



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS
INFECCIOSAS

MÔNICA DOS SANTOS ELIAS

**Avaliação da melanina como fator de proteção para
preservação de *Cryptococcus neoformans* na Coleção de
Fungos Patogênicos INI/Fiocruz**

Rio de Janeiro

2015

**Avaliação da melanina como fator de proteção para
preservação de *Cryptococcus neoformans* na Coleção de
Fungos Patogênicos INI/Fiocruz**

MÔNICA DOS SANTOS ELIAS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Márcia dos Santos Lazéra.

Co-orientador: Prof.^o Dr.^o Bodo Wanke

Rio de Janeiro

Agosto

2015

MÔNICA DOS SANTOS ELIAS

**Avaliação da melanina como fator de proteção para
preservação de *Cryptococcus neoformans* na Coleção de
Fungos Patogênicos INI/Fiocruz**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadores: Prof.^a Dr.^a. Márcia dos Santos Lazéra.

Prof. Dr. Bodo Wanke.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Paes

Fundação Oswaldo Cruz

Prof.^a Dr.^a. Isabel Cristina Fábregas Bonna

Fundação Oswaldo Cruz

Prof.^a Dr.^a. Luciana Trilles

Fundação Oswaldo Cruz

Dedico este trabalho
A Deus por sua infinita Graça
Ao meu presente precioso, minha amada família

AGRADECIMENTOS

Ao meu amado Deus por Seu inconfundível amor, sua interminável fidelidade, provendo tudo na hora certa.

Aos meus pais José Elias e Maria do Socorro, que são minha base, com suas simplicidades são meu exemplo de vida, determinação e perseverança.

Aos meus irmãos e sobrinhos, que com suas singularidades me ajudaram em todas as fases da minha vida, apesar das dificuldades, sempre terminamos com gargalhadas e cada vez mais unidos.

Aos meus orientadores Dr^a Márcia Lazéra e Dr. Bodo Wanke pela paciência em me instruírem e pela oportunidade de realizar este trabalho.

À Dr^a. Bernardina Penarrieta Morales por me incentivar desde o primeiro pensamento para realizar este projeto e estar sempre disponível a qualquer hora e lugar para ajudar, auxiliar com muita paciência e dedicação.

À Dr^a. Marília Martins Nishikawa, uma verdadeira mãe, que abriu as portas do Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) para realizar os experimentos, me ajudando exaustivamente com seu trabalho e experiência na bancada, além disso sempre estava acompanhada de um belo sorriso, conselhos e palavras confortantes.

Ao Carlos Nascimento do Laboratório de Micologia do INCQS, por sua solidariedade em colaborar para a realização deste trabalho, abdicando de seus finais de semana ensolarado e sempre de bom humor.

Ao Gilberto e a Mônica do setor de esterilização do INI pela dedicação na produção dos meios de cultura e materiais esterilizados.

Ao setor de esterilização e produção de meio de cultura do INCQS por serem tão generosos, compreensivos em produzir os meios de cultura e preparo dos materiais esterilizados.

Ao Departamento de Microbiologia do INCQS, em especial ao setor de esterilidade e o laboratório de bacteriologia por disponibilizarem seu espaço para a produção deste trabalho.

À Claudia, Carolina e Aline por me receberem tão cordialmente no laboratório de Micologia, além das preciosas ajudas.

Às “meninas da Ambiental”, Isabel, Rosani e Luciana pela compreensão da minha longa ausência do laboratório.

À equipe do Diagnóstico Micológico: Helena, Fábio e Rodrigo, que não consigo cortar o “cordão umbilical”, por sempre me apoiarem, me escutarem, pelos conselhos, pelas risadas, enfim por tudo, saibam que possuem um lugar especial no meu coração.

Ao Mario Gatti, que me deu a primeira oportunidade na Fiocruz, que além de me apresentar ao fantástico “Reino dos Fungos” me apresentou também a uma figura única, que deixou enorme saudade, Dr. Paulo Fialho Monteiro.

À Prof.^a Dr.^a Raquel Vasconcellos de estatística, que sempre se mostrou disponível e paciente para auxiliar nas análises estatísticas.

À Tatiana Fonseca, minha amiga desde a graduação, que com seu jeito meigo me ajudou e muito nesta fase com as disciplinas e principalmente em escutar minhas lamentações.

Aos meus amigos: Ana Paula, André, Karla, Luciana e Gleide, que mesmo distante me ajudaram por demais com suas palavras, incentivo, meus verdadeiros presentes de Deus.

A todos que contribuíram para este trabalho, direta ou indiretamente, meu muitíssimo obrigada.

Tudo é possível àquele que crê...”
(Marcos 9:23)

Elias, M S. **Avaliação da melanina como fator de proteção para preservação de *Cryptococcus neoformans* na Coleção de Fungos Patogênicos do INI/Fiocruz.** Rio de Janeiro; 2015. 78f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.

RESUMO

Coleções de Cultura devem garantir a viabilidade dos micro-organismos por períodos prolongados de tempo, além de minimizar os riscos de contaminação e alterações fenotípicas e genéticas. Os métodos mais utilizados para a preservação de leveduras são a liofilização e criopreservação à -70°C. Entretanto, há relatos mencionando possíveis mudanças, antes e após o processo de liofilização, nas características morfológicas e por consequência na viabilidade do fungo. Face ao papel protetor celular reconhecido da melanina, consideramos de interesse incluir uma variação da metodologia utilizando meio indutor da produção deste pigmento com o objetivo de determinar metodologias mais eficazes a serem aplicadas na Coleção de Fungos Patogênicos do INI/FIOCRUZ tendo como alvo inicial *C. neoformans*, não só pela importância deste agente de micose sistêmica, mas também pelo grande número de isolados preservados nesta coleção. Para tal, foi analisado o crescimento de 31 cepas de *C. neoformans* com produção de melanina, usando Ágar Semente de Níger (ASN) e Meio Mínimo com L-Dopa (MM) em isolados preservados pelos métodos de liofilização e de criopreservação a -70°C; além do crescimento sem produção de melanina, usando Ágar Sabouraud 2% (SAB2%). Os resultados indicam que após três meses de preservação a presença de melanina protege as células de *C. neoformans* na criopreservação -70°C e liofilização, demonstrando seu potencial para uso em metodologias de preservação deste agente.

Palavras-chave: *Cryptococcus neoformans*; criopreservação a -70°C; liofilização; melanina.

Elias, M S. **Melanin evaluation as a protective factor for the preservation of *Cryptococcus neoformans* in the Culture Collection of Pathogenic Fungi INI / Fiocruz.** Rio de Janeiro; 2015. 78p. Dissertation [Master in Clinical Research and Infectious Diseases] –National Institute of Infectious Diseases Evandro Chagas.

ABSTRACT

Culture Collections must ensure the viability of microorganisms for long period of time while minimizing the risk of contamination and phenotypic and genetic changes. The most widely used methods for preserving yeasts are lyophilization and cryopreservation at -70°C . However, there are reports indicating potential morphological and viability changes before and after the lyophilization process. It is known the protective role of melanin in *Cryptococcus neoformans*, therefore we consider of interest to include a new methodology using culture media which can induce melanin production, in order to determine the most effective methodologies to be applied in the Culture Collection of Pathogenic Fungi (INI / FIOCRUZ), initially targeting *C. neoformans*, not only because the importance of this systemic mycosis agent but also by the large number of isolates preserved in this collection. For this, the growth of 31 strains of *C. neoformans* with melanin production was analyzed using seed agar niger (ASN) and Minimum Medium with L-Dopa (MM) in isolates preserved by freeze-drying at -70°C and cryopreservation methods. The results indicate that after three months of preservation the presence of melanin protects the cells of *C. neoformans* in cryopreservation at -70°C and lyophilization, comparing to the growth without melanin on Sabouraud medium, showing its potential for the use as preservation methods of this agent in Culture Collections.

Key words: *Cryptococcus neoformans*; cryopreservation; lyophilization; melanin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – GRÁFICO DE SETORES ILUSTRANDO AS DIFERENTES ORIGENS DAS AMOSTRAS CLÍNICAS UTILIZADAS NO ESTUDO 23

FIGURA 2 – CULTIVO DE *C.NEOFORMANS* NOS MEIOS DE CULTURA: ÁGAR SABOURAUD 2% DE GLICOSE (PLACA DA ESQUERDA) E NO MEIO ÁGAR SEMENTE DE NÍGER (PLACA DA DIREITA) 24

FIGURA 3 – CULTIVO EM MEIO CANAVALINA-GLICINA-AZUL DE BROMOTIMOL (CGB). *C.NEOFORMANS* (TUBO DO LADO DIREITO-AMARELO ESVERDEADO) E *C.GATTII* (TUBO DO LADO ESQUERDO –AZUL COBALTO) 25

FIGURA 4 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DO PREPARO DAS BIOMASSAS NOS MEIOS DE CULTURA ÁGAR SABOURAUD 2% DE GLICOSE (SAB2%), ÁGAR SEMENTE DE NÍGER (ASN) E MEIO MÍNIMO COM L-DOPA (MM) 27

FIGURA 5 – BOX PLOT DA CONTAGEM DAS UFC DAS 31 CEPAS ANTES DA PRESERVAÇÃO (T0) E APÓS TRÊS MESES DE PRESERVAÇÃO (T1) POR CRIOPRESERVAÇÃO À -70°C NOS MEIOS: ÁGAR SABOURAUD 2% DE GLICOSE (SAB 2%), ÁGAR SEMENTE DE NIGER (ASN) E MEIO MÍNIMO COM L-DOPA (MM)

FIGURA 5 – BOX PLOT DA CONTAGEM DAS UFC DAS 31 CEPAS ANTES DA PRESERVAÇÃO (T0) E APÓS TRÊS MESES DE PRESERVAÇÃO (T1) POR CRIOPRESERVAÇÃO À -70°C NOS

MEIOS: ÁGAR SABOURAUD 2% DE GLICOSE (SAB 2%), ÁGAR SEMENTE DE NIGER (ASN) E MEIO MÍNIMO COM L-DOPA (MM) 34

FIGURA 6 – BOX PLOT DA CONTAGEM DAS UFC/ML 31 CEPAS ANTES DA PRESERVAÇÃO (T0) E APÓS TRÊS MESES DE PRESERVAÇÃO (T1) POR LIOFILIZAÇÃO NOS MEIOS: ÁGAR SABOURAUD 2% DE GLICOSE (SAB 2%), ÁGAR SEMENTE DE NIGER (ASN) E MEIO MÍNIMO COM L-DOPA (MM) 35

FIGURA 7 – BOX PLOT DA COMPARAÇÃO ENTRE AS METODOLOGIAS DE CRIOPRESERVAÇÃO A -70°C E LIOFILIZAÇÃO DAS MEDIANAS DAS UFC/ML DE 31 CEPAS PRESERVADAS POR TRÊS MESES NOS MEIOS: ÁGAR SABOURAUD 2% DE GLICOSE, ÁGAR SEMENTE DE NÍGER E MEIO MÍNIMO COM L-DOPA 37

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 – RESULTADO DOS TESTES DE IDENTIFICAÇÃO REALIZADOS NAS 31 CEPAS DE *CRYPTOCOCCUS* SPP DE ORIGEM CLÍNICA, PROVENIENTES DOS PACIENTES DO AMBULATÓRIO DO INI/FIOCRUZ E LACEN/DF, NO PERÍODO DE OUTUBRO DE 2011 A JULHO DE 2014** 32
- TABELA 2 – ANÁLISE ANTES DA PRESERVAÇÃO (T0) E APÓS TRÊS MESES DE PRESERVAÇÃO (T1) DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA DAS 31 CEPAS DE *C. NEOFORMANS* CRIOPRESERVADAS A -70°C EM SAB 2%, ASN E MM** 33
- TABELA 3 – ANÁLISE DA CONTAGEM ANTES DA PRESERVAÇÃO (T0) E APÓS TRÊS MESES DE PRESERVAÇÃO (T1), DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS DAS 31 CEPAS LIOFILIZADAS DE *C. NEOFORMANS* NOS MEIOS SAB 2%, ASN E MM** 35

TABELA 4 – COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE CRIOPRESERVAÇÃO À -70°C E LIOFILIZAÇÃO APÓS TRÊS MESES DE PRESERVAÇÃO (T1) DAS 31 CEPAS DE *C. NEOFORMANS* NOS TRÊS MEIOS DE CULTURA: SAB 2%, ASN E MM

36

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AFLP	- <i>Amplified Fragment Length Polimorphism</i>
AIDS	- Síndrome da Imunodeficiência adquirida
ASN	- Ágar Semente de Níger
ATCC	- <i>American Type Culture Collection</i>
CBS	- <i>Centraalburau voor Schimmelcultures</i>
CFP	- Coleção de Fungos Patogênicos
CGB	- Canavalina-Glicina Azul de Bromotimol
DNA	- Ácido Desoxiribonucléico
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
Fiocruz	- Fundação Oswaldo Cruz
HIV	- Vírus da Imunodeficiência Humana
ICBN	- <i>International Conference on Bioengineering and Nanotechnology</i>
IGS	- <i>Intergenic Spacer</i>

INCQS	- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INI	- Instituto Nacional de Infectologia
MAT α	- <i>Mating type alfa</i>
MATa	- <i>Mating type a</i>
MM	- Meio mínimo com L-Dopa
OCDE	- Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	- Potencial de hidrogênio
PLB1	- Gene fosfolipase B
RFLP	- <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SAB 2%	- Ágar Sabouraud com 2% de glicose
SPSS	- <i>Statistical Package for the Social Science</i>
UFC	- Unidade Formadora de Colônia
URA5	- <i>Gene Orotidine-5'-phosphate decarboxylase</i>
UV	- Ultravioleta
WDCM	- World Data Centre for Microorganisms
WFCC	- World Federation for Culture Collections

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 HISTÓRICO	1
1.2 CRIPTOCOCOSE	3
1.3 TAXONOMIA	3
1.4 FISIOLOGIA	4
1.5 ECOLOGIA	5
1.6 EPIDEMIOLOGIA	6
1.7 FATORES DE VIRULÊNCIA	7
1.8 COLEÇÕES DE CULTURA	8
1.9 MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO	10
1.9.1 Método de curto prazo: repique periódico	11
1.9.2 Métodos de médio prazo	11
1.9.2.1 Preservação em óleo mineral estéril	11
1.9.2.2 Preservação em água destilada estéril	12
1.9.2.3 Preservação por Congelamento	12
1.9.2.4 Preservação com areia, solo ou sílica gel	13
1.9.3 Métodos de longo prazo	13
1.9.3.1 Criopreservação	13
1.9.3.2 Liofilização	14
1.9.4 Crioprotetores	15
2. JUSTIFICATIVA	17
3. ASPECTOS ÈTICOS	
4. OBJETIVO	18
4.1 OBJETIVO GERAL	19
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
5. METODOLOGIA	20
5.1 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS	20

5.2 OBTENÇÃO DE BIOMASSAS	22
5.3 PRESERVAÇÃO	23
5.3.1 Criopreservação a -70°C	23
5.3.2 Liofilização	23
54 TESTE DE VIABILIDADE E PUREZA	24
5.4.1 Pré preservação	24
5.4.2 Pós Preservação	25
5.4.2.1 Criopreservação a -70°C	25
5.4.2.2 Liofilização	25
5.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
6. RESULTADOS	27
6.1 ANÁLISE DAS CEPAS PRESERVADAS POR CRIOPRESERVAÇÃO À -70°C	28
6.2 ANÁLISE DAS CEPAS PRESERVADAS POR LIOFILIZAÇÃO	29
6.3 COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE CRIOPRESERVAÇÃO A -70°C E LIOFILIZAÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>C. NEOFORMANS</i>	31
7. DISCUSSÃO	33
8. CONCLUSÕES	40
9. PERSPECTIVAS	37
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
11. ANEXOS	43

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO

O gênero *Cryptococcus*, do grego *Kryptus*, que significa “escondido”, “secreto”, “misterioso” e “obscuro”, foi descrito pela primeira vez por Kutzing, em 1833 para classificar um grupo de leveduras que não possuíam a capacidade de produzir endósporos.

A primeira descrição clínica de doença por *Cryptococcus neoformans* foi relatada, em 1864 em paciente de 31 anos, apresentando lesões de sarcoma da tibia. O isolamento foi realizado por Otto Busse e Abraham Buschke, que descreveram o agente como “corpúsculos ovais”. Anteriormente, Zenker em 1861, fez referência a um possível caso de criptococose, mas não obteve o isolamento da levedura para uma correta definição do caso (Freeman, 1931).

