

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO

BEATRIZ BASTOS FONSECA

**CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE
BIOFILMES DE *Candida albicans* ATRAVÉS DE MICROSCOPIA
ELETRÔNICA DE VARREDURA.**

Dissertação de Mestrado profissional submetida À Universidade Federal do Rio de Janeiro visando a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas (Biofísica)

Rio de Janeiro
2014

BEATRIZ BASTOS FONSECA

CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE BIOFILMES DE
Candida albicans ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE
VARREDURA.

Dissertação de Mestrado Profissional
apresentada ao Programa de Pós-graduação
para a pesquisa Biomédica (Biofísica),
Instituto de Biofísica Carlos Chagas
Filho, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biomédicas (Biofísica).

Orientadora: Prof^a Dr^a Sonia Rozental

Rio de Janeiro
2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Fonseca, Beatriz Bastos.

Caracterização da estrutura tridimensional de biofilmes de *Candida albicans* através de microscopia eletrônica de varredura. Rio de Janeiro, 2014 – 62 Folhas.

Dissertação (Mestre em Ciências Biomédicas – Biofísica). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.

Orientadora: Prof^a Dr^a Sonia Rozental

1. *Candida albicans* 2. Biofilme 3. Matriz extracelular 4. Microscopia eletrônica 5. Técnicas de congelamento

I Universidade Federal do Rio de Janeiro

II Título

FOLHA DE APROVAÇÃO

BEATRIZ BASTOS FONSECA

Caracterização da estrutura tridimensional de biofilmes de *Candida albicans* através de microscopia eletrônica de varredura

Rio de Janeiro, 28 de abril de 2014.

Dr^a Sonia Rozental, Universidade Federal do Rio de Janeiro (Orientadora).

Dr^a Marcia Attias, Universidade Federal do Rio de Janeiro (Revisora).

Dr André Santos, Universidade Federal do Rio de Janeiro (Banca Examinadora).

Dr Celso Sant'Anna, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Banca Examinadora).

Dr^a Susana Frases, Universidade Federal do Rio de Janeiro (Banca Examinadora).

Dedico ao meu bisavô Álvaro
e ao meu avô Juvenil (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela coragem e inspiração para superar cada dia.

Agradeço a minha mãe Sandra, que me apoiou e me incentivou sempre a continuar neste caminho, sendo meu alicerce e estando ao meu lado em todos os momentos. Agradeço também a todos os meus familiares que me apoiaram.

Agradeço ao meu namorado Arthur que entendeu meus momentos de estresse e minhas ausências para que este trabalho fosse executado, sempre estando ao meu lado me dando apoio, amor e carinho.

Agradeço a todos os meus amigos, especialmente a Rachel Rachid, pois sem sua ajuda e ensinamento das técnicas e uso dos aparelhos, não teria sido possível a conclusão deste trabalho. Agradeço a ela também por todos os nossos momentos de brincadeiras e risadas.

Agradeço a Sonia Rozental que foi muito mais do que uma orientadora, me incentivando e apoiando sempre.

Agradeço a Taissa Vila pela sua imensa colaboração no trabalho, quase uma co-orientadora, me ensinando e me mostrando o mundo dos biofilmes. Agradeço a ela também e a Caroline Guerra pela amizade e pelos momentos de descontração dentro e fora do laboratório, sempre com muita alegria e boas risadas.

Agradeço ao Marcel Lyra pelos ensinamentos referentes a técnicas de congelamento, pela ajuda direta e pelas conversas sempre produtivas.

Agradeço aos demais amigos do Laboratório de Biologia Celular de Fungos: Luana, Thalita, Raul, Victória e Nathalia que proporcionam um ótimo e animado local para se trabalhar.

Agradeço aos professores Celso Sant'Anna, Susana Frases e André Santos por terem aceitado o convite para serem membros da Banca Examinadora. Agradeço a Marcia Attias pelas sugestões e correções no texto da Dissertação que o melhoraram muito.

Agradeço aos professores e funcionários do Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer pela boa convivência.

Agradeço aos integrantes do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho a possibilidade e abertura deste curso de Mestrado Profissional, do qual tenho orgulho de fazer parte da primeira turma de mestres deste curso.

Agradeço as instituições de financiamento CAPES e FAPERJ pelos recursos disponibilizados.

Agradeço aos meus amigos de fora desse mundo da ciência, Eduardo, Ana, Mônica, Beatriz e Ana Luisa que me apoiaram, me incentivaram e tornaram esta caminhada muito mais prazerosa e entenderam minhas ausências.

Por fim, agradeço a cada indivíduo que direta ou indiretamente contribuiu para a realização desta Dissertação.

Um cientista sério não pode negar a existência de Deus, pois quem, como ele,
pode penetrar tão profundamente a Sua oficina e admirar a Sua Sabedoria,
só pode ajoelhar-se perante a grandeza do Espírito Divino.

Madler (1794-1874) – Astrônomo alemão

RESUMO

FONSECA, Beatriz Bastos. Caracterização da estrutura tridimensional de biofilmes de *Candida albicans* através de microscopia eletrônica de varredura. Rio de Janeiro, 2014. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciências Biomédicas – Biofísica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Candida albicans é um fungo usualmente encontrado nos tratos urinário e gastrointestinal e na microbiota da pele. Quando há uma infecção, a doença se inicia como uma candidíase, podendo se agravar para uma candidemia, principalmente, em pacientes imunodeprimidos. O uso de cateteres, dentaduras e outros dispositivos de longa permanência em pacientes internados induzem a formação de biofilmes de *C. albicans* dificultando o tratamento, pois o biofilme confere resistência contra a resposta imune do hospedeiro. A estrutura dos biofilmes de *C. albicans* é ainda pouco conhecida, principalmente, no que diz respeito à composição da sua matriz extracelular (MEC) polimérica. Acredita-se que esta matriz corrobore pela resistência do biofilme aos antifúngicos comerciais. Os estudos para caracterização da MEC esbarram em diferentes problemas, como os métodos de processamento para microscopia eletrônica que utilizam fixadores químicos que tendem a extrair a MEC, principalmente, durante as etapas de fixação química e desidratação. Com o insucesso das fixações químicas sugerimos o uso de fixação física uma vez que esta não terá nenhuma interferência química e poderá manter a MEC. Portanto, este trabalho visa comparar quatro métodos de fixação química, utilizando protocolos de Rotina, Sacarose, Vermelho de rutênio e Ácido tânico e fixação física, utilizando congelamento sob alta pressão e congelamento por imersão. Determinando assim o melhor protocolo para processamento de biofilmes de *C. albicans*, de modo a permitir a preservação da matriz extracelular e sua visualização, por microscopia eletrônica de varredura. No presente trabalho, a fixação química utilizando os diferentes protocolos apresentou boa preservação das células fúngicas, mas levou a extração da MEC. Já a fixação física induziu uma boa preservação das células fúngicas e MEC. Com o congelamento sob alta pressão observamos a MEC e fraturas no material. Com o congelamento por imersão observamos a MEC na sua estrutura como um todo, visualizando as fibrilas que recobrem inicialmente as leveduras e hifas e por cima dessas fibrilas o manto da MEC. Sendo assim utilizamos como processamento padrão a fixação física em substituição a fixação química que não apresenta bons resultados.

