



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CAMPUS UFRJ DUQUE DE CAXIAS
PROFESSOR GERALDO CIDADE



JOICE FERREIRA DA SILVA

ALVOS METABÓLICOS E ESTRUTURAIS DE *Candida albicans*:

Produção de Suporte para Crescimento Orientado de *Candida albicans*

DUQUE DE CAXIAS

2023

JOICE FERREIRA DA SILVA

ALVOS METABÓLICOS E ESTRUTURAIS DE *Candida albicans*:

Produção de Suporte para Crescimento Orientado de *Candida albicans*

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Campus Duque de Caxias da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas com ênfase em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcel Menezes Lyra da Cunha.

DUQUE DE CAXIAS

2023

CIP - Catalogação na Publicação

F383a Ferreira da Silva, Joice
Alvos Metabólicos e Estruturais de *Candida albicans*: Produção de Suporte para Crescimento Orientado de *Candida albicans* / Joice Ferreira da Silva. -- Rio de Janeiro, 2023.
64 f.

Orientador: Marcel Menezes Lyra da Cunha.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Duque de Caxias Professor Geraldo Cidade, Bacharel em Ciências Biológicas: Biotecnologia, 2023.

1. *Candida albicans*. 2. Microscopia Eletrônica. 3. Ultraestrutura. 4. Corantes. 5. Biologia celular. I. Menezes Lyra da Cunha, Marcel, orient. II. Título.

JOICE FERREIRA DA SILVA

ALVOS METABÓLICOS E ESTRUTURAIS DE *Candida albicans*:

Produção de Suporte para Crescimento Orientado de *Candida albicans*

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Campus Duque de Caxias da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Biotecnologia.

DATA DE APROVAÇÃO:

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Marcel Menezes Lyra da Cunha
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Profa Bianca Pizzorno Backx
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dr. Brunno Renato Farias Verçoza Costa
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Profa Fernanda Neumann
Universidade Federal do Rio de Janeiro

DEDICATÓRIA

Dedico minha monografia a toda a minha família e a todos os meus professores, desde a minha infância até a vida adulta, que tanto me ajudaram a alcançar meus objetivos mesmo sem conhecê-los.

EPÍGRAFE

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.”

Isaac Newton (1676)

RESUMO

Da Silva, Joice Ferreira. **Alvos Metabólicos E Estruturais De *Candida albicans*: Produção de Suporte para Crescimento Orientado de *Candida albicans*.** Monografia (Ciências Biológicas: Biotecnologia) - Campus Duque de Caxias Professor Geraldo Cidade, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Duque de Caxias, 2023.

O gênero *Candida* é composto por fungos de grande interesse médico devido a sua alta patogenicidade e mecanismos de virulência. *C. albicans* e *C. auris* são dois dos principais fungos de maior preocupação para a saúde pública segundo a Organização Mundial da Saúde, pois já são resistentes aos poucos antifúngicos existentes. Assim, toda a preocupação voltada para o gênero, somada aos problemas relacionados aos tratamentos com antifúngicos, servem de apoio para a análise da morfologia e ultraestrutura destes fungos, para compreensão e melhoria do tratamento.

A microscopia eletrônica é uma ferramenta usada para elucidar as características celulares e assim contribuir com a compreensão dos mecanismos da patogênese e fatores de virulência de *Candida* spp. O atual trabalho visa a otimização das análises por microscopia eletrônica ao utilizar suportes de celulose para o estudo orientado de *C. albicans*. Para tanto, não somente há a produção dos suportes, como também o aperfeiçoamento destes com auxílio da coloração, visando o melhor, mais rápido e seguro, manuseio e visualização.

Testes de coloração foram feitos com azul de tripan, azul de algodão e azul de metileno, pois a transparência dos suportes de celulose dificulta o processamento tanto para a microscopia eletrônica de varredura quanto para a microscopia eletrônica de transmissão. Foi verificada a manutenção da coloração frente a autoclavagem e etapas de fixação e processamento de amostras para microscopia eletrônica. O azul de tripan foi o corante de escolha para nosso protocolo de cultivo e processamento de fungos para microscopia eletrônica.

O suporte pode conter características químicas que garantem interação com o azul de tripan, haja vista que, tanto a celulose quanto o azul de tripan, possuem carga negativa. A interação também é evidenciada pela fluorescência obtida somente nos suportes corados. Dessa forma, nossa pesquisa progride para o

aperfeiçoamento de suportes que permitam a aderência de células, a orientação induzida de células filamentosas de fungos, e a maior facilidade do estudo por técnicas de microscopia eletrônica.

Palavras-chave: *Candida albicans*. Microscopia Eletrônica de Transmissão. Microscopia Eletrônica de Varredura. Ultraestrutura. Biologia Celular. Corantes.

ABSTRACT

Da Silva, Joice Ferreira. **ALVOS METABÓLICOS E ESTRUTURAIS DE *Candida albicans*: Produção de Suporte para Crescimento Orientado de *Candida albicans***. Monografia (Ciências Biológicas: Biotecnologia) - Campus Duque de Caxias - Professor Geraldo Cidade, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Duque de Caxias, 2023.

Candida genera is composed by fungi of great medical interest due to its pathogenicity and virulence mechanisms (GULATI et al., 2016; World Health Organization, 2022). *C. albicans* and *C. auris* are two of the major fungi with substantial concern to public health according to World Health Organization, which are already resistant to scarce antifungals that exist (World Health Organization, 2022). Despite that concern around the gener, furthermore, the problems related with antifungal treatments serve as justification for fungus morphological and ultrastructural analysis to enhance understanding and improve treatment.

Electron microscopy is a tool used to elucidate cellular characteristics and contribute to the understanding of virulence factors and pathogenesis mechanisms. The current work focuses on optimizing electron microscopy analyses by using cellulose supports for the oriented study of *C. albicans*. Additionally, it involves not only the production of these supports but also their refinement with the help of staining, aiming for the best, fastest, and most secure manipulation and visualization of the samples.

Staining assays were carried out with trypan blue, cotton blue, and methylene blue due to the difficulty in processing the transparent supports for scanning electron microscopy and transmission electron microscopy. The persistence of the stain was tested through autoclaving, fixation steps, and sample processing for electron microscopy. Trypan blue was the dye chosen for our fungal culture and electron microscopy processing protocol.

The support may contain chemical characteristics that facilitate interactions with trypan blue, considering that both cellulose and trypan blue are negatively charged. The interaction is evidenced by the fluorescence observed exclusively in dyed supports. Nonetheless, our research is progressing towards enhancing

supports that enable cell adherence, induce orientation of fungal filaments, and provide greater ease in conducting studies using electron microscopy techniques.

Palavras-chave: *Candida albicans*. Transmission Electron Microscopy. Scanning Electron Microscopy. Ultrastructure. Cellular Biology.

LISTA DE IMAGENS

Figura 1. Colonização e invasão do tecido do hospedeiro	17
Figura 2. Representação da variabilidade morfológica de <i>C. albicans</i>	18
Figura 3. Adesão, transição morfológica, biofilme e dispersão de <i>C. albicans</i>	21
Figura 4. Desregulação da microbiota e infecção por <i>Candida</i> spp.	25
Figura 5. Invasão de <i>C. albicans</i>	26
Figura 6. Passo-a-passo da metodologia	39
Figura 7. Suportes de celulose corados durante 24 horas	44
Figura 8. Suportes de celulose corados durante 48 horas	45
Figura 9. Suportes autoclavados posteriormente à coloração	46
Figura 10. Suportes armazenados durante 24 e 48 horas	46
Figura 11. Suportes fixados após a armazenagem	47
Figura 12. Suportes fixados e não autoclavados	47
Figura 13. Suportes desidratados com etanol	48
Figura 14. Comparação entre os agentes desidratantes após renovação do fixador	49
Figura 15. infiltração em epóxi diluído em acetona	49
Figura 16. Microscopia Ótica de <i>C. albicans</i> SC5314 crescida por 6 hem suporte de celulose 6 mm	50
Figura 17. Microscopia Ótica de <i>C. albicans</i> SC5314 crescida em suporte de celulose 6 mm corado em meio YNB+GLI	51
Figura 18. Microscopia de fluorescência do suporte de 6 mm corado	52
Figura 19. Imagens editadas da microscopia de fluorescência do suporte de 6 mm corado	52
Figura 20. Microscopia de fluorescência do suporte de 3 mm não corado	52
Figura 21. Microscopia de fluorescência de dois diferentes suportes de 3 mm semi-corados	53
Figura 22. Imagens editadas da microscopia de fluorescência de dois diferentes suportes de 3 mm semi-corados	53
Figura 23. Imagens editadas da microscopia de fluorescência de dois diferentes suportes de 3 mm semi-corados	54

LISTA DE ABREVIACOES

- Als:** Agglutinin-like sequence
- Bcr:** Biofilm and cell wall regulator
- cAMP:** cyclic Adenosine 3,5-Monophosphate
- CDR:** Candida Drug Resistance
- DC-SIGN:** dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin
- ICAM:** Intracellular Adhesion Molecule
- DDSA:** Dodecanyl Succinic Anhydride
- DMP-30:** 2,4,-tridimetilaminametilfenol
- Eap:** Enhanced adherence to polystyrene
- GPI:** Glicosilfosfatidilinositol
- Hcwp:** Hyphal cell wall protein
- HIV:** Human Immunodeficiency Virus
- ME:** Microscopia Eletrônica
- MET:** Microscopia Eletrônica de Transmissão
- MEV:** Microscopia Eletrônica de Varredura
- MHC:** Major Histocompatibility Complex
- MNA:** anidrido metil ndico
- MQS:** Moléculas de *Quorum sensing*
- NaOH:** Hidróxido de Sdio
- OMS:** Organizao Mundial da Saúde
- PAMPs:** Pathogen Associated Molecular Patterns
- PKA:** Proteína kinase A
- PRRs:** Pattern Recognition Receptors
- Saps:** Secreted aspartyl proteinases
- SDB:** Sabouraud Dextrose Broth
- SEM:** Scanning Electron Microscopy
- TEM:** Transmission Electron Microscopy
- TLR:** Toll Like Receptor
- UV:** Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Candida albicans	14
1.2 Parede celular	16
1.3 Fatores de Virulência	16
1.3.1 Polimorfismo	16
1.3.2 Adesinas	18
1.3.3 Biofilme	19
1.3.4 Moléculas secretadas	21
1.4 Interação com o hospedeiro e resposta imune	24
1.5 Antifúngicos e resistência adquirida	28
1.6 Microscopia Eletrônica	29
1.6.1 Microscopia Eletrônica de Varredura	31
1.6.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão	33
1.7 Suportes para Microscopia Eletrônica	35
1.8 Coloração de suporte para o processamento de Microscopia Eletrônica	36
2 JUSTIFICATIVA	38
3 OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo geral	38
3.2 Objetivos específicos	38
4 METODOLOGIA	39
4.1 Produção dos suportes	39
4.2 Tratamento com Hidróxido de Sódio (NaOH)	40
4.3 Coloração	40
4.3.1 Azul de algodão 5%	40
4.3.2 Azul de algodão 0,01%	41
4.3.3 Azul de metileno 1%	41
4.3.4 Azul de tripan 0,05%	41
4.4 Processamento para ME	41
4.4.1 Fixação	41
4.4.2 Desidratação	42
4.4.3 Infiltração de Resina	42
4.5 Crescimento de C. albicans em suporte corado	42
4.5.1 Propagação, cultivo de C. albicans e preparo dos suportes	42
4.5.2 Processamento para ME	43
5 RESULTADOS	43
5.1 Coloração	43
5.2 Descoloração	45
5.2.1 Autoclavagem	45

5.2.2 Armazenamento	46
5.2.3 Fixação	47
5.2.4 Desidratação	48
5.3 Crescimento de <i>C. albicans</i> em suporte corado	50
5.4 Análise dos suportes por microscopia de fluorescência	51
6 DISCUSSÃO	55
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
8 REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Candida albicans*

Candida albicans é o fungo causador das principais infecções hospitalares adquiridas, além de possuir alta mortalidade (GULATI *et al.*, 2016). A candidíase invasiva, ou seja, quando atravessa mucosas ou pele, possui mortalidade que varia de 20% a 50% dependendo do sítio da infecção (World Health Organization, 2022). De acordo com a lista de patógenos fúngicos de prioridade da Organização Mundial de Saúde (OMS), publicada em 2022, das espécies de *Candida*, a *C. albicans* e a *C. auris* são dois dos fungos de maior risco para a saúde pública (World Health Organization, 2022). Estes fungos possuem a capacidade de colonizar tecidos das regiões gastrointestinal e urogenital, mucosas, pele e unhas, além de conseguir se aderir a superfícies abióticas, como aquelas compostas por plásticos, tais como próteses e cateteres (GULATI *et al.*, 2016; SACHIVKINA *et al.*, 2021; BOJANG *et al.*, 2021).

A *C. albicans* é um microrganismo endógeno da microbiota dos animais, não causando infecção em condições normais. Entretanto, mudanças na nutrição, seja no tipo ou na concentração, no pH, no nível de dióxido de carbono, na temperatura, na composição da microbiota, na densidade celular, e na imunidade do hospedeiro, podem favorecer sua multiplicação e a infecção (GULATI *et al.*, 2016, ARSHAD *et al.*, 2019; SACHIVKINA *et al.*, 2021; BOJANG *et al.*, 2021). A alteração da microbiota pode ocorrer por tratamento com antibióticos, enquanto a imunidade pode ser suprimida por uso de medicamentos imunossupressores ou comprometida por doenças (ARDIZZONI *et al.*, 2021; GULATI *et al.*, 2016). A imunidade também é importante quando se trata de indivíduos neutropênicos, os quais possuem maior dificuldade no combate à *C. albicans* (BOJANG *et al.*, 2021).

Em condições adversas, como falta de nutrientes, fungos patogênicos têm seu metabolismo alterado, podendo ter como consequência sua adaptação e sobrevivência. Assim como em mamíferos, os fungos também possuem a capacidade de estocar glicogênio e usar como reserva energética na ausência de fontes de carbono externas (NELSON *et al.*, 2022; MIAO *et al.* 2023).

O acúmulo de glicogênio parece estar envolvido também na virulência de *C. albicans*, pois a falta de genes relacionados com a síntese e o catabolismo do

polímero diminuem a virulência de *Candida spp.* em modelos com infecção vulvovaginal. Entretanto, apesar de haver glicogênio na mucosa vaginal por fatores hormonais, tal qual a liberação de estrogênio, o gênero *Candida* pouco se desenvolve quando somente esse carboidrato está presente como fonte de carbono. Isso mostra que a assimilação pode ser baixa, mas o uso de glicogênio intracelular é de grande valia para a sobrevivência do fungo (MIAO *et al.* 2023).

O uso do glicogênio estocado serve como estratégia de sobrevivência. Sua biossíntese depende da glicosiltransferase (NELSON *et al.*, 2022; MIAO *et al.* 2023), traduzida a partir dos genes GLG21 e GLG2, a qual origina cadeias lineares de glicose alfa-1,4; da glicogênio sintase, traduzida a partir de GSY1, responsável pelo alongamento das cadeias geradas anteriormente; e da enzima responsável por formar as ramificações do tipo alfa-1,6, traduzida pelo gene GLC3. A degradação é feita por enzimas de desramificação, traduzidas a partir de GDB1, pela glicogênio fosforilase, GPH1, responsável por fosforilar resíduos de glicose da região terminal não redutora, ou pela glicoamilase vacuolar, SGA1, que gera glicose livre. Em *Saccharomyces cerevisiae*, o metabolismo do glicogênio é coordenado por proteínas quinases dependentes de ciclina, através da via Snf1/PKA (MIAO *et al.* 2023).

A vantagem do uso do glicogênio é a baixa pressão osmótica e a melhor compactação do polímero, o que garante estocagem sem promover a entrada de água por conta da quantidade de soluto no meio intracelular (NELSON *et al.*, 2022; MIAO *et al.* 2023). O estudo feito por MIAO e colaboradores (2023) foi importante para detectar se a candidíase vulvovaginal ou sistêmica poderia ser causada ou potencializada pela maior presença de glicogênio na mucosa vaginal. E, apesar de não contribuir diretamente com o desenvolvimento do fungo quando obtido exogenamente, a degradação do glicogênio extracelular pode facilitar a assimilação do carboidrato por *Candida spp.* de forma indireta, contribuindo para sua nutrição e seu desenvolvimento.

Ao considerar os dados obtidos pelos “Centers for Disease Control”, os quais informam que 368 milhões de dólares em média são gastos por ano nos Estados Unidos da América para tratamento de candidíase vulvovaginal (MIAO *et al.* 2023), pode-se perceber que os tratamentos atuais não estão sendo suficientes para combater o gênero *Candida* e suas múltiplas resistências adquiridas.

A cárie de primeira infância também está relacionada com a *C. albicans*, a qual está presente em uma proporção dobrada no biofilme em crianças com esse

problema em comparação àquelas que não possuem cárie. A prevalência de candidíase oral em crianças é de 4 a 15%, exceto naquelas acometidas pelo vírus da imunodeficiência humana, do inglês “Human Immunodeficiency Virus” (HIV), nas quais a prevalência é de 40%. Esse fungo também possui características que favorecem o surgimento de cáries, tais como a capacidade acidogênica, secreção de aspartil proteases que degradam o colágeno do dente e potencial acidúrico (ALKHARS *et al.*, 2023).

1.2 Parede celular

A parede celular é a parte mais externa do fungo e interage diretamente com superfícies abióticas e com o hospedeiro (LOWMAN *et al.*, 2021). Essa camada garante proteção ao estresse osmótico, contra a ação das células imunes e também à desidratação, além de outros estresses ambientais (TALAPKO *et al.*, 2021). A primeira camada, em contato com o meio extracelular, é composta por manana e manoproteínas. Posteriormente, existe uma camada formada de quitina e glucana. A quitina possivelmente interage com as duas cadeias de glucana, a linear, beta-1,3, e a ramificada, beta-1,6 (LOWMAN *et al.*, 2021; TALAPKO *et al.*, 2021).

A camada de manana e manoproteínas é importante pois receptores de células do sistema imunitário do hospedeiro são capazes de reconhecer estas estruturas, que estão na região mais externa da parede celular (LOWMAN *et al.*, 2021; TALAPKO *et al.*, 2021).