A patogenicidade do micro-organismo foi evidenciada por Busse após re-inoculação do cultivo na pele do paciente, que foi a óbito em decorrência da disseminação da infecção. Já o médico Buschke (1895), que cuidava do paciente, cultivou o mesmo patógeno da erupção da pele e ao observar o micro-organismo relatou que se tratava de um “coccídeo”. No mesmo ano dessas primeiras observações na clínica, Francesco Sanfelice (1984), na Itália, isolou de suco de pêssego uma levedura encapsulada, que denominou de *Saccharomyces neoformans*. Entretanto, Busse chamava o fungo de *Saccharomyces* e a doença de saccharomycosis hominis.

Em 1895, Sanfelice isolou novamente uma levedura similar a *S. neoformans* de um linfonodo de boi e também reconheceu a similaridade entre *S. neoformans* e o fungo isolado de Busse.

Vuillemin, em 1901, reclassificou os fungos isolados por Busse e Sanfelice para o gênero *Cryptococcus* e em duas espécies *C. hominis* e *C. neoformans* respectivamente, esta reclassificação foi baseada na incapacidade deste fungo fermentar fontes de carbono e a não formação de ascósporos.

Frothingham, em 1902, isolou a levedura de uma lesão pulmonar em um cavalo de Massachusetts que era similar ao fungo que Busse e Buschke haviam isolado. Com este achado ficou evidente que a levedura era patogênica para homens e animais.

Em 1950, Evans identificou três fenótipos diferentes com base nas propriedades antigênicas do polissacarídeo capsular a soros hiperimunes. Evans e Kessel demonstraram que a cápsula era determinante do sorotipo específico, denominando os sorotipos A, B e C (Evans 1950; Evans; Kessel 1951). Já o sorotipo D foi descrito em 1968 por Wilson, Bennett e Bailey. Algumas cepas apresentam constituintes antigênicos dos sorotipos A e D, que passou a representar o quinto sorotipo AD, híbrido descrito em 1985 (Ikeda et al. 1985)

Lodder e Kreger-van Rij, em 1952, realizaram um estudo taxonômico e finalmente definiram o nome do fungo patogênico como *Cryptococcus neoformans*. Mesmo com esse progresso na identificação taxonômica, que auxiliou a estabilizar o nome da levedura, a compreensão do ciclo de vida não foi completamente esclarecida.

Em 1970, Vanbreuseghem e Takashio relataram que a cepa de *C. neoformans* que Gatti e Eeckels isolaram de um paciente de 7anos do Zaire, que sofria de meningocéfale apresentava células alongadas, tanto in vivo como na cultura, sendo essa característica diferente dos isolados de *C. neoformans*, portanto classificaram esse isolado atípico como uma nova variedade, denominando de *C. neoformans* var. *gattii*. Posteriormente, em 1975, Kwon-Chung descreve os dois tipos sexuais (mating type) e aproximadamente 30 anos após, Kwon-Chung e colaboradores (2002) propõem que a variedade *gattii* seja considerada espécie devido à diferença fenotípica, estruturas sexuais diferentes, diferença genética e epidemiológica.

Ao longo desses anos com a evolução tecnológica no campo da pesquisa e devido ao crescente número de indivíduos imunodeprimidos, principalmente pela associação com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), os estudos dos agentes da criptococose têm evoluído, principalmente com o advento de novas técnicas de biologia molecular. Baseado nos resultados obtidos nas técnicas de biologia molecular tais como: DNA fingerprinting e PCR fingerprinting baseados em *microsatellite*-(M13) ou *minisatellite-specific primers*, *random amplification of polymorphic DNA analysis*, *amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis*, *restriction fragment length polymorphism (RFLP)* análises de *URA5* e *PLB1* genes, *IGS sequences*, *multigene sequence analysis*, *multi-locus sequence typing*, *multi-locus microsatellite typing* e técnicas de sequenciamento de todo o genoma, alguns autores tem utilizado o termo “Complexo *C. neoformans*” para designar os agentes da criptococose incluindo as duas espécies: *C. neoformans* and *C. gattii* (Vanbreuseghem, R., Takashio, M., 1970) e *C. neoformans* (sorotipos A,D e AD) e *C. gattii* (sorotipos B e C) (Kwon-Chung, K.J., Varma, 2006; Meyer et al. 2009; Kwon-Chung, K.J., 2011; Engelthaler et al. 2014; Morales et al. 2015), No entanto outros autores consideram o sorotipo A como *C.*

neoformans var *grubii* (serotype A) (Franzot et al. 1999). Este trabalho utilizará a classificação de duas espécies.

1.2 CRIPTOCOCOSE

A criptococose é uma micose cosmopolita, causadora de um impacto global significativo (Park et al. 2009). Os agentes desta doença são as leveduras capsuladas *C. neoformans* e *C. gattii*. É adquirida pela inalação de propágulos (basidiósporos ou leveduras desidratadas) presentes em ambientes contaminados e relacionadas a acúmulo de substratos orgânicos, tais como excretas de aves ou madeira em decomposição e restos de vegetais. Esta doença manifesta-se sob duas formas clínicas principais: 1) criptococose oportunista, que é cosmopolita, associada a condições de imunodepressão celular, causada predominantemente por *C. neoformans* e 2) criptococose primária (micose sistêmica), endêmica nas regiões Norte (Amazônia), Nordeste do Brasil incluindo o semiárido e ocorrendo mais esporadicamente nas demais regiões, acometendo crianças e indivíduos jovens, HIV-negativos (Cavalcanti, 1995) sendo causada por *C. gattii*. As duas espécies causam meningoencefalite acompanhada ou não de lesão pulmonar evidente, fungemia ou focos secundários para pele, ossos, rins, supra-renal, podendo evoluir para formas graves e fatais (Lazéra in Coura, 2005).

1.3 TAXONOMIA

Os agentes da criptococose, classificados segundo as normas de biossegurança, como classe de risco 2, estão incluídos no Reino Fungi, Filo Basidiomycota, Classe Tremellomycetes, Ordem Tremellales, Família Tremellaceae, Gênero *Filobasidiella* e espécies *neoformans* e *bacillispora* (Kwon-Chung 2011).

A forma sexuada ou teleomórfica são *Filobasidiella neoformans* (Kwon-Chung 1975) e *Filobasidiella bacillispora* (Kwon-Chung 1976 a), os basidiósporos foram observados somente *in vitro* em meios apropriados, à temperatura de 25 a 37°C, e na maioria das vezes ocorre entre células de leveduras no seu estado haplóide heterotalicas, sendo o heterotalismo controlado por sistema de um locus e dois alelos a e α (*MATa* e *MAT α*), sem a formação de basidiocarpos.

Na forma anamórfica ou assexuada estão incluídos *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) Vuillemin 1901 e *Cryptococcus gattii* Vanbreuseghem e Takashio, 1970 (DeVroey et Gattii, 1989). Apresentam-se microscopicamente como levedura haploide, capsulada, globosa ou ovalada, medindo de 3 a 8 µm de diâmetro, podendo ter brotamento único ou múltiplo a partir de qualquer ponto da parede celular. Os blastoconídios originados podem permanecer unidos à célula mãe por um colo estreito, não produzindo pseudohifas ou micélio, após três dias de incubação à temperatura de 25 a 37°C. Macroscopicamente, as colônias leveduriformes em meios como ágar Sabouraud glicose (SAB 2%), ágar extrato de malte-extrato de levedura, adquirem cor que variam de branco para creme, brilhante, textura mucóide, margem lisa e inteira (Kwon-Chung; Fell, 1987).

1.4 FISILOGIA

Os agentes da criptococose nos meios de cultura contendo substratos difenólicos é capaz de sintetizar pigmentos escuros apresentando colônia castanha. A primeira descrição deste pigmento foi relatada em 1963 por Staib em meio contendo extrato de *Guizotia abyssinica*, demonstrando que a pigmentação da colônia estava relacionada com o extrato da semente e até hoje tal meio é utilizado no diagnóstico microbiológico para distinguir a levedura. A melanina é produzida pela difenoloxidase de *Cryptococcus* spp., que é uma lacase semelhante a outras lacases encontradas nos basidiomicetos. Esta enzima é caracterizada por oxidar substratos como: difenol aromático, grupo diamino e catecolaminas nas posições orto e para, mas não em grupos monofenólicos como o fenol, tiamina ou tirosina. A atividade enzimática é inibida pela glicose em concentração superior a 0,5 %, no entanto a presença de íons de ferro e cobre estimulam a produção da melanina (Polacheck et al. 1982, Polacheck; Kwon-Chung, 1988; Polacheck, 1991; Williamson, 1994).

As leveduras de *Cryptococcus* spp. são identificadas por um conjunto de características fisiológicas e bioquímicas. São leveduras não fermentadoras de açúcares; assimilam por metabolismo oxidativo como única fonte de carbono a galactose, sacarose, maltose, trealose, D-xilose, melizitose, L-raminose, sorbitol, manitol, dulcitol, D-manitol, α -metil-d-glicosídeo, salicina, inositol, glicose e frutose. O nitrato não é assimilado como única fonte de nitrogênio inorgânico, também não sofre redução a nitrito. Hidrolisam uréia, por possuir a capacidade de produzir urease quando cultivado em meio ágar uréia de Christensen. São sensíveis à cicloheximida, não crescendo em meios nas concentrações de 0,2 a 0,5%;

embora alguns isolados cresçam em concentrações mais baixas de cicloheximida (Barnett et al. 1983).

O teste de CGB (canavanina-glicina-azul de bromotimol) é o mais usado para diferenciar as espécies *C. gattii* e *C. neoformans*. O *C. gattii* é naturalmente resistente a L-canavanina, pois a metaboliza em produtos não tóxicos, sendo então capaz de crescer no meio de CGB, onde a glicina é utilizada como única fonte de carbono e nitrogênio produzindo amônia, elevando o pH e alterando a cor do indicador de pH, azul de bromotimol, para azul cobalto ou azul esverdeado forte, originalmente o pH é 5,8 indicando a cor amarelo esverdeado. Entretanto, a grande maioria das cepas de *C. neoformans* são susceptíveis a L-canavanina e não podem assimilar a glicina como única fonte de carbono e nitrogênio, não crescendo no meio de CGB, portanto não alterando o pH, permanecendo a cor original do meio (Kwon-Chung et al. 1982b; Min; Kwon-Chung, 1986).

Outras diferenças metabólicas podem ser observadas entre as duas espécies, como a capacidade que *C. gattii* apresenta em assimilar rapidamente ácidos málico, fumárico, e succínico como única fonte de carbono (Kwon-Chung; Bennett, 1992) e ser também capaz de assimilar a D-prolina como única fonte de nitrogênio (Dufait et al. 1987; Nishikawa et al. 1996). O EDTA inibe a urease produzida por *C. gattii*, mas não por *C. neoformans* (Kwon-Chung et al. 1987).

1.5 ECOLOGIA

Cryptococcus neoformans é sapróbio cosmopolita, encontrado em vários substratos orgânicos. Tem sido estudado principalmente em ambientes urbanos, onde é clássica sua relação com habitat de diferentes espécies de aves gregárias e em catifeiro. Esses ambientes são ricos em fontes de nitrogênio, como creatinina e uréia, apresentando condições favoráveis ao crescimento abundante deste fungo (Passoni, 1998). Nestes habitats, o fungo atinge elevadas concentrações no substrato seco, constituindo microfocos, a partir dos quais propágulos se dispersam no ar e podem ser inalados, causando infecção regressiva ou doença (Kwon-Chung; Bennett, 1992).

Estudos realizados na África (Swinne et al. 1994) e no Brasil (Brito-Santos et al. 2015; Passoni, 1998) evidenciaram a presença dos agentes da criptococose na poeira domiciliar e nas amostras do peridomicílio, sugerindo que a exposição do homem ao fungo seja muito

mais frequente do que se pensa e faça parte de seu cotidiano.

Novo habitat natural foi descrito em diferentes regiões brasileiras, relacionado à madeira em decomposição em diferentes árvores tropicais, nativas ou introduzidas no Brasil, como cássia rosa (*Cassia grandis*), cássia amarela (*Senna multijuga*), ficus (*Ficus microcarpa*), jabolão (*Sygygium jabolana*), cacauero (*Theobroma cacao*), cabori (*Miroxylum peruiferum*), sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides*) (Lazéra et al. 1993, 1996, 2000, Restrepo et al. 2000; Montenegro; Paula, 2000).

1.6 EPIDEMIOLOGIA

C. neoformans é predominantemente oportunista, cosmopolita, acompanha a prevalência dos casos de condição de risco, tais como HIV/AIDS, linfomas, leucemias, lúpus eritematoso, gravidez, transplante de órgãos, câncer, sarcoidose, doenças autoimunes, diabetes e tuberculose. O uso de medicamentos imunossuppressores utilizados nestas condições demonstrou ser outro fator agravante (Lazéra *in* Coura 2005; Kronstad et al. 2012). A análise de dados realizada pelo Ministério da Saúde mostra que dos 215.810 casos de AIDS notificados no Brasil de 1980 a 2002, 6% apresentavam criptococose (Pappalardo; Melhem, 2003). Esta forma da criptococose ocorre em todas as regiões brasileiras, principalmente no Sul, Sudeste e Centro Oeste (Oliveira-Neto et al. 1993, Rozenbaum et al. 1994; Pinto 2003; Igreja et al. 2004; Fernandes et al. 2000; Casalli et al. 2003).

A letalidade para criptococose no Brasil gira em torno de 45% a 65% em casos de meningite, seja associada com AIDS, seja em indivíduos aparentemente normais. Há poucos registros de formas pulmonares, provavelmente pouco diagnosticadas, resultando em sub-notificação. Não constitui doença de notificação obrigatória. De fato, não dispomos de dados de incidência da criptococose em nosso país; os conhecimentos resultam de trabalhos fragmentados baseados em séries de casos. Apesar disso, observa-se uma tendência histórica de expansão geográfica regional e nacional. Por outro lado, é notória a ocorrência de diagnóstico tardio, sub-diagnóstico e falta de registro regular dos casos. (Pappalardo; Melhem, 2003).

Os estudos da criptococose no Brasil baseiam-se em análises retrospectivas de séries de casos, ou estudo de isolados de coleções de apoio à pesquisa, sem registro regular de dados clínicos e epidemiológicos. (Rozenbaum; Gonçalves, 1994; Santos, 2000; Nishikawa et al.

2003; Martins, 2003; Raso et al. 2004).

Segundo Albuquerque (2012) o estudo da criptococose no Brasil atualmente está em ascensão, ocupando a terceira posição na produção de publicações, que podem conduzir à descoberta de produtos e técnicas que irão contribuir para alternativas para prevenir, diagnosticar e tratar a criptococose.

1.7 FATORES DE VIRULÊNCIA

Os recursos que permitem um micro-organismo sobreviver e ampliar seu crescimento no hospedeiro são definidos como fatores de virulência. Entre os fatores de virulência conhecidos para *C. neoformans* e *C. gattii* estão: crescimento à temperatura de 37°C, cápsula de natureza polissacarídica e, produção de melanina e enzimas como fosfolipases e proteases.

A cápsula de natureza polissacarídica representa um dos importantes mecanismos de defesa da levedura contra os efeitos de proteção do hospedeiro, inibindo a fagocitose, a migração de leucócitos, alterando a expressão de citocinas e bloqueando o sistema complemento (Kozel, 1995). Mutantes hipocapsulados ou acapsulados têm sido descritos devido à mutação de genes envolvidos na síntese e na formação da cápsula polissacarídica. Esses mutantes mostraram-se menos virulentos do que as cepas normais. Além do mais, a cápsula aumenta consideravelmente de tamanho dependendo dos diferentes sítios da infecção (Chang; Kwon Chung, 1994).

As melaninas são pigmentos de alto peso molecular, possuem carga negativa, hidrofóbica, anamorfa e insolúvel em solventes aquosos e orgânicos. A síntese deste pigmento em *C. neoformans* necessita de substratos exógenos dihidroxifenólicos, em presença de oxigênio, sendo regulado por fatores como cobre, ferro e glicose (Trofa; Casadevall; Nosanchuk, 2011). As etapas das reações ocorridas para a formação de melanina em *C. neoformans* é sugerida pelo modelo de Mason-Roper, a ação da fenoloxidase, especificamente a lacase, com substratos exógenos são oxidados para sua correspondente quinona e sofrem um rearranjo espontâneo por meio de polimerização sequencial, seguida de auto-oxidação para formar o melanocromo e finalmente a melanina (Ito, 1993).

Apesar de estarem amplamente distribuídas em natureza, presentes desde as bactérias aos animais (Riley, 1997), até o momento não foi relatada uma estrutura definitiva das melaninas devido à sua insolubilidade (Nosanchuk; Casadevall, 2006). Os estudos realizados com melaninas fúngicas são realizados após as células melanizadas passarem por digestão

com enzimas proteolíticas e glicolíticas, seguidas de extração com agentes desnaturantes e ácido quente concentrado. Este tratamento permite a visualização de partículas escuras, que mantém o formato original da célula, não contendo o citoplasma e as organelas, classificadas como “fantasmas de melanina” (Wang; Aisen; Casadevall, 1996).