ABSTRACT

FONSECA, Beatriz Bastos. Three-dimensional characterization of *Candida albicans* biofilms by scanning electron microscopy. Rio de Janeiro, 2014 Dissertation (Professional Master in Biomedical Sciences - Biophysics) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Candida albicans is a fungus usually found in the gastrointestinal and urinary tracts, and also in the skin microbiota. The disease, normally, starts as a candidiasis and may worsen for a candidemia, mainly in immunocompromised patients. The use of catheters, dentures and other indwelling devices in hospitalized patients induce biofilm formation of *C. albicans*, difficulting the treatment as biofilm confer resistance to the host immune response. The structure of *C. albicans* biofilms is still unclear, especially with regard to their polymeric composition of the extracellular matrix (ECM). It is believed that this matrix could corroborate to the resistance of biofilms to commercial antifungal agents. Studies to characterize the ECM run into different problems and methods for processing for electron microscopy using chemical fixatives tend to extract the MEC, especially during stages of chemical fixation and dehydration. Therefore, this work aims to compare different methods of physical and chemical fixations and to determine the best protocol for processing of *C. albicans* biofilms to scanning electron microscopy, allowing the preservation of the extracellular matrix and its visualization. In our work, the chemical fixation showed good preservation of fungal cells, but led to the extraction of ECM. Since the physical fixation induced a good preservation of the yeast cells and ECM.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: DIFERENÇAS BÁSICAS ENTRE OS MICROSCÓPIOS ELETRÔNICOS DE TRANSMISSÃO (ESQUERDA) E DE VARREDURA (DIREITA). ADAPTADO DE BOZZOLA, ET AL., 1999.....	3
FIGURA 2: ESQUEMA DO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA.....	4
FIGURA 3: ESQUEMA ILUSTRATIVO DA SEQUÊNCIA DE DESENVOLVIMENTO DO BIOFILME DE <i>C. ALBICANS</i> , EM SUAS DIFERENTES FASES. A: ADESÃO DE LEVEDURAS EM SUSPENSÃO À SUPERFÍCIE, B: FORMAÇÃO DE COLÔNIAS E MULTIPLICAÇÃO CELULAR, C: SECREÇÃO DE MATRIZ EXTRACELULAR (MEC) E FORMAÇÃO DE HIFAS, FORMANDO UMA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL COMPLEXA. ADAPTADO DE: DOUGLAS J.L., 2003.....	10
FIGURA 4: APARELHO DE CONGELAMENTO POR ALTA PRESSÃO. A – APARELHO. B – MOEDAS DE COBRE ONDE OS MATERIAIS SÃO COLOCADOS E ROLDER UTILIZADO PARA COLOCAR A MOEDA. C – DETALHE DO PORTA ESPÉCIME COM A MOEDA JÁ ENCAIXADA, FAZENDO UM SANDUICHE NO MATERIAL. D – HOLDER SENDO COLOCADO NO APARELHO PARA A REALIZAÇÃO DO CONGELAMENTO (CHANDLER ET AL., 2009).	25
FIGURA 5: APARELHO DE CONGELAMENTO POR IMERSÃO (A). DETALHE DA PINÇA COM UMA GRADE PRONTA PARA O CONGELAMENTO. ADAPTADO DE: HTTP://MICROSCOPY.MED.UALBERTA.CA/EM-PREPARATIVE-EQUIPMENT/ , 2014.....	26
FIGURA 6: APARELHO DE SUBSTITUIÇÃO A FRIO.	27
FIGURA 7: BIOFILME DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> ATCC10231 APRESENTADO EM AUMENTOS PROGRESSIVOS. PRESENÇA DE LEVEDURAS E HIFAS ADERIDAS ÀS SUPERFÍCIES DE CATETER (A A D) E DE CUPON (E A H) PROCESSADAS CONFORME O PROTOCOLO 1 (ROTINA). VISUALIZAÇÃO NO QUANTA 250 EM ALTO VÁCUO.....	29
FIGURA 8: BIOFILME DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> 44A APRESENTADO EM AUMENTOS PROGRESSIVOS. PRESENÇA DE LEVEDURAS E HIFAS ADERIDAS ÀS SUPERFÍCIES DE CATETER (A A D) E DE CUPON (E A H) PROCESSADAS CONFORME O PROTOCOLO 1 (ROTINA).VISUALIZAÇÃO NO QUANTA 250 EM ALTO VÁCUO.....	30
FIGURA 9: BIOFILME DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> ATCC10231 APRESENTADO EM AUMENTOS PROGRESSIVOS. PRESENÇA DE LEVEDURAS E HIFAS ADERIDAS ÀS SUPERFÍCIES DE CATETER (A A D) E DE CUPON (E A H) PROCESSADAS CONFORME O PROTOCOLO 2 (SACAROSE). VISUALIZAÇÃO NO QUANTA 250 EM ALTO VÁCUO.....	31
FIGURA 10: BIOFILME DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> 44A APRESENTADO EM AUMENTOS PROGRESSIVOS. PRESENÇA DE LEVEDURAS E HIFAS ADERIDAS ÀS SUPERFÍCIES DE CATETER (A A D) E DE CUPON (E A H) PROCESSADAS CONFORME O PROTOCOLO 2 (SACAROSE). SETAS INDICANDO RESQUÍCIOS DE MEC. VISUALIZAÇÃO NO QUANTA 250 EM ALTO VÁCUO.	32
FIGURA 11: BIOFILME DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> ATCC10231 APRESENTADO EM AUMENTOS PROGRESSIVOS. PRESENÇA DE LEVEDURAS E HIFAS ADERIDAS ÀS SUPERFÍCIES DE CATETER (A A D) E DE CUPON (E A H) PROCESSADAS CONFORME O PROTOCOLO 3 (VERMELHO DE RUTÊNIO). SETAS INDICANDO FORMAÇÃO DE PRECIPITADOS. VISUALIZAÇÃO NO QUANTA 250 EM ALTO VÁCUO.	33
FIGURA 12: BIOFILME DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> 44A APRESENTADO EM AUMENTOS PROGRESSIVOS. PRESENÇA DE LEVEDURAS E HIFAS ADERIDAS ÀS SUPERFÍCIES DE CATETER (A A D) E DE CUPON (E A H) PROCESSADAS CONFORME O PROTOCOLO 3 (VERMELHO DE RUTÊNIO). SETAS INDICANDO FORMAÇÃO DE PRECIPITADOS OU RESQUÍCIOS DE MEC. VISUALIZAÇÃO NO QUANTA 250 EM ALTO VÁCUO.....	34
FIGURA 13: CÉLULAS PLANCTÔNICAS DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> ATCC10231 PROCESSADAS COM O PROTOCOLO 3 (VERMELHO DE RUTÊNIO) APRESENTANDO LEVEDURAS COBERTAS POR PRECIPITADOS (SETAS INDICANDO). VISUALIZAÇÃO NO QUANTA 250 EM ALTO VÁCUO.	36
FIGURA 14: BIOFILME DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> ATCC10231 APRESENTADO EM AUMENTOS PROGRESSIVOS. PRESENÇA DE LEVEDURAS E HIFAS ADERIDAS ÀS SUPERFÍCIES DE CATETER (A A D) E DE CUPON (E A H) PROCESSADAS CONFORME O PROTOCOLO 4 (ÁCIDO TÂNICO). VISUALIZAÇÃO NO QUANTA 250 EM ALTO VÁCUO.....	37

FIGURA 15: BIOFILME DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> 44A APRESENTADO EM AUMENTOS PROGRESSIVOS. PRESENÇA DE LEVEDURAS E HIFAS ADERIDAS ÀS SUPERFÍCIES DE CATETER (A A D) E DE CUPON (E A H) PROCESSADAS CONFORME O PROTOCOLO 3 (VERMELHO DE RUTÊNIO). SETAS INDICANDO FORMAÇÃO DE PRECIPITADOS. VISUALIZAÇÃO NO QUANTA 250 EM ALTO VÁCUO.	38
FIGURA 16: BIOFILME DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> ATCC 10231 EM AUMENTOS PROGRESSIVOS, NAS SUPERFÍCIES CATETER (A A D) E CUPON (E A H) OBSERVADAS EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA EM MODO AMBIENTAL. SETAS INDICANDO A MEC RECOBRINDO AS HIFAS E LEVEDURAS. VISUALIZAÇÃO NO QUANTA 250 EM BAIXO VÁCUO.	40
FIGURA 17: BIOFILME DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> 44A EM AUMENTOS PROGRESSIVOS, NAS SUPERFÍCIES CATETER (A A D) E CUPON (E A H) OBSERVADAS EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA EM MODO AMBIENTAL. SETAS INDICANDO A MEC RECOBRINDO AS HIFAS E LEVEDURAS. VISUALIZAÇÃO NO QUANTA 250 EM BAIXO VÁCUO.	41
FIGURA 18: BIOFILME DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> 44A APRESENTANDO MEC, NA SUPERFÍCIE CATETER (A A D) PROCESSADAS COM CONGELAMENTO POR ALTA PRESSÃO E SUBSTITUIÇÃO A FRIO. AUMENTOS MENORES (A E B) E AUMENTOS MAIORES (C E D). SETAS INDICANDO AS FRATURAS OCORRIDAS DURANTE O CONGELAMENTO. VISUALIZAÇÃO NO MAGELLAN 400 SUPER ALTA RESOLUÇÃO.	44
FIGURA 19: BIOFILME DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> 44A APRESENTANDO MEC, NA SUPERFÍCIE CATETER (A A D) PROCESSADAS COM CONGELAMENTO POR ALTA PRESSÃO E SUBSTITUIÇÃO A FRIO. AUMENTOS MENORES (A E B) E AUMENTOS MAIORES (C E D). SETAS INDICANDO AS FRATURAS OCORRIDAS DURANTE O CONGELAMENTO. v = VESÍCULAS MIGRANDO DA MEMBRANA PARA A PAREDE E m = MEC. VISUALIZAÇÃO NO MAGELLAN 400 SUPER ALTA RESOLUÇÃO.	45
FIGURA 20: MEC DO BIOFILME DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> 44A NA SUPERFÍCIE CATETER (A E B) PROCESSADAS COM CONGELAMENTO POR ALTA PRESSÃO E SUBSTITUIÇÃO A FRIO. SETAS INDICANDO ESPAÇOS ANTERIORMENTE OCUPADOS POR CÉLULAS. c= “CAMINHO” NA MEC POR ONDE CORRE A ÁGUA. f= FIBRILAS COM MEDIÇÕES. e= ESPAÇOS COM MEDIÇÕES. VISUALIZAÇÃO NO MAGELLAN 400 SUPER ALTA RESOLUÇÃO.	46
FIGURA 21: BIOFILME DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> 44A NA SUPERFÍCIE CATETER (A A D) PROCESSADAS COM CONGELAMENTO POR IMERSÃO E SUBSTITUIÇÃO A FRIO. SETAS INDICANDO A MEC RECOBRINDO AS LEVEDURAS. VISUALIZAÇÃO NO QUANTA 250 ALTO VÁCUO.	47
FIGURA 22: BIOFILME DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> 44A NA SUPERFÍCIE CATETER (A A D) PROCESSADAS COM CONGELAMENTO POR IMERSÃO E SUBSTITUIÇÃO A FRIO. SETAS INDICANDO AS FIBRILAS DE FORMAÇÃO DA MEC. VISUALIZAÇÃO NO QUANTA 250 ALTO VÁCUO.	48

