

## PRESERVAÇÃO DO FUNGOS DO COMPLEXO *SPOROTHRIX SCHENCKII* ATRAVÉS DO CONGELAMENTO: RELATÓRIO PARCIAL

MARCELA BRANDÃO COSTA<sup>1</sup>; JOSÉ RAPHAEL BATISTA XAVIER<sup>2</sup>; RENATA GARIN FREIRE DA SILVA<sup>3</sup>; ANGELITA DOS REIS GOMES<sup>4</sup>; OTÁVIA DE ALMEIDA MARTINS<sup>5</sup>; RENATA OSÓRIO DE FARIA<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – marcelabc@hotmail.com.br

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – jrphaelvet@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – renata\_garin@hotmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas - angelitagomes@gmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas - otavia.martins@hotmail.com

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas –renataosoriovet@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

A manutenção de isolados fúngicos em micotecas é de fundamental importância para estudos relativos à sua biologia, etiologia e aspectos epidemiológicos, no entanto, para pesquisas futuras a longo prazo, é necessária a escolha adequada do método de preservação (GIRÃO et al., 2004). Entre as técnicas de preservação de médio e longo prazo, estão a criopreservação e a liofilização (HOLLAND et al., 2003; PAOLI, 2005).

A técnica de criopreservação consiste na manutenção de microrganismos sob baixas temperaturas, tendo como objetivo minimizar o dano ao material biológico durante o processo de congelamento e estocagem a frio de tecidos, células animais e vegetais, bactérias, fungos e vírus (WOLFE e BRYANT, 2001). Esta técnica se baseia na manutenção de matéria orgânica a baixas temperaturas, -20°C a -80°C em freezers, e a ultrabaixas temperaturas, -150°C a -196°C em contêineres de nitrogênio líquido (PAOLI, 2005; WOLFE e BRYANT, 2001).

Outro fator que se deve levar em consideração é a escolha do agente crioprotetor, já que este reduz o estresse físico e químico derivado do congelamento e do degelo das células. As principais características físico-químicas ideais para um crioprotetor são: baixo peso molecular, alta solubilidade em água e baixa toxicidade celular (BUENO e GALLARDO, 1998). Portanto, há necessidade de desenvolvimento de metodologias adequadas de conservação para microrganismos que vem ganhando importância em virtude de enfermidades emergentes, tanto na medicina veterinária quanto humana (GIRÃO et al., 2004).

Entre estas enfermidades está a esporotricose, micose de grande importância em saúde pública, causada por fungos dimórficos do Complexo *Sporothrix schenckii*, que acometem principalmente felinos, mas também outros mamíferos, como cães e o homem, sua distribuição é mundial, podendo estar presente no solo e na matéria orgânica em decomposição, ele se apresenta na

forma micelial quando está no ambiente e na forma leveduriforme quando está parasitando o hospedeiro (CRUZ, 2013). A esporotricose é uma micose de implantação com potencial zoonótico, endêmica de regiões tropicais e subtropicais como a América Latina (BARROS, 2011).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento de cultivos de *Sporothrix* spp na forma leveduriforme frente ao congelamento utilizando como crioprotetor o glicerol a 20%.

## 2. METODOLOGIA

Foram utilizadas no experimento 16 isolados de *Sporothrix* spp. provenientes de amostras que chegaram para diagnóstico de esporotricose no do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (MicVet – UFPel) através de cultura fúngica. Após o recebimento das amostras, as mesmas foram semeadas em meio Mycosel® e em meio Saborourad acrescido de cloranfenicol (SbCl), sendo então a placa contendo Mycosel® colocada na estufa de 25°C e a placa de SbCl na de 37°C por 3 a 7 dias, passado esse período e havendo crescimento, as amostras foram analisadas quanto seu aspecto macroscópico e microscópico, para então caracterizar o *Sporothrix* spp. (CRUZ, 2013).

Após realizado o isolamento, as cepas foram preparadas para o congelamento, de acordo com ATCC® 2019, com modificações, foi retirada uma alçada da colônia já isolada e identificada como de *Sporothrix* spp. e depois adicionada a 5 mL de BHI (Brain Heart Infusion Broth), que em seguida foram acondicionadas em estufa a 37°C, onde de oito isolados foram utilizados um tempo de crescimento de três dias e as oito restantes foi utilizado um tempo de crescimento de cinco dias. Passado esse período de crescimento, foi retirado 1,5mL de BHI contendo *Sporothrix* spp. e colocados em tubos de congelamento de 2 mL, sendo adicionado 20% do volume de glicerol (0,3 ml) e posteriormente submetidas ao congelamento em freezer a temperatura de -70°C.