A melanina encontrada no complexo *Cryptococcus* está localizada na parede celular próxima à membrana, atua como um protetor celular sob variações das condições ambientais, como a exposição a radiações ultravioleta (UV), a toxinas e temperaturas extremas, bem como das ações predadora de nematóides (Eisenman et. al. 2005; Rosas; Casadevall, 1997). Por outro lado, a presença do pigmento aumenta a virulência em hospedeiros, anula a ação dos anticorpos mediadores da fagocitose e também pode interferir na sensibilidade aos antifúngicos (Zhu; Williamson, 2004).

Segundo Casadevall e Perfect (1998) *C. neoformans* tem baixa atividade proteolítica, mas as proteases contribuem para a virulência, degradando os tecidos do hospedeiro ou destruindo proteínas imunologicamente importantes. Estudos realizados por diferentes grupos demonstram que isolados de *C. neoformans*, sendo estes tanto de origem clínica como de fontes ambientais de diferentes cidades, foram fortemente positivos para a produção desta enzima (Vidotto et al. 2005; Pereira, 2006; Campos; Baroni, 2010).

As fosfolipases são produzidas e secretadas por vários micro-organismos incluindo os fungos como parte de sua virulência (Ghannoum, 2000). Dentre as cinco classes produzidas pelos micro-organismos, duas têm sido descritas como fatores de virulência em *C. neoformans*, a fosfolipase B e C, em que são secretadas no meio extracelular e hidrolisam fosfolípideos do hospedeiro (Cox et al. 2001; Siafakas et al. 2006). Essas enzimas desestabilizam a membrana celular e facilita a adesão da levedura às células do hospedeiro.

Vários estudos identificaram a prevalência da atividade de fosfolipases nos isolados estudados, como Vidotto et al. (1998), que as identificou em isolados de pacientes com AIDS, assim como em isolados de *C. neoformans* em fezes de pombos e de outras aves (Baroni, 2001; Pereira, 2006).

1.8 COLEÇÕES DE CULTURA

A primeira coleção de cultura de micro-organismo foi criada pelo Dr. Frantisek Král na Universidade Alemã de Praga, por volta de 1890, que fornecia e distribuía culturas puras

para estudos comparativos e identificação de bactérias patogênicas (Spencer-Martins, 1994; Uruburu, 2003). Nas quatro primeiras décadas do século 20 outras coleções de cultura surgiram na Europa, Estados Unidos e Japão, como a CBS “Centraalburau voor Schimmelcultures”, fundada em 1906 na Holanda e a ATCC “American Type Culture Collection”, fundada em 1925 em Washington, mas atualmente está localizada em Manassas, Virgínia, com a finalidade de conservar e fornecer material de referência para estudos taxonômicos e monitoramento epidemiológico. Segundo o Centro Internacional de Dados da Federação Mundial de Coleções de Cultura (WDCM) existem 625 coleções de culturas registradas distribuídas em 71 países.

Ao longo desses anos estas coleções passaram por evolução devido aos avanços nas áreas da microbiologia industrial, biotecnologia e biologia molecular. Por outro lado, esses avanços não ocorreram de forma simultânea nos países em desenvolvimento, incluindo o Brasil, em função da ausência de políticas adequadas para o setor, recursos limitados e falta da demanda industrial qualificada. A partir da década de 90, as coleções brasileiras iniciaram mudanças de cunho político, regulatório e tecnológico, que perduram até o momento, surgindo novas demandas a serem superadas (Vazoller; Canhos, 2005).

Coleções de culturas microbianas são centros de conservação *ex situ* da biodiversidade e têm como função primária de preservar e disponibilizar organismos relevantes para a pesquisa científica, particularmente estudos taxonômicos e epidemiológicos, bem como fornecer linhagens para aplicações tecnológicas e atividades de ensino. Para tanto, a preservação e a manutenção de cultivos devem ser realizados de forma a garantir a sobrevivência, viabilidade do micro-organismo, assim como a conservação das propriedades morfológicas, fisiológicas, características genéticas e a pureza dos isolados durante períodos prolongados (Abreu; Tutunji, 2005; Canhos et al. 2007). Os materiais biológicos preservados nestas coleções podem ser matéria-prima para obtenção dos mais variados produtos biotecnológicos, incluindo fármacos, alimentos, bebidas alcoólicas e ácidos orgânicos. São também utilizados no saneamento ambiental, notadamente nas práticas avançadas de biorremediação de resíduos tóxicos. Na agricultura, os micro-organismos são importantes na fixação biológica do nitrogênio e no controle biológico de pragas. Culturas puras obtidas de coleções de referência são utilizadas em atividades de ensino, estudos taxonômicos, identificação de patógenos, controle epidemiológico de doenças infecciosas, produção de kits para diagnóstico e testes de controle de qualidade de produtos e materiais. Portanto, o material biológico preservado por métodos adequados em coleções de culturas tem um papel estratégico e ampla gama de aplicações nas áreas de saúde, pesquisa, agropecuária e indústria.

O Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) preserva há 25 anos os isolados provenientes de espécimes clínicos e de coletas domiciliares/ambientais dos pacientes atendidos no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, atual INI, com o objetivo de desenvolver as pesquisas para mestrado e doutorado dos funcionários e alunos. A partir do reconhecimento do Laboratório de Micologia como Laboratório de Referência, o número de isolados e conseqüentemente das pesquisas foram gradativamente aumentando, gerando assim uma maior demanda nos procedimentos para conservação. Somente em 2009 a coleção obteve reconhecimento institucional, sendo denominada como Coleção de Fungos Patogênicos (CFP) e registrada na WFCC cadastrada como WDCM 951.

Esta coleção é constituída por leveduras e fungos filamentosos patogênicos para o homem e animais. A CFP mantém isolados de origem clínica não somente dos pacientes do INI, mas de outras unidades de diferentes estados do Brasil que são enviadas através do Serviço de Referência, bem como obtidas de amostras ambientais de diferentes habitats ou microfocos provenientes de várias regiões brasileiras; preserva também isolados provenientes de projetos de pesquisa e fornece-os a instituições externas à Fiocruz seguindo procedimentos padronizados.

1.9 MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO

A preservação de micro-organismos é um processo complexo em virtude do escasso conhecimento sobre as reações e modificações morfológicas que ocorrem em condições de armazenamento. Estes problemas têm incentivado o desenvolvimento de pesquisas em virtude da importância que algumas espécies vêm adquirindo no campo das doenças infecciosas, na área ambiental, veterinária e no reconhecimento da importância da biodiversidade microbiana. Desta forma, estudos têm conduzido ao aprimoramento de técnicas destinadas à conservação de diversas espécies de micro-organismos (Girão et al. 2004; Holland et al. 2003).

As metodologias de preservação buscam manter a estabilidade genética, as características morfológicas, metabólicas, antigênicas, de patogenicidade, virulência e a viabilidade das culturas (Smith; Ryan, 2003). A escolha de uma técnica para conservação depende das particularidades do agente, das características do método, dos custos de manutenção, da importância do acervo e, principalmente, da disponibilidade de equipamentos

(Abreu; Tutunji, 2005; Girão et al. 2004).

Os métodos utilizados para a manutenção de micro-organismos estão classificados como: método de curto prazo (repiques periódicos), métodos de médio prazo (imersão em óleo mineral estéril, água destilada estéril, areia ou solo, em sílica gel e congelamento na faixa de -4°C a -20°C) e métodos de longo prazo (criopreservação em temperaturas ultra-baixas, -80°C e -196°C , e liofilização).

1.9.1 Método de curto prazo: repique periódico

O repique contínuo é um método simples, de baixo custo, não necessita de reativação, não provoca injúria celular e não necessita de equipamentos sofisticados. A metodologia é considerada como a mais antiga e tradicional na manutenção de culturas em um laboratório de preservação, onde realiza a transferência periódica da cultura para outro tubo de ensaio com novo meio de cultura. Dentre as desvantagens desta metodologia estão: crescente risco de contaminação devido as constantes manipulações da cultura para realizar os repiques periódicos, alterações e/ou perdas das características genéticas provenientes da intensa multiplicação celular, necessidade de espaço físico maior para armazenamento das culturas e logística quanto ao transporte (Costa; Ferreira, 1991).

Segundo Girão (2004), a idade das culturas interfere de forma significativa neste método de preservação, porque culturas velhas tendem a produzir “culturas-filhas” alteradas tanto morfológica como fisiologicamente. Além do risco de comprometimento da estabilidade genética, da perda da patogenicidade ou virulência, mesmo permanecendo viável, por isso a necessidade de verificação periódica das características de cada cepa.

1.9.2 Métodos de médio prazo

1.9.2.1 Preservação em óleo mineral estéril

Este método consiste na aplicação de aproximadamente um centímetro de óleo mineral estéril sobre uma cultura de micro-organismo com a finalidade de limitar a quantidade de oxigênio disponível, ocasionando uma redução no metabolismo e, conseqüentemente, na taxa

de multiplicação do agente. A preservação por esta técnica proporciona uma maior longevidade às cepas, quando comparada ao repique periódico. Entretanto, apresentam desvantagens equivalentes à técnica do repique periódico, como a possibilidade de contaminações, instabilidade genética e dificuldades com a utilização do óleo, sua esterilização e manuseio (Canhos; Umino; Manfio, 2004; Costa; Ferreira, 1991).

Estudos indicam que as bactérias podem ser preservadas por um período de um a sete anos dependendo da espécie, enquanto que os fungos sobrevivem de um a cinco anos, sendo que para as leveduras, sobrevivem por até sete anos (Costa; Ferreira, 1991).

1.9.2.2 Preservação em água destilada estéril

Esta técnica é também conhecida como método de Castellani, o método é baseado na transferência de blocos de ágar contendo micro-organismos para um frasco com água destilada estéril, que visa atingir um estágio de hipobiose, com a diminuição do metabolismo e formação do estado latente da célula diante da restrição de fontes nutritivas (Costa; Ferreira, 1991; Abreu; Tutunji, 2005). Apresenta como vantagem o baixo custo, ausência de contaminação por ácaros e pode ser empregada por um grande número de gêneros de fungos e leveduras. E como desvantagem a aplicação desta técnica é restrita a micro-organismos que tenham aderência ao ágar e a necessidade de espaço físico para acondicionar os frascos (Abreu; Tutunji, 2005; Passador et al. 2010).

1.9.2.3 Preservação por Congelamento

A preservação de micro-organismos em temperaturas entre -4 e -20°C apresenta-se como um dos métodos de manutenção mais simples e baratos, além de oferecer boa segurança para o armazenamento de diversos micro-organismos por períodos de alguns meses a dois anos (Tortora; Funke; Case, 2011). A desvantagem do método é a possibilidade de redução da viabilidade de algumas cepas em função dos danos causados às células decorrentes da formação de cristais de gelo e da variação eletrolítica na faixa de temperatura utilizada.

1.9.2.4 Preservação com areia, solo ou sílica gel

Estes métodos consistem basicamente na inoculação do micro-organismo em areia, solo ou sílica gel estéril e posterior secagem. São considerados métodos simples e rentável em curto prazo (10 anos) para as preservações em areia ou solo, já para a sílica em gel é considerada rentável por 25 anos. Dentre as vantagens estão: degeneração da cultura se a umidade for alta, risco de mutações genéticas e a toxicidade do gel de sílica (Smith et al 2001).

1.9.3 Métodos de longo prazo

1.9.3.1 Criopreservação

Esta metodologia tem a finalidade de manter em criotubos uma variedade de tipos celulares sob baixas temperaturas -20°C a -80°C em freezers, e a ultra-baixas temperaturas -150°C a -196°C em containeres de nitrogênio líquido (Wolfe; Bryant, 2001; Paoli, 2005).

A eficácia desta técnica está interligada a uma série de fatores como, a espécie do micro-organismo, tamanho e estrutura celular, a fase e a taxa de desenvolvimento, a temperatura de incubação, a composição do meio de cultura, o pH, a osmolaridade e aeração, a taxa de resfriamento, a temperatura e o tempo de estocagem, a taxa de aquecimento e o meio de recuperação (Costa et al. 2009).

Como vantagem da utilização da criopreservação está na capacidade de recuperar maior quantidade de células viáveis, redução das mutações genéticas e a praticidade na aplicação da técnica, assim como na recuperação das cepas (Abreu; Tutunji, 2005; Costa et al., 2009).

Assim como em qualquer outra técnica de preservação, a criopreservação também possui suas desvantagens, como os possíveis danos a membrana celular, ocasionado principalmente pelo comportamento da água presente no processo. A água congelada expande-se ao cristalizar e no processo de fusão tende a recrystalizar e aglutinar, formando longos e protuberantes cristais de gelo, capazes de provocar uma série de danos mecânicos, bioquímicos e osmóticos à célula (Carvalho, 2007).

Outra desvantagem da criopreservação é a crioinjúria, um evento letal, onde a solução

extracelular apresenta maior volume que a intracelular. Portanto, o congelamento extracelular pode ocorrer primeiro e 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 fluxo de água para fora da célula. A alta concentração intracelular inibe a formação de gelo, contudo a desidratação e a elevada concentração de íons podem ser severas o bastante para causar danos (Wolfe; Bryant, 2001; Hubalek, 2003).

Contudo, a formação de cristais de gelo e o mecanismo de efluxo da água são os responsáveis por danos irreversíveis à membrana e a morte celular. Por isso, a necessidade do cuidado com as variações de temperatura empregadas no processo de resfriamento e congelamento de materiais biológicos, que podem ser minimizadas com a utilização dos crioprotetores (Hubalek, 2003).

1.9.3.2 Liofilização

A liofilização é uma metodologia de preservação que está baseada na remoção da água intracelular de materiais biológicos congelados por sublimação. É constituída por três etapas: congelamento, desidratação primária e desidratação secundária (Morgan et al. 2006).

O congelamento promove a inércia do micro-organismo a ser liofilizado, gerando uma interrupção das reações químicas e atividades biológicas. Nesta fase a suspensão líquida é resfriada com a formação de cristais de gelo, conforme o processo de congelamento avança gradativamente a água contida no líquido congela, aumentando assim a concentração do líquido remanescente. Assim, a suspensão torna-se mais concentrada, a viscosidade aumenta, induzindo a inibição de nova cristalização. Esse líquido altamente concentrado e viscoso, solidifica, produzindo uma fase amorfa, cristalina ou amorfo-cristalina combinada. Esta etapa é a mais crítica do processo, devido a formação de cristais de gelo, que são capazes de gerar danos às estruturas celulares, degradar as enzimas presentes no citosol e consequentemente levar a morte dos micro-organismos (Morgan et al. 2006; Paoli, 2005; Costa et al. 2009).

A desidratação primária consiste na retirada de 90%, aproximadamente, da água do produto a ser liofilizado. Esta remoção ocorre por sublimação sob-vácuo e a velocidade de secagem na liofilização é lenta, sendo em média de 0,001°C a 0,006°C por segundo (Paoli, 2005; Costa et al. 2009).

Na secagem secundária ocorre à remoção da água absorvida pelo produto, que não se

separou do gelo durante o congelamento e, conseqüentemente não sublimou. A água não congelada deve ser adsorvida na superfície do produto cristalino, porque a sua presença pode causar a rápida decomposição do produto, quando estocado à temperatura ambiente. Esta secagem deve ser rápida para não danificar o produto e somente após esta etapa é que os frascos e/ou as ampolas devem ser fechados sob vácuo (Paoli, 2005; Costa et al. 2009).

Fatores como umidade, temperatura, oxigênio, luz e contaminantes são descritos como influenciadores do tempo de viabilidade das cepas preservadas por liofilização, por isso é imprescindível que o material liofilizado seja armazenado de forma que fiquem protegidos desses fatores (Morgan et al. 2006).

A liofilização tem como vantagens: ser aplicável à maioria dos micro-organismos, manter alta estabilidade do material conservado por longo período, com baixa taxa de mutação e contaminação, não requer monitoramento nem manutenção frequente, ocupa pouco espaço para armazenamento e praticidade de transporte para longas distâncias, pois não há necessidade de refrigeração. Por outro lado, as desvantagens são: pode causar danos celulares, alterar a permeabilidade da membrana celular, levando ao aumento da sensibilidade e alguns agentes seletivos, aumentar a multiplicação celular na fase de latência e a necessidade de incremento nutricional, custo do equipamento e recursos humano especializado (Abreu; Tutunji, 2005; Canhos et al. 2004; Morgan et al. 2006).

1.9.4 Crioprotetores

Os agentes crioprotetores são utilizados nas técnicas de preservação, principalmente nas que possuem etapa de congelamento, com a finalidade de reduzir o estresse físico e químico originado no congelamento e no descongelamento das células (Smith; Ryan, 2012; Kurtzman et al. 2011)

A classificação mais tradicional dos crioprotetores é baseada na capacidade de penetração em materiais biológicos, sendo denominados: crioprotetores penetrantes ou intracelulares e crioprotetores não penetrantes ou extracelulares (Hubalek, 2003).