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: PROTOCOLOS REALIZADOS PARA FIXAÇÃO QUÍMICA.	24
--	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC: American Type Culture Collection

CA: *Candida albicans*

CAP: Congelamento por alta pressão

CI: Congelamento por imersão

CVC: Cateter Venoso Central

MEC: Matriz Extracelular

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

MEVA: Microscopia Eletrônica de Varredura Ambiental

PBS: Salina tamponada com fosfato

SF: Substituição a frio

SFB: Soro Fetal Bovino

UTI: Unidade de Tratamento Intensivo

VR: Vermelho de Rutênio

Sumário

1 - INTRODUÇÃO:	2
1.1 – Microscopia eletrônica	2
1.2 - <i>Candida albicans</i>	6
1.2.1 – Biofilme de <i>Candida albicans</i>	8
1.3 - Preparo de amostras para microscopia eletrônica	12
1.4 - Microscopia eletrônica utilizada para fungos	17
2 - OBJETIVO GERAL:	19
2.1 – Objetivos específicos	19
3 – MATERIAIS E MÉTODOS:	20
3.1 - <i>Candida albicans</i>	20
3.2 - Formação de biofilmes de <i>Candida albicans</i>	20
3.3 - Microscopia eletrônica de varredura	21
3.3.1 - Fixação Química	21
3.3.1.2 - Modo Ambiental	24
3.3.1.3 – Fixação Física	24
4 – RESULTADOS:	27
4.1 - Fixação química – observação em MEV alto vácuo, 15KV, Quanta 250	27
4.2 – Observação em modo ambiental, 20KV, pressão 8,77mbar, temperatura 5°C, umidade 91,2%	39
4.3 – Fixação física – observação em MEV alto vácuo, super alta resolução, 1,00KV, Magellan 400 (congelamento por alta pressão) e MEV alto vácuo 15KV, Quanta 250 (congelamento por imersão)	42
5- DISCUSSÃO	49
6 - CONCLUSÃO:	57
7 - REFERÊNCIAS:	59

1 - INTRODUÇÃO:

1.1 – Microscopia eletrônica

Os primeiros microscópios eletrônicos surgiram na década de 1930, foram desenvolvidos na Alemanha por Knoll e Ruska. Os microscópios eletrônicos de transmissão comerciais com qualidade razoável surgiram na década de 1940 e os microscópios eletrônicos de varredura entraram no mercado apenas em 1960 (DE SOUZA, 2011).

O microscópio eletrônico utiliza elétrons como fonte de radiação. Com o microscópio eletrônico, conseguimos aumentos de mil vezes na ampliação quando comparados ao microscópio de luz. Acompanhado por um paralelo aumento na capacidade de resolução permitindo uma melhor observação dos materiais biológicos. Sendo assim, começou a ser possível a observação de DNA, vírus e muitas organelas pela primeira vez. O microscópio eletrônico influenciou profundamente a nossa compreensão da organização dos tecidos e, especialmente, da célula (BOZZOLA et al., 1999).

Dois tipos básicos de instrumentos são chamados de microscópios eletrônicos (figura 1) tendo usos fundamentalmente diferentes. O microscópio eletrônico de transmissão (MET) projeta elétrons através de uma fatia fina de amostra para produzir uma imagem bidimensional em uma tela fosforescente (ecrã). O microscópio eletrônico de varredura (MEV) produz uma imagem que dá a impressão de três dimensões. Este microscópio utiliza um feixe de elétrons que varre a superfície da amostra gerando elétrons secundários a partir do espécime que são então detectados por um sensor e assim convertido em imagem (BOZZOLA et al., 1999).

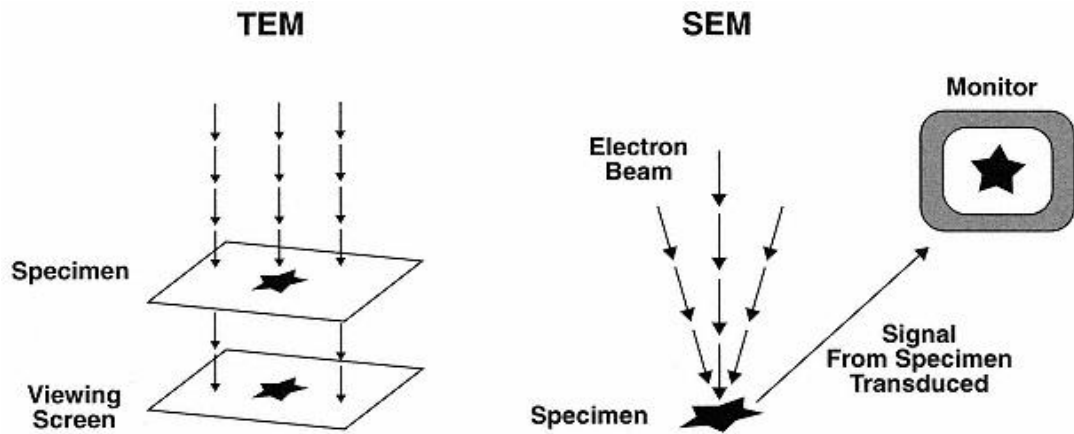


Figura 1: Diferenças básicas entre os microscópios eletrônicos de transmissão (esquerda) e de varredura (direita). Adaptado de BOZZOLA, et al., 1999.

O primeiro trabalho reconhecido descrevendo o conceito de um MEV é o de Knoll. Mais adiante, Von Ardenne em 1938 construiu um microscópio eletrônico de varredura e transmissão adaptando bobinas de varredura a um microscópio eletrônico de transmissão (DEDAVID et. al., 2007).

O princípio de um MEV, como descrito acima utiliza um feixe de elétrons de pequeno diâmetro para explorar a superfície da amostra. Possuindo também um sistema de bobinas de deflexão, no qual o feixe pode ser guiado de modo a varrer a superfície da amostra segundo uma malha retangular. O sinal de imagem resulta da interação do feixe incidente com a superfície da amostra. O sinal recolhido pelo detector é utilizado para modular o brilho do monitor, permitindo a observação. A maioria dos instrumentos usa como fonte de elétrons um filamento de tungstênio aquecido, operando numa faixa de tensões de aceleração de 10 a 30 kV. O feixe é acelerado pela alta tensão criada entre o filamento e o ânodo. Ele é, em seguida, focalizado sobre a amostra por uma série de três lentes eletromagnéticas com um spot menor que 4 nm. O feixe interagindo com a amostra produz elétrons e fótons que podem ser coletadas por detectores adequados e convertidas em um sinal de vídeo (figura 2) (DEDAVID et. al., 2007).

