maria a 35°C. Posteriormente, 10 µL da suspensão foram semeados em placas de ágar Sabouraud Dextrose (ASD) acrescido de clorafenicol e o restante do material transferido para tubos contendo caldo BHI e incubado em estufa microbiológica a 35°C por até 72 horas. O crescimento fúngico foi constatado pela visualização de colônias nas placas de ASD ou pela turvação do caldo BHI e posteriormente semeados novamente em ASD. A micromorfologia dos isolados foi avaliada utilizando a técnica de tinta nanquim. A pureza da amostra foi confirmada através da realização de provas bioquímicas para confirmação da espécie.

Resultados: dos 166 isolados 15,1% (25) estavam viáveis, sendo a maioria *C. neoformans* (20), seguido por *C. gattii* (4) e *C. albidus* (1). Diante do exposto é possível concluir que embora seja uma técnica eficaz, a criopreservação não pode ser utilizada por um longo período de tempo para manutenção de espécimes de *Cryptococcus* spp., sendo necessário a reativação dos isolados estocados em um intervalo de tempo de menor.

PALAVRAS-CHAVE: *Cryptococcus* spp., Estocagem de micro-organismos, Preservação.

EVALUATION OF THE VIABILITY OF YEASTS OF THE GENUS *CRYPTOCOCCUS* STORED BY THE CRYOPRESERVATION TECHNIQUE FOR 10 YEARS

ABSTRACT: Introduction: With scientific and biotechnological advances, the need for the preservation of microorganisms in laboratories for educational, diagnostic, and research purposes has become increasingly evident. **Objective:** To evaluate the viability of *Cryptococcus* spp. isolates stored under cryopreservation conditions for a period of 10 years. **Methodology:** The viability of 166 isolates stored in cryogenic tubes containing Brain Heart Infusion (BHI) broth supplemented with 20% glycerol and maintained in a freezer at -20°C between 2014 and 2023 was assessed. For reactivation, the tubes containing yeast suspensions were completely thawed in a 35°C water bath. Subsequently, 10 µL of the suspension were inoculated onto Sabouraud Dextrose Agar (SDA) plates supplemented with chloramphenicol, and the remaining volume was transferred to tubes containing BHI broth, followed by incubation in a microbiological oven at 35°C for up to 72 hours. Fungal growth was confirmed by the presence of colonies on SDA plates or turbidity in BHI broth, after which the cultures were re-inoculated onto fresh SDA. Micromorphological analysis was performed using India ink staining. Sample purity was confirmed through biochemical tests for species identification. **Results:** Of the 166 isolates, 15.1% (25) were viable, the majority being *C. neoformans* (20), followed by *C. gattii* (4) and *C. albidus* (1). In light of these findings, it can be concluded that although cryopreservation is an effective technique, it may not be suitable for long-term storage of *Cryptococcus* spp. isolates, highlighting the need for periodic reactivation within a shorter time frame.

KEYWORDS: *Cryptococcus* spp., Microorganism storage, Preservation.

INTRODUÇÃO

Cryptococcus spp. caracteriza-se por ser um fungo leveduriforme, unicelular, encapsulado, pertencente à classe dos basidiomicetos, e algumas espécies podem produzir um pigmento denominado melanina, considerado um importante fator de virulência. Engloba mais de 37 espécies, das quais duas são de grande relevância em saúde pública: *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. Isso, porque ambas espécies podem desencadear infecções graves denominadas de criptococose, como pneumonia, meningite e infecção de corrente sanguínea, em indivíduos imunocomprometidos e imunocompetentes (Araújo et al., 2015).

Cryptococcus neoformans apresenta distribuição mundial, sendo encontrado em solo contaminado com fezes de aves, especialmente de pombos. Acomete principalmente indivíduos imunocomprometidos, sendo potencialmente fatal. É o segundo patógeno fúngico mais isolado de pacientes portadores da Síndrome da Imunodeficiência Humana (AIDS) (Gushiken et al., 2021).