A propriedade de um crioprotetor penetrante é a de realizar ligações com as moléculas de água, minimizando a formação e o tamanho dos cristais de gelo, assim como reduzindo as concentrações de soluto tanto no meio extracelular quanto no intracelular. Substâncias como metanol, etilenoglicol, propilenoglicol, dimetilformaldeído, metilacetamida, DMSO e glicerol,

estão classificadas como crioprotetores penetrantes (Hubalek, 2003).

Já os crioprotetores não penetrantes ou extracelulares induzem o aumento da osmolaridade do meio externo, gerando a passagem da água do interior da célula para o meio extracelular, evitando 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. As substâncias classificadas para este tipo de crioprotetor são: mono, oligo, e polissacarídeos, manitol, sorbitol, dextrana, metilcelulose, polietilenoglicol entre outros (Hubalek, 2003).

Apesar das propriedades das substâncias crioprotetoras como, elevação da permeabilidade da membrana celular, diminuição do ponto de congelamento da água e de fluidos biológicos, redução da concentração de sais dissolvidos para evitar o choque osmótico, proteção dos micro-organismos e suas proteínas contra desidratação, destruição térmica e radiação; essas substâncias não permitem a sobrevivência de todas as células, pois podem apresentar efeitos tóxicos devido a concentração do crioprotetor utilizado, bem como, do tempo de exposição da célula ao mesmo (Hubalek, 2003; Oliveira; Sette; Fantinatti-Garboggini,2006).

2. JUSTIFICATIVA

A Coleção de Fungos Patogênicos do INI/FIOCRUZ possui atualmente cerca de 300 isolados de *Cryptococcus* spp de interesse médico, veterinário e epidemiológico, sendo os métodos utilizados para a preservação desses isolados a liofilização e criopreservação à -70°C, conforme recomendam as diretrizes dos manuais elaborados pela OECD, pois garantem a viabilidade por períodos prolongados de tempo, além de minimizar os riscos de contaminação e alterações fenotípicas e genéticas (Sette et al. 2007; Cavalcante et al. 2007; OECD, 2007). Entretanto, há relatos mencionando possíveis mudanças, antes e após o processo de liofilização, nas características morfológicas e por consequência na viabilidade do fungo (Figueiredo, 2001; Paoli, 2005; Voyron et al. 2009) demonstrando que, são necessários estudos para verificação da viabilidade.

Há carência de publicações sobre a questão da análise da viabilidade celular antes e após a utilização de metodologias de preservação (-70°C e liofilização) dos agentes da criptococose. Usualmente, a produção de biomassa para a preservação é realizada em meios não indutores da produção de melanina. No entanto, face ao papel protetor celular reconhecido deste fator de virulência encontrado caracteristicamente neste agente, consideramos de interesse incluir uma variação da metodologia do cultivo utilizando meio indutor da produção deste pigmento. Portanto, a necessidade de realizar estudos para determinação de metodologias mais eficazes a serem aplicadas na Coleção de Fungos Patogênicos do INI/FIOCRUZ tendo como alvo inicial *C. neoformans*, não só pela importância, mas também pelo grande número de isolados preservados nesta coleção.

3. ASPECTOS ÉTICOS

O Comitê de Ética em Pesquisa do INI/Fiocruz considerou desnecessária a submissão do projeto em 11 de setembro de 2013. (ANEXO I).

4. OBJETIVO

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da melanina como protetora da viabilidade celular de *C. neoformans* submetidos a dois métodos de preservação: criopreservação a -70°C e liofilização.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o crescimento em cultivo de *C. neoformans* com produção de melanina em isolados preservados pelos métodos de criopreservação a -70°C e de liofilização.
- Verificar o crescimento em cultivo de *C. neoformans* sem produção de melanina em isolados preservados pelos métodos de criopreservação a -70°C e de liofilização.
- Comparar a viabilidade das cepas de *C. neoformans* com e sem a produção de melanina preservados pelos métodos de criopreservação a -70°C e de liofilização.

5. METODOLOGIA

5.1 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

Neste estudo foram analisados 31 isolados de *C. neoformans* do período de outubro de 2011 a julho de 2014, sendo 18 isolados de pacientes atendidos no ambulatório do INI onde suas amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Micologia e 4 isolados de pacientes do Distrito Federal encaminhadas pelo Lacen à CFP/INI para identificação e depósito. Estes isolados foram obtidos a partir de 21 amostras de líquido, 6 hemoculturas, 1 urina, 1 lavado broncoalveolar, 1 escarro induzido e 1 aspirado de medula óssea (Figura 1).

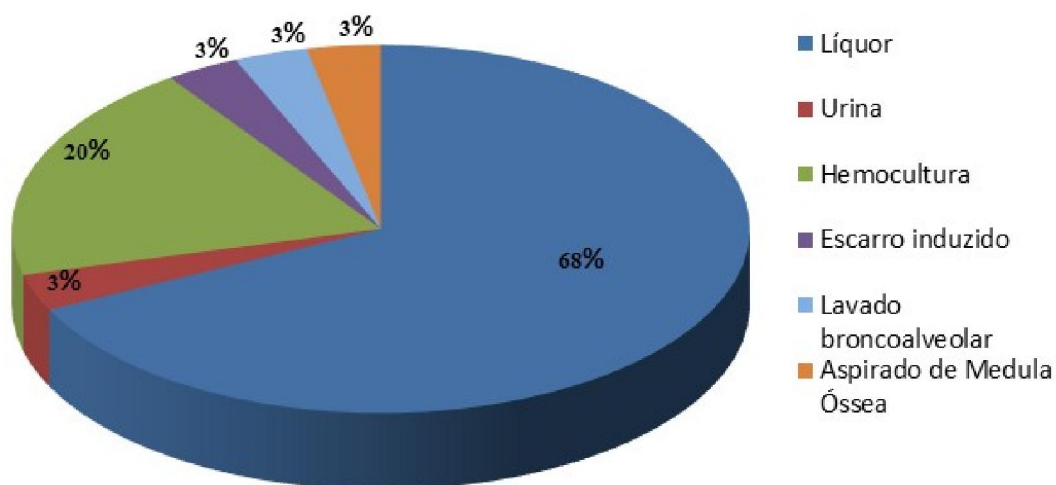


Figura 1: Gráfico de setores ilustrando as diferentes origens das amostras clínicas utilizadas no estudo.

Inicialmente, cada isolado foi inoculado em meio ágar Sabouraud 2% de glicose (SAB 2%) (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD 21152 USA. 38800) e incubados em estufas bacteriológicas a 28°C por 48 h. Posteriormente cada isolado foi submetido aos seguintes testes para determinar sua espécie:

1. Produção de fenoloxidase: os isolados foram semeados em placas de Petri contendo meio ágar semente de Níger (ASN) e incubados a 28°C durante 72 h, para verificar a produção de pigmento tipo melanina a partir de compostos orto e para-difenóis presentes neste meio. A observação de colônia com coloração marrom claro a escuro, fenoloxidase positiva, induz a identificação presuntiva das duas espécies de *C.spp.* (Staib; Seeliger, 1966) (Figura 2)

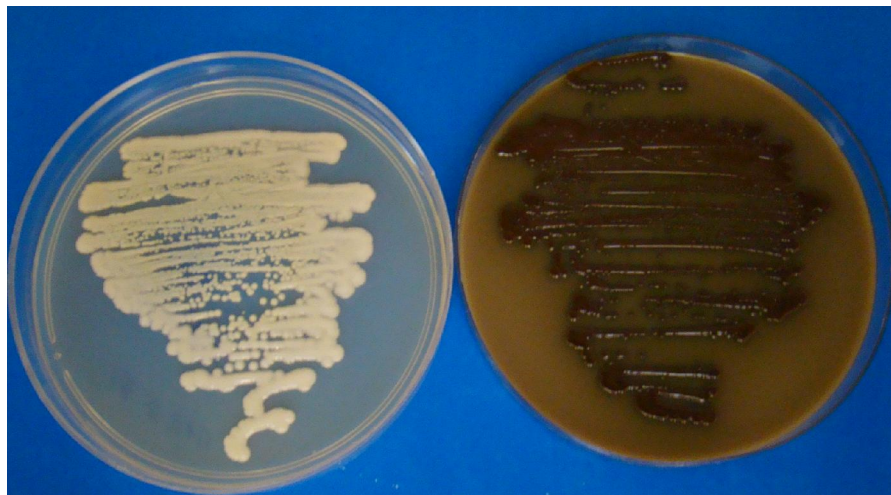


Figura 2: Cultivo de *C.neoformans* nos meios de cultura: ágar Sabouraud 2% de glicose (placa da esquerda) e no meio ágar semente de níger (placa da direita).

2. Identificação bioquímica: Método comercial automatizado Vitek 2 YST (bioMérieux, Inc., Durham, USA) foi utilizado na identificação. A partir do cultivo em SAB 2% a 28°C por 48 h foi preparado uma suspensão em solução salina a 0,45% pH 4,5, próprio para uso no Vitek 2, com turvação ajustada ao padrão 2.0 da escala de McFarland, usando o *DensiCheck*TM Vitek[®]2. Essa suspensão foi utilizada para inocular o cartão YST de acordo com as instruções do fabricante descritas no manual do aparelho ViteK 2. (INFORMAÇÃO, 2008). Após 24 h, o resultado foi emitido, identificando os isolados.

3. Confirmação da espécie *C. neoformans* em meio Canavalina-Glicina-Azul de Bromotimol (CGB): para confirmar a identificação de *C. neoformans* utilizou-se o meio CGB com incubação a 28°C durante cinco dias. O meio CGB tem pH $5,8 \pm 0,1$ e apresenta-se com uma coloração amarelo-esverdeada, que muda para azul cobalto quando há alcalinização do meio pelo aumento do pH resultante da hidrólise da glicina, devido ao crescimento do micro-organismo. Os isolados *C. neoformans* não são capazes de assimilar a glicina e são sensíveis a

L-canavanina, não crescendo no meio de CGB, mantendo a cor original do meio (amarelo-esverdeada), enquanto que *C.gattii* é capaz de crescer neste meio que passa a ter coloração azul cobalto. (Klein et al. 2009).

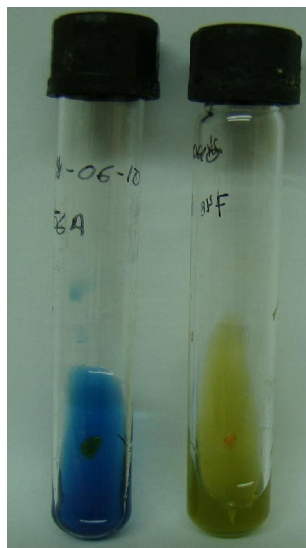


Figura 3: Cultivo em meio Canavalina-Glicina-Azul de Bromotimol (CGB). *C.neoformans* (tubo do lado direito- amarelo esverdeado) e *C.gattii* (tubo do lado esquerdo –azul cobalto).

5.2 OBTENÇÃO DE BIOMASSAS

Posteriormente à identificação dos isolados como *C. neoformans*, foi realizado repique de cada cepa, em tubos 15x160 mm, contendo ágar Sabouraud 2%. Após incubação a 28°C por 48 h, preparou-se uma suspensão com água destilada estéril a 3.0 da escala de McFarland de cada cepa. A partir dessa suspensão 100µL foram inoculados em quatro tubos de 25X200 mm, contendo os três meios de cultura utilizados neste estudo, sendo dois meios diferentes para a produção de melanina, ASN e o meio mínimo(MM) que é quimicamente definido (Shaw,C.E., Kapica, L. 1972) constituído: 15 mM glicose (Sigma Aldrich CO., St.Louis, MO), 10mM MgSO₄.7H₂O (E.MercK, Darmstadt), 29,4 mM KH₂PO₄(Vetec Química Fina LTDA, Distrito Industrial de Duque de Caxias, RJ), 13mM glicina (Sigma Aldrich CO., St.Louis, MO), 3,0µM Tiamina (Sigma Aldrich CO., St.Louis, MO), 1,0 mM L-Dopa (Sigma Aldrich CO., St.Louis, MO) com pH 5.5, e o meio SAB 2%, no qual não é observado a produção de melanina.

Após inoculação, os tubos contendo o meio MM foram incubados à 28°C por 5 dias protegidos da luz, devido a sensibilidade do composto L-dopa, enquanto que os tubos contendo os meios ASN e SAB incubou-se a 28°C por 3 dias e 2 dias, respectivamente (figura 4).

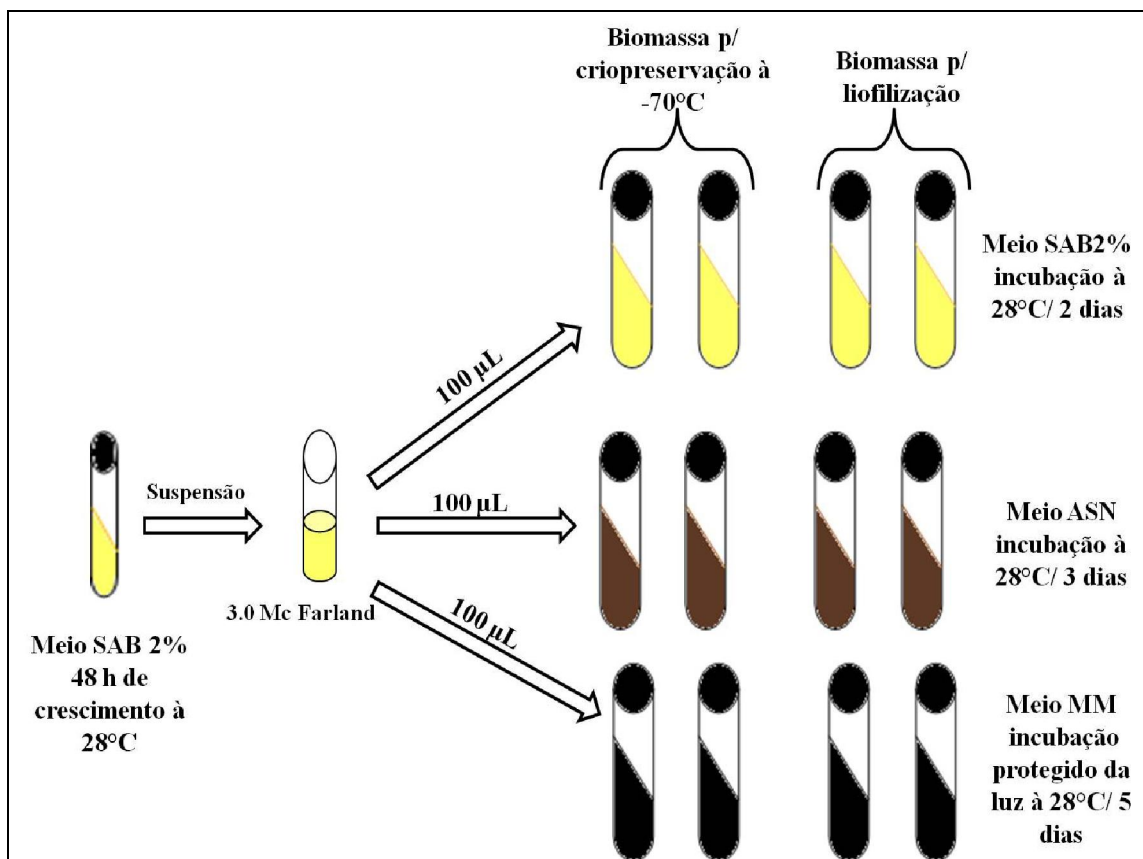


Figura 4: Esquema ilustrativo do preparo das biomassas nos meios de cultura Ágar Sabouraud 2% de glicose (SAB2%), Ágar Semente de Níger (ASN) e Meio Mínimo com L-Dopa (MM).

5.3 PRESERVAÇÃO

5.3.1 Criopreservação a -70°C

Em cada tubo com biomassa de *C. neoformans* nos meios SAB 2%, ASN e MM foi adicionado 2,5mL de glicerol a 15% (Sigma-Aldrich). Com o auxílio da pipeta foi preparado

uma suspensão de glicerol com a biomassa, que foi transferida para um Erlenmeyer de 25 mL. Após homogeneização, 500 μ L da suspensão foi transferida para 15 criotubos, e em seguida os tubos foram colocados no ultra-freezer à -70°C .