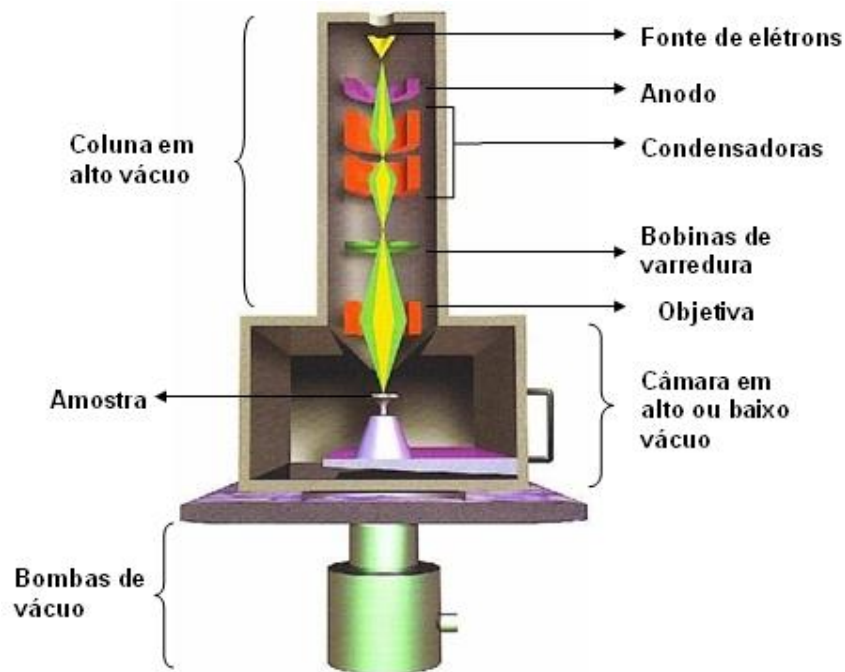


Figura 2: Esquema do microscópio eletrônico de varredura.
Adaptado de <http://fap01.if.usp.br/~lff/mev.html>

A imagem formada a partir do sinal captado na varredura eletrônica de uma superfície pode apresentar diferentes características, uma vez que a imagem resulta da amplificação de um sinal obtido de uma interação entre o feixe eletrônico e o material da amostra. Diferentes sinais podem ser emitidos pela amostra. Dentre os sinais emitidos, os mais utilizados para obtenção da imagem são originários dos elétrons secundários e/ou dos elétrons retroespalhados (BOZZOLA et. al., 1999).

O MEV pode ser utilizado em alto vácuo ou baixo vácuo. No alto vácuo temos as características do sistema descritas acima, já em baixo vácuo temos condições de pressão significativamente superiores e que permitem a geração de imagens e espécimes hidratados, fracamente condutores eletricamente em um ambiente gasoso na câmara de espécimes, variando entre 133 e 1596 Pa. Controla-se a pressão do ambiente gasoso da câmara de espécimes para variar entre 300 e 700 Pascal de pressão de gás ou vapor d'água. Este equipamento permite a observação da amostra *in natura*. (DE SOUZA, 2011).

O MEV de pressão variável, ou ambiental ou de baixo vácuo pode ser definido como um equipamento capaz de operar com a pressão na câmara do espécime desde alto-vácuo ($133,10^{-6}$ Pa) até um nível de pressão de 609 Pa, que é a pressão de saturação de vapor de água a 0°C, ou superior; na qual, os espécimes se mantem plenamente hidratados (DE SOUZA, 2011).

O ambiente gasoso na câmara de espécime adiciona características relevantes ao MEV modo ambiental, que são: o ambiente rico ou saturado de átomos ou moléculas de gases ou de vapor d'água é um meio de dissipação de carga elétrica; e, este ambiente pode ser utilizado como um meio de detecção, ou seja, um meio que pode gerar sinais oriundos de elétrons secundários ou de elétrons retroespalhados a serem coletados por detectores especialmente desenhados para tal fim (DE SOUZA, 2011).

A operação em modo ambiental muitas vezes requer a utilização de detectores capazes de operar em um gás, uma vez que o tradicional detector *Everhart-Thornley* de elétrons secundários (ETD) causará faíscas no estado gasoso. Os vários métodos de coleta ou detecção de sinais no gás geralmente dependem de alguma forma de pré-deteção de amplificação do sinal (STOKES, 2008).

Quando o gás que temos dentro do microscópio é o vapor de água, há inúmeras experiências que podem ser realizadas, que são únicas para o modo ambiental. Por exemplo, é possível manter um ambiente que corresponde a uma pressão saturada de vapor de água (100% de umidade relativa, UR) em torno de uma amostra úmida, ou uma pressão de vapor de equilíbrio adequado a esse espécime, de modo que a amostra não hidrate e nem desidrate. A pressão do vapor varia em função da temperatura, geralmente mantida entre 0°C e 25°C, os valores de vapor de água saturado ocorrem a pressões entre 600 Pascal e 2,66 KPascal (4,5 a 20 torr) (STOKES, 2008).

1.2 - *Candida albicans*

Candida albicans é um fungo comensal comum em seres humanos e alguns animais de sangue quente. Coloniza superfícies mucosas de indivíduos saudáveis (cavidade oral, vias respiratórias) e é considerado um componente da microbiota do trato digestivo e geniturinário (SAID, 2013).

É o primeiro fungo patogênico medicamente importante para o qual a sequência completa do genoma foi determinada (SAID, 2013).

Ao longo das últimas três décadas, *C. albicans*, tornou-se um patógeno clinicamente importante, responsável por infecções superficiais, chamadas de candidíase e bem como infecções profundas, chamadas de candidemia. A maioria das infecções são oportunistas, dependendo da defesa imunológica do hospedeiro e de mudanças do ambiente da levedura no organismo (SAID, 2013).

Diferentes espécies de *Candida*, principalmente *C. albicans* e, em menor grau não *albicans* (*Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida lusitaniae*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, etc.) representam o principal grupo de espécies de leveduras recuperadas de pacientes com candidíases (SINGH, 2007).

Desde 1980, a *C. albicans*, emergiu como um problema proeminente, com um número crescente de pacientes imunocomprometidos acometidos de candidíase invasiva. Consequentemente, *C. albicans* tornou-se uma causa frequente de infecções representando uma ameaça grave como doença invasiva associada a altas taxas de mortalidade (superiores a 30 % em muitos relatórios), apesar da disponibilidade de tratamentos antifúngicos, incluindo novos azólicos e equinocandinas (SAID, 2013).

Porém, o número de cepas de *C. albicans* que vem demonstrando resistência a antifúngicos azóis tem aumentado consideravelmente, causando sérios obstáculos para a

quimioterapia ser bem sucedida. Ambos, *C. albicans* e *C. não- albicans* desenvolveram uma variedade de mecanismos se tornando resistente a antifúngicos e drogas (ROSCOE, 2013).

Fatores predisponentes para candidíase incluem terapias imunossupressoras e citotóxicas, tratamento com antibióticos de amplo espectro, AIDS, diabetes, abuso de drogas, uso de cateter venoso central (CVC) e dispositivos de longa permanência. Nas últimas décadas, a incidência de infecções fúngicas por *C. albicans* e outras espécies fúngicas oportunistas aumentaram drasticamente devido ao crescimento do número de pacientes imunocomprometidos (ROSCOE, 2013). Este fungo pode causar uma grande variedade de infecções variando de mucosa, superficial, a candidíase disseminada, profunda. Portanto, o desenvolvimento de candidíase depende de um equilíbrio delicado entre os fungos e o estado imunitário do hospedeiro que determina o comensal ou relação parasitária (SINGH, 2007).

A partir de dados clínicos, verifica-se que tanto a produção de anticorpos, como a resposta imune mediada por células contribuem para conferir proteção contra a candidíase. A patogenicidade de *C. albicans* depende do estado imunológico do hospedeiro, sendo um complexo fator de virulência que está relacionado com esse microorganismo, incluindo a secreção de enzimas hidrolíticas, a variabilidade antigénica entre outros (SINGH, 2007).

A expressão da maioria dos fatores de virulência é regulada *in vitro* por meio de parâmetros ambientais e *in vivo* dependendo do estágio da infecção e varia também de acordo com a espécie hospedeira ou tecidos (SINGH, 2007).

É geralmente aceito que o dimorfismo (a capacidade de crescer tanto como brotamento/levedura ou numa forma filamentosa/hifa) é por si só, uma característica de

virulência e está correlacionado com outros fatores de virulência associados com a morfologia celular (SINGH, 2007).

Além da transição levedura - hifa, *C. albicans* sofre também outro tipo de alteração morfológica, chamado de comutação fenotípica, que envolve a geração espontânea e reversível de diferentes estados morfológicos e fisiológicos expressando diferentes padrões de características relacionadas à patogenicidade (fatores de virulência, antigenicidade e resistência a drogas antifúngicas) facilmente observada na morfologia das colônias (SINGH, 2007).

1.2.1 – Biofilme de *Candida albicans*

Os biofilmes são a principal forma de crescimento microbiano e são críticos para o desenvolvimento de uma infecção clínica. Eles são responsáveis por um amplo espectro de infecções microbianas no hospedeiro humano (MITCHELL, 2012).

Muitos fungos de importância médica podem produzir biofilmes, incluindo *Candida sp.*, *Aspergillus sp.*, *Cryptococcus sp.*, o *Trichosporon sp.*, *Coccidioides sp.*, e *Pneumocystis sp.* (MITCHELL, 2012).

Os biofilmes são definidos como comunidades altamente estruturadas de microorganismos que são ou estão associados a uma superfície ou ligados uns aos outros alocados dentro de uma matriz extracelular (MEC), que se parece com um gel e que dá proteção a esse microorganismo. As vantagens para um organismo dentro de um biofilme incluem: proteção do meio ambiente, resistência ao estresse físico e químico, cooperação metabólica, e regulação na expressão gênica com base na comunidade (WILLIAMS, 2012).