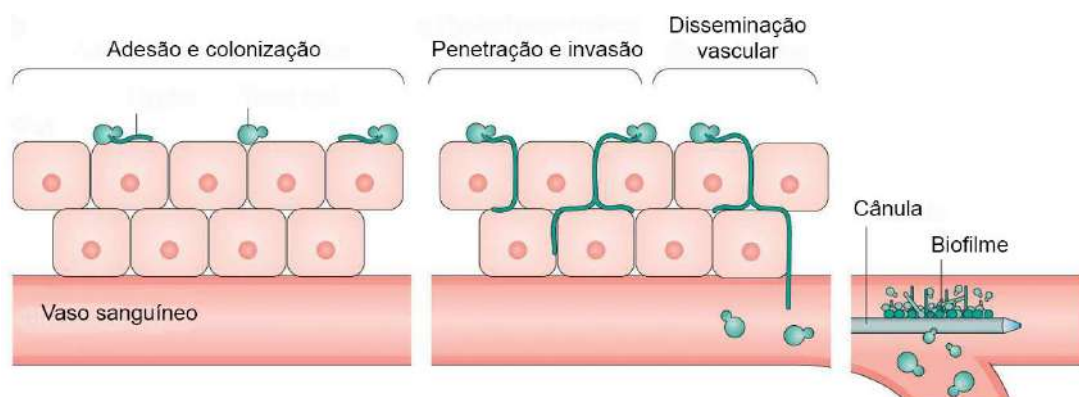
Além dessa composição, já foi vista ligação O-glicosídica, do tipo alfa-1,6, entre a beta-1,6 glucana e o glicogênio, mostrando que este também pode fazer parte da parede celular de alguns fungos, incluindo *C. albicans* e *S. cerevisiae*. Neste mesmo trabalho, dois modelos de interação são propostos. Em um deles, o glicogênio estaria na porção citoplasmática, enquanto no outro, o glicogênio estaria na região extracelular, interno à parede celular (LOWMAN *et al.*, 2021).

1.3 Fatores de Virulência

1.3.1 Polimorfismo

A *C. albicans* é um fungo polimórfico capaz de transitar entre as morfologias de hifa, pseudo-hifa e levedura, principalmente. Essa transição (fig. 1 e 2) garante patogenicidade, virulência e capacidade de reprodução (SACHIVKINA *et al.*, 2021; TALAPKO *et al.*, 2021). A mudança para a forma filamentosa culmina na invasão tecidual (fig. 1B), logo após a adesão, o que acarreta na entrada do fungo na corrente sanguínea por invasão mecânica. Já na corrente sanguínea, o fungo transita para o estado leveduriforme, promove sua replicação e consegue se disseminar para outros tecidos para estabelecer novos sítios de infecção (SACHIVKINA *et al.*, 2021; BOJANG *et al.*, 2021). A transição morfológica entre levedura e hifa é possível graças a diversas alterações transcricionais que são sinalizadas por fatores exógenos ou endógenos, como pH e aumento de fontes nitrogenadas (TALAPKO *et al.*, 2021).

Fig. 1 – Colonização e invasão do tecido do hospedeiro.



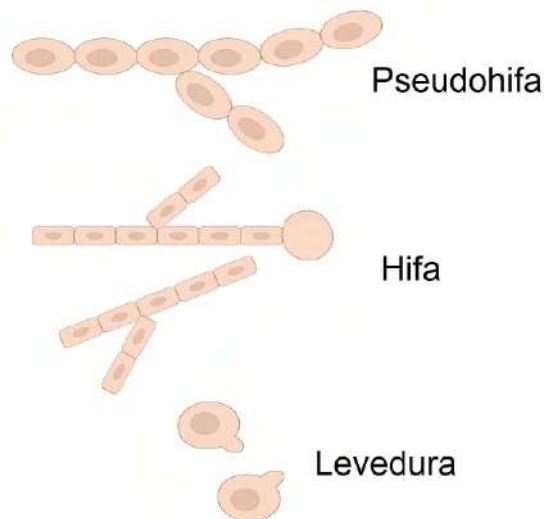
A imagem representa a invasão e colonização do hospedeiro por *C. albicans*. Primeiramente as leveduras se aderem e colonizam a região mais superficial, filamentado posteriormente à adesão. Por fim, invadem os tecidos de forma mecânica e química até atingir os vasos sanguíneos, colonizando, inclusive, objetos abióticos (como cateteres e cânulas). Na corrente sanguínea, passam a se multiplicar e conseguem se disseminar facilmente para atingir novos tecidos e iniciar novos pontos de infecção. Fonte: PAPAS *et al.*, 2018.

A levedura possui estrutura mais ovalada, podendo possuir cicatrizes derivadas do brotamento celular. A pseudo-hifa é uma cadeia de leveduras alongadas que permanecem unidas umas às outras, não compartilhando conteúdo citoplasmático. A hifa ocorre quando uma célula se alonga, produzindo mais lipídeos, proteínas de parede celular, mais vesículas, etc. Em *C. albicans*, uma mesma hifa pode possuir mais de um núcleo e o conteúdo plasmático atravessa todo o filamento através de septos (TALAPKO *et al.*, 2021).

A diferença entre essas 3 morfologias está ilustrada na figura 2. Os blastóporos são as leveduras, e é possível ver a divisão naquelas que possuem uma pequena levedura aderida a uma maior. A levedura é uma célula capaz de realizar reprodução assexuada, em que há a reprodução através de brotamentos. Esses brotamentos geram cicatrizes na superfície da célula mãe, característica essa que identifica a divisão celular. Nas hifas, os espaços entre um retângulo e outro simulam os septos que fazem parte do filamento (TALAPKO *et al.*, 2021).

Porém, em alternância às estruturas supracitadas, a *C. albicans* produz clamidósporos. Essas estruturas são esporos assexuados gerados em condições adversas extremas, sendo maiores que as leveduras e com uma espessura maior da parede celular, justamente para fornecer maior proteção (SACHIVKINA *et al.*, 2021; TALAPKO *et al.*, 2021).

Fig. 2 – Representação da variabilidade morfológica de *C. albicans*.



As diferentes morfologias de *C. albicans* demonstradas acima podem ser interconvertidas. Isso significa que o fungo consegue transitar sua forma independentemente daquela que está apresentando no momento.

1.3.2 Adesinas

Para que haja a infecção, os fungos do gênero *Candida* precisam garantir a adesão ao hospedeiro. Essa interação pode ser eletrostática, hidrofóbica ou por forças de Van der Waals. O epitélio é a primeira barreira que o fungo encontra ao interagir com seu hospedeiro, onde encontra alguns mecanismos de defesa que serão descritos posteriormente neste documento. A adesão de *C. albicans* a

superfícies abióticas também é possível, como, por exemplo, pela expressão de proteínas chamadas "Enhanced adherence to polystyrene" (Eap) 1, as quais aumentam a adesão ao poliestireno (HÖFS *et al.*, 2016).

O estado leveduriforme promove a adesão necessária para a formação das hifas, mas é o estado filamentoso que resulta em maior adesão ao hospedeiro, pois há a expressão de mais adesinas não encontradas nas leveduras (HÖFS *et al.*, 2016). Através de adesinas como "Hyphal cell wall protein" (Hwp) 1, "agglutinin-like sequence" (Als) 3 e Als5, a *C. albicans* consegue se aderir ao epitélio de animais que podem estar comprometidos ou suprimidos imunologicamente (SACHIVKINA *et al.*, 2021).

Als1, Als3, Hwp1 e "Biofilm and cell wall regulator" (Bcr) 1 são necessárias para a aderência em superfícies bióticas e abióticas, o que antecede a formação de biofilme e define seu desenvolvimento (GULATI *et al.*, 2016). As Als são uma família de proteínas que podem interagir com as beta-1,6 glucanas da parede celular através de âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Als5-7 e Als9 são encontradas nas leveduras, enquanto que as Als1-4 são traduzidas em tubos germinativos e nas hifas. A Hwp1 é expressa em hifas e parece ter um papel importante no estabelecimento da candidíase orofaríngea em ratos. Estas adesinas reconhecem estruturas como fibronectina, transglutaminases e fibrinogênio (HÖFS *et al.*, 2016; TALAPKO *et al.*, 2021).

1.3.3 Biofilme

O biofilme possui uma matriz extracelular (também conhecida como matriz polimérica extracelular) que envolve as células do fungo, além de outras espécies de microrganismos, e promove resistência e proteção aos diferentes tipos morfológicos de *C. albicans* (GULATI *et al.*, 2016; HUANG *et al.*, 2019; TALAPKO *et al.*, 2021). O biofilme pode ser produzido em superfícies bióticas e abióticas, como implantes e cateteres (HUANG *et al.*, 2019). Quando a matriz é formada, as células que a compõem passam a estar protegidas de antifúngicos, células e moléculas do sistema imunitário, pois esta impede a entrada dos mesmos (GULATI *et al.*, 2016; HUANG *et al.*, 2019).

Essa barreira pode ser tanto física quanto bioquímica, pois já foi visto que a presença e aplicação exógena de beta-1,3 glucana diminui a suscetibilidade do

fungo a antifúngicos. A aplicação de beta-1,3 glucanase no biofilme aumenta a suscetibilidade de células do biofilme ao fluconazol, enquanto a adição do polissacarídeo em células planctônicas, diminui. Esse mesmo carboidrato estrutural pode ser capaz de interagir especificamente com a anfotericina B, inibindo sua atividade (GULATI *et al.*, 2016).

Além disso, contribuindo para a virulência, há o aumento da expressão de bombas de efluxo de células do biofilme já no início da sua formação, no processo de aderência, e que permanece mesmo na ausência de antifúngicos. Normalmente, essas bombas de efluxo são expressas em células planctônicas quando algum antifúngico desafia a *C. albicans*, porém, hipotetiza-se que na presença de biofilme, esses genes seriam expressos pela competição que ocorre com outros microrganismos (ARDIZZONI *et al.*, 2021; GULATI *et al.*, 2016).

Alguns reguladores transcricionais são necessários para permitir a formação do biofilme, mas variam dependendo das condições em que o fungo se encontra. Para crescimento em placas de poliestireno sob agitação, reguladores como Bcr1, Ace2, Snf5, e Arg8 foram expressos para a formação do biofilme. As hifas possuem outros reguladores que auxiliam no biofilme, sendo proteínas importantes também para o desenvolvimento filamentoso (ARDIZZONI *et al.*, 2021; GULATI *et al.*, 2016).

O biofilme de *C. albicans* é extremamente perigoso para aqueles que fazem uso de cateteres e próteses. Isso porque, quando o fungo se adere e forma biofilme, se torna difícil o tratamento e há necessidade do uso de altas doses de antifúngicos e, em alguns casos, cirurgia para remoção do objeto contaminado. O problema das altas doses de antifúngicos é evidente também pelos danos ocasionados aos órgãos responsáveis pela metabolização e depuração dos medicamentos, fígado e rins (GULATI *et al.*, 2016). Entretanto, em casos de infecção vaginal, não é sabido se o biofilme interespecífico interfere na maior resistência bacteriana às drogas, tal como ocorre para o fungo na presença de antifúngicos (ARDIZZONI *et al.*, 2021).

A composição desta matriz é majoritariamente de proteínas, as quais são, em maior proporção, formadas por enzimas inferidas como tendo atividade hidrolítica, ou seja, possivelmente atuam na hidrólise dos biopolímeros presentes no biofilme. A segunda maior composição é de carboidratos, como glucanas, N-acetilglicosamina, rhamnose e manose. Entretanto, o biofilme não é formado apenas por moléculas secretadas pela *C. albicans*, pode haver conteúdo de células lisadas do fungo ou do

hospedeiro, anticorpos e conteúdo de outros microrganismos, por exemplo (GULATI *et al.*, 2016).

Para que o biofilme seja formado (fig. 3), as leveduras precisam, primeiramente, se aderir umas às outras e se ancorar a alguma superfície de forma eficiente (GULATI *et al.*, 2016; TALAPKO *et al.*, 2021), caso contrário serão lavadas. Essa superfície pode ser dos próprios vasos sanguíneos do hospedeiro ou qualquer tecido do corpo, assim como materiais de silicone e poliestireno. O resultado dessa ancoragem é uma camada de células leveduriformes (GULATI *et al.*, 2016). Após a ancoragem, as células se replicam e iniciam a filamentação dando origem a mais camadas de células e à matriz extracelular. As próprias hifas dão suporte estrutural às células presentes (GULATI *et al.*, 2016; TALAPKO *et al.*, 2021).

Por último, ocorre a maturação do biofilme e dispersão das células, principalmente leveduras. Este passo acarreta em novos sítios de infecção quando a estrutura é formada na corrente sanguínea, causando candidemia (GULATI *et al.*, 2016; TALAPKO *et al.*, 2021). As células leveduriformes dispersas não possuem as mesmas características daquelas planctônicas, pois, de alguma forma, apresentam maior virulência em modelos de ratos, maior capacidade de aderência e de formação de biofilme. NRG1 e PES1 foram genes vistos como sendo importantes para a maior dispersão celular a partir do biofilme, pois, quando superexpressos, há o aumento de células liberadas da matriz polimérica (GULATI *et al.*, 2016).

Fig. 3 – Adesão, transição morfológica, biofilme e dispersão de *C. albicans*.

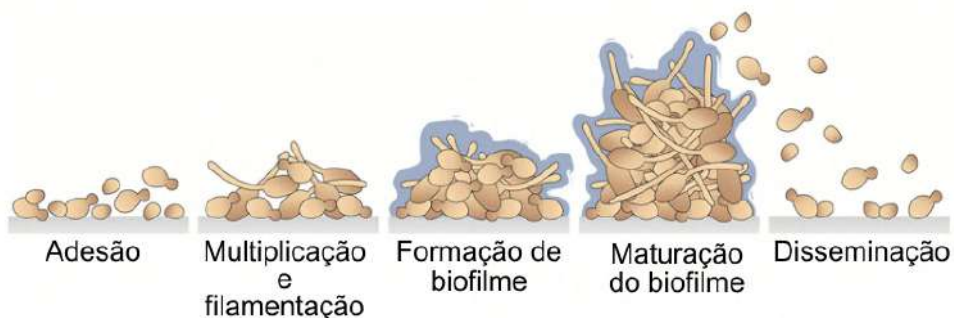


Imagem modificada. Fonte: FARIA-GOLÇALVES *et al.*, 2021.

1.3.4 Moléculas secretadas

Os microrganismos possuem a capacidade de secretar diferentes moléculas que interagem com o meio externo, seja induzindo uma sinalização ou clivando outras estruturas. Essas moléculas podem ser secretadas isoladamente ou através de vesículas (BLEACKLEY *et al.*, 2019). A *C. albicans* secreta moléculas que irão facilitar a invasão dos tecidos, como fosfolipases, que hidrolisam fosfolipídeos da membrana plasmática, e proteases, que degradam as proteínas responsáveis pela junção célula-célula (ARDIZZONI *et al.*, 2021).

Uma das famílias de moléculas secretadas por *Candida* spp. é a candidalisina. A candidalisina é uma toxina composta por peptídeos citolíticos, que podem variar na composição de aminoácidos (ARDIZZONI *et al.*, 2021; MOYES *et al.*, 2016; RICHARDSON *et al.*, 2022). Foi identificada em fungos que causam doenças humanas primeiramente em 2016, em *C. albicans*, mas já foi vista em outras espécies do gênero. Essa família possui majoritariamente estrutura secundária de alfa hélice em solução aquosa, sendo um peptídeo anfipático que afeta as mucosas do epitélio e a ativação do sistema imunitário (MOYES *et al.* 2016; RICHARDSON *et al.*, 2022).

Nas mucosas, a candidalisina resulta na invasão do fungo por via gastrointestinal, com influxo de cálcio pelos danos ao epitélio, e consequente ruptura da membrana e extravasamento do conteúdo citoplasmático. Na ativação do sistema imunológico, a candidalisina influencia a liberação de citocinas amplificando ainda mais a resposta inflamatória do hospedeiro, o que agrava o quadro do paciente (ARDIZZONI *et al.*, 2021; RICHARDSON *et al.*, 2022). A candidalisina parece ser bastante importante no recrutamento de neutrófilos na mucosa vaginal, pois já foi visto que ratos desafiados com cepas de *C. albicans* incapazes de secretar essa toxina citolítica, apresentaram menor recrutamento de neutrófilos, menor quantidade de citocinas pró-inflamatórias e de danos no epitélio (ARDIZZONI *et al.*, 2021).

Os microrganismos, assim como plantas, conseguem liberar também as moléculas de *quorum sensing* (MQS), induzindo uma resposta às condições ambientais. Basicamente agem como moduladores de expressão gênica, agindo sob promotores e causando adaptação às mudanças externas. Essas moléculas são liberadas a partir do momento em que a densidade celular chega em um limiar específico, e uma célula passa a induzir a outra, ou a si mesma, a alterar suas características fenotípicas (ARSHAD *et al.*, 2019).

As MQS são pequenas moléculas capazes de causar autoindução celular após atingirem seus respectivos receptores (MARTINA *et al.*, 2016; ARSHAD *et al.*, 2019), os quais ainda não são bem caracterizados. Os receptores podem ser localizados na superfície da membrana ou no citoplasma e, quando estimulados, há a sinalização para um feedback positivo para a produção da MQS e uma regulação positiva ou negativa para o mecanismo de adaptação (MARTINA *et al.*, 2016; ARSHAD *et al.*, 2019).

O farnesol é uma das MQS secretadas por *C. albicans* e age na transição morfológica ao reprimir a formação de hifas. Inibe a adenilil ciclase (Cyr1) de *C. albicans*, influenciando na via Ras/cAMP/PKA. Essa via é responsável, por exemplo, pelo desenvolvimento celular, transição morfológica branco-opaco e levedura-hifa, e na formação de biofilme (HUANG *et al.*, 2019). Apesar de reprimir características que garantem a patogenicidade, o estado leveduriforme é a morfologia responsável pela disseminação na corrente sanguínea como mencionado em GULATI e colaboradores (2016). Embora SACHIVKINA e colaboradores (2021) relatem que o farnesol também previne a formação de biofilme, talvez, com o biofilme já formado, esses efeitos, aparentemente negativos ao fungo, ainda não sejam suficientes para retardar a infecção. Logo, provavelmente podem se somar ao processo de candidemia.