5.3.2 Liofilização

Em dois tubos de cultura com biomassa de *C. neoformans*, com e sem produção de melanina, foi adicionada uma suspensão com 5mL de Skim Milk a 20% (Difco™, Becton, Dickinson and Company), com o auxílio da pipeta foi preparada uma suspensão do skim Milk com a biomassa. Foram colocados 500 μ L da suspensão de biomassa em frascos tipo o de penicilina de 2,5 mL; em seguida, colocou-se a tampa de borracha, apropriada para o frasco utilizado no processo de liofilização, não fechando-o totalmente, permitindo a saída da água sublimada. Os frascos foram armazenados durante a noite à -70°C . Após esse período, os frascos foram colocados no liofizador (LIOTOP 101) por aproximadamente 20 h e fechados pelo sistema de prensa, fechando completamente os frascos sob vácuo, lacrados e posteriormente armazenados a -20°C . Após 15 dias, foi realizado o teste de vácuo dos frascos com pistola detectora de vácuo (Buckleys- UVRAL LTD, Range Road, Hythe, Kent CT 21 6HG).

5.4 TESTE DE VIABILIDADE E PUREZA

5.4.1 Pré preservação

A partir das suspensões homogeneizadas obtidas dos diferentes meios de cultura a serem preservados pelos métodos de liofilização e criopreservação, foi inoculada uma gota na superfície da placa de Petri contendo os meios de cultura SAB 2% e ASN e estriada por esgotamento para verificar a pureza da suspensão da biomassa. Dessas suspensões, uma alíquota de 100 μ L foi transferida para tubos de ensaio com 9,9 mL de água destilada estéril, equivalendo a diluição 10^{-2} . A partir desse tubo, realizou-se diluições seriadas (10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6}) e 100 μ L das diluições 10^{-4} e 10^{-5} foram inoculadas em uma placa de Petri com meio

SAB 2%, sendo que a diluição 10^{-6} foi inoculada em triplicata; para realizar a análise das mediana, devido proporcionar neste fator de diluição uma melhor contagem das UFCs; posteriormente com uma alça de Drigalski, o inóculo foi espalhado na superfície do meio. As placas foram incubadas à 28°C por 48 h para posterior contagem das unidades formadoras de colônia (UFC/ mL).

O procedimento descrito acima foi realizado para todas as cepas utilizadas neste estudo.

5.4.2 Pós Preservação

5.4.2.1 Criopreservação a -70°C

De cada cepa, preservada a -70°C , foram retirados 3 criotubos, um de cada meio de cultura utilizados neste estudo, após os períodos de 30, 60 e 90 dias de preservação, os tubos foram descongelados à temperatura ambiente. Após o descongelamento, os mesmos foram homogeneizados e os procedimentos realizados foram descritos no item pré-preservação (4.4.1).

5.4.2.2 Liofilização

De todos os isolados liofilizados retirou-se do freezer a -20°C um frasco com líófilo de cada meio de cultura utilizado neste estudo (SAB %, ASN e MM), após os períodos de 30, 60 e 90 dias de preservação. O lacre de cada frasco foi retirado com o auxílio de uma tesoura previamente limpa com álcool 70% e gaze estéril, foi adicionado 500 μL de água purificada estéril para a hidratação do líófilo ficando em repouso por 30 minutos. Após a hidratação, os procedimentos realizados foram descritos no item pré-preservação (4.4.1).

5.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de dados foi realizada pelo software Excel 2007 e pelo software *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versão 16.0. O teste de normalidade de Shapiro-Wilk indicou rejeição da normalidade das variáveis estudadas, indicando a utilização de testes não-paramétricos. Para verificar o comportamento das unidades formadoras de colônia com e sem produção de melanina antes da preservação (T0) e após três meses de preservação (T1) pelo método de congelamento à -70°C e liofilização foi realizada a análise das medianas, mínimos e máximos e o *p-valor* calculado a partir da aplicação do teste de Wilcoxon. *p*-valores <0,05 indicaram diferenças estatisticamente significantes.

6. RESULTADOS

Neste estudo foram analisados 31 isolados de *C. neoformans* de origem clínica, com crescimento em meio de cultura que não induzem a produção de melanina (SAB 2%) e em dois meios de cultura indutores de melanina (ASN e MM). Os 31 isolados foram caracterizados como *C. neoformans* após testes de identificação. Estas cepas foram submetidas aos métodos de preservação por criopreservação a -70°C e liofilização, e encontram-se estocadas na Coleção de Fungos Patogênicos do INI/Fiocruz (tabela 1).

Tabela 1: Resultado dos testes de identificação realizados nas 31 cepas de *Cryptococcus* spp de origem clínica, provenientes dos pacientes do ambulatório do INI/Fiocruz e Lacen/DF, no período de outubro de 2011 a julho de 2014.

CFP ^a	Espécime Clínico	Fenoxidase	VITEK 2	CGB ^b
00496	Líquor	Positiva	C.neoformans	Negativo
00497	Líquor	Positiva	C.neoformans	Negativo
00498	Urina	Positiva	C.neoformans	Negativo
00499	Líquor	Positiva	C.neoformans	Negativo
00500	Líquor	Positiva	C.neoformans	Negativo
00521	Líquor	Positiva	C.neoformans	Negativo
00522	Líquor	Positiva	C.neoformans	Negativo
00523	Líquor	Positiva	C.neoformans	Negativo
00524	Hemocultura	Positiva	C.neoformans	Negativo
00525	Hemocultura	Positiva	C.neoformans	Negativo
00526	Líquor	Positiva	C.neoformans	Negativo
00527	Hemocultura	Positiva	C.neoformans	Negativo
00528	Hemocultura	Positiva	C.neoformans	Negativo
00529	Líquor	Positiva	C.neoformans	Negativo
00530	Líquor	Positiva	C.neoformans	Negativo
	Escarro			
00531	Induzido	Positiva	C.neoformans	Negativo
00533	Líquor	Positiva	C.neoformans	Negativo
00534	Hemocultura	Positiva	C.neoformans	Negativo
	Lavado			
00535	broncoalveolar	Positiva	C.neoformans	Negativo
00536	Líquor	Positiva	C.neoformans	Negativo
00537	Líquor	Positiva	C.neoformans	Negativo
00538	Líquor	Positiva	C.neoformans	Negativo
00539	Líquor	Positiva	C.neoformans	Negativo
00540	Líquor	Positiva	C.neoformans	Negativo
00541	Líquor	Positiva	C.neoformans	Negativo
00542	Hemocultura	Positiva	C.neoformans	Negativo
	Aspirado de			
00544	medula óssea	Positiva	C.neoformans	Negativo
00546	Líquor	Positiva	C.neoformans	Negativo
00547	Líquor	Positiva	C.neoformans	Negativo
00548	Líquor	Positiva	C.neoformans	Negativo
00549	Líquor	Positiva	C.neoformans	Negativo

^a CFP: Coleção de fungos Patogênicos (número de identificação)

^b CGB: Canavalina-glicina-Azul de Bromotimol

6.1 Análise das cepas preservadas por criopreservação à -70°C

Na análise das medianas das UFC das 31 cepas criopreservadas à -70°, no tempo T0 e T1, usando meios SAB 2%, e MM obteve-se *p-valores* significativos de acordo com a mediana, no entanto para o meio ASN o *p-valor* obtido não foi estatisticamente significativo (tabela 2, figura 5). O que significa que o ASN foi o melhor meio para preservação dos isolados, com menor perda celular após a preservação.

Comparando o meio SAB 2% com o ASN e o meio MM foi observado que a perda de UFC é estatisticamente significativa (*p-valor* < 0,05), porém quando comparamos ASN e MM foi observado que a perda de UFC não é estatisticamente significativa (*p-valor* 0,673), o que demonstra que os meios indutores de melanina conservaram melhor as UFC.

Tabela 2: Análise antes da preservação (T0) e após três meses de preservação (T1) das unidades formadoras de colônia das 31 cepas de *C. neoformans* criopreservadas a -70°C em SAB 2%, ASN e MM.

Meio de Cultura	Mediana (min-max)		<i>p-valor</i> ^a
	T0 ^b	T1 ^c	
Ágar Sabouraud 2%	62 (2-99)	37 (3-79)	0,001
Ágar Semente de Níger	34 (11-59)	31 (11-49)	0,112
Meio Mínimo com L-Dopa	38 (11-82)	33 (9-85)	0,002

^a*p-valor* calculado pelo teste de Wilcoxon; ^b mediana contagem das UFC/mL antes da preservação; ^c mediana contagem das UFC/mL com 90 dias de preservação.

6.2 Análise das cepas preservadas por liofilização

Conforme pode ser verificado na tabela 3, os *p-valores* apresentaram estatisticamente significância de acordo com as medianas das unidades formadoras de colônia das 31 cepas de *C. neoformans*, que foram submetidos à liofilização nos meios de cultura SAB 2%, ASN e MM, antes e após três meses de liofilização (figura 6), demonstrando que nos três meios ocorreu perda celular significativa após preservação.

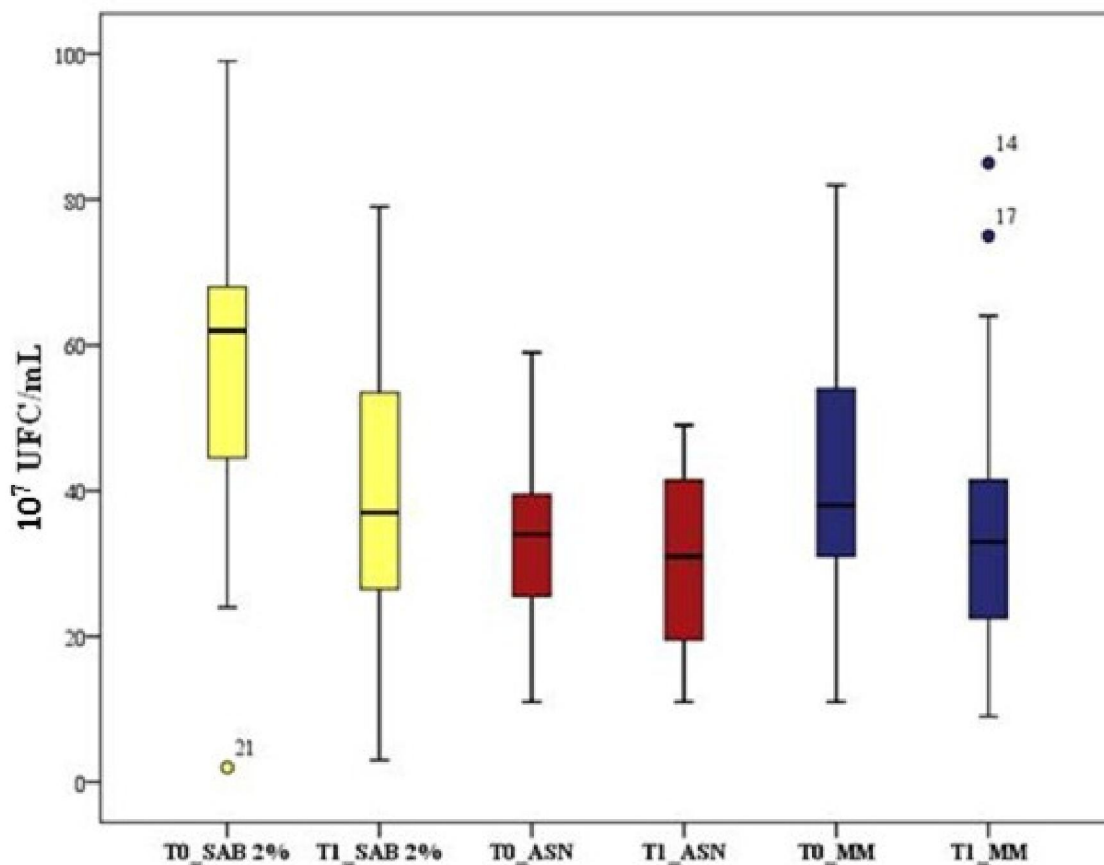


Figura 5 Box Plot da contagem das UFC das 31 cepas antes da preservação (T0) e após três meses de preservação (T1) por criopreservação à -70°C nos meios: ágar Sabouraud 2% de glicose (SAB 2%), ágar Semente de Níger (ASN) e Meio Mínimo com L-Dopa (MM).

Tabela 3: Análise da contagem antes da preservação (T0) e após três meses de preservação (T1), das unidades formadoras de colônias das 31 cepas liofilizadas de *C. neoformans* nos meios SAB 2%, ASN e MM.

Meio de Cultura	Mediana (min-max)		<i>p</i> -valor ^c
	T0 ^a	T1 ^b	
Ágar Sabouraud 2%	57 (4-106)	7 (0-23)	0,001
Ágar Semente de Níger	32 (13-56)	13 (1-31)	0,001
Meio Mínimo com L-Dopa	48 (15-91)	13 (0-100)	0,001

^a T0- mediana contagem das UFC/mL antes da preservação; ^bT1- mediana da contagem das UFC/mL após três meses de preservação; ^c*p*-valor obtido pelo teste de Wilcoxon

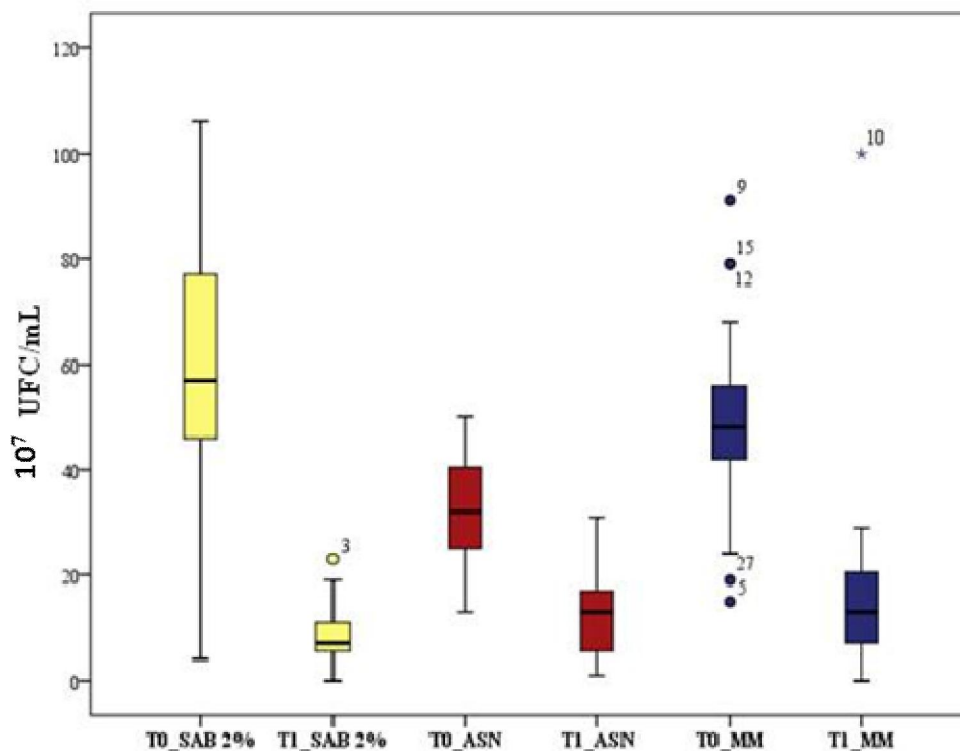


Figura 6 Box Plot da contagem das UFC/mL 31 cepas antes da preservação (T0) e após três meses de preservação (T1) por liofilização nos meios: ágar Sabouraud 2% de glicose (SAB 2%), ágar Semente de Niger (ASN) e Meio Mínimo com L-Dopa (MM).

6.3 Comparação dos métodos de criopreservação a -70°C e liofilização dos isolados de *C. neoformans*

Para comparar as duas metodologias de preservação utilizadas neste estudo foi realizada a porcentagem de sobrevivência das UFC/mL e o teste de Wilcoxon das 31 cepas. Após os três meses de preservação (T1), verificou-se que o método de criopreservação à -70°C permitiu recuperar maior número de UFC do que a liofilização nos três meios utilizados (*p*-valor 0.001) (tabela 4, figura 6). Porém, com a utilização do meio MM, este resultado não

pode ser considerado, já que também houve diferença estatística significativa na contagem das unidades formadoras de colônias (p -valor 0,042) na pré-preservação (T0)

Tabela 4: Comparação entre os métodos de criopreservação à -70°C e liofilização após três meses de preservação (T1) das 31 cepas de *C. neoformans* nos três meios de cultura: SAB 2%, ASN e MM.