Entre os fungos patogênicos de seres humanos, *C. albicans* é a espécie mais frequentemente associada à formação de biofilme, particularmente em implantes

médicos e cateter venoso central (CVC), tendo um impacto significativo na morbidade e mortalidade dos pacientes. Assim, *C. albicans* tornou-se o principal modelo para estudar os mecanismos que estão na base da formação do biofilme fúngico. *C. albicans* é a principal espécie do gênero *Candida* que se submete a transição hifa-levedura, formando complexos morfológicos compostos de levedura, hifa e pseudo-hifa (D'ENFERT, 2013).

Os biofilmes de *C. albicans* podem se formar tanto numa combinação de mucosa, meio biótico, como em superfícies abióticas, como dentaduras e CVC (MITCHELL, 2012).

Comunidades de células de biofilme são mais resistentes a drogas antifúngicas do que as células planctônicas. Os fatores contribuintes para esta resistência incluem o próprio biofilme, a presença de MEC, heterogeneidade metabólica intrínseca a biofilmes e associada ao biofilme, aumento da regulação de genes de bomba de efluxo (MITCHELL, 2012).

Recentemente, foi mostrado que as células que se desprendem do biofilme têm uma maior associação com a mortalidade dos pacientes do que as leveduras planctônicas (WILLIAMS, 2012).

Biofilmes de *C. albicans* são compostos principalmente de filamentos em forma de hifas e leveduras, sendo ambas necessárias para a formação de biofilme. A formação é um processo sequencial que envolve a aderência a um substrato (tanto abiótico quanto em superfície mucosa), proliferação de levedura sobre a superfície, e a indução da formação de hifas. A MEC se acumula e assim temos o amadurecimento do biofilme (MITCHELL, 2012).

O desenvolvimento do biofilme de *C. albicans*, *in vitro*, em superfícies abióticas, já foi descrito por diversos autores e parece ocorrer em quatro etapas sequenciais: (i)

fase inicial (0-11h), na qual as leveduras em suspensão e circulantes aderem à superfície abiótica; (ii) fase intermediária (12-30h), referente à multiplicação das células, formação de estrutura com múltiplas camadas de leveduras sobrepostas e início da filamentação das células; (iii) fase de maturação (32-72h), na qual a matriz polimérica secretada embebe completamente todas as camadas de células aderidas à superfície, em uma estrutura tridimensional composta por leveduras, hifas e pseudohifas; (iv) dispersão, onde as células mais superficiais se desprendem do biofilme e colonizam áreas adjacentes da superfície (figura 3) (CHANDRA et al., 2001; RAMAGE et al., 2005, SENEVIRATNE et al., 2008; D'ENFERT, 2013).

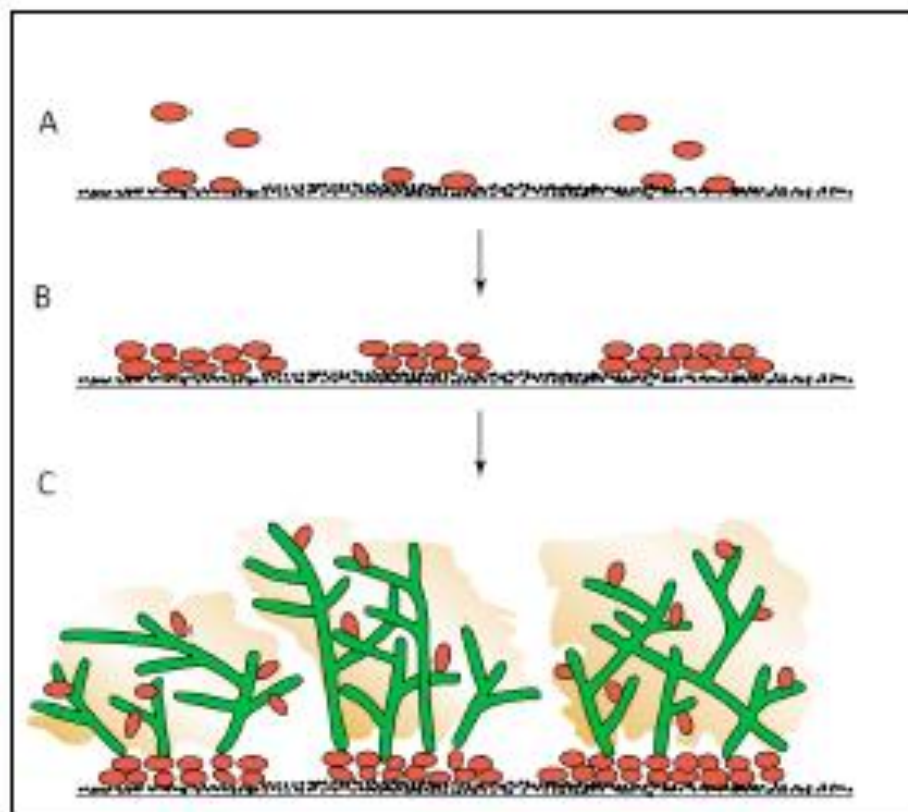


Figura 3: Esquema ilustrativo da sequência de desenvolvimento do biofilme de *C. albicans*, em suas diferentes fases. A: adesão de leveduras em suspensão à superfície, B: formação de colônias e multiplicação celular, C: secreção de matriz extracelular (MEC) e formação de hifas, formando uma estrutura tridimensional complexa. Adaptado de: Douglas J.L., 2003.

Além de *C. albicans* as espécies *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* e *C. tropicalis* também estão associadas à formação de biofilme e infecções em CVC (WILLIAMS, 2012).

Um progresso considerável tem sido alcançado nos últimos anos na caracterização da regulação e dos mecanismos que regem a formação e tolerância antifúngica de biofilmes de fungos (D'ENFERT, 2013).

Clinicamente, os biofilmes são importantes por serem refratários ao tratamento antifúngico, o que representa um grande problema para os clínicos porque a dose necessária para erradicar o biofilme pode exceder a concentração máxima de antibióticos (WILLIAMS, 2012).

Por proporcionar um santuário seguro para os microrganismos, os filmes também podem agir como reservatórios para fontes persistentes de infecção em um paciente e pode afetar negativamente a saúde de um número crescente de indivíduos, incluindo pacientes com infecção pelo HIV, câncer, transplantados, pacientes que necessitam de cirurgia ou tratamento intensivo, e recém-nascidos (WILLIAMS, 2012).

A composição geral da MEC de biofilmes de *C. albicans* foi determinada por Al-Fattani et al. (2006). A matriz extraída de biofilmes de *C. albicans* apresentou, majoritariamente, carboidratos (39,6%), sendo que a maior proporção foi de glicose (32,2%), seguido de pequenas quantidades de manose e galactose. Mostrando, ainda proteínas (5,0%), hexosamina (3,3%), fósforo (0,5%) e ácido urônico (0,1%). O restante percentual corresponde ao seu DNA.

A MEC tem papel primordial na tolerância antifúngica, assim como em biofilmes bacterianos, a MEC ajuda a preservar a integridade arquitetônica de biofilmes de fungos que contribui para tolerância a antifúngicos. Em *C. albicans*, a produção da MEC é um dos processos que têm implicado na tolerância do biofilme a antifúngicos.

De fato, tem sido mostrado que a tolerância aparece muito rapidamente após a adesão a superfícies bióticas, antes da produção da MEC ser iniciada. Além disso, variando a quantidade da MEC em biofilme de *C. albicans* a tolerância a antifúngicos será diferente. Assim, outros processos podem desempenhar um papel na tolerância, tais como a densidade celular, a expressão de bombas de efluxo ou a ocorrência de células persistentes (D'ENFERT, 2013).

A MEC de biofilme de *C. albicans* resistente tem se mostrado resistente a antifúngicos, especialmente aqueles das classes de azólicos e poliênicos (D'ENFERT, 2013).

Dados agora indicam que a MEC, que é composta de b-1, 3-glucana sequestra azólicos e polienos antifúngicos, impedindo seu acesso às células do biofilme. Os biofilmes que liberam mais b-1, 3-glucanas se mostram mais resistentes a antifúngicos (D'ENFERT, 2013).

Biofilmes de *C. albicans* e *C. parapsilosis* tem se mostrado relativamente resistentes à fluconazol, anfotericina B, nistatina e voriconazol (MITCHELL, 2012).

1.3 - Preparo de amostras para microscopia eletrônica

As amostras precisam passar por diversas etapas para que estejam prontas para a observação no MEV. Precisamos que essas amostras tenham: dimensões reduzidas, estejam limpas e secas (desidratada), estejam bem preservadas, sejam resistentes ao vácuo, sejam condutoras de cargas elétricas e estejam perfeitamente fixadas ao suporte, através de um adesivo ou cola também condutor (DE SOUZA, 2011).