Esses componentes podem ser confundidos com outras moléculas sinalizadoras, mas para não gerar esse erro, existem alguns atributos para serem consideradas moléculas de *quorum sensing* (MARTINA *et al.*, 2016; ARSHAD *et al.*, 2019):

1. Acumular no meio extracelular de forma proporcional ao aumento do número de células (MARTINA *et al.*, 2016; ARSHAD *et al.*, 2019);
2. Após atingir uma determinada densidade celular, precisa gerar uma resposta coordenada da população celular (ARSHAD *et al.*, 2019). Essa resposta é distinta quando células individuais são atingidas (MARTINA *et al.*, 2016);
3. Se aplicado exogenamente, precisa gerar o mesmo fenótipo daquele quando as próprias células as secretam (MARTINA *et al.*, 2016; ARSHAD *et al.*, 2019);
4. O efeito na população é distinto do resultado do metabolismo primário da MQS, ou seja, o efeito da MQS é uma ação de resposta a esta molécula que

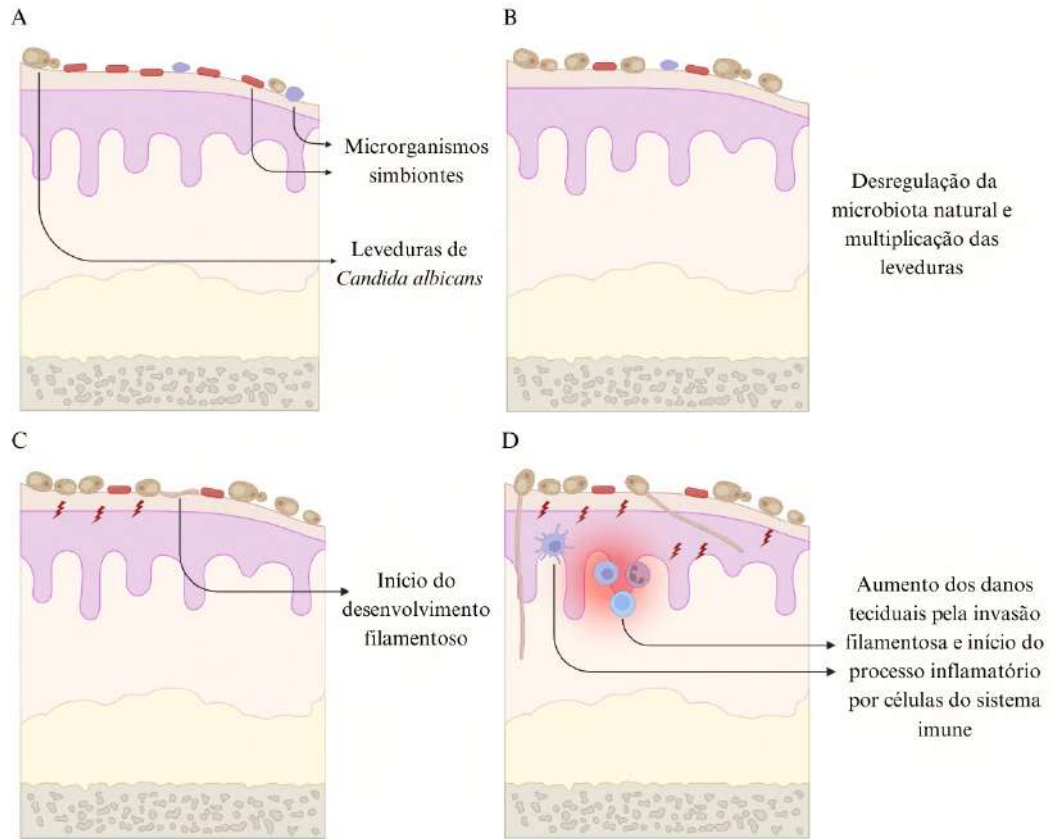
resulta na coordenação do comportamento da população (MARTINA *et al.*, 2016);

5. Não pode ser tóxica aos organismos geradores no intervalo de concentração necessário para gerar o fenótipo de adaptação (MARTINA *et al.*, 2016).

1.4 Interação com o hospedeiro e resposta imune

Normalmente, o estado leveduriforme não afeta o hospedeiro em situações de comensalismo. Mas para que a levedura permaneça, assim como ocorre para os microrganismos endógenos benéficos ao hospedeiro, ela precisa ser tolerada. Esse processo de tolerância se trata da irresponsividade do sistema imunológico. Isso pode ocorrer, por exemplo, pela falta de interação entre os ligantes e os receptores do fungo e do hospedeiro, respectivamente, como no caso da mucina que evita o contato direto com a superfície celular do hospedeiro. Essa tolerância possui um limite que pode ser ultrapassado pelo número de células, induzindo resposta imunológica. A própria microbiota do local pode inibir o crescimento e desenvolvimento de *C. albicans* (ARDIZZONI *et al.*, 2021). A microbiota vaginal possui bactérias, como as *Lactobacilli* spp., que acidificam a genitália para o pH 4 através da liberação de ácido láctico durante a fermentação, inviabilizando a formação de hifas, a expressão de fatores de virulência e crescimento de alguns microrganismos (ARDIZZONI *et al.*, 2021; EDWARDS *et al.*, 2019).

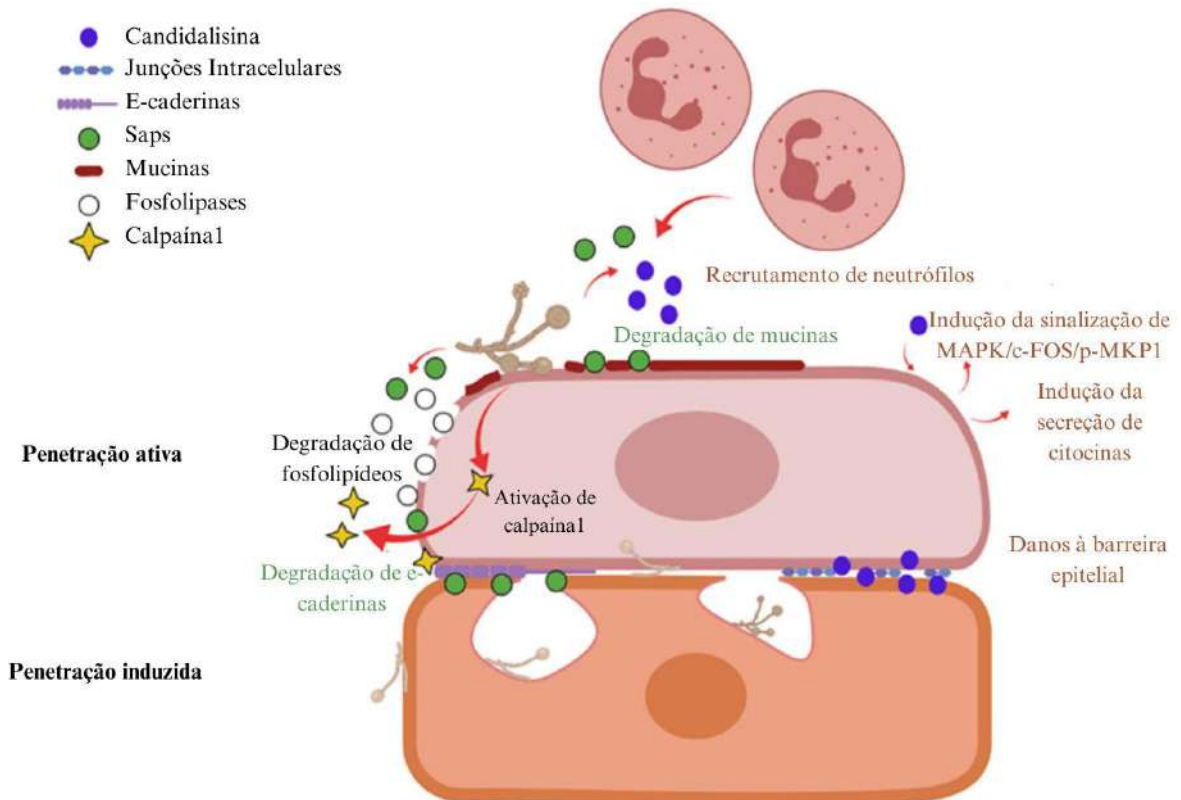
Fig. 4 – Desregulação da microbiota e infecção por *Candida* spp.



Em A, existe uma quantidade tolerável de leveduras de *Candida* spp. coexistindo com outros microrganismos simbiotes, como bactérias produtoras de ácido láctico. Em B, ocorre uma desregulação da microbiota fazendo com que não haja mais a inibição do crescimento das leveduras e consequente aumento do número de células, início da filamentação e danos teciduais, como em C. Em D, vemos o aumento dos danos teciduais ocasionados pelo início do processo inflamatório e recrutamento de células do sistema imunológico. Fonte: Desenvolvida pela autora. Criado em BioRender.com.

Após o sucesso na aderência de *C. albicans* ao hospedeiro, as células podem invadir ativamente, ou seja, mecanicamente, ou passivamente através da endocitose promovida pelo próprio epitélio do animal. A invasão mecânica depende de adesinas, como Als3, fosfolipases, candidalisina e aspartil proteases secretadas (Saps), as quais ocasionam, respectivamente, no ancoramento, na degradação dos fosfolipídios da membrana plasmática, na reatividade imunológica e consequente dano ao epitélio pela liberação de citocinas e, por último, na degradação de mucinas e de junções oclusivas, proteínas extremamente importantes para integridade do tecido (ARDIZZONI *et al.*, 2021).

Fig. 5 – Invasão de *C. albicans*.



A ilustração remete às duas diferentes formas do fungo invadir tecidos mais internos do hospedeiro, além de algumas das moléculas importantes nesse processo. Fonte: ARDIZZONI *et al.*, 2021.

Apesar da existência de células e de anticorpos que atuam contra os diversos patógenos, existem outras estruturas que previnem essa interação com o hospedeiro ou geram uma barreira para impedir a entrada dos mesmos. As junções oclusivas são formadas por proteínas que não somente mantêm as células unidas, como também impedem a entrada de outras células do meio mais externo para os tecidos mais internos. As mucinas são glicoproteínas que formam um muco sobre o epitélio, impedindo a interação com a pele e mucosas através de interação eletrostática. Essa interação pode ser de atração com o patógeno, neutralizando suas adesinas e impedindo a aderência ao hospedeiro, por exemplo (ABUL *et al.*, 2015).

Enquanto isso, o sistema imunológico adaptativo é capaz de reconhecer estruturas não pertencentes àquelas presentes em seu hospedeiro. Isso ocorre através de receptores que reconhecem padrões moleculares, ou "Pattern Recognition Receptors" (PRRs), presentes em células especializadas do sistema imunológico. Esses receptores se ligam a estruturas do hospedeiro ou estruturas exógenas pertencentes a patógenos, os "Pathogen Associated Molecular Patterns"

(PAMPs). A dectina-1, por exemplo, é uma PRR que se liga a beta-glucanas, lectina tipo-C de células dendríticas (DC-SIGN) que interagem com N-mananas, e “Toll Like Receptor” (TLR) 2 e TLR4 que se ligam às O-mananas (ARDIZZONI *et al.*, 2021; BOJANG *et al.*, 2021).

Uma das formas do organismo combater a *C. albicans* é através da fagocitose, porém, é necessário o reconhecimento de seus PAMPs. O problema se dá pois o fungo consegue remodelar sua parede celular diminuindo moléculas imunogênicas e alterando a frequência de reconhecimento, o que acarreta na evasão do sistema imunológico. Essa remodelação pode ocorrer na mudança morfológica, quando a *C. albicans* transita de levedura para hifa e muda a proporção de beta-glucana presente em sua superfície, escondendo ainda mais seus epítomos das células do hospedeiro. A forma filamentosa possui menos beta-glucana, inviabilizando o reconhecimento por dectina-1. Entretanto, neutrófilos são capazes de forçar a exposição desse polissacarídeo (BOJANG *et al.*, 2021). A proporção desse polissacarídeo também é alterada de acordo com as fontes de carbono, pois na presença de lactato o conteúdo é menor, o que mascara a beta-glucana na mucosa vaginal (ARDIZZONI *et al.*, 2021).

Outra característica na interação entre o fungo e o seu hospedeiro seria a discriminação entre a morfologia filamentosa e a leveduriforme. Essa diferenciação é feita por células dendríticas, as quais fazem a intermediação entre o sistema imunológico inato e adaptativo. Quando fagocitam e processam os antígenos de *C. albicans*, essas células expõem os antígenos e apresentam via “Major Histocompatibility Complex” (MHC) para células T. Essa diferenciação das morfologias auxilia na polarização de células T para Th2, quando hifas, e Th1, quando leveduras (BOJANG *et al.*, 2021).

Além disso, como já mencionado acima, indivíduos neutropênicos também são suscetíveis à infecção pelo fungo. Isso ocorre porque os neutrófilos são os principais atuantes contra a candidíase. Esta célula é capaz de envolver, internalizar e eliminar as células patogênicas via dectina-1 (BOJANG *et al.*, 2021). Apesar disso, ARDIZZONI e colaboradores (2021) relatam a ineficiência de neutrófilos no combate à candidíase vulvovaginal, mostrando que atuam mais na evidência e agravamento dos sintomas do que na defesa contra o patógeno causador da infecção.

1.5 Antifúngicos e resistência adquirida

Duas estruturas celulares de fungos são muito importantes para o entendimento dos antifúngicos, o ergosterol, lipídio da classe dos esteróis, e a parede celular, mais especificamente a síntese de beta-1,3 glucana e a quitina. Os antifúngicos podem atuar de forma a causar ruptura na membrana pela retirada do ergosterol, assim como também podem inibir sua síntese e formar poros na membrana causando a lise. Na parede celular temos a presença de quitina e beta-1,3 glucana, as quais são alvos dos antifúngicos de forma a inibir sua síntese, desestabilizando a parede celular (JEFFERY-SMITH *et al.*, 2018).

Esses antifúngicos são escassos quando comparados a medicamentos bactericidas. Ainda podem ser divididos entre fungistáticos e fungicidas. Os fungicidas atuam matando o fungo, enquanto os fungistáticos somente irão impossibilitar o crescimento e divisão, impedindo o avanço da infecção, deixando que o sistema imunitário do paciente atue na eliminação. Entretanto, isto pode gerar fungos residuais levando à seleção e ao retorno da infecção. Tais medicamentos são extremamente tóxicos justamente por esses microrganismos serem eucariotos e parecidos, celularmente, com os animais. Logo, muitos compostos, como a anfotericina B, acabam interagindo com moléculas de membranas de humanos e causando efeitos adversos. Alguns antifúngicos atuam diretamente na síntese de ergosterol, por exemplo, inibindo enzimas responsáveis por essa síntese de forma a causar o menor dano possível nos humanos (JEFFERY-SMITH *et al.*, 2018).

Das classes de antifúngicos existentes, os principais são os polienos, equinocandinas e azóis. A nistatina é o polieno capaz de retirar o ergosterol da membrana citoplasmática dos fungos, mas já existem fungos resistentes. Essa resistência é associada com a baixa quantidade de ergosterol nas células. A nistatina tem toxicidade baixa, mas é pouco absorvida no trato gastrointestinal e, por isso, é usada topicamente. O fluconazol é um azol responsável por causar interrupção na síntese do ergosterol, inibindo a lanosterol 14-alfa demetilase. É mais tóxico do que a nistatina e pode ser usado sistemicamente. A caspofungina é uma equinocandina capaz de inibir a 1,3-glucana sintase, perturbando a estrutura da parede celular de fungos. Essa classe passou a ser usada pela alta resistência dos fungos aos demais antifúngicos (ALKHARS *et al.* 2023).

A alta capacidade de adaptação de *C. albicans* favorece seu alto desempenho e estabelecimento da infecção nos hospedeiros (ALKHARS *et al.* 2023). O gene ERG11, que codifica a enzima C14-alfa demetilase, está presente em *C. albicans*. Mutações ocorridas nessa sequência podem levar a sua resistência ao fluconazol, sendo essa alteração genotípica também encontrada em *C. auris*. Essa resistência ocorre pois os fungistáticos da classe dos azóis são capazes de atuar inibindo a C14-alfa demetilase. Modificações nesse gene podem interferir na ligação dos azóis de forma a diminuir a afinidade pelos sítios da enzima (JEFFERY-SMITH *et al.*, 2018; MARTINEZ *et al.*, 2006). Mutações em genes responsáveis pela tradução de esterois C5,6-dessaturase (ERG3) e das bombas de efluxo (CDR) também já foram identificadas como fatores para resistência ao fluconazol (ALKHARS *et al.* 2023).

Outros estudos relatam que a diferença de carboidrato no meio induz alterações na parede celular. Quando submetida a lactato, *C. albicans* apresenta parede celular mais fina, resistência antifúngica a caspofungina, tunicamicina e anfotericina B, e maior aderência ao plástico. Quando submetida à glicose, apresenta resistência fúngica ao miconazol e resistência ao estresse oxidativo induzido pelos fagócitos do sistema imunológico (VALVERDE, 2021).

Outro gene que pode ser alvo de antifúngicos é o ARO1, responsável pela síntese de aminoácidos de leveduras através da via do chiquimato. Essa via não é essencial para *S. cerevisiae*, mas é para *C. albicans*. A diminuição da expressão em *C. albicans* está ligada à menor virulência em *Galleria mellonella* infectada pelo fungo, provavelmente pela incapacidade de produção de aminoácidos aromáticos. Ao mesmo tempo, a falta de um dos alelos de ARO1 acarretou na maior adesão e formação de biofilme, pela maior expressão dos genes ALS1, ALS3 e ECE1. Há maior resistência aos estressores de parede celular, como zimoliase (degradadora de beta glucana), quando há menor expressão do gene. Da mesma forma, a quantidade de mana e quitina diminui (YEH *et al.*, 2020).

1.6 Microscopia Eletrônica

A microscopia eletrônica permite o estudo de estruturas muito pequenas, como organelas, vesículas e citoesqueleto. A microscopia eletrônica de varredura possibilita a visualização da superfície da amostra, coberta com um material

condutor, enquanto que a microscopia eletrônica de transmissão auxilia na visualização das estruturas intracelulares. Ambos envolvem a emissão de um feixe colimado de elétrons sobre a amostra em ambiente a vácuo. (SOUZA *et al.*, 2007; FRANKEN *et al.*, 2020; FRANKL, *et al.*, 2015). Os elétrons são utilizados pelo curto comprimento de onda derivado da aceleração do movimento dessas partículas, o que gera imagens de estruturas bem pequenas (FRANKEN *et al.*, 2020). Por fazer uso de elétrons, as amostras podem apresentar danos por quebra de ligações químicas. Esse dano vai depender da voltagem utilizada e da quantidade de elétrons que uma mesma área recebe, ou seja, da concentração dos elétrons. Isso porque a onda emitida é extremamente energética e a amostra aquece (FRANKEN *et al.*, 2020; DEDAVID *et al.*, 2007).

Tanto para a microscopia eletrônica de varredura, quanto para a de transmissão, algumas etapas do processamento são compartilhadas, tais como fixação e desidratação, que podem variar no tipo de solução utilizada também. Outras etapas são específicas para cada uma das técnicas (SOUZA *et al.*, 2007). A etapa de fixação ocorre para garantir maior estabilidade às estruturas da célula, processo importante para a visualização das células o mais próximo possível ao que havia quando as células estavam vivas (SOUZA *et al.*, 2007). Tal etapa também previne que as estruturas subcelulares sejam levadas durante a desidratação pelas trocas sucessivas entre as diferentes concentrações de etanol ou acetona (FRANKL, *et al.*, 2015). A fixação pode ocorrer por métodos químicos, os quais podem manter a estabilidade celular (SOUZA *et al.*, 2007).

Um tipo de fixador são os aldeídos, como o glutaraldeído (1,5-pentanodial), que interage bem com grupamentos amino nas regiões terminais e presentes nas cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos (SOUZA *et al.*, 2007; PubChem). O glutaraldeído precisa de certos cuidados para manter sua eficiência de fixação, como impedir o contato com o ar para evitar oxidação e consequente formação de subprodutos. Para isso, pode-se adicionar gás inerte como o nitrogênio molecular (SOUZA *et al.*, 2007). Os fixadores químicos participam de reações que podem alterar o pH da solução, atrapalhando a infiltração de resina ou a própria etapa de fixação. Por este motivo, os fixadores são preparados com tampões, como o cacodilato, que ainda aumenta a preservação estrutural da membrana (FRANK *et al.*, 2015). Entretanto existe um problema que deve ser considerado na escolha do

tampão, pois os íons gerados pelo tampão podem reagir com o fixador, culminando na redução da qualidade e, até mesmo, na precipitação dele (SOUZA *et al.*, 2007).