Cryptococcus gattii pode ser encontrado em troncos de árvores e em matéria orgânica morta presente no solo de áreas temperadas e tropicais. Afeta indivíduos imunocomprometidos e imunocompetentes, incluindo crianças e jovens sem evidência

de imunossupressão aparente, sendo de comportamento endêmico ou focal nas zonas tropicais e subtropicais, especialmente nas regiões Norte (Amazônia) e Nordeste do Brasil, incluído o semiárido, e, esporadicamente, nas demais regiões brasileiras (Brasil, 2024).

Diante da sua relevância, o estudo desses micro-organismos é importante, tanto do ponto de vista epidemiológico quanto para diagnóstico. Assim, surge a necessidade da preservação de micro-organismos em laboratório para fins de diagnóstico, pesquisa ou ensino (De Souza et al., 2017).

Diferentes metodologias podem ser utilizadas para a preservação de micro-organismos, variando em relação ao tempo de preservação (curto, médio ou longo prazo), aos níveis de manutenção da viabilidade celular, estabilidade das características fenotípicas e genotípicas dos isolados, custos operacionais e complexidade metodológica (Smith; Ryan, 2015; Silva et al., 2020). São exemplos de técnicas empregadas rotineiramente na preservação de micro-organismos subcultivo periódico, conservação em água destilada, criopreservação e liofilização (Santos et al., 2018).

Como cada micro-organismo apresenta peculiaridades intrínsecas, a escolha das formas de manutenção baseia-se na avaliação das características fenotípicas, no comportamento de cada espécie frente aos métodos de preservação, bem como nas vantagens e desvantagens de cada técnica. Aquela que for capaz de preservar em maior tempo o maior número de gêneros e espécies possíveis será a mais confiável, sem interferência nas características fenotípicas e genotípicas, e terá preferência de uso sobre as demais (Amorim et al., 2020; Bacelo et al., 2010).

Diante do exposto, e da necessidade da manutenção de micro-organismos em laboratórios de microbiologia para fins de ensino e pesquisa utilizando um método viável economicamente, e que permita a preservação dos isolados a médio/longo prazo, realizamos este estudo para avaliar a efetividade da estocagem de leveduras do gênero *Cryptococcus* em caldo BHI com glicerol em freezer a -20°C após 10 anos de armazenamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi avaliada a viabilidade de 166 isolados de *Cryptococcus* spp. estocados em frascos contendo caldo Brain Heart Infusion (BHI) acrescido de glicerol e mantidos a -20°C entre 2014 e 2023, sendo 150 isolados de *C. neoformans*, 15 isolados de *C. gattii* e 1 isolado de *C. albidus*. Para reativação dos isolados, os tubos contendo as suspensões das leveduras foram descongelados totalmente em banho-maria a 35°C. Posteriormente, 10 µL da suspensão foram semeados em placas de ágar Sabouraud Dextrose (ASD) acrescido de clorafenicol, e o restante do material foi transferido para tubos contendo caldo BHI e incubado em estufa microbiológica a 35°C por até 72 horas (Oplustil et al., 2020).

O crescimento fúngico foi constatado pela visualização de colônias nas placas de ASD ou pela turvação do caldo BHI. Quando não houve crescimento no meio sólido e foi verificada turvação do caldo após o período de incubação, alíquotas de 10 µL da suspensão turva foram semeadas em outra placa contendo ASD e o material incubado a 35°C por 48 horas. A não formação de colônias no meio sólido e não turvação do caldo indicou ausência de crescimento microbiano e, conseqüentemente, perda da viabilidade do micro-organismo.

Avaliação das características fenotípicas

Para determinar a pureza dos isolados viáveis, o material isolado em placas de ASD foi semeado em ágar semente de níger para avaliar as características morfológicas das colônias bem como a produção de melanina, típica de espécies de *Cryptococcus*.

Além disso, os isolados foram submetidos à avaliação micromorfológica utilizando tintam naquim para detecção da presença de cápsula. Provas bioquímicas também foram realizadas para confirmar a identificação do isolado em nível de espécie e, conseqüentemente, a pureza dos mesmos (Oplustil et al., 2020).