Após o período de sete dias de congelamento, um tubo foi aberto e uma alíquota foi repicada em meio PDA (Agar Batata Dextrose) e colocado em estufa de 25°C por três a cinco dias, após este período havendo o crescimento foi realizado a avaliação da viabilidade celular e morfologia das colônias, após o repique, as colônias retornaram para o congelamento, parem serem testadas nos tempos de três meses, seis meses, nove meses e um ano. As colônias foram examinadas quanto a suas características macromorfológicas, como textura, topografia e

coloração do verso e anverso, e micromorfológicas, como tamanho, coloração e organização das estruturas do micélio reprodutivo na forma micelial. Para exame direto das culturas filamentosas, uma alçada da colônia foi coletada e corada com coloração de lactofenol azul de algodão em lâmina e lâminula e visualizada no microscópico óptico com aumento de 400x.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas oito amostras com três dias de incubação na forma leveduriforme, houve crescimento de cinco isolados (62,5% de viabilidade), demonstrando que este tempo não foi suficiente para o estabelecimento de cepas de *Sporothrix spp.* nestas condições. No entanto, as outras oito amostras que foram incubadas por cinco dias, após o congelamento obtiveram-se 100% de viabilidade, provavelmente devido o tempo de incubação ter sido maior. Porém uma expressiva variedade de fatores influencia a efetividade da criopreservação de microrganismos, como à espécie a qual o exemplar pertence, o tipo de cepa, a fase e a taxa de desenvolvimento, a temperatura de incubação, a composição do meio de crescimento, dentre outros o próprio tempo de estocagem (DAY e MCLELLAN, 1995; KIRSOP e DOYLE, 1991). Resultado semelhante foi relatado por BRILHANTE et al.; (2015) que obtiveram 100% de viabilidade após armazenamento da forma filamentosa, usando o crioprotetor penetrante glicerol associado aos crioprotetores não penetrantes lactose ou sacarose, por 3, 6 e 9 meses, não sendo encontrado outros estudos até o momento da escrita desse trabalho que relatem a utilização das formas leveduriformes no congelamento.

a viabilidade foi à utilização de caldo BHI que é um meio mais nutritivo que o PDA, proporcionando mais energia para a célula se estabelecer e se multiplicar, consequentemente melhorar sua potencial viabilidade pós congelamento. Este meio é derivado de nutrientes de cérebro e coração, contendo peptona e dextrose que são fontes de nitrogênio, carbono, enxofre e vitaminas e carboidrato que os microrganismos utilizam para fermentação (ANVISA, 2004).

Os próximos passos a serem realizados, tratam do acompanhamento dessas colônias e a observação das mesmas quanto a sua viabilidade e capacidade de manter a morfologia dos isolados, no decorrer de diferentes períodos de tempo.

Portanto, a criopreservação é a técnica atualmente preferida em muitas coleções de culturas, pois diminui a atividade metabólica celular, permitindo que os isolados permaneçam estáveis por longos períodos de tempo, além de evitar

colônias de contaminação e também ocupar um menor espaço quando comparado com outros métodos de conservação e consequentemente um menor gasto, já que os repiques podem ser mais longos (BRILHANTE et al., 2004; HUBÁLEK, 2003).

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho sugerem que a escolha de uma técnica para conservação depende dentre outros fatores, do tempo de acondicionamento, não existindo, desta maneira, uma fórmula padrão e universal para a estocagem e preservação de fungos. Considerando a vasta diversidade microbiana, conclui-se que existe ainda demanda de muita pesquisa para definir qual a melhor metodologia para cada espécie.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Descrição dos meios de culturas empregados nos exames microbiológicos. Módulo IV, p. 15, 2004.
- ATCC® MyCology CulTure guide tips and techniques for culturing yeasts and filamentous fungi. **The Essentials of Life Science Research**. p. 17-19, 2009.
- BARROS, M. B. L.; ALMEIDA, P. R.; SCHUBACH A. O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Clin Microbiol**, v. 24, p. 633–654, 2011.
- BRILHANTE, R.S.N et al. Evaluation of *Microsporum canis* in different methods of storage. **Med Mycol** 42:499–504.2004.
- BRILHANTE, R.S.N. et al. Easy Storage Strategies for *Sporothrix* spp. Strains. **Biopreservation and bio banking**. Volume 13, Number 2, 2015.
- BUENO, L; Gallardo, R. **A conservação de fungos filamentosos em água destilada estéril**. Revista Iberoam. Micol. p. 166-168, 1998.
- COSTA, E. C. et al. Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. **Ciência Animal**, Goiânia, v. 19, n. 2, p.111-122, 2009.
- CRUZ, L.C.H. Complexo *Sporothrix schenckii*. Revisão de parte da literatura e considerações sobre diagnóstico e epidemiologia. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, p. 8-28, 2013.
- DAY, J. G.; MCLELLAN, M. R. Cryopreservation and freeze-drying protocols. **New Jersey: Humana Press**, 1995.
- GIRÃO, M. D. et al. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.37, n.3, p. 229-233, maio-junho, 2004.
- HOLLAND, N. T.et al. Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies. **Mutation Research,California**, p. 217-234, 2003.
- HUBÁLEK, Z. **Protectants used in the cryopreservation of microorganisms**. Cryobiology, New York, v. 46, p. 205-229, 2003.
- KIRSOP, B. E.; DOYLE, A. Maintenance of microorganisms and cultured cells. 2.ed. London: **Academic Press**, 1991.
- MORGAN, C. A.; HERMAN, N.; WHITE, P. A.; VESEY, G. Preservation of microorganisms by drying – a review. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.66, n. 2, p.183-193, ago. 2006.
- PAOLI, P. Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research. **FEMS Microbiol Rev**. v. 29, pg. 897-910, 2005.
- WOLFE, J.; BRYANT, G. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. **International Journalof Refrigeration**, Surrey, v. 24, p. 438-450, 2001.