Para a microscopia eletrônica, os fixadores não podem ser desnaturantes para que a morfologia original da célula seja mantida. Os fixadores desnaturantes são aqueles que interagem com as proteínas expondo suas regiões hidrofóbicas e as precipitando. Logo, proteínas globulares e fibrosas, como as de membrana e actina, perdem suas interações intermoleculares (SOUZA *et al.*, 2007). Além disso, essas substâncias químicas podem auxiliar a impedir a coagulação de proteínas no processo de desidratação, o qual necessita de etanol ou acetona, por exemplo. Dessa forma, os fixadores interagem com a estrutura, ainda permitindo certo contato com a água, mas impedindo a coagulação protéica (SOUZA *et al.*, 2007).

A etapa de desidratação ocorre após a fixação e consiste na troca do conteúdo aquoso intracelular por etanol ou acetona. Para haver essa troca, é necessário aumentar gradativamente a concentração dos hidrocarbonetos até atingir a concentração de 100% de etanol ou acetona. A água vai absorvê-los e, a cada troca, a água sai aos poucos até não fazer mais parte da célula (SOUZA *et al.*, 2007).

1.6.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

Na Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), em inglês “Scanning Electron Microscopy” (SEM), o feixe viaja sobre a amostra permitindo que elétrons secundários e retroespalhados sejam emitidos do material (SOUZA *et al.*, 2007; DEDAVID *et al.*, 2007). Isso é possível pois a amostra é antes coberta com material condutor, auxiliando na ionização de sua superfície (SOUZA *et al.*, 2007). A detecção dos elétrons retroespalhados e secundários pelo MEV permite a formação de uma imagem topográfica. A profundidade observada nas imagens de MEV é feita de acordo com a energia dos elétrons que chegam ao detector (SOUZA *et al.*, 2007; DEDAVID *et al.*, 2007).

Os elétrons retroespalhados ocorrem pela colisão perpendicular elástica com a amostra, que quase é conservada. O feixe bate e o elétron volta (SOUZA *et al.*, 2007; DEDAVID *et al.*, 2007). Os elétrons secundários são gerados a partir da ação do espalhamento inelástico, no qual o feixe colide com elétrons do alvo. Quando essa colisão ocorre, os elétrons do feixe perdem energia para o elétron do alvo, o

qual absorve parte ou toda a energia para ionizar ou saltar de nível eletrônico. Quando a energia é suficiente para retirar os elétrons do alvo, a amostra ioniza e emite os elétrons secundários, que são provenientes da mesma (SOUZA *et al.*, 2007).

Para tanto, a amostra precisa ser processada e aderida a um material condutor (SOUZA *et al.*, 2007; DEDAVID *et al.*, 2007). O processamento de MEV é importante para que o material se torne mais condutor e ofereça maior resistência para evitar danos pelo feixe de elétrons. Este processamento envolve a fixação, desidratação, secagem e cobertura (se com metais, usualmente definida como metalização), mas pode variar de acordo com as características do próprio material, podendo consistir em mais ou menos etapas dessas mencionadas (SOUZA *et al.*, 2007).

A fixação ocorre como já mencionado, utilizando o glutaraldeído, por exemplo. Após fixar, ocorre a desidratação. A troca normalmente começa com a solução selecionada 30%, e, caso seja necessário parar o processamento, deve-se deixar a amostra em solução 70% por até 24 horas. Para se certificar de que a água foi totalmente removida, o banho em etanol ou acetona 100% é repetido até 3 vezes. A amostra não pode secar durante a desidratação, logo, a troca deve ser feita rapidamente com intervalos de 10 minutos (SOUZA *et al.*, 2007).

Após fixar e desidratar, ocorre a secagem em ponto crítico na presença de etanol ou acetona absolutos, onde gradativamente são substituídos por dióxido de carbono líquido em baixas temperaturas. A amostra fica dentro da câmara do ponto crítico, na qual é submetida a baixas temperaturas e a alta pressão e, por fim, a temperaturas acima de 31 °C para que o dióxido de carbono entre em seu estado gasoso secando a amostra (SOUZA *et al.*, 2007). A secagem também pode ocorrer utilizando compostos orgânicos voláteis de baixa tensão superficial, como o hexa-metil-disilazano, que é adicionado logo após a desidratação com etanol e rapidamente volatilizado a temperatura ambiente (SOUZA *et al.*, 2007).

Na sequência, a amostra precisa ser coberta por um material condutor. Mas para isso, ela precisa ser fixada sobre um porta-amostra. Essa fixação pode ocorrer com auxílio de uma fita dupla-face condutora eletricamente. A cobertura metálica tem espessura, usualmente, de 5 a 30 nm, e permite a condução e emissão de elétrons da amostra. Um dos metais utilizados é o ouro, e um dos métodos é o

“sputtering”, no qual há bombardeamento do metal sobre a amostra (SOUZA *et al.*, 2007).

1.6.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), em inglês “Transmission Electron Microscopy (TEM)”, forma imagens bidimensionais produzidas com auxílio do feixe de elétrons que atravessa uma ultra fina camada da amostra. Essa técnica é capaz de mostrar as estruturas macromoleculares e organelas que compõem a célula, e não a topografia dela como ocorre no MEV (STADTLÄNDER *et al.*, 2007; FRANKL, *et al.*, 2015).

Na transmissão, as etapas de fixação e desidratação também estão incluídas, acrescentando algumas outras, tais como lavagem com tampão, infiltração de resina, corte e contrastação (SOUZA *et al.*, 2007; FRANKL, *et al.*, 2015). Na fixação, o tetróxido de ósmio é um dos fixadores utilizados, apesar de ser mais utilizado como na pós fixação. Este preserva bem a estrutura celular, interagindo com lipídios insaturados, como fosfolipídios e lipoproteínas. Além da fixação, existe a pós fixação, que é feita logo em seguida, também com o mesmo repertório de fixadores disponíveis. O tetróxido de ósmio também é utilizado na pós-fixação, garantindo inclusive contraste ao espécime (SOUZA *et al.*, 2007).

Outro fixador que também age na contrastação é o acetato de uranila. Este contrasta positivamente os cortes feitos para microscopia eletrônica, mas também reduz a capacidade de extração de proteínas e lipídeos, por exemplo, o que é uma ação fixadora, mas acarreta na extração de glicogênio no citoplasma. O acetato de uranila não pode interagir com fosfato nem cacodilato pois precipita, havendo necessidade de lavar com água caso a amostra contenha esses tampões (SOUZA *et al.*, 2007).

Antes da desidratação, ocorre um processo de lavagem para retirar o fixador, que pode ser feita com tampão ou água deionizada. Assim como na varredura, a desidratação também ocorre com acetona ou etanol, pois estes são capazes de serem misturados às resinas que serão incluídas posteriormente. Em ambos os casos, o cuidado deve ser grande nessa etapa para evitar presença de artefatos, como membranas colabadas (SOUZA *et al.*, 2007).

Seguida da desidratação que ocorreu de forma gradual até a concentração de 100% da solução desidratante, ocorre a infiltração da resina. A resina precisa ser passível de infiltração na célula, deve permitir que cortes nanométricos sejam feitos e possuir resistência aos elétrons. Podem ser de epóxi ou acrílicas (SOUZA *et al.*, 2007). O Epon® é uma resina epóxi que consiste basicamente de uma mistura com epóxi, catalisador 2,4,-tridimetilaminametilfenol (DMP-30), anidrido dodecenil succínico (DDSA) e anidrido metil nádico (MNA). Tanto a proporção desses reagentes quanto a mudança por outros podem alterar a capacidade de infiltração ou consistência, deixando mais duro ou mais macio o bloco formado após a polimerização com temperatura elevada (SOUZA *et al.*, 2007).

Portanto, com a resina preparada, independentemente da origem, ela é diluída no solvente escolhido para a desidratação em diferentes proporções, passando por 1:1 e finalizando com resina 100%, assim como ocorre na desidratação. Quanto menor a permeabilidade da amostra, como quando o espécime apresenta parede celular, mais lenta e com mais diluições deve ser feita a infiltração para que o conteúdo adentre eficientemente (SOUZA *et al.*, 2007). Após a última troca com resina 100%, a infiltração é feita em material de polietileno e silicone, tais como as cápsulas BEEM.

Outra forma de fazer a infiltração é utilizando suportes que irão dentro desses materiais para emblocamento, o que auxilia na orientação da amostra (SOUZA *et al.*, 2007). Esses suportes podem ser processados juntamente com a amostra, participando de todas as etapas anteriormente citadas. Após a polimerização, o bloco é formado e está pronto para sofrer cortes. Essa etapa é a de ultramicrotomia, a qual garante que amostras sejam cortadas com espessuras de dezenas de nanômetros, usualmente entre 60 e 80 nm. Quanto mais finos, maior a resolução e menor o contraste. Os ultramicrótomos podem possuir navalhas de vidro, diamante e aço, as quais podem gerar cortes mais ou menos finos e têm diferentes durabilidades (SOUZA *et al.*, 2007).

A contrastação pode ser feita após o corte ou antes, como já após a fixação. Essa etapa consiste em expor a amostra a metais pesados gerando maior contraste na visualização, podendo ser possível enxergar estruturas que, normalmente, não são tão bem diferenciadas, como a membrana plasmática. A contrastação pode ser feita com o próprio acetato de uranila, mas outro componente utilizado é o citrato de chumbo (SOUZA *et al.*, 2007).

1.7 Suportes para Microscopia Eletrônica

Para manter ou induzir a orientação da amostra a ser visualizada, o espécime pode ser disposto ou crescido em suportes. Células podem ser crescidas em Thermanox™, uma lamínula formada de polímeros, ou Aclar®, um filme plástico (SOUZA *et al.*, 2007). O material deve permitir a boa infiltração da resina e, caso não haja a boa troca do solvente de desidratação com a resina, o bloco pode quebrar, impedindo o corte adequado. Uma das vantagens do uso de suportes é a análise do espécime sem necessidade da centrifugação e coleta do *pellet* para o processamento, logo, o crescimento no suporte permite a visualização da amostra conforme ocorreu o desenvolvimento (KINGSLEY *et al.*, 1988), exceto caso tenha ocorrido alguma alteração devido ao processamento para microscopia.

O Aclar® é um copolímero plástico transparente, inerte quimicamente, flexível e fácil de ser cortado no formato e tamanho desejado. Não produz fluorescência, o que o torna desejável em alguns experimentos que levam à visualização em microscópios de fluorescência, e é facilmente retirado do bloco polimerizado de epóxi. Essa última característica, de ser facilmente destacado do bloco, pode ser positiva para amostras que não necessitam da manutenção da orientação (JIMÉNEZ *et al.*, 2010; KINGSLEY *et al.*, 1988), o que não é desejável para os objetivos deste trabalho e de outros projetos do grupo. No caso de amostras de fungos como *C. albicans*, que são muito pequenos e não possuem claro fenótipo que define a região basal e a apical das células, manter o suporte íntegro e aderido às células permite a clara definição de qual parte da célula está aderida à superfície e qual parte é a parte não aderida da levedura ou da hifa.

O Thermanox™ também é um plástico resistente aos solventes químicos e possui baixa permeabilidade a gases (www.thermofisher.com, acesso em 04 de julho de 2023), o que provavelmente também impede a infiltração de resina e destaque do suporte do bloco de polimerização de epóxi. Ao contrário do Aclar®, o Thermanox™ possui autofluorescência e não é recomendável para experimentos nos quais as amostras produzem fluorescência (www.thermofisher.com, acesso em 04 de julho de 2023).

Materiais biodegradáveis podem ser utilizados para suportar o crescimento celular. Na bioengenharia tecidual, são utilizados como arcabouços, do inglês

“scaffolds”, os quais as células utilizam como suporte para adesão, crescimento, migração, mimetizando órgãos ou tecidos. Podem ser arquitetados como nanopartículas para armazenar e liberar gradualmente substâncias bioativas que estimulam a regeneração, angiogênese ou que caracterizam alguma atividade antimicrobiana (AMBROGI *et al.*, 2020, GHOSAL *et al.*, 2019).

Na indústria, os polímeros são utilizados para imobilização de células e posterior uso em biorreator. Essa técnica permite o crescimento celular e facilita a clarificação, pois as células permanecem retidas e são facilmente retiradas do mosto. Existem formas de promover a imobilização, uma delas é através da aderência das células ao suporte sólido por meio de interações hidrofóbicas e eletrostáticas (ARAÚJO *et al.*, 2021). Neste trabalho, a celulose é o biopolímero utilizado para a produção dos suportes e, ao contrário dos suportes já descritos aqui, o de celulose permite boa infiltração da resina e evita que haja o destaque do bloco quando há o corte. Outra vantagem é o fato de ser biodegradável, facilmente corado e muito mais flexível.

1.8 Coloração de suporte para o processamento de Microscopia Eletrônica

Alguns materiais são transparentes e de difícil manuseio, havendo necessidade de métodos alternativos para visualizar com maior acurácia. Durante a cultura e o processamento dos suportes criados pelo grupo, tornou-se difícil o manuseio devido à transparência do suporte de celulose. Foi hipotetizado que o uso de corantes facilitaria a manipulação e, para isso, uma revisão bibliográfica também foi feita sobre os corantes que possivelmente teriam afinidade por celulose.

Os corantes podem ser absorvidos ou adsorvidos no material selecionado para coloração, ou seja, podem adentrar regiões mais profundas ou somente permanecer na superfície, respectivamente (HUBBE *et al.*, 2019). Essas interações dependem das características químicas do corante e do material, isto é, da carga elétrica de ambos. O estado carregado ou descarregado vai ser influenciado pelo pH da solução e pela capacidade de desprotonação e protonação. Interações eletrostáticas e hidrofóbicas são relatadas em trabalhos que buscam expor como ocorre a coloração de materiais por corantes aniônicos e catiônicos (AL-GHOUTI *et al.*, 2020; HUBBE *et al.*, 2019). A carga global das moléculas é controlada com a

determinação do pH ideal para maior eficiência da adsorção ou absorção (AL-GHOUTI *et al.*, 2020).

Além de corar, os cromóforos também podem servir como indicadores de reações, como aquelas que causam alteração de pH. São os metacrômicos, como o laranja de acridina. Esses são capazes de indicar presença de metabolização na região, mostrando onde há presença de células vivas (HUBBE *et al.*, 2019). Este último facilitaria mais um desafio que o grupo tem encontrado, que é a colagem do suporte na fita de carbono para a varredura. Infelizmente, pode não haver crescimento celular suficiente em um dos lados do suporte, que está submerso no meio de cultura, logo, seria eficiente saber o lado em que há mais células para colar o suporte, antes de metalizar.

A celulose é aniônica pela presença de hidroxilas na composição estrutural. Logo, corantes catiônicos são mais recomendados para colorir esse tipo de material. Entretanto, os corantes aniônicos conseguem interagir com matéria celulósica dependendo do restante da composição da estrutura ou do pH da solução, como mencionado (AL-GHOUTI *et al.*, 2020; HUBBE *et al.*, 2019).

O azul de algodão é um corante ácido, aniônico e solúvel em água por conta de seu grupamento sulfato, o qual está ionizado a partir do pH 3. A eficiência de coloração é maior quando o carboidrato é tratado com grupos que garantem maior interação com o corante. Essa modificação é utilizada pois a celulose é fácil de ser adquirida e de baixo custo, sendo utilizada para tratamento de efluentes contaminados pela indústria têxtil (HARO *et al.*, 2020). O azul de algodão e o azul de tripan são utilizados para corar fungos, interagem com quitina e glucana, respectivamente (BALÁZ *et al.*, 2001; LECK *et al.*, 1999). Mas o azul de tripan também é capaz de interagir com materiais lignocelulósicos (HUBBE *et al.*, 2019).

Como HUBBE e colaboradores (2019) relatam que corantes catiônicos possuem maior chance de serem absorvidos ou adsorvidos pela celulose, o azul de metileno pareceu ser um bom candidato para corar o polissacarídeo. Em pH básico, as interações eletrostáticas podem estar envolvidas nessa adsorção, em pH neutro predominaram as interações hidrofóbicas, enquanto que em pH ácido as ligações de hidrogênio podem estar relacionadas também (AL-GHOUTI *et al.* 2020; HUBBE *et al.*, 2019). Por ser uma reação endotérmica, há necessidade de absorção de calor, sendo usada a temperatura de 45 °C por AL-GHOUTI e colaboradores (2020). A adsorção por azul de metileno em materiais lignocelulósicos pode ocasionar na

deformação da estrutura. A melhor adsorção ocorre em pH mais básico pelo estado ionizado do corante, o que pode estar relacionado com a natureza catiônica do corante e a carga negativa da superfície (AL-GHOUTI *et al.* 2020), o que de fato ocorreria com a celulose devido aos grupos funcionais hidroxilas.

2 JUSTIFICATIVA

O processamento para ME apresenta certos desafios para análise das amostras. Um dos desafios que o grupo quer contornar é a necessidade de centrifugação do cultivo de células para o processamento do *pellet* gerado. Na visualização dessa amostra, a massa celular formada não garante resultados tão fidedignos quanto células crescidas e visualizadas da forma como cresceram, como o caso que será visto nesta monografia. Além de um suporte que, de fato, permita o processamento correto e desejado dos espécimes, haja vista a baixa infiltração da resina nos suportes mencionados anteriormente.

Outro desafio seria o manuseio do próprio suporte de celulose, o qual é transparente e ainda mais difícil de enxergar quando imerso em alguma solução ou solvente. Então, a coloração facilita esse processo e impede a perda do suporte por conta dessa dificuldade.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Produzir suportes corados para crescimento orientado de células de *C. albicans*, para melhor manuseio do suporte, dispersão celular suficiente para melhor distinção, visualização e entendimento da ultraestrutura celular e, consequentemente, de mecanismos envolvidos em sua patogenicidade.

3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver a metodologia para crescer, direcionadamente, células de *C. albicans* em seu estado filamentoso, impedindo sobreposição celular no crescimento em suporte para MEV e MET;

- Identificar corantes adequados para os suportes. Objetivando melhor manuseio, crescimento de fungos em condições de esterilidade, resistência ao processamento para microscopia eletrônica e permitindo a observação do lado em que as células aderiram melhor e, assim, saber qual deixar exposto para processar e visualizar no microscópio.

4 METODOLOGIA

Ao longo da monografia, será possível ver diversos experimentos que ocorreram de forma paralela, ou que ocorreram posteriormente, mas que estão juntos em uma mesma seção. Para não gerar confusões na cronologia, um organograma foi feito para deixar claro quais passos foram tomados. A princípio, a metodologia se limitou aos passos 1 a 5. Vários problemas foram encontrados e aprimoramentos foram sendo feitos até chegar à segunda parte do organograma, do passo A ao F.

Fig. 6 – Passo-a-passo da metodologia.



4.1 Produção dos suportes

Os suportes foram preparados a partir de sacos de diálise da marca Inlab com porosidade de 25 angstroms e cut-off de peso molecular de 12.000-16.000, compostas de celulose regenerada. Essas membranas foram cortadas em formato

circular de diâmetro igual a 6 mm, lavadas em 4 ciclos de 10 minutos com água Milli-Q aquecida em torno de 40 °C, sob agitação constante em shaker orbital. A cada ciclo, a troca de água era feita para retirar qualquer composto presente no material. Posteriormente, as membranas permaneceram armazenadas em água Milli-Q à temperatura ambiente (SILVA, 2021).