Meios de cultura	% de Sobrevivência		p -valor ^c
	$-70^{\circ}\text{C}^{\text{a}}$	Lio ^b	
Ágar Sabouraud 2% de glicose	59%	12%	0,001
Ágar Semente de Niger	91%	40%	0,001
Meio mínimo com L-Dopa	87%	27%	0,001

a: criopreservação a -70°C ; b: Liofilização; c: p -valor obtido pelo teste de Wilcoxon

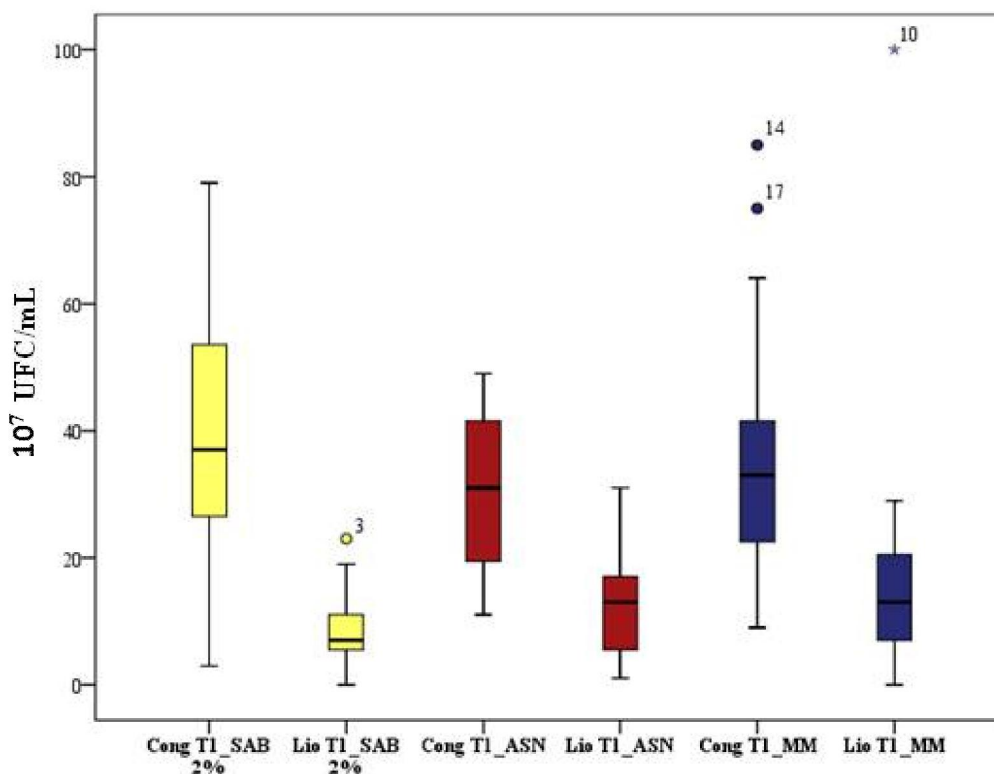


Figura 7. Box Plot da comparação entre as metodologias de criopreservação a -70°C e Liofilização das medianas das UFC/mL de 31 cepas preservadas por três meses nos meios: ágar Sabouraud 2% de glicose, ágar Semente de Níger e Meio Mínimo com L-Dopa.

7. DISCUSSÃO

As coleções de cultura microbianas têm a função de prover material biológico autenticado que será base de pesquisa, produtos biotecnológicos com aplicação no campo da saúde, da indústria, entre outros.

A composição do meio de cultura é um dos fatores que visam à conservação da integridade celular (Smith et al. 2001) e a melanina é descrita como protetora de células de *C. neoformans* submetidas a frio e ao calor (Rosas; Casadevall 1997), sendo assim, o presente estudo testou duas técnicas de preservação à -70°C e liofilização de 31 cepas de *C. neoformans* em três diferentes meios de cultura (SAB, ASN E MM) para avaliar a influência da melanina como protetora da viabilidade celular de *C. neoformans* nestas condições.

Com relação à criopreservação à -70°C , as unidades formadoras de colônia de 31 cepas de *C. neoformans* foram cultivados em SAB 2%, utilizado rotineiramente no Laboratório de Micologia para recuperação e identificação presuntiva (McGinnis, 1980), e observou-se que a mediana da contagem das UFC/mL no SAB 2% em T0 foi maior que a dos meios produtores de melanina (ASN e MM). Isto provavelmente ocorreu pela constituição do meio que está relacionada à obtenção de massa fúngica, sendo importante ressaltar que o meio SAB2% tem 20g de glicose por litro, o que induz o metabolismo primário e crescimento rápido em 48 horas (McGinnis, 1980). O meio ASN, possui 0,1 g/L de glicose e o meio mínimo 2,7 g/L, já que concentrações elevadas de glicose inibem a expressão de melanina em *Cryptococcus* spp. Os meios de cultura indutores de melanina são preparados com baixas concentrações de glicose para ativar a via metabólica de produção da melanina a partir de compostos difenólicos da semente de Níger ou L-Dopa. Neste estudo foi observado que *C. neoformans* em 72 horas de incubação em meio ASN, obteve menor massa celular em relação ao MM, por outro lado o MM apresentou menos massa celular que o SAB 2% (tabela 2), o que pode ser relacionado à menor adição de glicose (2,7g/L) em relação ao SAB 2%.

Após os três meses de preservação (T1) por criopreservação a -70°C houve perda das UFC nos três meios. Esta perda foi estatisticamente significativa para SAB 2% e MM, e para o meio ASN a perda não foi significativa. Considerando ainda a tabela 2, observa-se nos números mínimos e máximos a ampla variação de contagem de UFC nas cepas analisadas, reflexo da heterogeneidade das cepas. Por outro lado, a contagem inicial de células no T0

pode subestimar gemulação em fase inicial, que após o congelamento se expressa em maior número de colônias, explicando, por exemplo, o porquê de uma cepa ter UFC inicial aparentemente menor do que após congelamento. Por isso a análise das medianas expressa melhor o experimento como um todo. Da mesma forma a figura 5 expressa os extremos de UFC; a maioria das amostras está representada por “box-plot” bem como a respectiva mediana. Neste mesmo gráfico, chama a atenção a grande perda de viabilidade no meio SAB 2%, observamos a queda de valores de UFC após criopreservação (T1), mas para o meio ASN há praticamente uma estabilização de valores de UFC em T1, e comportamento similar no meio MM, embora não tão marcante.

Estes resultados sugerem o papel protetor da melanina nos três primeiros meses de criopreservação a -70°C . A melanina tem sido descrita como fator de proteção potencial de *Cryptococcus* spp frente a diferentes condições e drogas (Wang et al. 1996). *C. neoformans* já foi testado na temperatura de -20°C por 24 h em meio MM revelando-se a melanina protetora da viabilidade celular (Rosas; Casadevall 1997). No entanto, não identificamos publicações sobre os agentes da criptococose testando a viabilidade celular na criopreservação -70°C com presença de melanina, como no presente estudo.

Já em relação à liofilização, as medianas dos valores de UFCs de SAB 2% e ASN, bem como os valores mínimos e máximos no tempo T0 foram similares aos observados na criopreservação, demonstrando que a biomassa dos inóculos obtida para os experimentos de forma homogênea é decorrente da metodologia proposta. Mas para o MM não foi observado esta mesma reprodutibilidade no crescimento das colônias. Observou-se a perda expressiva de UFCs após 3 meses de liofilização, quando em meio SAB2% (*p*-valor 0,001), mesmo utilizando Skim Milk 20% como crioprotetor. Este fato é conhecido, pois o processo de liofilização leva à destruição da morfologia macroscópica (Bunse; Steigleder 1991) bem como a morte celular causada pela desidratação súbita, tendo melhores resultados para fungos produtores de conídios. Com relação a *C. neoformans* os métodos de repique sucessivo e liofilização foram comparados por Cavalcante et al. (2007) em oito cepas, neste estudo observou-se que as cepas apresentaram diferentes tempos de crescimento em Sabouraud dextrose pelo método de repique sucessivo e o método de liofilização causava alterações macro e micro-morfológicas das cepas. Utilizando meios produtores de melanina (ASN e MM), observamos que houve menor perda das UFCs, sugerindo que a presença de melanina pode ter um papel protetor celular durante o processo da liofilização. Este comportamento fica melhor evidenciado quando observamos as medianas representadas pelos “box-plot” (figura 6).

Observando-se o número de UFC após preservação (T1), o método de criopreservação apresentou valores maiores na recuperação de UFC, independente do meio. Para avaliar melhor os dois métodos são necessários que se façam análises em maior tempo de preservação, de forma regular e por vários anos, no entanto não encontramos na literatura análises de longo prazo para *C. neoformans* comparando metodologias utilizando meios indutores de melanina. No tempo de observação do presente trabalho o melhor método foi o de criopreservação a -70°C em meio Níger, seguindo-se o meio MM.

Os meios utilizados para indução da produção de melanina são diferentes quanto à fórmula. O meio MM é quimicamente definido, a L-DOPA tem um custo elevado e exige cuidados quanto ao preparo e ao armazenamento, sendo necessário mantê-lo protegido da luz e sob-refrigeração. No entanto o meio ASN não é quimicamente definido, a obtenção das sementes é proveniente de diferentes fontes comerciais e de baixo custo, sendo uma alternativa quando há menor disponibilidade de recursos financeiros.

Desta forma, concluímos que os meios indutores de melanina tiveram um papel importante de proteção celular, de cepas de *C. neoformans* submetidos à criopreservação e liofilização. Este papel protetor da melanina ficou bem evidente tanto para o meio ASN e MM frente ao método de liofilização e, com relação a criopreservação a -70°C o meio ASN apresentou menor perda de viabilidade do que o meio MM, embora este tenha também reduzido a morte celular quando comparado ao método padrão com o meio SAB 2%.

O cultivo de *C. neoformans* utilizando meios indutores da produção de melanina tem sido utilizado como parte de identificação fenotípica, mas não foi ainda proposto para Coleções de Cultura de Fungos. Ambos os meios (ASN e MM) mostram-se promissores para estabelecer um protocolo de rotina para procedimentos de preservação, no entanto estudos futuros de avaliação regular a médio e longo prazo da viabilidade celular nesta modalidade são necessários.

8. CONCLUSÕES

- Este estudo sugere que a presença de melanina protege as células de *C. neoformans* submetidas à preservação por criopreservação a -70°C e liofilização, o que indica seu potencial para uso em metodologias de preservação deste agente .
- O método de criopreservação a -70°C ocasiona menor perda celular quando é utilizado meio indutor de melanina (ASN), quando comparado a meio não indutor de melanina (SAB 2%).
- Apesar de o método de liofilização ocasionar grande perda celular, neste estudo observou-se que a utilização dos meios indutores de melanina (ASN e MM) ocasionou menor perda celular, quando comparado com meio não indutor de melanina (SAB 2%).

9. PERSPECTIVAS

Esta análise inicial deve ser estendida nos mesmos isolados preservados nos três meios de cultura por períodos maiores para verificar a curva de viabilidade ao longo do tempo. Como preservamos as cepas em tubos criogenicos e frascos tipo o de penicilina, gerados pelos diferentes métodos e meios de cultivo suficientes para estudos futuros, pretendemos dar continuidade as análises em 6 meses e 1 ano inicialmente, também será realizada a tipagem molecular também será realizada em todas as cepas analisadas neste estudo para posterior verificação e estudos de médio e longo prazo deverão ser realizados para avaliar a proteção da melanina na preservação de *C. neoformans* em Coleções de Cultura de Fungos.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu, M.M.V., Tutunji, V.L. Implantação e manutenção da coleção de culturas de microrganismos. UniCEUB. 2005; 2: 236-52.

Albuquerque, P.C., Rodrigues, M.L. Research trends on pathogenic *Cryptococcus* species in the last 20 years: a global analysis with focus on Brazil. Future Microbiol. (2012); 7 (3): 319-329.

Barnett, J.A., Payne R.W., Yarrow, D. Yeasts: characteristics and taxonomy. Cambridge University Press. 1983; p.1138.

Baroni, F.A. Espécies de *Cryptococcus neoformans* isoladas de torres de igrejas na Cidade do Rio de Janeiro, RJ, Brasil. São Paulo. Tese [Doutorado em Microbiologia] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2001.

Brito-Santos, F., Barbosa, G.G., Trilles, L., Nishikawa, M.M., Wanke, B., Meyer, W., Carvalho-Costa, F.A., Lazéra, M.S. Environmental isolation of *Cryptococcus gattii* VGII from indoor dust from typical wooden houses in the deep Amazonas of the Rio Negro Basin. Plos One. 2015; 10(2): e0115866.doi:10.1371/journal.pone.0115866.

Bunse, T, Steigleder, GK. The preservation of fungal cultures by lyophilization. Mycoses. 1991; 34: 173-176.

Buschke, A. Über eine durch coccidien hervorg erufene Krankheit des Menschen. Dtsch. Med. Wochenschr. 1895; 21:14.

Busse, O. Über parasitare Zelleinschlüsse und ihre Züchtung. Zentralbl. Bakteriol. 1894; 16:175-180.

Busse, O. Über Saccharomycosis hominis. Virchows Arch. A. 1895; 140: 23-46.

Campos, F.L., Baroni, F.A. Isolados de *Cryptococcus neoformans*, *C.gattii* e *C. laurentii* produtores de protease e fosfolipase. Revista de Patologia Tropical. 2010; 39(2): 83-89.

Canhos, V.P., Sette, L.D., Cupolillo, E., Tigano, M.S., Vazoller, R.F. O papel da Sociedade Brasileira de Microbiologia no suporte à consolidação da Rede Brasileira de Coleções de Cultura de Microrganismos. *Microbiologia in foco*. 2007; 2: 40-8.

Canhos, V.P., Umino, C.Y., Manfio, G.P. Coleções de cultura de microrganismos. Resumo: Coleções de culturas de microrganismos. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP – Centro de Referência em Informação Ambiental, 2004.

Carvalho, F.D. Indução de estruturas esféricas ou similares durante a cristalização da água por processos físicos ou químicos. *Ciência Agrotécnica*. 2007; 31(3): 814-820.

Casadevall, A., Perfect, J.R. *Cryptococcus neoformans*. vol.595. Washington, DC: ASM press, 1998.

Casali, A.K., Goulart, L., Rosa, S.L.K., Ribeiro, A.M., Amaral, A.A., Hartz, S.A., Schrank, A., Meyer, W., Vainstein, M.H. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state of Rio Grande do Sul. *F.Y.R.* 2003; 3: 405-415.

Cavalcante A, Freitas RS, Vidal MS, Dantas KC, Levi JE, Martins JEC. Evaluation of phenotypic and genotypic alterations induced by long periods of subculturing of *Cryptococcus neoformans*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007; 102: 41-7.

Cavalcanti, M.A.S. Criptococose e seu agente no Meio Norte, estados do Piauí e Maranhão, Brasil. Rio de Janeiro. Tese [Doutorado] – Fundação Oswaldo Cruz e Universidade Federal do Piauí; 1995.

Chang, Y.C., Kwon-Chung, K.J. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. *Mol Cell Biol*. 1994; 14 (7) 4912-9.

Costa, C.P., Ferreira, M.C. Preservação de microrganismos: revisão. *Revista de Microbiologia*. 1991; 22(3): 263-268.

Costa, E.C., Teixeira, M.F.S., Dantas, T.V.M., Melo, V.S.P., Araújo, S.A.C., Rolim, B.N. Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. *Ciência Animal*. 2009; 19(2): 111-122. [Acesso em 13 jul. 2015]. Disponível em: http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/artigo10_2009.pdf

- Cox, G.M., Mcdade, H.C., Chen, S.C., Tucker, S.C., Gottfredsson, M., Wright, L.C., Sorrell, S.D., Leidich, A., Casadevall, A., Ghannoum, M.A., Perfect, J.R. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* 2001; 39: 166-175.
- DeVroey, J.F., Gatti, F. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* Vanbreuseghem and Takashio, 1970. *Mycoses* 1989; 32:675.
- Dufait, R., Velho, R., DeVroey, C. Rapid identification of the two varieties of *Cryptococcus neoformans* by D-proline assimilation. *Mykosen.* 1987; 30:483.
- Eisenman, H.C., Nosanchuk, J.D., Webber, J.B., Emerson, R.J., Camesano, T.A., Casadevall, A. Microstructure of cell wall-associated melanin in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Biochemistry.* 2005; 44 3683-3693.
- Engelthaler, D.M., Hicks, N.D., Gillece, J.D., et al. *Cryptococcus gattii* in North American Pacific Northwest: whole population genome analysis provide insights into species evolution and dispersal. *M Bio* 2014; 5 (4):e01464-14.
- Evans EE. The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. I-A serologic classification by means of the capsular and agglutination reactions. *J Immunol.* 1950; 64: 423-430.
- Evans EE, Kessel JF. The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol.* 1951; 67:109-114.
- Fernandes, O.F.L., Costa, T.R., Costa, M.R., Soares, A.J., Pereira, A.J.S.C., Silva, M.M.R. *Cryptococcus neoformans* isolados de pacientes com AIDS. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2000; 33 (1): 75-78.
- Figueiredo, M.B. Métodos de preservação de fungos patogênicos. *Biológico.* 2001; 63: 73-82.
- Franzot, S.P., Salkin, I.F., Casadevall, A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *J.C.M.* 1999;37:(3): 838-840.
- Freeman, W.J. *Torula* infection of the central nervous system. *J. Psychol. Neurol.* 1931; 43:236.