Análise dos dados

Os resultados foram apresentados na forma de tabela, sendo as informações sobre a viabilidade dos isolados estocados e a pureza das suspensões expressos em frequências absolutas e relativas.

RESULTADOS

Dos 166 isolados, 15,1% (25) estavam viáveis, sendo 20 isolados de *C. neoformans*, quatro de *C. gattii* e um de *C. albidus*. Além disso, 10 eram cepas padrão e 15 isolados clínicos. Dez estoques apresentaram contaminação por fungos filamentosos (70%) e bactérias (30%). A frequência da viabilidade está apresentada na Tabela 1.

| Espécie | Total | Crescimento | Viabilidade (%) |
|--------------------------------|-------|-------------|-----------------|
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | 150 | 20 | 13,3% |
| <i>Cryptococcus gattii</i> | 15 | 4 | 26,6% |
| <i>Cryptococcus albidus</i> | 1 | 1 | 100% |
| Total | 166 | 25 | 15,1% |

Tabela 1: Viabilidade de isolados fúngico estocados em caldo BHI- glicerol a -20°C.

Fonte: Os autores, 2025.

DISCUSSÃO

Neste estudo foi avaliada a viabilidade de isolados de *Cryptococcus* spp., incluindo cepas-padrão e amostras clínicas, estocadas há dez anos com o método de criopreservação. Com os resultados obtidos nesta avaliação, é possível apontar se o método de criopreservação em BHI-glicerol garante a viabilidade e a preservação das características fenotípicas de fungos a longo prazo e possui uma viabilidade técnica e econômica que se encaixe na realidade de laboratórios de instituições de ensino e pesquisa públicas.

Os micro-organismos são as entidades bióticas mais numerosas e antigas do planeta. Sua presença e atividade são essenciais para o funcionamento e equilíbrio dos ecossistemas, além de representarem uma importante fonte de recursos genéticos para o avanço biotecnológico e desenvolvimento econômico sustentável. Contribuem para a descoberta de novos fármacos e outras aplicações na saúde, agricultura, indústria e meio ambiente, por meio de estratégias tradicionais de isolamento e seleção. No entanto, a preservação de fungos em laboratório, com suas características inalteradas, é importante para pesquisa, uma vez que permite a disponibilidade do mesmo em qualquer momento. A estocagem desses micro-organismo é um processo complexo em virtude do quase inexpressivo conhecimento que se tem a respeito das reações e modificações que ocorrem nos micro-organismos em condições de armazenamento e devido à emergente importância atribuída à preservação de amostras (Dellaretti, 2014).

Neste estudo, apenas 15,1% dos isolados armazenados sob criopreservação foram recuperados, porcentagem inferior àquela observada em uma pesquisa que avaliou a viabilidade de 328 leveduras dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Rodothorulla* também preservadas em BHI e glicerol a -20°C há 4 anos, na qual mais de 90% dos isolados foram recuperados, indicando que o tempo de armazenamento influencia à sobrevivência das leveduras (Silva; Costa; Reche, 2008).

Um outro estudo de 2019, que avaliou a viabilidade de leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus* estocados em BHI-glicerol em temperatura ambiente por 3,5 anos, obteve 60% de amostras de *Cryptococcus* spp. viáveis (Menezes; Pedroso, 2019). Por fim, Oliveira e colaboradores (2023) encontraram viabilidade superior a 80% de diferentes espécies bacterianas estocadas sob criopreservação por quatro anos. Provavelmente, a diferença dos resultados encontrados entre os estudos deve-se ao longo tempo de congelamento dos isolados desta pesquisa, à espécie considerada, e a fatores técnicos, como risco de instabilidade de manutenção da temperatura do freezer durante o período de estoque, seja pela manutenção do equipamento ou queda de energia elétrica.

Embora este seja um tema importante do ponto de vista educacional, científico e ambiental, a literatura possui poucos estudos sobre o assunto. Nesse sentido, a realização de pesquisas que avaliem a eficácia de diferentes métodos de preservação de micro-organismos deve ser incentivada, a fim de estabelecer qual método de conservação seria mais eficaz e para qual tipo de micro-organismos é mais adequada a sua utilização.