4.2 Tratamento com Hidróxido de Sódio (NaOH)

Em béquer de plástico, 50 mL de água Milli-Q foram vertidos e 2 g de NaOH foram homogeneizados para preparo de 1 M da base. Para o preparo de 0,5 M a solução de 1 molar foi diluída 1:1. As membranas foram submersas por 48 horas em microtubo de 1,5 mL (eppendorf), um para cada concentração.

4.3 Coloração

Houve tratamento do suporte de celulose com hidróxido de sódio para melhor interação com corantes aniônicos, principalmente. O tratamento foi feito para que íons positivos fossem inseridos na estrutura, pois existem trabalhos que já destacam a menor afinidade da celulose por estruturas químicas carregadas negativamente (HUBBE *et al.*, 2019; HARO *et al.*, 2020; AL-GHOUTI *et al.*, 2020). Essa inserção de cátions já foi feita por grupos anteriores, como em HARO e colaboradores (2020), que utilizavam essa técnica para tratamento de efluentes ao modificar a celulose para retirada de corantes negativamente carregados.

Como os corantes podem ser tóxicos, algumas concentrações escolhidas foram baseadas em trabalhos que usaram os corantes em fungos (BALÁZ *et al.*, 2001; VOHNÍK *et al.*, 2009) , já que um dos objetivos é crescer células na superfície dos suportes.

4.3.1 Azul de algodão 5%

O corante foi comprado na sua forma de cristal totalmente puro, comercializado pela indústria ISOFAR. O preparo ocorreu em tubo de fundo cônico de 50 mL com 25 mL de água Milli-Q e 1,25 g de azul de algodão. Realizando triplicatas, o suporte foi submerso com corante e deixado a 25°C por 24 e 48 h.

4.3.2 Azul de algodão 0,01%

A partir de uma solução estoque 5% que será explicada abaixo, 0,05 mL foram transferidos para tubo de 50 mL com 24,95 mL de água Milli-Q. Os suportes foram submersos no corante e deixados à temperatura ambiente por 24 e 48 h.

4.3.3 Azul de metileno 1%

O azul de metileno usado foi o da marca ProQuímicos. A concentração de 1% foi escolhida pois o grupo observou que essa concentração não danifica as células e permite o crescimento. A solução estoque já estava pronta. Realizando triplicatas, os suportes foram submersos no corante e deixados para corar à temperatura ambiente por 24 e 48 h.

4.3.4 Azul de tripan 0,05%

Foi utilizado o do fabricante Polyscience Inc. A partir de uma solução a 0,4%, 1,25 mL foram pipetados em tubo de fundo cônico de 15 mL com 10 mL de água Milli-Q. A coloração ocorreu em triplicatas com os suportes submersos em microtubos e deixados à temperatura ambiente por 24 e 48 h.

4.4 Processamento para ME

A fim de analisar se os suportes corados suportariam o processamento para microscopia eletrônica, cada etapa foi mimetizada expondo os suportes aos reagentes utilizados nas concentrações que se cogitaram ser mais descolorantes.

4.4.1 Fixação

O fixador foi preparado na capela em tubo de fundo cônico de 50 mL com 0,1 M de cacodilato, 4% de paraformaldeído e 2,5% de glutaraldeído. Ao final da adição de cada volume desses componentes, o fixador foi avolumado para 15 mL com água Milli-Q. Cada suporte foi fixado por 1 h.

4.4.2 Desidratação

Etanol 100%, da MERCK®, e acetona 100%, da VETEC®, foram utilizados para desidratar os suportes corados. Essa etapa ocorreu por 24 h e o nível de descoloração foi verificado no final desse tempo. A desidratação ocorreu em microtubos ou placas de 96 poços para o etanol, e em pequenas garrafas de vidro com boa vedação para a acetona.

4.4.3 Infiltração de Resina

A resina 1:1 e a pura foram incluídas nos suportes desidratados com etanol e acetona para verificar se havia difusão do corante no Epon®. Os suportes foram colocados em microtubos e a resina foi gotejada até cobrir a amostra. Permaneceram sob agitação leve por 1 dia, e depois a resina foi retirada para inserir uma nova e pura. A nova resina foi adicionada da mesma forma, mas de forma lenta. As pequenas bolhas formadas foram retiradas com auxílio de uma ponteira.

4.5 Crescimento de *C. albicans* em suporte corado

4.5.1 Propagação, cultivo de *C. albicans* e preparo dos suportes

A *C. albicans* SC5314 foi propagada em Sabouraud Dextrose Broth (SDB) em volume de 10 mL por 6 h a 25°C sob agitação de 180 rpm. Posteriormente, 2 mL deste meio foram retirados e pipetados em um novo meio SDB com volume de 18 mL, deixando um volume final de 20 mL, sob os mesmos parâmetros de agitação e temperatura, porém *overnight*.

Os suportes de 6 mm, para MEV, e 3 mm, para MET, foram autoclavados, assim como o corante de azul de tripan, e corados por 24 h. Esses suportes foram, posteriormente, lavados em água Milli-Q estéril para retirar o excesso do corante e colocados em meio de cultura contendo: Yeast Nitrogen Base (YNB) + 2%Gli (Glicose 2%) + H₂O ou YNB + 2%Gli ou YNB + 2%Gli + Soro Fetal Bovino (SFB).

O inóculo foi feito na concentração de 5×10^5 células/mL e essa concentração foi obtida a partir da diluição de 10 µL da solução de propagação com 90 µL de

fixador paraformaldeído 4% (1:10). Após a diluição, foi feita a contagem em câmara de Neubauer para determinar a quantidade de células por mL. Os dois lados da câmara foram contados, mas somente os quadrantes dos vértices e do meio de cada lado foram usados. O cálculo para determinação do número de células por mL: **Nº células/mL = quantidade de células × 5** (número de quadrantes) **× 10⁴ × 10** (fator de diluição). Posteriormente, uma regra de 3 foi feita para saber o volume que continha a concentração de 5×10^5 células. O inóculo foi feito em 1 mL de meio de cultivo. As células foram cultivadas por 4 h, 8 h, 12 h e 24 h. Em cada ponto, as amostras foram fixadas em Karnovsky e armazenadas em geladeira para o processamento para MEV e MET.

4.5.2 Processamento para ME

Para a MEV, as amostras foram submetidas a uma bateria de desidratação nas concentrações de acetona de 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, repetindo a de 30% e 100% 2 vezes. Por fim, as amostras foram secas em ponto crítico e metalizadas com ouro. Para MET, as amostras foram desidratadas da mesma forma, mas as etapas seguintes foram de infiltração com resina em diferentes concentrações (resina:acetona), 1:3, 2:3, 1:1, 2:1, 3:1 e resina pura. A cada troca, as resinas diluídas ou pura ficaram 1 dia sob agitação branda e, após o último dia de infiltração, houve a renovação da resina pura e polimerização a 70 °C por 3 dias. As amostras foram armazenadas, com atenção às amostras para MEV que precisaram permanecer em dessecador.

5 RESULTADOS

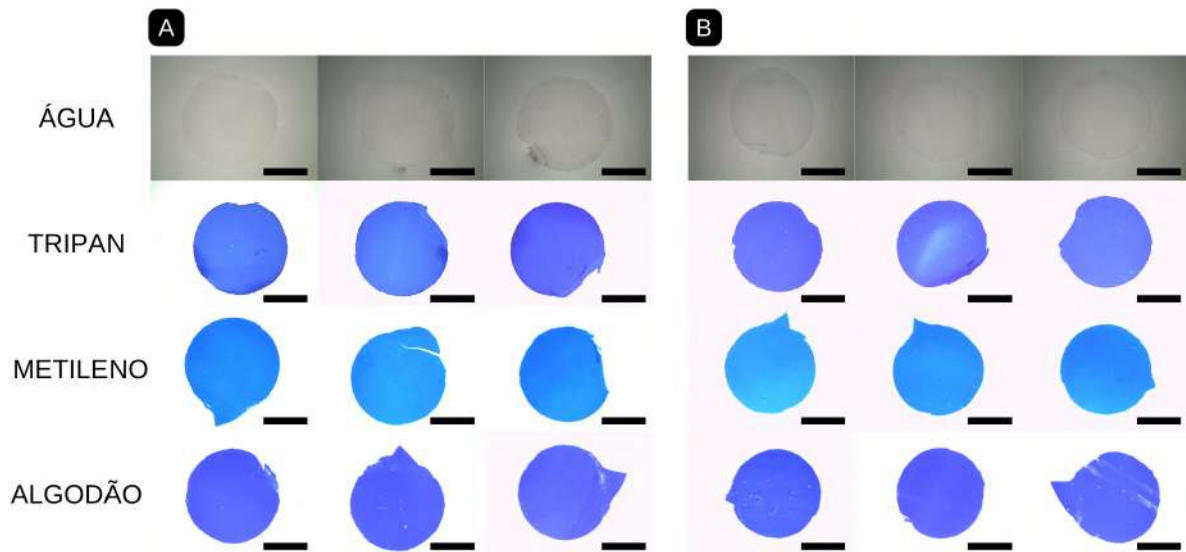
5.1 Coloração

O azul de algodão 0,01% foi incapaz de corar o suporte de forma eficiente, o qual perdeu sua coloração nos dias seguintes ao armazenamento e após autoclavar. Logo, a solução estoque 5% foi utilizada. A autoclavação acarretou em perda parcial ou total da coloração de todos os suportes, logo, tanto os suportes quanto os corantes foram autoclavados separadamente e posteriormente ocorreu a coloração.

Todos os corantes foram capazes de colorir os suportes transparentes de celulose (fig. 7 e 8), exceto pela concentração de 0,01% do azul de algodão. Cada

um possui um tempo específico necessário para isso, mas, a fim de padronizar, escolhemos os tempos de 24 e 48 horas, que são os tempos em que obtivemos bons resultados. Diferentes condições foram utilizadas para otimizar o uso dos corantes que não permaneceram aderidos ao suporte, como será descrito mais abaixo. Entre as condições testadas, está o tratamento prévio com NaOH.

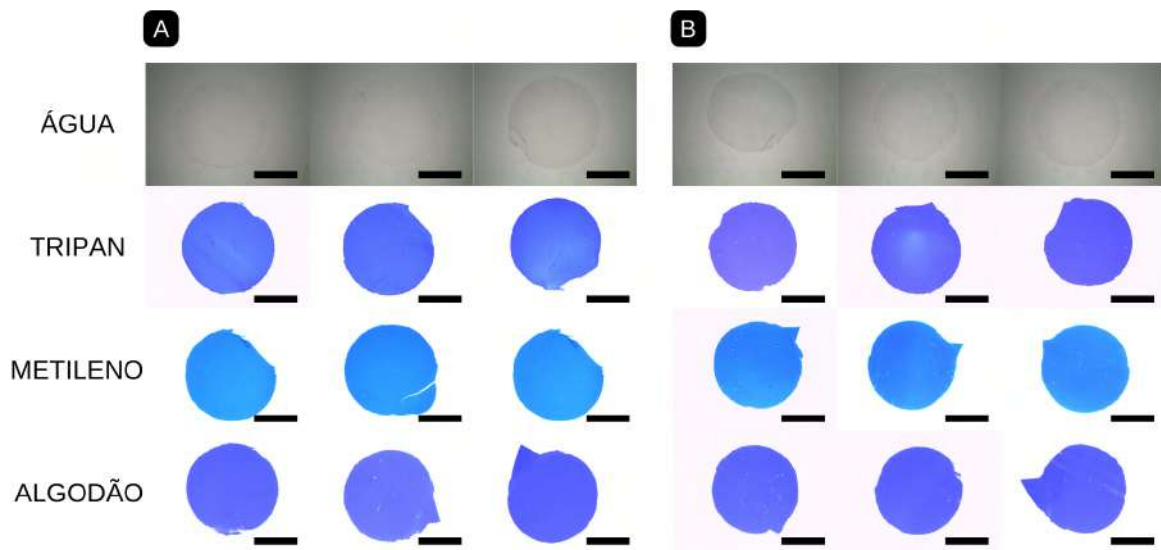
Fig. 7 – Suportes de celulose corados durante 24 horas.



Triplícatas dos suportes de celulose corados durante 24 horas. Em A, os suportes sem tratamento e, em B, com tratamento. A água foi usada como controle para mostrar que não houve alteração na estrutura da membrana pelas etapas de coloração e processamento para ME. Barra de escala: 3 mm. Fonte: Desenvolvida pela autora.

As imagens foram feitas nos mesmos parâmetros de brilho, saturação, balanço de luz, etc. Não houve diferença na intensidade das cores das triplicatas dos corantes, mostrando que o tratamento (fig. 7B e 8B) não resultou em maior ou menor absorção ou adsorção do corante pela celulose. Apenas as amostras de azul de metileno apresentaram tonalidade ligeiramente alterada pelo tratamento, mas não mais intensa.

Fig. 8 – Suportes de celulose corados durante 48 horas.



Triplícatas dos suportes de celulose corados durante 48 horas. Em A, sem tratamento e, em B, com tratamento. A água foi usada como controle para mostrar que não houve alteração na estrutura da membrana pelas etapas de coloração e processamento para ME que serão demonstradas ao longo do trabalho. Barra de escala: 3 mm. Fonte: Desenvolvida pela autora.

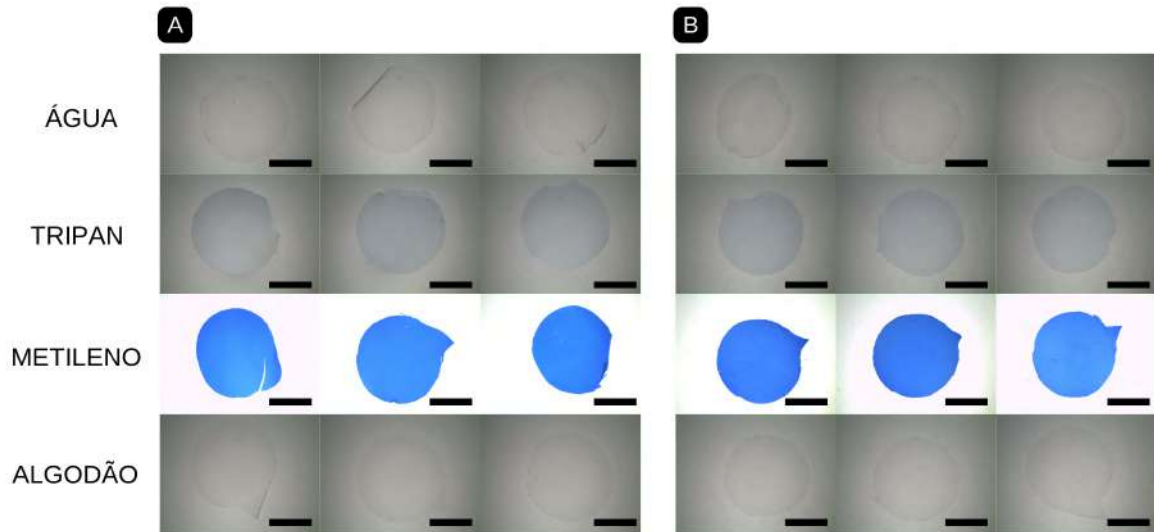
5.2 Descoloração

A interação entre os corantes e o suporte precisa ser forte o suficiente para que o processo de cultivo celular e processamento para microscopia não interfira de forma negativa, ou seja, o suporte não pode descorar. Para isso, uma série de etapas foram seguidas para mimetizar um experimento com crescimento celular e processamento para ME.

5.2.1 Autoclavagem

A autoclavagem foi feita a 121 °C por 30 minutos. Foi nítida a descoloração dos suportes (fig. 9), exceto daqueles corados com azul de metileno. Isso poderia ser explicado pela sua característica catiônica (HUBBE *et al.*, 2019) ou sua termodinâmica. O azul de metileno possui boa adsorção em altas temperaturas por biomassa celulósica, o que pode indicar sua permanência no suporte após a autoclavagem (AL-GHOUTI *et al.* 2020). Por conta desses resultados, foi decidido que o melhor seria autoclavar tanto o suporte quanto o corante antes de corar, e manter tudo estéril quando houvesse o experimento com crescimento celular. Dessa forma, a coloração não sofreria efeitos da autoclavagem.

Fig. 9 – Suportes autoclavados posteriormente à coloração.

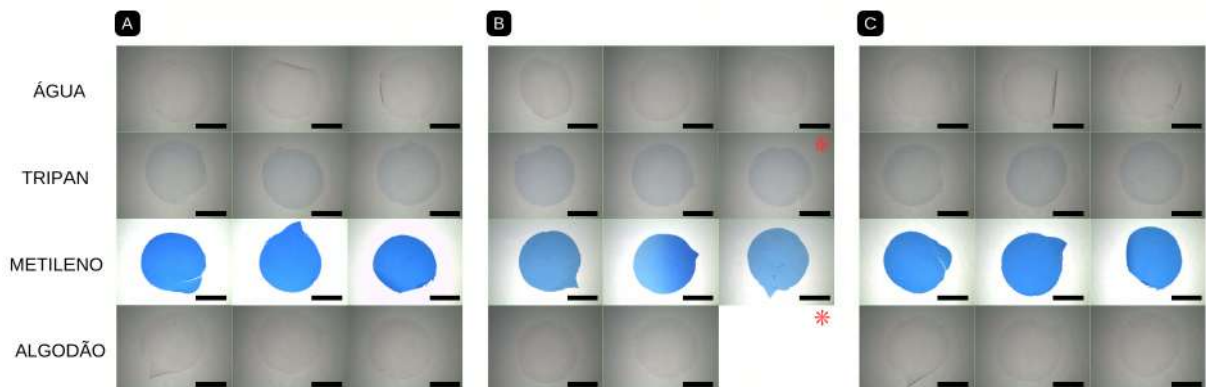


Esses suportes foram os mesmos anteriormente mencionados após a coloração de 48 horas. Em A, temos as amostras não tratadas e, em B, as tratadas. Barra de escala: 3 mm.

5.2.2 Armazenamento

O armazenamento ocorreu em água Milli-Q durante 24 e 48 h, pois o meio de cultivo também é aquoso. O azul de metileno suportou tanto a autoclavagem quanto o armazenamento durante 24 (fig. 10A e 10B) e 48 horas (fig. 10C). Não houve armazenamento dos suportes tratados por mais tempo pois não foram vistos benefícios visíveis no tratamento com NaOH. O asterisco vermelho na amostra “tripan” (fig. 10) indica uma amostra não armazenada em água.

Fig. 10 – Suportes armazenados durante 24 e 48 horas.