A fixação química é realizada para preservar o material em seu estado natural evitando ao máximo a introdução de “artefatos”. As soluções fixadoras podem ser

diversas, sendo os reagentes glutaraldeído ou mistura deste com formaldeído os agentes fixadores mais utilizados, tendo como objetivo fixar o material e aumentar a resistência física da amostra. Utiliza-se também uma etapa com pós-fixador que aumentará a condutividade elétrica do material fixado. Tanto a fixação como a pós-fixação precisam ser seguidas de lavagens com tampão para remoção de resíduos que possam vir a precipitar na sequencia do processamento (DE SOUZA, 2011).

Após estas etapas o material passa por uma desidratação e secagem para trocar toda a água existente por um desidratante, acetona ou etanol, sendo para MEV o etanol o mais utilizado. Ao final dessas etapas temos então o material pronto para metalização e visualização no MEV mantendo todas as características necessárias descritas acima (DE SOUZA, 2011).

Na fixação física (criofixação), temos o congelamento de uma amostra que tem como vantagens sobre a fixação química uma taxa muito mais rápida de fixação e estabilização de todos os componentes celulares simultaneamente. A criofixação, seguida de substituição a frio mostra uma melhor preservação ultraestrutural do que a preservação produzida por técnicas de fixação química (MORPHEW, 2007).

Porém, existe o problema que precisam ser evitados quando se congela uma amostra biológica, que é a formação de cristais de gelo. O ideal é que a água ao se congelar atinja um estado amorfo, em que não haja cristais de gelo. Processo denominado de vitrificação. Sendo assim a cristalização é indesejável e a vitrificação é o principal objetivo (DE SOUZA, 2011). Sendo assim, temos o congelamento ultra-rápido, que é o congelamento de uma amostra biológica a uma taxa tão rápida que o gelo é vítreo ou que os cristais de gelo que se formam são menores do que pode ser detectado nos elétrons no microscópio não sendo maiores do que 10-15nm (MORPHEW, 2007).

O congelamento sob alta pressão foi primeiramente proposto por Moor & Riehle (1968) com a finalidade de aumentar a profundidade do bom congelamento de materiais biológicos. Até então todos os métodos de congelamento apresentavam cristais de gelo de tamanho muito grande ou a área bem congelada era restrita a delgada camada celular (DE SOUZA, 2011).

O princípio da técnica de congelamento por alta pressão se baseia no uso de uma pressão de 2100 bar, obtendo-se grande redução dos cristais de gelo ou mesmo a vitrificação, que é o ideal, pois não forma cristais de gelo. Segundo o princípio Le Catelier, o congelamento conduz a um aumento do volume da água. A alta pressão reduz esta expansão, limitando deste modo, o fenômeno de cristalização. Quando a água é congelada sob esta pressão, seu ponto de congelamento é abaixado para -22°C . Com este método, a velocidade de congelamento necessária para se obter a vitrificação de espécimes biológicos é diminuída em duzentas vezes e a velocidade em que os cristais de gelo se formam é diminuída em cem vezes (DE SOUZA, 2011). Possibilita o congelamento de espécimes vivos de tamanho razoável (200 μm de espessura) sem crioproteção, incluindo tecidos animais e vegetais. O material biológico pode estar vivo e em movimento e suas alterações serão totalmente flagradas no congelamento por alta pressão. No preparo do material o mesmo é colocado em suportes de ouro ou níquel e pressurizado a 2100bar em 20 milissegundos. Ao alcançar esta pressão, jatos de nitrogênio líquido (na mesma pressão) são lançados sobre o suporte com o material, congelando-o instantaneamente. Desse modo, o tecido recebe pressão num período de tempo de aproximadamente 500 milissegundos (1/2 segundo), mas com 30 milissegundos o material estará congelado. Com apenas 10 milissegundos de contato com o nitrogênio, a temperatura já cai para -50°C e a temperatura final alcança -170°C .

O principal objetivo do congelamento sob alta pressão das amostras é preservar a ultraestrutura de células em seu estado nativo e fisiologicamente ativo (MORPHEW, 2007).

Após as amostras terem sido criofixadas por congelamento por alta pressão podem ser utilizadas para: visualização direta de amostras congeladas em um microscópio, que possua crio estágio (material visualizado no Crio-MEVEC); seções de corte do material congelado em um crioultramicrotomo; congelamento por criofatura e por substituição a frio (MORPHEW, 2007).

O congelamento sob alta pressão, em combinação com a substituição do gelo vitrificado por solvente orgânico a baixa temperatura, que é chamada substituição a frio é amplamente aceita como um método que é superior à fixação química convencional. Quando crioprocessados tecidos e células mostram menos extração de material biológico e artefatos com menor degradação (ALLEN, 2008).

O congelamento por imersão é muito utilizado para o congelamento de grades contendo células em suspensão e sua observação direta, congelada no microscópio. Essas grades, ou algum suporte pequeno de igual tamanho, são imersas rapidamente num líquido criogênico, sendo o etano e o propano os mais utilizados. O contato desses criogênicos com o nitrogênio líquido que resfria o aparelho, permite que eles mantenham uma boa temperatura para congelamento (em torno de -171°C) (TIVOL, 2008).

Para que o etano ou o propano se mantenham em forma líquida é necessária uma refrigeração do aparelho com nitrogênio líquido, que resfria o recipiente com o propano ou etano que irá receber o material posteriormente, fazendo com que assim se tenha um bom congelamento sem vitrificação do material (TIVOL, 2008).

O aparelho funciona como uma guilhotina que mergulha o material rapidamente no líquido criogênico congelando-o instantaneamente. Como a superfície de congelamento existente é muito pequena, apenas conseguimos congelar a primeira camada de células, sem grandes profundidades, portanto não é um método muito indicado para a preservação de tecidos como um todo (SCHMIDT-KREY, 2011).

Após o congelamento por esses métodos realizaremos a substituição a frio para ambos.

A metodologia de substituição a frio foi descrita pela primeira vez em 1941 por Simpson. Posteriormente, ela foi desenvolvida e aperfeiçoada. Hoje, tornou-se uma técnica rotineira para uma melhor preservação ultraestrutural de amostras biológicas (DE SOUZA, 2011).

A substituição a frio é o processo de substituição da água vitrificada em um espécime congelado de um solvente orgânico a uma temperatura baixa e, geralmente, tem lugar na presença de um agente fixador secundário. A substituição a frio é realizada a temperaturas baixas onde os cristais de gelo não podem crescer, isto é, abaixo de -70°C. Uma vez que a substituição esteja completa, as amostras serão aquecidas, chegando à temperatura ambiente, sem recristalização, porque a água agora não está presente na amostra (MORPHEW, 2007).

Como explicitado, a substituição a frio permite que se passe da fixação física (congelamento) para a fixação química (com agentes fixadores químicos) (DE SOUZA, 2011).

Uma variedade de solventes pode ser usada para substituição a frio, sendo a acetona a que tem fornecido resultados mais satisfatórios, com melhor preservação da estrutura e mínima extração, e a maioria dos protocolos que se segue indicam o seu uso (MORPHEW, 2007).

1.4 - Microscopia eletrônica utilizada para fungos

Como já foi descrito acima a microscopia eletrônica tem aplicação em várias áreas e existem diversos trabalhos onde há sua utilização, tendo os fungos como objeto de estudo.

No trabalho de Pesti *et. al.* (1999), utilizaram a microscopia eletrônica de varredura para investigar mutantes morfológicos de duas colônias de *C. albicans*, quanto à proporção de hifas e pseudohifas. Com a MEV, foi possível identificar diferentes ramificações de hifas, sugerindo que o mutante realmente é diferente do seu grupo controle.

Sakaguchi *et. al.* (1993) utilizaram o congelamento por imersão e a criofratura para análise de *Cryptococcus neoformans*. Após a infecção feita em ratos, os cérebros foram perfundidos com fixadores, congelados e criofaturados para observação da cápsula polissacarídica das leveduras *in vivo* comparadas com as das leveduras *in vitro*. Neste caso não houve diferença quanto ao tamanho capsular em espessura e comprimento.

Wang *et. al.* (1995) utilizaram a microscopia eletrônica de transmissão em cepas de *C. neoformans* melanizados e mutantes não melanizados, para fazer a identificação dessa melanina e seu local de ocorrência. Posteriormente, usaram antifúngicos para determinação de virulência, o que mostrou, através da microscopia que as células com melanina parecem ter uma virulência maior quando comparadas as células mutantes sem melanina.

Chandra *et. al.* (2011) usaram microscopia eletrônica de varredura para visualização de biofilme de *C. albicans* crescidos *in vivo*, em coelhos e em biofilme crescido em cateter. A microscopia foi realizada para a caracterização e comparação da formação de biofilmes por tipo selvagens e mutantes isogênicos.