CONCLUSÃO

Apenas 25 isolados (15,1%) de *Cryptococcus* spp. preservados em BHI com glicerol a -20°C estavam viáveis após dez anos de armazenamento, sendo *C. gatti* a espécie com maior taxa de aproveitamento (26,6%), em relação ao total de isolados avaliados por espécie.

Assim, é possível concluir que, embora seja uma técnica eficaz, a criopreservação não pode ser utilizada por um longo período para manutenção espécies de *Cryptococcus* sendo sugerida a reativação dos isolados estocados em um tempo menor para novamente serem armazenados.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Escola Técnica de Saúde pela bolsa concedida à Stefanny Cristina Alves da Silva. Agradecem também à Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior) pela disponibilidade das bases de dados para consulta de artigos científicos (Código de Financiamento 001).

CONFLITO DE INTERESSE

Não há.

REFERÊNCIAS

AMORIM, C. F.; OLIVEIRA, A. C. S. de; COSTA, E. A. S. Bacteriotech construction in a higher education institution for teaching and research purposes. **Research, Society and Development**. v. 9, n. 9, p. e212997101, 2020.

ARAÚJO JÚNIOR, E.C.; TÁPARO, C.V.; UCHIDA, C.Y.; MARINHO, M. *Cryptococcus*: isolamento ambiental e caracterização bioquímica. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.67, n.4, p.1003-1008, 2015.

BACELO, K.L.; DA COSTA, K.R.; FERREIRA, J.C.; CANDIDO, R.C. Biotype stability of *Candida albicans* isolates after culture storage determined by randomly amplified polymorphic DNA and phenotypical methods. **Mycoses**, v. 53, n. 6, p. 468–474, 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/criptococose>. Acesso em 08 de agosto de 2024.

DELLARETTI, E.M. Preservação de Fungos em Baixas Temperaturas. Preservação de fungos em baixas temperaturas. **Monografia (Bacharelado Interdisciplinar em Biosistemas)**, 2014.

DE SOUSA, B.R. et al. Técnicas de obtenção, manutenção e reativação de culturas microbianas. **Journal of Medicine and Health Promotion**. v. 2, n. 3, p.827-842, 2017.

GUSHIKEN AC, SAHARIA KK, BADDLEY JW. Cryptococcosis. **Infect Dis Clin North Am**. v. 35, n. 2, p. 493-514, 2021.

MENEZES, R.P.; PEDROSO, R.S. Viabilidade *in vitro* de leveduras armazenadas à temperatura ambiente. **Revista Eletrônica de Farmácia**. 2019.

OLIVEIRA, L.S.; LOPES, M.S.M.; PENATTI, M.P.A.; RÖDER, D.V.D.B.; MENEZES, R.P. Avaliação da viabilidade de bactérias estocadas em caldo BHI-glicerol a - 20°C há quatro anos. **RECIMA**. v. 4, n. 3, 2023.

OPLUSTIL, C.P.; et al. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**. 4ª ed., São Paulo: Sarvier, 2020.

SANTOS, L. R.; OLIVEIRA, E. M.; PEREIRA, F. N. Avaliação da estabilidade fenotípica de isolados microbianos submetidos a subcultivos seriados. **Revista de Microbiologia Aplicada**, v. 49, n. 2, p. 113–119, 2018.

SILVA, A. C.; ALMEIDA, L. F.; COSTA, M. S. Métodos de preservação de micro-organismos: uma revisão. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 18, n. 1, p. 45–56, 2020.

SILVA, J. O.; COSTA, P. P.; RECHE S. H. C. Manutenção de leveduras por congelamento a -20°C. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, p. 73-74, 2008.

SMITH, D.; RYAN, M. J. The maintenance and preservation of living fungi. In: DIJKSTERHUIS, J.; SAMSON, R. (ed.). **Food mycology: a multifaceted approach to fungi and food**. Boca Raton: CRC Press, 2015.