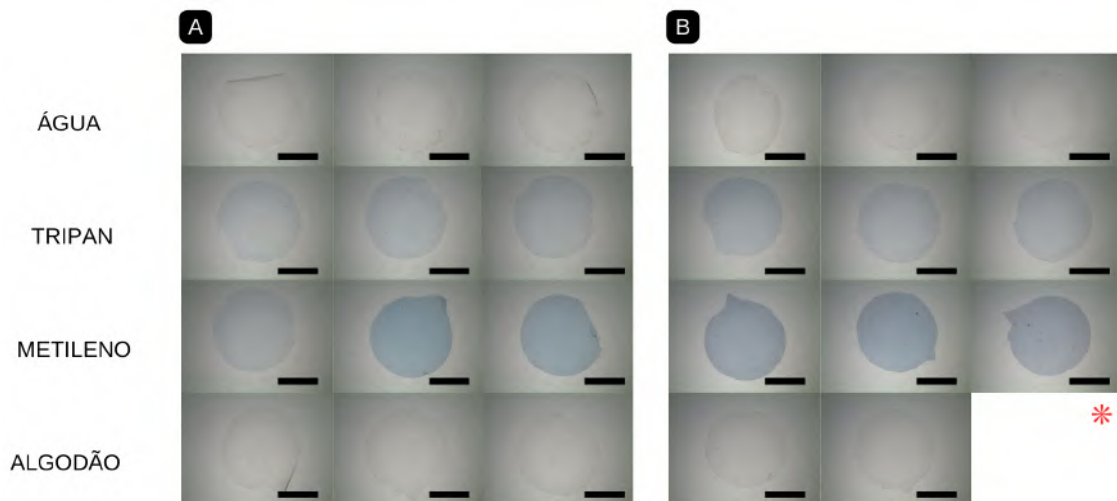


Suportes autoclavados e armazenados em água Milli-Q por 24 horas, sem (A) e com (B) tratamento. Em C, os suportes sem tratamento e armazenados por 48 horas. O asterisco na amostra “algodão” sinaliza a perda dessa amostra. Os corantes não foram autoclavados. Barra de escala: 3 mm.

5.2.3 Fixação

A solução fixadora descoloriu parcialmente todos os suportes no início dos testes (fig. 11). Como a autoclavagem também foi um fator negativo (fig. 9), a fixação foi feita sem autoclavar após a coloração (fig. 12).

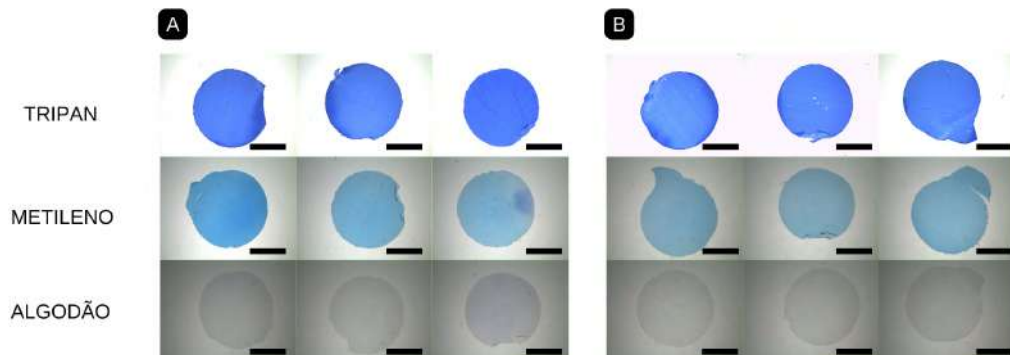
Fig. 11 – Suportes fixados após a armazenagem.



Imagens feitas após a fixação. As amostras foram submersas durante uma hora. Em A, amostras não tratadas, e em B, com tratamento. O asterisco sinaliza a perda da amostra. Barra de escala: 3 mm

Ao corar os suportes sem autoclavar posteriormente, é visto que os corantes, exceto pelo azul de algodão, suportam o processo de fixação sem descolorir tanto quanto aqueles suportes que foram autoclavados após corar. Isso demonstra que os materiais devem ser autoclavados primeiramente para depois haver a coloração com todos os procedimentos estéreis que serão feitos para o crescimento de microrganismos na superfície do suporte.

Fig. 12 – Suportes fixados e não autoclavados.

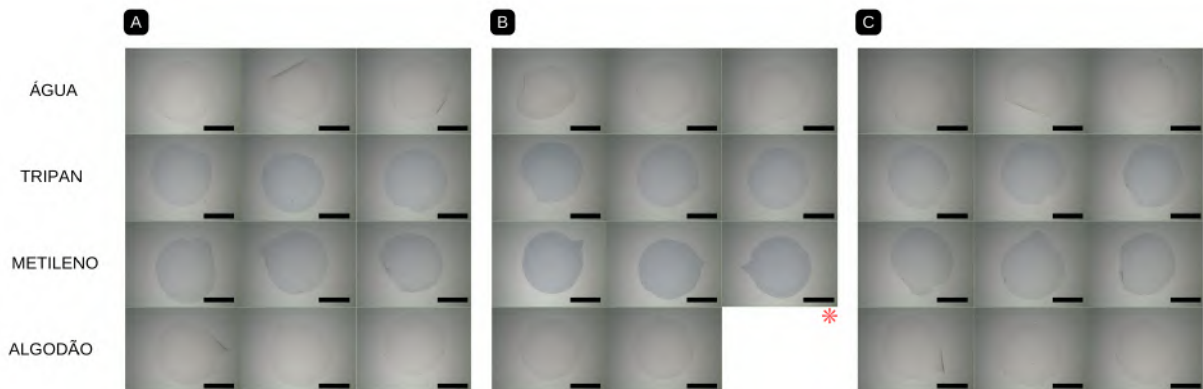


Imagens dos suportes posteriores à fixação. Em A, temos os suportes corados sem autoclavar posteriormente. Em B, os suportes e os corantes foram autoclavados separadamente e, posteriormente, ocorreu a coloração. Em ambos, não houve tratamento com NaOH devido a sua ineficácia em manter o corante aniônico aderido. A autoclavagem causa descoloração e, por isso, estas amostras não foram autoclavados após a coloração. O azul de tripan (A) é o corante mais resistente ao processo de fixação. Em B a imagem foi feita para verificar se ocorria alguma diferença na coloração caso o corante fosse autoclavado. Barra de escala: 3 mm.

5.2.4 Desidratação

A desidratação foi feita, primeiramente, com etanol 100%. Porém, nos primeiros experimentos, o etanol retirava quase completamente o corante do suporte, inviabilizando seu uso (fig. 11).

Fig. 13 – Suportes desidratados com etanol.

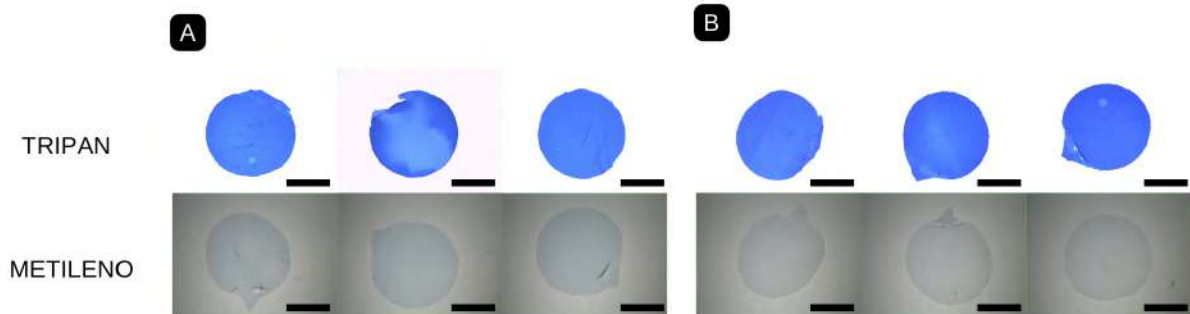


Em A, todos os suportes foram anteriormente corados com corantes não autoclavados, autoclavados posteriormente à coloração, fixados e desidratados por 24 h com etanol 100%. Em B, novos suportes foram tratados, corados com corantes não autoclavados, autoclavados posteriormente à coloração, fixados e desidratados durante 24 horas com etanol 100%. Em C, são os suportes apresentados em A desidratados durante 48 horas com etanol 100%. O asterisco sinaliza a amostra perdida. Os suportes em B não foram desidratados por mais tempo, como em A, pois não foram vistos benefícios no uso do tratamento com NaOH. Barra de escala: 3 mm. Fonte: Desenvolvida pela autora.

Assim, o etanol foi substituído pela acetona e bons resultados foram obtidos (fig. 14A). No mesmo experimento da acetona, houve a renovação do fixador, pois o fixador usado anteriormente já havia acabado, o que poderia ter influenciado no resultado final da desidratação com o novo agente. Por isso, mais um experimento foi feito para analisar se de fato a acetona era o melhor agente desidratante ou se o fixador anterior não permitia a fixação correta do corante. Com base na figura 14, a comparação deixa claro que a solução fixadora preparada anteriormente permitiu a lavagem do suporte, e que a nova solução, com os mesmos componentes e nas mesmas proporções, exerceu seu papel com maior eficiência, impedindo a lavagem

do azul de tripan, mesmo utilizando o etanol (fig. 14B). Esse teste não considerou o azul de algodão, que já havia sido descartado anteriormente pela falta de afinidade pelo suporte.

Fig. 14 – Comparação entre os agentes desidratantes após renovação do fixador.

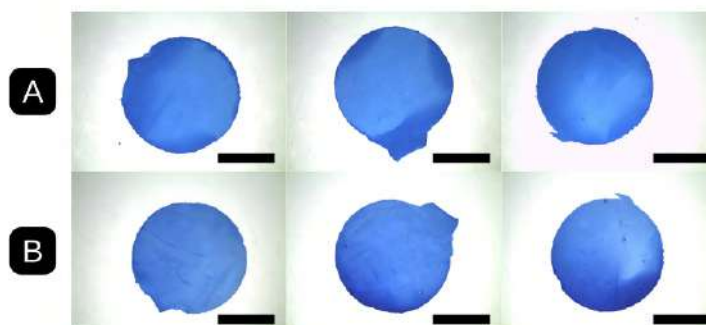


Em A, temos novos suportes corados com os corantes autoclavados, fixados por 1 hora com o fixador reabastecido e desidratados com acetona. Em B, temos os suportes corados juntamente com aqueles em A, fixados separadamente com a mesma solução e desidratados com etanol. Barra de escala: 3 mm.

5.2.5 Infiltração de resina

A infiltração foi feita para analisar a possibilidade do corante se difundir (fig. 15). O experimento foi feito com resina epóxi:acetona (1:1), e com resina pura (dados não mostrados). Em ambas as resinas, não houve difusão do corante. O mesmo experimento foi feito com etanol após o uso do novo fixador, a difusão foi aparente, mas não muito grande. Apesar disso, a acetona foi o agente desidratante usado para o crescimento celular com suporte corado (dados não mostrados).

Fig. 15 – infiltração em epóxi diluída em acetona.

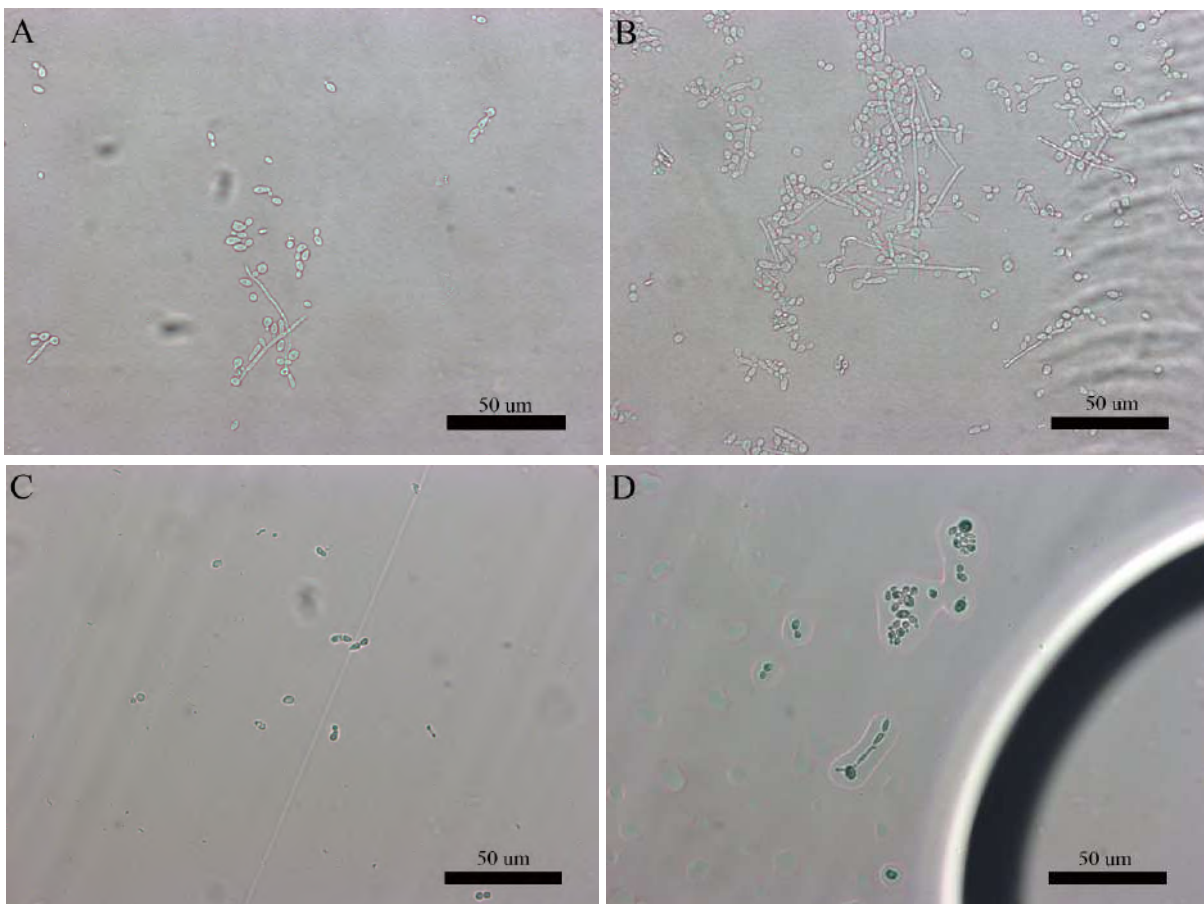


Amostras coradas com o corante azul de tripan autoclavado, fixadas com o karnovsky reabastecido e desidratadas com acetona (A). Posteriormente, foram mantidas *overnight* em agitação branda em resina 1:1 (B). Barra de escala: 3 mm.

5.3 Crescimento de *C. albicans* em suporte corado

O crescimento eficiente da *C. albicans* em suporte de celulose já foi demonstrado em experimentos anteriores (fig. 16), os quais permitiram boa reprodução celular e filamentação. As células cresceram sob os mesmos parâmetros mencionados na metodologia, mas com diferença apenas no tempo de fixação (2 horas, 4 horas e 6 horas) e na presença ou ausência de poli-L-lisina para garantir carga na superfície do suporte e melhor aderência do fungo a este.

Fig. 16 – Microscopia ótica de *C. albicans* SC5314 crescida por 6 h em suporte de celulose 6 mm.

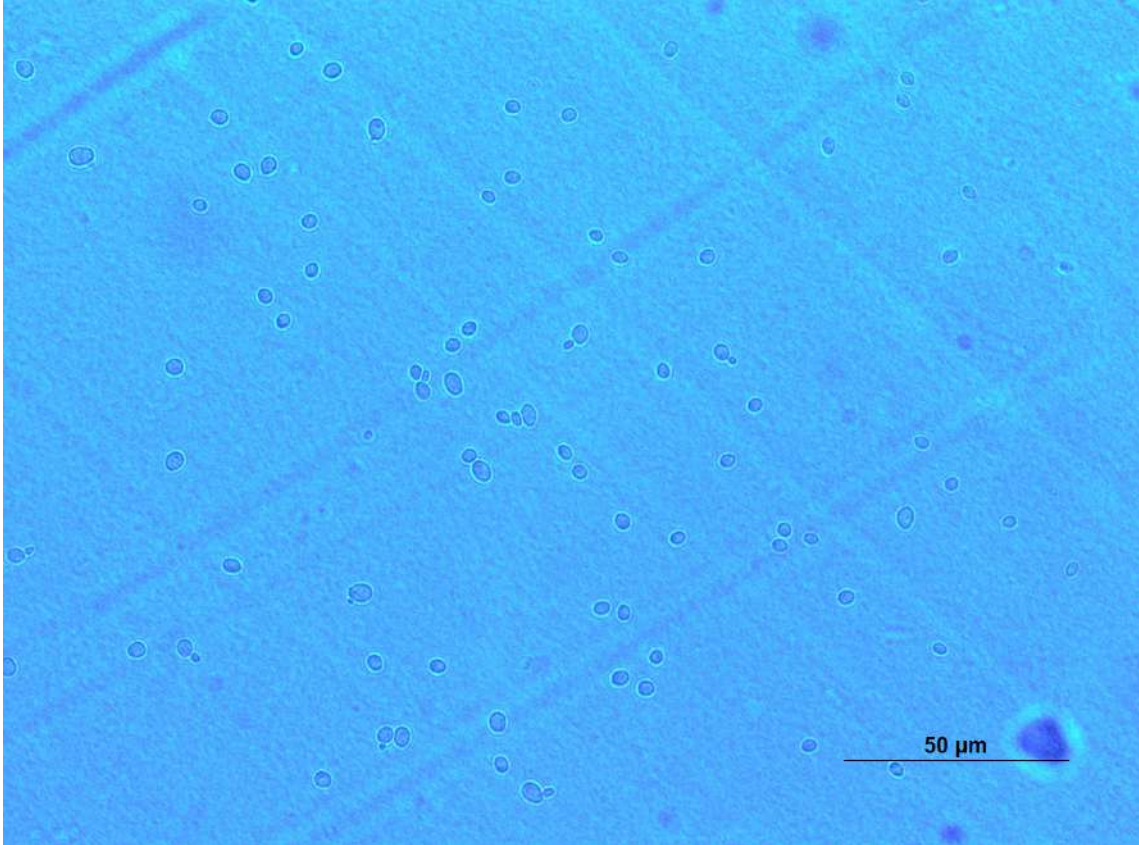


O meio de cultura em A e B é YNB+GLI+SFB com poli-L-lisina, enquanto em C e D, YNB + GLI + SFB sem Poli-L-lisina. Fonte: Desenvolvida pela autora.

A figura 16 mostra um experimento feito à parte desta monografia e sem uso de corantes, sendo usada somente para destacar a capacidade de adesão do fungo à celulose e a maior aderência na presença de Poli-L-lisina. Neste trabalho, o experimento foi feito sem a adição de poli-L-lisina, mas foi possível ver a presença de células aderidas ao suporte mesmo após o cultivo sob agitação (fig. 17). Os

suportes também foram visualizados no microscópio de fluorescência para identificar a capacidade de emissão de luz pelo suporte, como será discutido mais adiante.

Fig. 17 – Microscopia óptica de *C. albicans* SC5314 crescida em suporte de celulose 6 mm **corado**.



Uma das amostras de *C. albicans* crescida sob agitação em suporte corado em meio YNB + GLI. Diversas leveduras são vistas.