Ninj *et. al.* (2012) mostraram suspensões fúngicas incubadas em dentina humana, poliestireno e lâminas de vidro por microscopia eletrônica de varredura. A microscopia foi utilizada para análise do processo de formação do biofilme de *C. albicans*, assim como a microscopia confocal. Obtendo como resultados que as células são capazes de viver em condições anaeróbias e com nutrientes limitados, o que dificulta o tratamento da doença.

Khan *et. al.* (2012) utilizaram a microscopia eletrônica de varredura para caracterizar nanopartículas de ouro conjugadas a nanopartículas de azul de metileno. As nanopartículas foram utilizadas em biofilme de *C. albicans* e células planctônicas como forma de terapia contra *C. albicans*.

No presente trabalho utilizaremos o microscópio eletrônico de varredura (MEV) que é um dos instrumentos disponíveis para a observação e análise das características microestruturais de materiais sólidos. Utilizaremos dois tipos de fixação para os materiais, a fixação química e a fixação física (criofixação).

2 - OBJETIVO GERAL:

Estabelecer o melhor método de fixação de biofilme de *Candida albicans* e a melhor modalidade de microscopia eletrônica de varredura para observação da matriz extracelular.

2.1 – Objetivos específicos

- Avaliar diferentes métodos de fixação química e física de biofilmes de *C. albicans* quanto à capacidade de preservação da MEC
- Avaliar melhor modalidade de MEV (alto vácuo ou ambiental) a ser utilizada para visualização da MEC.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS:

3.1 - *Candida albicans*

Foram utilizadas 2 cepas de *Candida albicans* sendo uma cepa ATCC e um isolado clínico. A cepa ATCC utilizada foi *Candida albicans* ATCC 10231 e a amostra clínica foi *Candida albicans* nº 44A que foi isolada de lavado gástrico de paciente do Hospital Hemorio – IBEx e cedidas ao Laboratório de Biologia Celular de Fungos pelo MsC. Marcos Dornellas.

3.2 - Formação de biofilmes de *Candida albicans*

Inicialmente as cepas foram atividades em tubo falcon contendo caldo Ágar Sabouraud e mantidas neles por 24hs a 35°C na estufa. Após as 24hs retiramos 10µl do pellet e o colocamos em outro tubo falcon contendo caldo Ágar Sabouraud que também é deixado na estufa a 35°C por 24hs. Utilizamos o pellet deste repique para crescer e formar o biofilme. Os biofilmes foram crescidos por 24h na superfície de 1 cm de cateteres venosos centrais (CVC) (BD™ IntracathVialon™) cortados longitudinalmente para expor o seu interior, e em cupons de silicone (Neves & Neves Metalomecânica - Portugal) (1 cm²) no interior de microplacas de 96 poços. Primeiramente, 100 µL da suspensão fúngica (1 x 10⁷ UFC/ml) foram dispensados nos poços, e as microplacas incubadas a 35 °C por 1.5 h, sob agitação. Após esse período de aderência, o sobrenadante foi retirado e 100 µL de meio RPMI 1640, suplementado com 2% de glicose, e 20% SFB, foi adicionado em cada um dos poços. As placas foram incubadas por um período adicional de 24 h, a 35°C, sob agitação constante (adaptado de KUHN et al., 2002a).

3.3 - Microscopia eletrônica de varredura

3.3.1 - Fixação Química

Os processamentos foram realizados com secções de aproximadamente 1 cm de cateteres venosos centrais (CVC) cortados longitudinalmente para expor o seu interior, e em cupons de silicone. Ambas as superfícies são feitas do mesmo material, sendo o CVC numa forma côncava e o cupon numa forma plana.

Os biofilmes foram formados sobre os materiais, como descrito anteriormente, por 24h. Em seguida, os cateteres ou cupons, contendo os biofilmes, foram lavados em PBS 0,01M, pH 7.2, e processados para MEV (alto vácuo) seguindo quatro protocolos diferentes, descritos a seguir:

A - Protocolo 1 (rotina): Consiste na rotina adotada no laboratório de Biologia Celular de Fungos (Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ), sendo a fixação feita com formaldeído 4%, glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2. O volume final do fixador foi ajustado com água destilada e a fixação foi realizada por uma hora. Após esse tempo, o biofilme, crescido em cateter e em cupon, foi lavado com tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2, para retirada do excesso de fixador e colocado num pós-fixador que consiste de tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M. Essa pós-fixação foi de trinta minutos, em seguida, os cateteres e cupons foram lavados com água destilada para retirada do excesso de pós-fixador e foi realizada uma desidratação em série, até 100%, de etanol/água: 30%, 50%, 70%, 90% e 100% (3 vezes), quinze minutos cada.

Após este processamento, o material foi levado para o equipamento de ponto crítico de CO₂ (Bal-tec CPD030), onde foi complementemente seco e posteriormente metalizado com ouro (BALZERS UNION FL-9496), para aquisição de imagens do

material no microscópio eletrônico de varredura alto vácuo (Quanta 250 – FEI – Alemanha).

B- Protocolo 2 (sacarose): Consiste na fixação com glutaraldeído 2,5%, em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2. O volume final do fixador foi ajustado com água destilada e a fixação foi realizada por uma hora, após esse tempo o biofilme crescido em cateteres e cupons foram lavados, por 10 minutos, em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2, com sacarose 0,2M pH 7,2 e cloreto de magnésio 2Mm e depois lavados novamente, da mesma forma, por mais vinte minutos e foi realizada uma desidratação sem série, até 100% de etanol/água: 30%, 50%, 70% (cinco minutos cada), 95% e 100% (2 vezes) (dez minutos cada).

Após este processamento secaremos como descrito na rotina.

C- Protocolo 3 (vermelho de rutênio): Consiste na fixação com glutaraldeído 2,5%, adicionado de vermelho de rutênio 0,5mg/ml, em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2. O volume final do fixador foi ajustado com água destilada e a fixação realizada por uma hora, após esse tempo o biofilme crescido em cateteres e cupons foram lavados com tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2 para retirada do excesso de fixador e colocadas em um pós-fixador que consiste em tetróxido de ósmio 1%, com vermelho de rutênio, em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2. Essa pós-fixação foi de trinta minutos, em seguida, os cateteres e cupons foram lavados com água destilada para retirada do excesso de pós-fixador e foi realizada uma desidratação em série, até 100% de etanol/água: 30%, 50%, 70%, 90% e 100% (3 vezes), quinze minutos cada.

Após este processamento secaremos como descrito na rotina.

D- Protocolo 4 (ácido tânico): Consiste na fixação com glutaraldeído 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2. O volume final do fixador foi ajustado com água destilada e a fixação foi realizada por duas horas a 4°C, em seguida, o biofilme crescido em cateteres e cupons foram lavados com tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2 para retirada do excesso de fixador e foram colocadas em um pós-fixador que consiste em tetróxido de ósmio 1% em água destilada, essa pós-fixação foi de uma hora a 4°C. Após os cateteres e cupons foram lavados com água destilada para retirada do excesso de pós-fixador e foram colocados em um contrastante que consiste de ácido tânico 1% em água destilada, esse contrastante permaneceu no material por trinta minutos em temperatura ambiente. Os cateteres e cupons foram lavados com água destilada para retirada do excesso do contrastante e foram colocados em outro contrastante que consiste em acetato de uranila 1% em água destilada por trinta minutos, e em seguidas foram lavados com água destilada para retirada do excesso do contrastante e foram realizadas séries de desidratação de 30%, 50%, 70%, 90% e 100% (3 vezes), quinze minutos cada.

Após este processamento secaremos como descrito na rotina.

Para simplificar, apresentamos os protocolos na tabela abaixo (tabela 1).

Tabela 1: Protocolos realizados para fixação química.

Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo 4
<ul style="list-style-type: none"> • Fixação: Formaldeído 4% + Glutaraldeído II 2,5% em tampão Cacodilato de sódio 0,1 M (1h) • Pós-fixação: OsO₄ 1% + FeCNK (30min.) • Desidratação: Etanol 30, 50, 70, 90 e 100% (15min./conc.) 	<ul style="list-style-type: none"> • Fixação: GA II 2,5% em Cacodilato de sódio 0,1 M (1h) • Pós-fixação: Sacarose 0,2 M + MgCl₂ mM em Cacodilato de sódio 0,1 M (10 min.) • Desidratação: Etanol 30, 50, 70 (5 min./conc.) e 90, 95 e 100% (10 min./conc.) 	<ul style="list-style-type: none"> • Fixação: GA II 2,5% + VR 0,5 mg/mL em Cacodilato de sódio 0,1 M (1h) • Pós-fixação: OsO₄ 1% + VR 0,5 mg/mL em Cacodilato de sódio 0,1 M (30min.) • Desidratação: Igual a rotina 	<ul style="list-style-type: none"> • Fixação: GA II 2% em Cacodilato de sódio 0,1 M (2h a 4°C) • Pós-fixação: OsO₄ 1% (1h a 4°C) • Contrastante: Ácido tânico 1% (30 min) • Contrastante: Acetato de uranila 1% (30 min) • Desidratação: Igual a rotina

3.3.1.2 - Modo Ambiental

O material foi crescido nos cateteres e cupons como descritos anteriormente e após seu tempo de crescimento, foram retirados do meio e lavados em água destilada para observação. Tanto os cateteres como os cupons foram colocados em stubs específicos para a observação imediata em microscópio eletrônico de varredura no modo ambiental (Quanta 250 – FEI – Alemanha).