Frothingham, L.A. A tumor-like lesion in the lung of a horse caused by a blastomyces (torula). J.Med res. 1902; 3: 31-43.

Ghannoum, M.A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. Clin Microbiol. Rev. 2000; 13: 122-143.

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

Holland, N.T., Smith, M.T., Eskenazi, B., Bastaki, M. Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies. Elsevier. 2003; 543(3): 217-234.

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

Igreja, R.P., Lazéra, M.S., Wanke, B., Gutierrez, G.M.C., Kidd, E., Meyer, W. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients of the Brazilian city. Med Mycol. 2004; 42: 229-238.

INFORMAÇÃO de produtos de identificação. In: VITEK 2 tecnologia: manual do utilizador do software. Durham: Biomérieux, 2008. Cap. 6

Ito, S. Biochemistry and physiology of melanin. In: N.Levine. Pigmentation and Pigmentary Disorders. Boca Raton,FL. CRC Press; 1993. p.33-59.

Ikeda, R., Nishikawa, A., Shinoda, T., Fukazawa, Y. Chemical characterization of capsular polysaccharide from *Cryptococcus neoformans* serotype A-D. Microbiol Immunol. 1985; 29: 981-991.

Klein, K.R., Hall, L., Deml, S.M., Rysavy, J.M., Wohlfiel, S.L., Wengenack, N.L. Identification of *Cryptococcus gattii* by use of L-canavanine glycine bromothymol blue medium and DNA sequencing. J Clin Microbiol. 2009; 47(11): 3669-72.

Kosel, T.R. Virulence factors of *Cryptococcus neoformans*. Review .Trends Microbiol. 1995; 3(8) 295-9.

Kronstad, J., Saikia, S., Nielson, E.D., Kretschmer, M., Jung, W., Hu, G., Geddes, J.M., Griffiths, E.J., Choi, J., Cadieux, B., Caza, M., Attarian, R. Adaptation of *Cryptococcus neoformans* to mammalian hosts: integrated regulation of metabolism and virulence. *Eukaryot Cell*. 2012; 11(2): 109-18.

Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T., Robert, V. Methods for Isolation, Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeasts. In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T., editors. *The Yeasts a Taxonomic Study*. 5 th ed. Amsterdam, 2011. P.87-110.

Kützing, F. *Algarum Aquae dulcis germaniae decas III*. New York Botanical Garden, New York, NY; 1833.

Kwon-Chung, K.J. A new genus, *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia*. 1975; 67: 1197-1200.

Kwon-Chung, K.J. A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes." *Mycologia* 1976; 68: 942-946.

Kwon-Chung, K.J., Polacheck, I., Bennett, J.E. Improved diagnostic médium for separation, of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). *J Clin Microbiol*. 1982b; 15: 535-537.

Kwon-Chung, K.J., Fell, J.W. *Filobasidiella* Kwon-Chung. In: Kreger van Rij, editors. *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam; 1987; p. 467-495.

Kwon-Chung K.J., Bennett, J.E. *Cryptococcosis*. In: *Medical mycology*. Lea&Febiger, Philadelphia; 1992. p. 392-446.

Kwon-Chung, K.J., Boekhout, T., Fell, W., Diaz, M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (*Basidiomycota*, *Hymenomycetes*, *Tremellomycetidae*). *Taxon*. 2002; 51: 804-806.

Kwon-Chung, K. J., Varma, A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS yeast research*. 2006; 6:(4) 574-587.

Kwon-Chung, K. J., *Filobasidiella* Kwon-Chung (1975). In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T., editors. *The Yeast, a Taxonomic Study*. 5 ed. Amsterdam: Elsevier; 2011. v. 3, p. 1443.

Lazera, M.S., Wanke, B., Nishikawa, M.M. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. J Med. Vet. Mycol. 1993; 31: 449-454.

Lazera, M.S., Pires, F.D.A., Camillo-Coura, L., Nishikawa, M.M., Bezerra, C.C.F., Trilles, L., Wanke, B. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying Wood forming hollows in living trees. J Med. Vet. Mycol. 1996; 34: 127-131.

Lazera, M.S., Cavalcanti, M.A.S., Londero, A.T., Trilles, L., Nishikawa, M.M., Wanke, B. Possible primary niche of *Cryptococcus neoformans*. Med. Micol. 2000; 38: 379-383.

Lazera, M.S., Gutierrez, G.M.C., Cavalcanti, M.A.S., Wanke, B. Criptococose. In: Coura JR. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. V.II, p. 1223-1235.

Lodder, J., Kreger-van Rij, N.J.W. The Yeasts - a taxonomic study. The Yeasts - a taxonomic study 1952; p.713.

Martins, L.M.S. Epidemiologia da criptococose em crianças e adultos jovens e diversidade de *Cryptococcus neoformans* no meio Norte do Brasil. Rio de Janeiro. Tese [Mestrado] - Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz; 2003.

Meyer, W., Aanensen, D.M., Boekhout, T., et al. Consensus multi locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. Med. Mycol. 2009; 47:561-70.

Morales, B.P., Trilles, L., Bertho, A.L., Junior, I.N., Oliveira, R.V., Wanke, B., Lazera, M.S. In vitro susceptibility testing of amphotericin B for *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* AFLP1/VNI and *Cryptococcus gattii* AFLP/VGII by CLSI and flow cytometry. Mycoses. 2015; 58(5): 273-9.

McGinnis, MR. Laboratory Handbook of Medical Mycology. 11ed. New York: Academic Press; 1980. cap.3:73-102

Min K.H., Kwon- Chung, K.J. The biochemical basis for the distinction between the two *Cryptococcus neoformans* varieties with CGB medium. Zentralbl Bakteriol Hyg A. 1986; 261: 471-480.

Montenegro, H., Paula, C.R. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in the city of São Paulo, Brazil. *Med.Mycol.* 2000; 38: 385-390.

Morgan, C.A., Herman, N., White, P.A., Vesey, G. Preservation of microorganisms by drying – a review. *Journal of Microbiological Methods.* 2006; 66:(2) 183-193.

Nishikawa M.M., Sant’Anna, O.D., Lazéra, M.S., Wanke, B. Use of D-proline assimilation and CGB medium screening Brazilian *Cryptococcus neoformans* isolates. *J Med Vet Mycol.* 1996; 34: 365-366.

Nishikawa, M.M., Lazéra, M.S., Barbosa, G.G., Trilles, L., Balassiano, B.R., Macedo, R.C.L., Bezerra, C.C.F., Pérez, M.A., Cardarelli, P., Wanke, B. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 73-77.

Nosanchuck, J.D., Casadevall A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50:3519-3528.

OECD. Best practice guidelines for biological resource centers. Organization for economic Co-operation and Development. França. 2007.

Oliveira-Netto, I.C., Machado, C.C., Wagner, M.B., Severo, L.C. Meio século de criptococose no Brasil: revisão de 308 casos (1941-1992). *Ambito Hospitalar (Infectologia).* 1993; 7: 5-16.

Oliveira, V.M., Sette, L.D., Fantinatti-Garboggini, F. Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos. Divisão de Recursos Microbianos. Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas. 2006; 1-19.

Paoli, P. Biobancos microbiológicos a partir de coleta de amostras para a epidemiologia, diagnóstico e pesquisa. *FEMS Microbiol Rev.* 2005; 29: 897-910.

Pappalardo, M.C.S.M., Melhem, M.S.C. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. *Rev.Inst.Med.Trop. São Paulo.* 2003; 45: 299-305.

Passador, M.M., Pires, G.C.C., Finatti, D., Aparecido, C.C., Figueiredo, M.B. Manutenção da viabilidade e patogenicidade de culturas mantidas na micoteca “Mário Barreto Figueiredo”.

Biológico. 2010; 72(1): 51-55. [Acesso em 13 jul. 2015]. Disponível em: http://200.144.6.109/docs/bio/v72_1/passador.pdf

Passoni L.F.C., Wanke, B., Nishikawa, M.M., Lazéra, M.S. *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil: an analysis of the domestic environment of AIDS patients with and without cryptococcosis. *Medical mycology*. 1998; 36 (5): 305.

Park, B.P., Wannemuehler, K.A., Marston, B.J., Govender, N., Pappas, P.G., Chiller, T.M. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *Aids*. 2009; 23(4): 525-530.

Pereira, J.R. Isolamento e caracterização de *Cryptococcus neoformans* de excretas de aves em lojas de animais do município do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado em Microbiologia Veterinária] – Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2006.

Pinto, J.V.L. Criptococose associada a AIDS. Análise da casuística do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Fiocruz entre 1987 e 2002. Rio de Janeiro. Tese [Mestrado] - Instituto Oswaldo Cruz; 2003.

Polacheck, I., Hearing, V.J., Kwon-Chung, K.J. Biochemical studies of phenoloxidase and utilization of catecholamines in *Cryptococcus neoformans*. *J Bacteriol*. 1982; 150: 1212-1220.

Polacheck, I., Kwon-Chung, K.J. Melanogenesis in *Cryptococcus neoformans*. *J Gen Microbiol*. 1988; 134: 1037-1041.

Polacheck, I. The Discovery of melanin production in *Cryptococcus neoformans* and its impact on diagnosis and the study of virulence. *Int J Med Microbiol*. 1991; 276: 120-123.

Raso, T.F., Werther, K., Miranda, T., Mendes, G.M.J.S. Cryptococcosis outbreak in psittacine birds in Brazil. *Med Mycol*. 2004; 42: 355-362.

Restrepo, A., Baumgardner, D.J., Bagagli, E., Cooper, C.R., McGinnis, M.R., Lazéra, M.S., Barbosa, F.H., Bosco, S.M.G., Camargo, Z.P., Coelho, K.I.R., Fortes, S.T., Franco, M.,

Montenegro, M.R., Sano, A., Wanke, B. Clues to the presence of pathogenic fungi in certain environments. *Med.Mycol.* 2000; 38 (suppl I): 67-77.

Riley, P.A. Melanin. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997; 29: 1235-1239.

Rosas, A.L, Casadevall, A. Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. *FEMS Microbiology Letters.* 1997: 153 265-272.

Rozenbaum, R., Gonçalves, A.J.R. Clinical epidemiological study of 171 cases of cryptococcosis. *Clin Infect Dis.* 1994; 18: 369-380.

Sanfelice, F. Contributo alla morfologia e biologia dei blastomiceti che si sviluppano Nei succhidi alcuni frutti. *Ann. Igien.* 1894; 4: 463-495.

Sanfelice, F. Über einen neuen Pathogen Blastomyceten welcher innerhalb der Gewebe unter Bildung, Kalkartig aussehender massendegeneriert. *Zentralbl. Bakteriol. Parasit. Infekt. Hyg.* 1895; 18: 521-526.

Santos, L.O. Criptococose no estado do Amazonas: estudo de 75 casos diagnosticados na Fundação de Medicina Tropical/ FMT/IMTM(1988-1998). Rio de Janeiro. Tese [Mestrado] - Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz; 2000.

Sette LD, Cupolilo E, Tigano MS, Vazoller RF, Canhos VP. Recomendações para operação e gerenciamento de coleções de culturas de microrganismo. *Microbiologia in foco.* 2007; 2: 49-55.

Siafakas, A.R., Wright, L.C., Sorrell, T.C., Djordjevic, J.T. Lipid rafts in *Cryptococcus neoformans* concentrate the virulence determinants phospholipase B1 and Cu/Zn superoxide dismutase. *Eukaryot. Cell.* 2006; 5: 488-498.

Smith, D.; Clayton, S; Ryan, M; Day, J; Green, P. Preservation methodology. In *The UKNCC Biological Resource.* 2001; UKNCC, Engham. p.72-121.

Smith, D., Ryan, M.J. Situação atual das coleções de fungos e seu papel na biotecnologia. *Handbook of fungal biotechnology.* 2003; 527-538.

Smith, D., Ryan, M.J. Implementing Best Practices and Validation of Cryopreservation Techniques for Microorganisms. *The Scientific World Journal.* 2012; 1-9.

Spencer-Martins, I. Coleções de Culturas de Microrganismos: nos Bastidores da Biotecnologia. Boletim de Biotecnologia. 1994; 47: 33-37.

Staib, F. New concepts in the occurrence and identification of *Cryptococcus neoformans*. Mycopathol Mycol Appl. 1963; 19: 143-145.

Staib, F., Seeliger, HP. A new selective medium for the isolation of *C. neoformans* from fecal material and from soil. Ann Inst Pasteur. 1966; 110(5): 792-3.

Swinne, D., Deppner, M., Maniratunga, S., Laroche, R., Floch, J.J., Kadende, P. Aids-associated cryptococcosis in Bujumbura, Burundi: an epidemiological study. J Med Vet Mycol. 1991; 29 (1): 25-30.

Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L. Microbiologia. 10 ed. Porto Alegre: Artmed. 2011; p.964.

Trofa, D., Casadevall, A., Nosanchuk, J.D. Melanin: Structure, Function, and Biosynthesis in *Cryptococcus*. In: Heitman *et al.* *Cryptococcus*: From Human Pathogen to model yeast. Washington, DC: ASM Press; 2011. p.55-56.

Uruburu, F. History and services of cultures collections. International Microbiology. 2003; 6: 101-103.

Vanbreuseghem, R., Takashio, M. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) Vuillemin. Part II. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. Nov. Ann. Soc. Belg. Med. Trop. 1970; 50: 695-702.

Vazoller, R.F., Canhos, V.P. Projeto: Diretrizes e Estratégias para a modernização de Coleções Biológicas Brasileiras e a Consolidação de Sistemas Integrados de informações sobre Biodiversidade. Coleções de Culturas e Serviços e Centros de Recursos Biológicos. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. São Paulo. 2005; 6-8.

Vidotto, V., Leone, R., Sinicco, A., Ito-Kuwa, S., Criseo, G. Comparasion of phospholipase production in *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients and droppings. Mycopathologia. 1998; 142: 71-76.

Vidotto, V., Melhem, M., Pukinskas, S., Aoki, S., Carraga, C., Pugliese, A. Extracellular enzymatic activity and serotype of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from AIDS patients in Brazil. Rev. Iberoam. Micol. 2005; 22: 29-33.

Voyron, S *et al.* Vitality and genetic fidelity of white-rot fungi mycelia following different methods of preservation. Mycol Res. 2009; 113: 1027-38.

Vuillemin, J.P. Les blastomycetes pathogenes. Rev. Gen. Sci. 1901; 12: 732-751.

Wang, Y., Aisen P., Casadevall A. Melanin, melanin “ghosts”, and melanin composition in *Cryptococcus neoformans*. Infect. Immun. 1996; 64: 2420-2424.

Williamson P.R. Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. J Bacteriol. 1994; 176: 656-664.

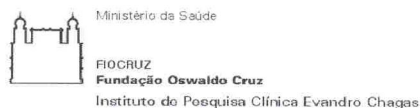
Wilson, D.E., Bennett, J.E., Bailey, J.M. Serologic grouping of *Cryptococcus neoformans*. Experimental Biology and Medicine. 1968; 127(3): 820-823.

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

Zhu, X., Williamson, P.R. Role of lacase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. FEMS Yeast research. 2004; 5: 1-10. Spencer-Martins, I. Coleções de Culturas de Microrganismos: nos Bastidores da Biotecnologia. Boletim de Biotecnologia. 1994; 47: 33-37

11. ANEXOS

ANEXO A – Memorando do Comitê de Ética em Pesquisa Clínica do INI/Fiocruz



Rio de Janeiro, 11 de setembro de 2013.

Do: Comitê de Ética em Pesquisa do IPEC
 Para: Dra. Márcia dos Santos Lazéra

Prezada Dra. Márcia,

Considerando que o projeto **“Avaliação da melanina como fator de proteção para preservação de *Cryptococcus neoformans* na Coleção de Fungos Patogênicos do IPEC/FIOCRUZ”** é um projeto apresentado à Coordenação de Pós-Graduação *Stricto Sensu* – Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, da aluna Monica dos Santos Elias, tendo como orientadora a Dra. Márcia dos Santos Lazéra e que não envolve seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - IPEC/Fiocruz declara ser desnecessária a sua submissão ao mesmo.

Informamos, ainda, que os resultados da pesquisa podem ser divulgados sem avaliação do CEP.

Atenciosamente,

Dr^a Léa Ferreira Camillo-Coura
 Coordenadora do Comitê
 de Ética em Pesquisa
 Mat. SIAPE 003709620
 IPEC / FIOCRUZ

VL

ANEXO B – Composição e preparo dos meios de cultura utilizados no projeto

1. Canavalina-Glicina-Azul de Bromotimol (CGB)

Preparo da solução A (para um volume final de 100 mL)

- L-Canavanina – 300mg
- Glicina – 10g
- KH_2PO_4 – 1g
- $7\text{H}_2\text{O MgSO}_4$ – 1g
- Tiamina ou Tiamina HCl – 1g

Diluir os reagentes acima com água tipo 1, completar até o volume final de 100mL.