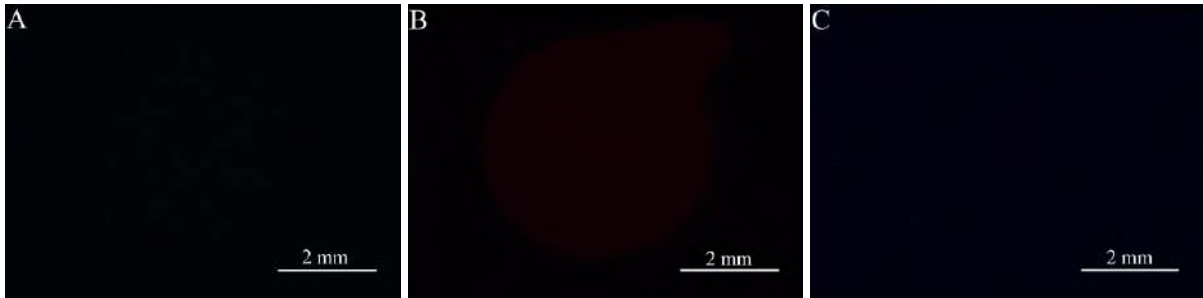
5.4 Análise dos suportes por microscopia de fluorescência

Uma análise em microscópio de fluorescência foi feita para verificar se haveria fluorescência nos suportes corados e não corados. Na MET, a fluorescência seria uma vantagem para identificar melhor amostras bem pequenas dentro do bloco de resina, facilitando a etapa de corte. Como se pode ver na figura 18 e 19, o suporte corado emite fluorescência vermelha, ao ser excitado com comprimento de onda na faixa de luz verde verde (fig. 18B). Enquanto isso, a figura 20 mostra que o suporte sem corar não é autofluorescente.

A figura 19 mostra a mesma sequência de imagens de microscopia da figura 18, porém editadas para melhor visualizar a fluorescência emitida pelo suporte. A cor vermelha é bem mais perceptível e demarca muito mais o suporte (fig. 19B),

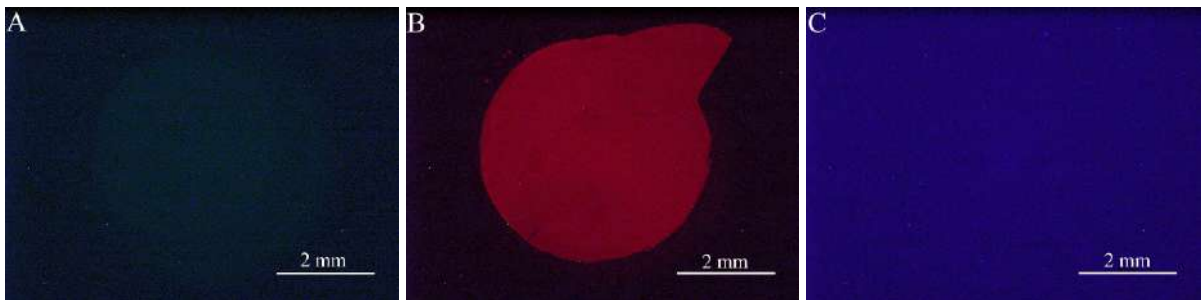
enquanto que com excitação na faixa UV (fig. 19C), o suporte não pode ser visualizado. Entretanto, na excitação pelo azul, é possível ver parcialmente o suporte emitindo a cor verde (fig. 19A).

Fig. 18 – Microscopia de fluorescência do suporte de 6 mm **corado**.



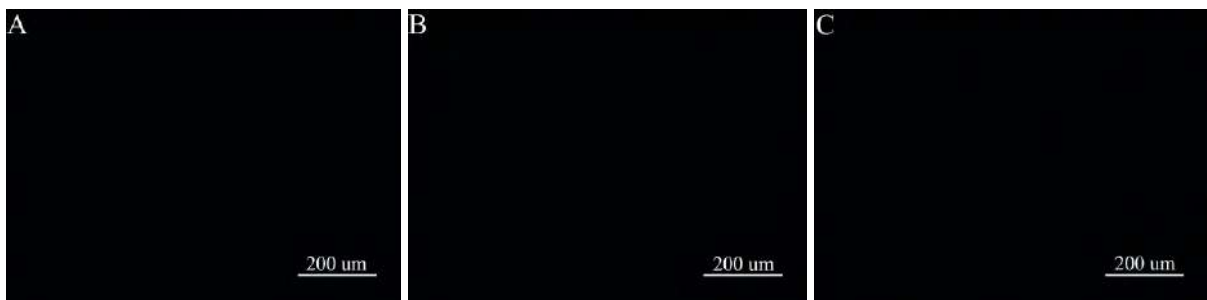
O mesmo suporte foi visualizado em três diferentes emissões de luz, no azul (A), no verde (B) e no vermelho (C).

Fig. 19 – Imagens editadas da microscopia de fluorescência do suporte de 6 mm **corado**.



As imagens foram ajustadas no Adobe Photoshop na opção de “curvas”, com os parâmetros de entrada = 25 e saída = 164, com a emissão do microscópio no azul (A), no verde (B) e no UV(C).

Fig. 20 – Microscopia de fluorescência do suporte de 3 mm **não** corado.

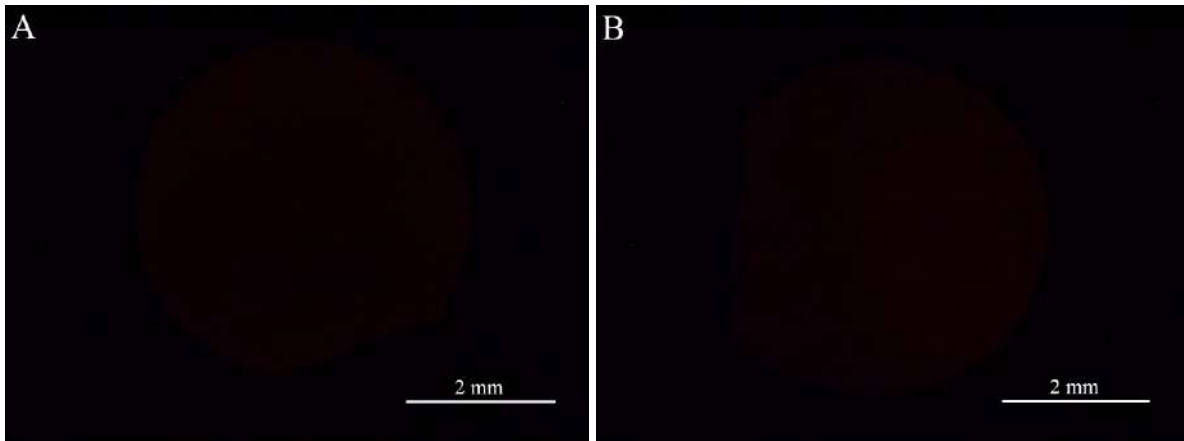


Um mesmo suporte foi visualizado em três diferentes emissões de luz, no azul (A), no verde (B) e no UV(C). Diferente da imagem anterior, essa foi feita com o suporte de 3 mm, pois não havia suportes prontos de 6 mm disponíveis. Entretanto, não há qualquer diferença a não ser o tamanho do corte e o fato de não estar corado.

A figura 21 e 22 exibem os suportes que não foram corados totalmente, ou seja, sua superfície não estava completamente azul. Apesar disso, todo o suporte

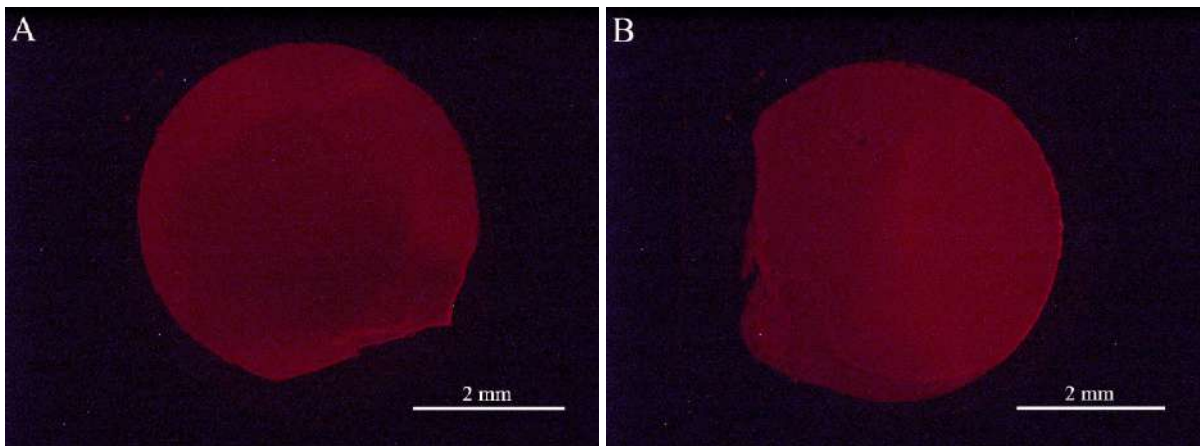
emitiu a cor vermelha ao ser excitado pelo comprimento de onda na cor verde e. A figura 22 apenas são imagens editadas a partir daquelas da figura 21, para melhor visualizar a cor vermelha refletida pelo suporte. O meio de cultivo não interfere na fluorescência, como mostrado na figura 23.

Fig. 21 – Microscopia de fluorescência de dois diferentes suportes de 3 mm fracamente corados.



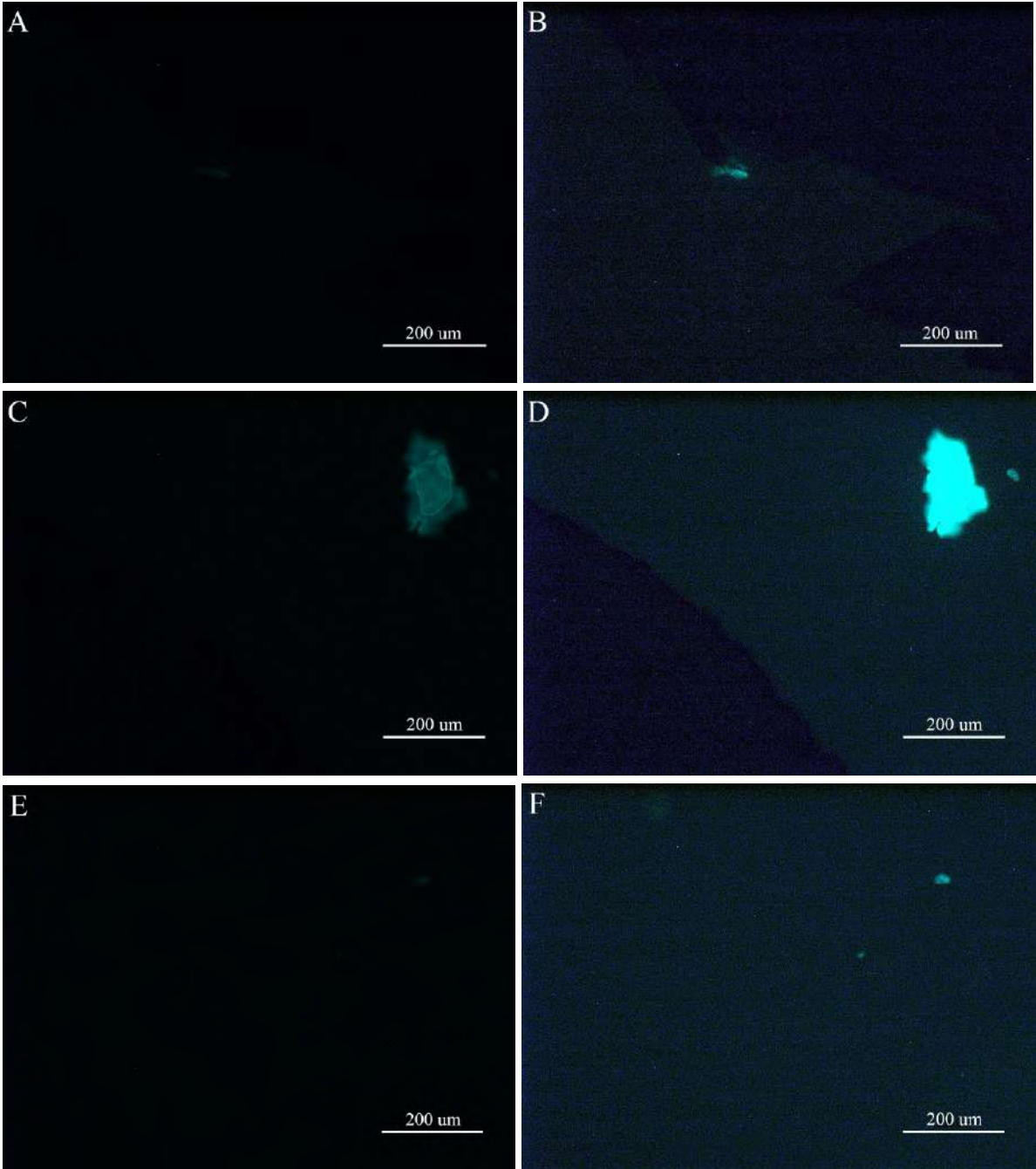
Dois diferentes suportes que foram parcialmente corados. Isso provavelmente ocorreu devido ao excesso de suportes dentro de um microtubo de 1 mL com apenas poucos microlitros do azul de tripan. Nem todos os suportes tiveram total contato com o corante.

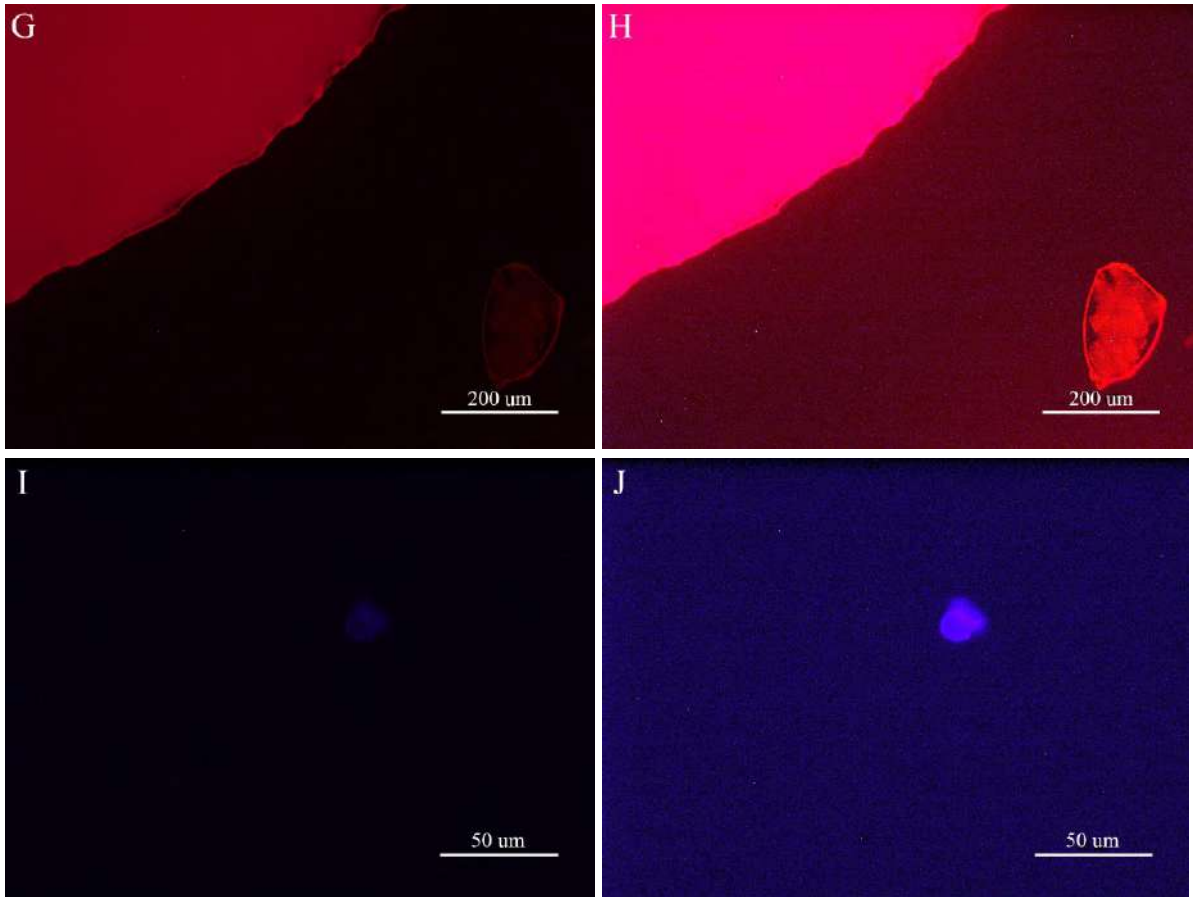
Fig. 22 – Imagens editadas da microscopia de fluorescência de dois diferentes suportes de 3 mm fracamente corados.



As imagens foram ajustadas no Adobe Photoshop na opção de “curvas”, com os parâmetros de entrada = 25 e saída = 164. Representam as imagens da figura 21, respectivamente.

Fig. 23 – Microscopia de fluorescência do suporte de celulose 6 mm corado e cultivado em meio YNB + GLI + H₂O.





Crescimento de *C. albicans*, não visualizada, pois não absorveu o azul de tripan, nem emite fluorescência sem corantes fluorescentes específicos. Em A, C e E, há a emissão na faixa do azul, refletindo manchas esverdeadas. Em C conseguimos diferenciar o suporte que se encontra no lado inferior esquerdo, mais escurecido. Em G, há a emissão na faixa do verde, com uma mancha próxima à barra de escala, a qual é visivelmente delimitada. O suporte está marcado em vermelho mais vibrante, no lado superior esquerdo. Em I, a emissão é na faixa do UV. As imagens B, D, F, H e J foram ajustadas no Adobe Photoshop na opção de “curvas”, com os parâmetros de entrada = 25 e saída = 164. Estes experimentos indicam que o meio de cultivo não exerce influência sobre a fluorescência do suporte.

6 DISCUSSÃO

Com todas as informações obtidas a partir dos testes com os três corantes, azul de tripan, azul de metileno e azul de algodão, além da revisão literária feita, foi decidido que o azul de tripan seria o corante que o grupo definiria para uso em experimentos que serão feitos em sequência. A autoclavagem dos suportes já corados iria facilitar o protocolo, pois haveria menor uso do fluxo laminar, já que a esterilização seria feita logo em seguida. Como a autoclavagem foi uma etapa limitante, existe a necessidade de seguir com a coloração de forma totalmente estéril caso haja crescimento celular posteriormente, para evitar a contaminação.

O armazenamento em água Milli-Q foi feito para avaliar se haveria difusão da cor durante o cultivo das células, o que pouco ocorreu, mesmo antes da fixação, exceto para o azul de algodão. O desafio com a desidratação por 24 horas mostrou boa estabilidade da cor após a fixação, e os experimentos posteriores com cultura e processamento para MEV e MET mostraram resultados bons e muito similares aos demonstrados aqui, porém na presença de células de *C. albicans*.

O azul de tripan, apesar de aniônico, parece possuir alguma afinidade pela membrana de diálise, e essa característica pode estar presente, provavelmente, pelo processo de fabricação da membrana. A membrana utilizada para produção dos suportes é obtida a partir de celulose regenerada, por um processo chamado de fabricação de viscose (EL SEOUD *et al.*, 2020; KLOCK *et al.*, 2005).

Nesse processo, a celulose é diluída em meio alcalino, dando origem ao xantato de celulose (viscose), o qual sofre extrusão em ácido sulfúrico formando filmes de celulose. A adição do componente celulósico em meio alcalino libera intermediários, como o xantato, e desfaz as ligações de hidrogênio entre as cadeias do polissacarídeo. Já os intermediários farão parte do processo de *crosslinking* para produção dos filmes. Outras moléculas, adicionadas no meio, podem participar dessa composição, auxiliando no *crosslinking* e também oferecendo novas propriedades físico-químicas (EL SEOUD *et al.*, 2020; KLOCK *et al.*, 2005).

Anteriormente à membrana de celulose regenerada, a membrana baseada em celulose era derivada do algodão. Porém, é pouco permeável à água, diminuindo o fluxo na hemodiálise, além de apresentar maior imunogenicidade. A membrana sintética de celulose regenerada é mais biocompatível (MACLEOD *et al.*, 2005) por gerar menor resposta imunológica nos pacientes (KOHLOVÁ *et al.* 2019; SCHAEFERA *et al.*, 1987). Dessa forma, o grupo acredita que pode haver a inserção de átomos ou grupos responsáveis pela estabilização do corante na superfície do suporte, mas que não foram mencionados ou não foram encontradas as informações sobre.

Em experimentos anteriores, já foi observada a capacidade de crescimento microbiano no suporte de celulose e, como se pode ver na figura 16, as células aderem melhor na presença de poli-L-lisina. Provavelmente, as células são varridas durante o cultivo em meio agitado, logo, a maior presença de células no suporte na presença de poli-L-lisina pode ser indicador de que as leveduras estão sendo

lavadas. O crescimento de *C. albicans* no suporte azulado demonstrou ser eficaz (fig. 17).

Ademais, resultados inesperados foram obtidos. O suporte de celulose na presença do azul de tripan emitiu cor vermelha na excitação com luz verde do microscópio de fluorescência (fig. 18B e 19B), e, parcialmente, a cor verde na excitação com azul (fig. 19A). Entretanto, o suporte não é autofluorescente, ou seja, sem corantes não emite fluorescência (fig. 20).

Durante a coloração dos suportes, alguns não foram completamente corados. Isso porque estavam grudados uns aos outros dentro do recipiente que continha o corante, o que desfavoreceu a penetração do azul de tripan. Esses suportes não semeados e semicorados também foram visualizados, mas a cor vermelha foi homogênea em todo o suporte. Ou seja, mesmo quando somente uma parte do suporte estava azul pelo corante, o mesmo emitiu a mesma intensidade de vermelho na fluorescência em toda a sua superfície (fig. 21 e 22).

Uma hipótese pode ser levantada a partir disso: O suporte pode estar suficientemente impregnado antes mesmo de obter a cor azulada. A explicação para a emissão de fluorescência do azul de tripan foi pesquisada. Em estudos anteriores, foi descrita a capacidade de internalização do azul de tripan por células viáveis através de macropinocitose e passagem por canais iônicos, com auxílio de microscópio fluorescente na emissão de 530-640 nm (emissão máxima de 630-720 nm). Isso foi visto através da coloração de células na presença e ausência de amiloride, um inibidor de macropinocitose. Apenas na falta do inibidor, células viáveis puderam ser coradas em vesículas na região perinuclear. Nitrato de prata foi usado para induzir a pinocitose, o que aumentou a emissão de fluorescência do tripan (KERSCHBAUM *et al.*, 2021). Mas, segundo KERSCHBAUM e colaboradores (2021), o azul de tripan não emite fluorescência sozinho, e a luz refletida provavelmente se dá pelas interações com proteínas das vesículas formadas.

A interação com as proteínas depende de interações eletrostáticas, possibilitadas pelo nível de protonação tanto do corante quanto das cadeias laterais e grupos amino e carboxi terminais proteicos. Em meio ácido, os grupos com enxofre do tripan estão ionizados, enquanto algumas proteínas possuem os grupos laterais nitrogenados carregados positivamente, influenciando na maior interação (GAO *et al.*, 2003).

Apesar da fluorescência emitida pelo tripan na presença de proteínas, a celulose regenerada não aparenta ser formada por macromoléculas exógenas, ou seja, adicionadas no processo de viscose, apenas por estruturas menores (KOHLOVÁ *et al.* 2019; SCHAEFERA *et al.*, 1987).

Além disso, a regeneração não parece vir da celulose purificada, logo, fora a formação de intermediários, algumas proteínas ou peptídeos presentes no material celulósico podem ser "aprisionados" durante o *crosslinking*. Pode haver também a otimização da membrana ao adicionar outras moléculas que, inclusive, são utilizadas para diminuir a imunogenicidade, como os grupos amino terciários (KOHLOVÁ *et al.* 2019; SCHAEFERA *et al.*, 1987).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A coloração de fato facilitou a visualização do suporte durante todo o trabalho, o que nos faz defender que esta coloração é útil para manejo da amostra e processamento para MEV e MET. O suporte transparente oferece dificuldade para ser visualizado e pode ocasionar em perda da amostra, pois a mesma pode grudar nos instrumentos e acabar sendo descartada ou simplesmente perdida. Outro fator é que o cuidado maior no manejo dos suportes transparentes, para que não se percam, aumenta o tempo de trabalho e uso de equipamentos, principalmente quando ocorre algum erro e devemos repetir o procedimento.

O protocolo, representado pela figura 6 de A-F, foi estabelecido e testado sucessivas vezes na medida em que precisávamos confirmar uma hipótese ou consertar erros cometidos, como no caso do fixador que retirou boa parte do corante no primeiro teste ou quando não houve a coloração dos suportes (fig. 21 e 22).

A fluorescência emitida pelo suporte deve ser entendida como uma vantagem quando se pensa na MET. Isso porque pode ser incorporada a tecnologia de fluorescência durante o corte no micrótomo, permitindo visualizar com maior acurácia a localização e orientação da amostra que pode ser, inclusive, muito pequena para enxergar a olho nú dentro de um bloco de resina não-fluorescente. A faixa de excitação no comprimento de onda da luz verde favoreceu mais a visualização, mas também é visto que o comprimento de onda do azul também permite a emissão de cor pelo suporte, a cor verde, o que só pôde ser visto após a edição das imagens para realçar as cores (fig. 19A).

Temos a perspectiva de observar futuramente as amostras processadas desta forma em MEV e MET. Esclareço que as amostras processadas para microscopia eletrônica não terminaram por ser visualizadas devido à mudança do laboratório Núcleo Multidisciplinar de Pesquisa UFRJ – Xerém em Biologia, onde a pesquisa é realizada, o que deixou o microscópio fora de uso desde março deste ano. Porém, foi visto crescimento celular no suporte corado como já mencionado, demonstrando que o corante não impediu o desenvolvimento das células. Nas imagens de microscopia de fluorescência, parece não ter ocorrido internalização do corante pelas células, como descrito por KERSCHBAUM e colaboradores (2021). Isso pode indicar que não houve morte celular, visto que o corante também é indicador de morte celular (POLYSCIENCE), ou que o corante ficou bem fixado no suporte e não estava disponível para a internalização.

Como as amostras não foram visualizadas até o momento, não houve como saber se o inóculo e o tempo de cultivo foram suficientes para permitir as análises em MET, assim como se houve o crescimento filamentosos e sobreposição celular em todos os meios. Ainda que a figura 17 mostre presença de leveduras, o processamento acarreta na lavagem das células.

Após o retorno das atividades do laboratório, os próximos passos serão a marcação da superfície do suporte com grade de microscopia. A ideia é favorecer depressões microscópicas, onde a célula irá se depositar em regiões identificáveis por coordenadas visíveis em múltiplas técnicas de microscopia. Isso vai favorecer um dos nossos objetivos, que é orientar o crescimento da célula, algo que não pôde ser visto neste trabalho, mas que o grupo continuará em busca.

Usando das vantagens adquiridas com o suporte, tais como adesão celular, crescimento e desenvolvimento celular e o processamento adequado para ME, os próximos passos são as análises ultraestrutural e morfológica de *C. albicans* na presença de diferentes moléculas, tais como as moléculas de *quorum sensing* aqui mencionadas. Dessa forma, almeja-se o estudo das estruturas intracelulares na presença e ausência dessas substâncias para comparar as mudanças ocorridas, assim como entender os fatores de virulência ou de inibição de virulência relacionados com a adaptação e a comunicação intraespecífica ou interespecífica.

8 REFERÊNCIAS

ABBAS, A. *et al.* **Imunologia Celular e Molecular**. 8ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2015.

AL-GHOUTI, M. *et al.* **Mechanistic understanding of the adsorption and thermodynamic aspects of cationic methylene blue dye onto cellulosic olive stones biomass from wastewater**. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 1-18, 2020.

ALKHARS, N. *et al.* **Antifungal Susceptibility of Oral Candida Isolates from Mother-Infant Dyads to Nystatin, Fluconazole, and Caspofungin**. *Journal of Fungi*, v. 9, n. 5, p. 580, 2023.

AMBROGI, V. *et al.* **Biocompatible alginate silica supported silver nanoparticles composite films for wound dressing with antibiofilm activity**. *Materials Science and Engineering: C*, v. 112, n. 110863, p. 1-9, 2020.

ARAUJO, T. *et al.* **Yeast immobilisation for brewery fermentation**. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 127, n. 4, p. 302-316, 2021.

ARDIZZONI, A. *et al.* **It takes two to tango: How a dysregulation of the innate immunity, coupled with Candida virulence, triggers VVC onset**. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, p. 692491, 2021.

ARSHAD, M. *et al.* **Fungal Quorum-Sensing Molecules and Inhibitors with Potential Antifungal Activity: A Review**. *Molecules*, v. 24, n. 10, p. 1-18, 2019.

BALÁZ, M. *et al.* **A novel inserted membrane technique for studies of mycorrhizal extraradical mycelium**. *Mycorrhiza*, v. 11, n. 6, p. 291-296, 2001.

BLEACKLEY, M. *et al.* **Fungal extracellular vesicles with a focus on proteomic analysis**. *Proteomics*, v. 19, n. 8, p. 1-14, 2019.

BOJANG, E. *et al.* **Immune Sensing of *Candida albicans***. *J. fungi* 2021, v.2 n.7, p. 119-137, 2021.

DEDAVID, B. *et al.* **Microscopia eletrônica de varredura: Aplicações e preparação de amostras**. Edição do Centro de Microscopia e Microanálises do IDÉIAPUCRS - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007. p. 60.

EDWARDS, V. *et al.* **The cervicovaginal microbiota-host interaction modulates *Chlamydia trachomatis* infection**. *MBio*, v. 10, n. 4, p. e01548-19, 2019.

EL SEOUD, O. *et al.* **Cellulose regeneration and chemical recycling: closing the “cellulose gap” using environmentally benign solvents**. *Macromolecular Materials and Engineering*, v. 305, n. 4, p. 1900832, 2020.

FARIA-GONÇALVES, Paula *et al.* **Virulence Factors as Promoters of Chronic Vulvovaginal Candidosis: A Review**. *Mycopathologia*, p. 1-19, 2021.

FRANKEN, L. *et al.* **A technical introduction to transmission electron microscopy for soft-matter: Imaging, possibilities, choices, and technical developments.** *Small*, v. 16, n. 14, p. 1-15, 2020.

FRANKL, A. *et al.* **Electron microscopy for ultrastructural analysis and protein localization in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Microbial Cell*, v. 2, n. 11, p. 412-428, 2015.

GAO, H. *et al.* **Interaction of trypan blue with protein and application.** *Journal of the Chinese Chemical Society*, v. 50, n. 2, p. 329-334, 2003.

GHOSAL, K. *et al.* **Synthesis and characterization of interpenetrating polymeric networks based bio-composite alginate film: a well-designed drug delivery platform.** *International journal of biological macromolecules*, v. 130, p. 645-654, 2019.

GULATI, M. *et al.* ***Candida albicans* biofilms: Development, regulation, and molecular mechanisms.** *Microbes and infection*, v. 18, n. 5, p. 310-321, 2016.

HARO, M. *et al.* **A simplified method of synthesis to obtain zwitterionic cellulose under mild conditions with active ionic moieties.** *Molecules*, v. 25, n. 13, p. 1-14, 2020.

HÖFS, S. *et al.* **Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota.** *Journal of Microbiology*, v. 54, n. 3, p. 149-169, 2016.

HUANG, G. *et al.* **Multiple roles and diverse regulation of the Ras/cAMP/protein kinase A pathway in *Candida albicans*.** *Molecular Microbiology*, v. 111, n. 1, p. 6-16, 2019.

HUBBE, M. *et al.* **Analytical Staining of Cellulosic Materials: A Review.** *BioResources*, v.14, n. 3, p. 7387-7464, 2019.

JEFFERY-SMITH, A. *et al.* ***Candida auris*: a review of the literature.** *Clinical microbiology reviews*, v. 31, n. 1, p. 1-18, 2018.

JIMÉNEZ, N. *et al.* **Gridded Aclar: preparation methods and use for correlative light and electron microscopy of cell monolayers, by TEM and FIB–SEM.** *Journal of microscopy*, v. 237, n. 2, p. 208-220, 2010.

KERSCHBAUM, H. *et al.* **Trypan blue - adapting a dye used for labelling dead cells to visualize pinocytosis in viable cells.** *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 56, n. S1, p. 171-184, 2021.

KINGSLEY, R. *et al.* **Preparation of cultured mammalian cells for transmission and scanning electron microscopy using Aclar film.** *Journal of electron microscopy technique*, v. 10, n. 1, p. 77-85, 1988.

KLOCK, U. *et al.* **Química da Madeira**. 3ª edição. Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias - Departamento de Engenharia e Tecnologia Florestal. Curitiba, p. 86, 2005.

KOHLOVÁ, M. *et al.* **The biocompatibility and bioactivity of hemodialysis membranes: their impact in end-stage renal disease**. *Journal of Artificial Organs*, v. 22, n. 1, p. 14-28, 2019.

LECK, A. *et al.* **Preparation of lactophenol cotton blue slide mounts**. *Community Eye Health*, v. 12, n. 30, p. 24, 1999.

LOWMAN, D. *et al.* **Glucan and glycogen exist as a covalently linked macromolecular complex in the cell wall of *Candida albicans* and other *Candida* species**. *The Cell Surface*, v. 7, p. 1-9, 2021.

MACLEOD, A. *et al.* **Cellulose, modified cellulose and synthetic membranes in the haemodialysis of patients with end-stage renal disease**. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, v. 2009, n. 3, p. 1-62, 2005.

MARTINA A. *et al.* **Quorum-sensing in yeast and its potential in wine making**. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 100, n. 18, p. 7841-7852, 2016.

MARTINEZ, R. **Atualização no uso de agentes antifúngicos**. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 32, p. 449-460, 2006.

MIAO, Jian *et al.* **Glycogen Metabolism in *Candida albicans* Impacts Fitness and Virulence during Vulvovaginal and Invasive Candidiasis**. *Mbio*, v. 14, n. 2, p. e00046-23, 2023.

MOYES, D. *et al.* **Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection**. *Nature*, v. 532, n. 7597, p. 64–68, 2016

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. National Center for Biotechnology Information. **PubChem**. Disponível em : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glutaraldehyde>. Acesso em: 18 de janeiro de 2023.

NELSON, D. *et al.* **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 8ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2022. p. 1220.

PAPPAS, Peter G. *et al.* **Invasive candidiasis**. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 4, n. 1, p. 1-20, 2018.

POLYSCIENCE. **Trypan Blue 0.4% Solucion**. Disponível em: <https://www.polysciences.com/india/trypan-blue-0-4-solution>. Acesso em: 17 de julho de 2023.

RICHARDSON, J. *et al.* **Candidalysins Are a New Family of Cytolytic Fungal Peptide Toxins**. *MBio*, v. 13, n. 1, p. e03510-21, 2022.

SACHIVKINA, N. *et al.* **Morphological characteristics of *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, and *Candida glabrata* biofilms, and response to farnesol.** *Veterinary World*, v. 6, n. 14, p. 1608-1614, 2021.

SCHAEFERA, R. *et al.* **Enhanced Biocompatibility with a New Cellulosic Membrane: Cuprophan® versus Hemophan®** **Key Words. Biocompatibility • Cellulosic membranes • Complement ■ Elastase • Lactoferrin.** *Blood Purification*, v. 5, n. 4, p. 262-267, 1987.

SILVA, R. **Suporte Para Microscopia Eletrônica Orientada De Fungos.** Rio de Janeiro: Duque de Caxias, 2021.

SOUZA, W. *et al.* **Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas.** 3ª ed. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 2007. p. 423.

STADTLÄNDER, H. *et al.* **Scanning electron microscopy and transmission electron microscopy of mollicutes: Challenges and opportunities.** *Modern research and educational topics in microscopy*, v. 1, p. 122-131, 2007.

TALAPKO, J. *et al.* ***Candida albicans* — The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection.** *J. Fungi*, v. 7, n. 79, p. 1-19, 2021.

ThermoFisher. **Nunc™ Thermanox™.** Disponível em: https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/150067?gclid=Cj0KCQjwho-IBhC_ARIsAMpgMofBcweU9Qp-jPU0J_v-x5Q0HrEx3BnfgvI5axsUuF-jRZgvCv6bKgQaAmTtEALw_wcB&ef_id=Cj0KCQjwho-IBhC_ARIsAMpgMofBcweU9Qp-jPU0J_v-x5Q0HrEx3BnfgvI5axsUuF-jRZgvCv6bKgQaAmTtEALw_wcB:G:s&s_kwid=AL!3652!3!562127230705!!!g!!!15287362487!128563401494&cid=bid_clb_ccp_r01_co_cp0000_pjt0000_bid00000_0se_gaw_dy_pur_con. Acesso em 04 de julho de 2023.

VALVERDE, V. **Busca de novos alvos para antifúngicos: Ultraestrutura e metabolismo na transição morfológica do fungo *Candida albicans*.** Rio de Janeiro: Duque de Caxias, 2021.

VOHNÍK, M. *et al.* **Testate amoebae (Arcellinida and Euglyphida) vs. Ericoid mycorrhizal and DSE fungi: a possible novel interaction in the mycorrhizosphere of ericaceous plants?** *Microb Ecol.* v. 57, n. 1, p. 203-214, 2009.

YEH, Y. *et al.* ***Candida albicans* Aro1 affects cell wall integrity, biofilm formation and virulence.** *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v. 53, n. 1, p. 115-124, 2020.

World Health Organization. **WHO releases first-ever list of health-threatening fungi.** 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/25-10-2022-who-releases-first-ever-list-of-health-threatening-fungi>. Acesso em 27 de janeiro de 2023.