Verificar o pH da solução, que deverá ser 5.6, para realizar ajuste do pH utilizar NaOH ou HCl fumegante (37%).

Utilizando Cabine de Segurança Biológica esterilizar, por filtração (membrana de $0,22\mu\text{m}$) com auxílio de uma bomba de vácuo, após a filtração fazer alíquotas de 25 mL, em tubos estéril com tampa de rosca protegidos da luz e armazenar à -20°C .

Preparo da solução B - Solução de Azul de Bromotimol Sódico 0,4%

(Para um volume final de 100 mL)

- Azul de Bromotimol Sódico – 0,4g
- Água tipo 1 – 100mL

Em um Becker de 200mL acrescentar os 0,4 g de azul de bromotimol sódico, diluir com água tipo 1 até o volume final de 100mL, homogeneizar e após transferir para frasco com tampa de rosca ao abrigo da luz e armazenar à 2 a 8°C .

Preparo final (solução A + solução B) do meio – Volume final de 250 mL

- Ágar-ágar – 5g
- Solução B – 5 ml
- Solução A – 25 mL
- Água tipo 1 – 220 mL

Deixar a temperatura ambiente a solução A, armazenada anteriormente à - 20°C.

Acrescentar em um Erlenmeyer de 500 mL, 5 g de ágar-ágar, 5 mL da solução B, diluir e completar o volume até 220 mL com água tipo 1. Autoclavar à 121°C por 15 minutos. Retirar o Erlenmeyer de 500 mL após a autoclavação e resfriar \pm 55°C. Acrescentar ao meio resfriado 25 mL da solução A lentamente, homogeneizando bem. Distribuir com auxílio de pipeta graduada estéril 2,5 mL nos tubos de ensaio previamente estéreis 13x 100 mm com tampa de rosca. Inclinar os tubos em bancada com suporte para a formação de bisel.

Armazenar em 2°C a 8°C.

2. Ágar Semente de Níger (ASN)

- Semente de *Guizotia abyssínia* – 100g
- Ágar-ágar – 20g
- Água destilada – 1000 mL

Em um Becker de 1000 mL transferir 100 g da semente de *Guizotia abyssínia* e adicionar 500 mL de água destilada estéril para ferver no micro-ondas durante 30 minutos. Aguardar esfriar e bater no liquidificador para quebrar a semente. Coar com auxílio de uma gaze, transferindo para um balão de 2000 mL, acrescentar 20 g de ágar-ágar e completar o volume final para 1000 mL de água destilada.

Colocar rolha de algodão hidrófilo, papel alumínio, vedando com fita de autoclave. Autoclavar a 121 °C por 15 minutos e após autoclavação distribuir em placas de Petri estéril.

3. Ágar Sabouraud Dextrose (SAB 2%)

- Neopeptone – 10g
- Dextrose – 20g
- Àgar-àgar – 20g
- Àgua destilada estéril – 1000 mL

Em um balão de 2000 mL acrescentar 10g de Neopeptone, 20g de Dextrose e 20g de àgar-àgar, completar o volume final até 1000 mL com àgua destilada e homogeneizar. Colocar rolha de algodão hidrófilo, papel alumínio, vedando com fita de autoclave. Autoclavar a 121 °C por 15 minutos e após autoclavação distribuir em placas de Petri estéril.

4. Meio mínimo (MM)

Solução L-Dopa

- L-Dopa (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) – 247 mg
- Àgua destilada - 50 mL

Dissolver 247 mg de L-Dopa em 50 mL de àgua destilada protegido da luz. Para dissolver esta solução é necessário aquecer, devido a dificuldade de dissolver. Após dissolver filtrar a solução em filtro com membrana de 0,22 µL. Armazenar à -20°C protegido da luz.

Solução Tiamina

- Tiamina HCl – 200 mg
- Àgua destilada estéril – 10 mL

Dissolver 200 mg de Tiamina em 10 mL de àgua destilada estéril. Filtrar a solução em filtro com membrana de 0,22 µL. Armazenar à -20°C.

Meio Mínimo

- KH_2PO_4 – 4g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 2,5 g
- Glicina – 0,975 g
- D-Glucose – 3 g
- Tiamina – 51 µL

- L-Dopa – 40 mL

- Ágar-ágar – 15 g

Dissolver 4 g de KH_2PO_4 , 2,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,975 g de glicina em 300 mL de água destilada. Ajustar o pH para 5.5 utilizando KOH e/ou H_3PO_4 . Em seguida acrescentar 3 g de D-glucose, 51 μL de tiamina e 40 mL de L-Dopa e completar até o volume final de 500 mL. Filtrar em filtro com membrana de 0,22 μL .

Dissolver 15 g de ágar-ágar em 500 mL de água destilada estéril e autoclavar a 121°C por 15 minutos. Resfriar $\pm 55^\circ\text{C}$ e acrescentar aos poucos o meio mínimo. Em seguida distribuir em placas.

ANEXO C – Tabela de teste de viabilidade antes da preservação das 31 cepas de *C.neoformans* utilizadas no estudo nos métodos de liofilização e criopreservação nos meios SAB 2%, ASN e MM.

Teste de viabilidade dos métodos de liofilização e criopreservação a -70°C, antes da preservação expresso em 10⁷ UFC/ml e nos meios de cultura SAB 2%, ASN E MM

CFP	Meio de Cultura	T0	
		Lio	Crio(-70°C)
496	SAB 2%	54	58
	ASN	31	27
	MM	61	32
497	SAB 2%	48	64
	ASN	32	36
	MM	32	53
498	SAB 2%	32	99
	ASN	32	43
	MM	32	62
499	SAB 2%	32	52
	ASN	32	30
	MM	32	23
500	SAB 2%	32	25
	ASN	32	20
	MM	32	19
521	SAB 2%	32	85
	ASN	32	52
	MM	32	55
522	SAB	32	63
	ASN	32	34
	MM	32	43
523	SAB 2%	32	31
	ASN	32	34
	MM	32	50
524	SAB 2%	32	43
	ASN	32	36
	MM	32	75
525	SAB 2%	32	56
	ASN	32	52
	MM	32	56
526	SAB	32	50
	ASN	32	39
	MM	32	60
527	SAB 2%	32	89
	ASN	32	20
	MM	32	71
528	SAB 2%	32	69
	ASN	32	40
	MM	32	45
529	SAB 2%	32	24
	ASN	32	11
	MM	32	82
530	SAB	32	99

	ASN	32	47
	MM	32	11
531	SAB 2%	32	66
	ASN	32	32
	MM	32	36
533	SAB 2%	32	72
	ASN	32	29
	MM	32	72
534	SAB 2%	32	62
	ASN	32	39
	MM	32	38
535	SAB 2%	32	60
	ASN	32	58
	MM	32	45
536	SAB 2%	32	99
	ASN	32	41
	MM	32	52
537	SAB 2%	32	2
	ASN	32	35
	MM	32	35
538	SAB 2%	32	62
	ASN	32	30
	MM	32	35
539	SAB 2%	32	91
	ASN	32	59
	MM	32	38
540	SAB 2%	32	67
	ASN	32	35
	MM	32	14
541	SAB 2%	32	59
	ASN	32	19
	MM	32	34
542	SAB 2%	32	66
	ASN	32	21
	MM	32	36
544	SAB 2%	32	67
	ASN	32	26
	MM	32	30
546	SAB 2%	32	30
	ASN	32	19
	MM	32	30
547	SAB 2%	32	34
	ASN	32	36
	MM	32	28
548	SAB 2%	32	46
	ASN	32	19
	MM	32	27
549	SAB 2%	32	40
	ASN	32	25
	MM	32	33

CFP: Coleção de Fungos Patógenos; T0: antes da preservação; Lio: liofilização; Crio: criopreservação a -70°C; SAB 2%: ágar Sabouraud 2% de glicose; ASN: ágar semente de níger; MM: meio mínimo.

ANEXO D – Tabela de teste de viabilidade após um mês de preservação das 31 cepas de *C.neoformans* utilizadas no estudo nos métodos de liofilização e criopreservação nos meios SAB 2%, ASN e MM.

CFP	Meio de Cultura	T1	
		Lio	Crio(-70°C)
496	SAB 2%	8	58
	ASN	16	44
	MM	9	33
497	SAB 2%	12	19
	ASN	22	39
	MM	6	61
498	SAB 2%	10,7	64,4
	ASN	19,7	37,5
	MM	4,1	31,6
499	SAB 2%	5,6	12,9
	ASN	1,6	13,5
	MM	1,9	14,1
500	SAB 2%	5	16
	ASN	7	18
	MM	5	19
521	SAB 2%	9,3	45
	ASN	15	29
	MM	5,9	31,2
522	SAB	6,7	34,8
	ASN	15,4	26,4
	MM	10,6	19,2
523	SAB 2%	5,6	21
	ASN	11,2	24,4
	MM	15,1	34
524	SAB 2%	5,2	32,6
	ASN	13,7	32,9
	MM	22,3	55,8
525	SAB 2%	5,8	31,5
	ASN	10,3	30,4
	MM	11,1	42,1
526	SAB	14,3	35,5
	ASN	12,2	33,3
	MM	4,4	30,2
527	SAB 2%	13	42
	ASN	16	20
	MM	13	27
528	SAB 2%	3	27
	ASN	5	36
	MM	27	39
529	SAB 2%	1	4
	ASN	4	13
	MM	1	51

530	SAB 2%	8	42
	ASN	14	40
	MM	32	9
531	SAB 2%	10	39
	ASN	20	25
	MM	3	45
533	SAB 2%	13	45
	ASN	14	39
	MM	15	42
534	SAB 2%	4,7	29
	ASN	12,2	25
	MM	1,3	45
535	SAB 2%	10,5	62
	ASN	25,8	35
	MM	6,7	4,2
536	SAB 2%	21,2	58
	ASN	16,6	38
	MM	22	67
537	SAB 2%	3	34
	ASN	17	32
	MM	15	37
538	SAB 2%	11	62
	ASN	10	31
	MM	32	29
539	SAB 2%	9	39
	ASN	16	26
	MM	24	33
540	SAB 2%	5	46
	ASN	5	37
	MM	6	22
541	SAB 2%	2	47
	ASN	6	19
	MM	15	34
542	SAB 2%	5	33
	ASN	2	27
	MM	22	30
544	SAB 2%	5	35
	ASN	7	19
	MM	13	36
546	SAB 2%	3	11
	ASN	1	15
	MM	8	23
547	SAB 2%	2	14
	ASN	13	34
	MM	15	36
548	SAB 2%	4	14
	ASN	4	18
	MM	5	19
549	SAB 2%	9	33
	ASN	7	12
	MM	9	19

CFP: Coleção de Fungos Patogênicos; T1: após 1 mês da preservação; Lio: liofilização; Crio: criopreservação a -70°C; SAB 2%: ágar Sabouraud 2% de glicose; ASN: ágar semente de niger; MM: meio mínimo.

ANEXO E – Tabela de teste de viabilidade após dois meses de preservação das 31 cepas de *C.neoformans* utilizadas no estudo nos métodos de liofilização e criopreservação nos meios SAB 2%, ASN e MM.

Teste de viabilidade dos métodos de liofilização e criopreservação a -70°C, após dois meses de preservação expresso em 10⁷ UFC/ml e nos meios de cultura SAB 2%, ASN E MM

CFP	Meio de Cultura	T2	
		Lio	Crio(-70°C)
496	SAB 2%	4	44
	ASN	20	37
	MM	4	35
497	SAB 2%	13	32
	ASN	21	29
	MM	11	42
498	SAB 2%	12	57
	ASN	20	41
	MM	3	52
499	SAB 2%	5	22
	ASN	2	17
	MM	1	12
500	SAB 2%	3	18
	ASN	3	9
	MM	2	16
521	SAB 2%	11	56
	ASN	22	33
	MM	6	31
522	SAB	17	54
	ASN	16	36
	MM	7	43
523	SAB 2%	13	29
	ASN	15	29
	MM	21	38
524	SAB 2%	6	40
	ASN	18	45
	MM	31	92
525	SAB 2%	5	44
	ASN	10	33
	MM	12	74
526	SAB	8	63
	ASN	16	43
	MM	4	30
527	SAB 2%	13	89
	ASN	18	37
	MM	19	31
528	SAB 2%	5	55
	ASN	8	44
	MM	21	42
529	SAB 2%	1	4
	ASN	9	12
	MM	0	65

530	SAB 2%	4	58
	ASN	12	51
	MM	4	26
531	SAB 2%	10	56
	ASN	28	49
	MM	4	25
533	SAB 2%	13	42
	ASN	25	53
	MM	21	55
534	SAB 2%	3	31
	ASN	16	31
	MM	5	39
535	SAB 2%	15	53
	ASN	13	39
	MM	6	48
536	SAB 2%	13	49
	ASN	16	44
	MM	22	76
537	SAB 2%	3	27
	ASN	21	45
	MM	16	32
538	SAB 2%	10	61
	ASN	15	21
	MM	38	36
539	SAB 2%	19	49
	ASN	14	57
	MM	25	49
540	SAB 2%	3	23
	ASN	6	42
	MM	5	15
541	SAB 2%	7	44
	ASN	3	13
	MM	23	36
542	SAB 2%	7	29
	ASN	4	27
	MM	21	29
544	SAB 2%	3	44
	ASN	5	27
	MM	18	36
546	SAB 2%	1	13
	ASN	1	12
	MM	9	27
547	SAB 2%	3	17
	ASN	8	16
	MM	11	22
548	SAB 2%	4	23
	ASN	6	20
	MM	8	32
549	SAB 2%	6	27
	ASN	3	22
	MM	8	32

CFP: Coleção de Fungos Patogênicos; T2: após 2 meses da preservação; Lio: liofilização; Crio: criopreservação a -70°C; SAB 2%: ágar Sabouraud 2% de glicose; ASN: ágar semente de níger; MM: meio mínimo.

ANEXO F – Tabela de teste de viabilidade após três meses de preservação das 31 cepas de *C.neoformans* utilizadas no estudo nos métodos de liofilização e criopreservação nos meios SAB 2%, ASN e MM.

Teste de viabilidade dos métodos de liofilização e criopreservação a -70°C, após três meses de preservação expresso em 10⁷ UFC/ml e nos meios de cultura SAB 2%, ASN E MM			
CFP	Meio de Cultura	T3	
		Lio	Crio(-70°C)
496	SAB 2%	9	38
	ASN	9	31
	MM	7	37
497	SAB 2%	11	22
	ASN	15	23
	MM	10	36
498	SAB 2%	23	74
	ASN	29	41
	MM	3	43
499	SAB 2%	6	28
	ASN	4	16
	MM	2	18
500	SAB 2%	4	3
	ASN	2	27
	MM	1	17
521	SAB 2%	16	79
	ASN	12	29
	MM	8	46
522	SAB	8	53
	ASN	17	49
	MM	12	40
523	SAB 2%	7	49
	ASN	15	36
	MM	22	43
524	SAB 2%	7	49
	ASN	17	44
	MM	28	22
525	SAB 2%	6	57
	ASN	10	36
	MM	100	63
526	SAB	17	54
	ASN	15	44
	MM	6	39
527	SAB 2%	16	76
	ASN	17	38
	MM	15	37
528	SAB 2%	7	50
	ASN	11	35
	MM	18	38
529	SAB 2%	2	3
	ASN	6	20
	MM	0	85

530	SAB 2%	10	52
	ASN	19	43
	MM	17	14
531	SAB 2%	6	35
	ASN	17	42
	MM	2	27
533	SAB 2%	13	57
	ASN	31	41
	MM	20	75
534	SAB 2%	9	26
	ASN	16	11
	MM	2	39
535	SAB 2%	10	57
	ASN	21	44
	MM	11	46
536	SAB 2%	19	72
	ASN	22	47
	MM	27	64
537	SAB 2%	3	31
	ASN	17	19
	MM	17	16
538	SAB 2%	15	37
	ASN	12	19
	MM	24	23
539	SAB 2%	11	27
	ASN	21	44
	MM	28	28
540	SAB 2%	2	37
	ASN	9	26
	MM	29	9
541	SAB 2%	5	37
	ASN	3	20
	MM	19	23
542	SAB 2%	6	23
	ASN	4	11
	MM	21	27
544	SAB 2%	6	33
	ASN	3	32
	MM	13	28
546	SAB 2%	0	10
	ASN	1	11
	MM	7	18
547	SAB 2%	3	7
	ASN	13	20
	MM	17	33
548	SAB 2%	7	16
	ASN	4	16
	MM	9	26
549	SAB 2%	5	29
	ASN	5	18
	MM	8	19

CFP: Coleção de Fungos Patogênicos; T2: após 3 meses da preservação; Lio: liofilização; Crio: criopreservação a -70°C; SAB 2%: ágar Sabouraud 2% de glicose; ASN: ágar semente de níger; MM: meio mínimo.