3.3.1.3 – Fixação Física

O material foi crescido nos cateteres como descritos anteriormente. Em seguida, os cateteres, contendo os biofilmes, foram lavados em PBS 0,01M, pH 7.2, e processados para MEV seguindo os dois protocolos descritos abaixo:

I - Congelamento sob alta pressão (CAP): O material congelado é retirado do aparelho e mantido em nitrogênio líquido até ser usado na técnica seguinte (substituição a frio), esta transferência para o nitrogênio líquido deve ser imediata, a fim de se evitar a devitrificação ou a recristalização (DE SOUZA, 2011).

Neste trabalho o congelamento do cateter foi realizado no aparelho (HPF – BALTEC HPM 010) (figura 4). Estes foram colocados em uma moeda de cobre (figura 4 – B) e submetidos ao congelamento no aparelho de congelamento por alta pressão. O congelamento ideal usa uma pressão de 2100 bar, em 20 milissegundos, a -193°C . Essa pressão é exercida sobre a moeda de cobre, que está fazendo um sanduiche no material (figura 4 – C), esta moeda é que recebe os jatos do nitrogênio líquido (Figura 4 – D). Após a retirada das amostras do aparelho, como alternativa, podem ser guardadas no balão de nitrogênio para seguir para a substituição a frio.

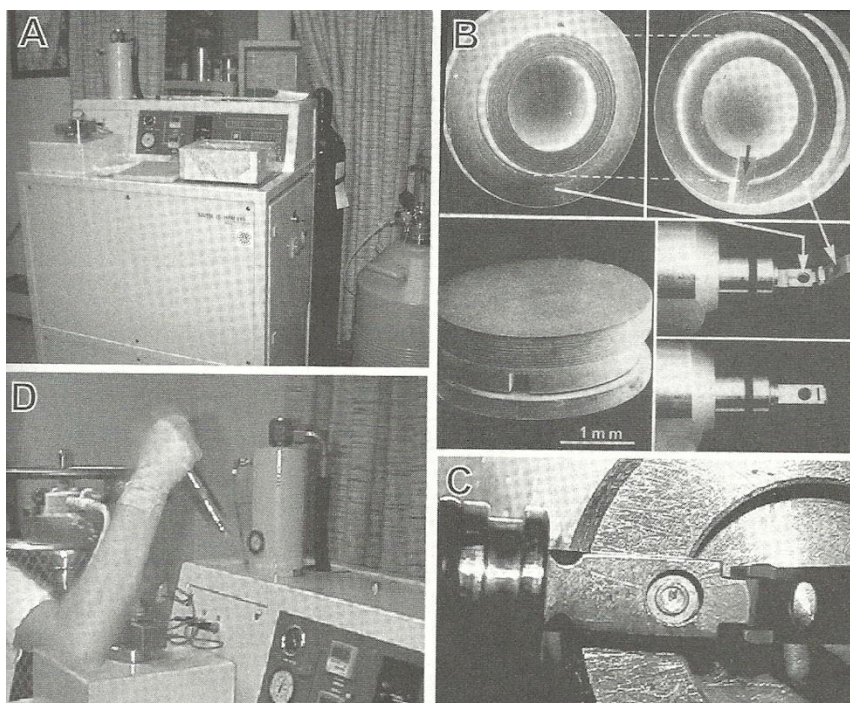


Figura 4: Aparelho de congelamento por alta pressão. A – Aparelho. B – Moedas de cobre onde os materiais são colocados e roldar utilizado para colocar a moeda. C – Detalhe do porta espécime com a moeda já encaixada, fazendo um sanduiche no material. D – Holder sendo colocado no aparelho para a realização do congelamento (CHANDLER et al., 2009).

II – Congelamento por imersão (CI): Foi realizado no aparelho LEICA CPC - Alemanha (figura 5-A), utilizando etano líquido numa temperatura de -171°C prendemos o cateter na ponta da pinça (semelhante ao ocorrido na figura 5-B) da guilhotina e o inserimos no aparelho para o congelamento. Em seguida, as amostras foram guardadas no balão de nitrogênio para seguir para a substituição a frio.

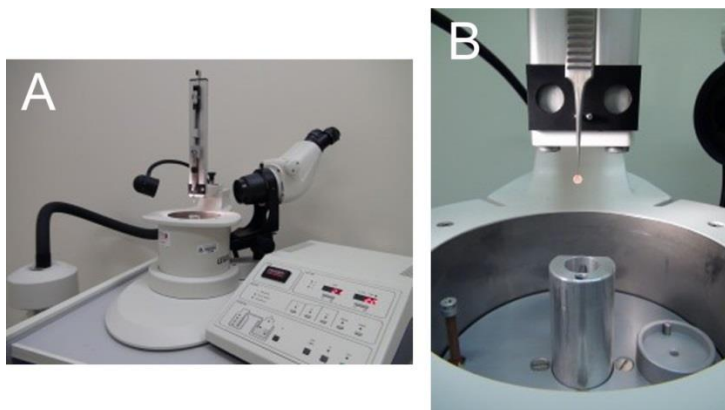


Figura 5: Aparelho de Congelamento por imersão (A). Detalhe da pinça com uma grade pronta para o congelamento. Adaptado de: <http://microscopy.med.ualberta.ca/em-preparative-equipment/>, 2014.

III- Substituição a frio (SF): Após o congelamento no CAP, o material se encontra em nitrogênio líquido, a -193°C , o método de substituição a frio é utilizado para trazê-lo a temperatura ambiente. A substituição foi feita com OsO_4 1% em acetona, no aparelho de substituição a frio (LEICA EM AFS2 - Alemanha) (figura 6), com uma curva de 48 horas, a -90°C , 15 horas de subida de -90°C a -20°C , 3 horas de parada em -20°C e subida de -20°C a 4°C , em 4 horas. Após esse tempo, o material foi retirado do aparelho e lavado em acetona 100% para retirada do excesso do meio de substituição, e a acetona foi substituída por etanol, numa sequência de 50% etanol e 50% acetona por 5 minutos e etanol 100% duas vezes por 5 minutos cada. O material foi levado para o equipamento de ponto crítico de CO_2 (Bal-tec CPD030), onde foi completamente seco e posteriormente metalizado com ouro para aquisição de imagens no microscópio

eletrônico de varredura em alto vácuo (Quanta 250 – FEI – Alemanha e Magellan 400 (alta resolução) – FEI – Alemanha (INMETRO)).



Figura 6: Aparelho de substituição a frio.

Adaptado de: <http://www.magersci.com/leicaemsampleprep/products.php?p=483>, 2014.

4 – RESULTADOS:

4.1 - Fixação química – observação em MEV alto vácuo, 15KV, Quanta 250

Os processamentos químicos não foram muito eficientes para observação da MEC, porém todos os protocolos utilizados preservaram bem as leveduras e filamentos de *Candida albicans*. Com o protocolo 1 (rotina) (figuras 7 e 8) conseguimos notar uma boa preservação das células, porém não foi possível observar a MEC.

Observamos que a cepa ATCC10231 (figura 7-A) parece formar um biofilme menos denso do que a cepa 44A (figura 8-A). Notamos, também, que a adesão do biofilme no cupon (figuras 7 e 8 – E a H) parece ser pior ao que vemos no CVC, uma vez que as células parecem ter se soltado, como pode ser visualizado nos aumentos menores (figuras 7 A e E e 8 A e E). Este padrão se mantém em todos os

processamentos químicos, tanto do crescimento da cepa 44A, quanto a uma melhor preservação do processamento na superfície do cateter para ambas as cepas.

É possível notar a presença de hifas e leveduras bem preservadas, no protocolo de rotina (figuras 7 e 8), entretanto não foi possível a visualização da MEC. Como o interesse do nosso trabalho é a manutenção e preservação da MEC, seguimos para um segundo protocolo.

O protocolo 2 (sacarose) (figuras 9 e 10), foi utilizado por se mostrar bom na preservação da cápsula polissacarídica do *Cryptococcus sp.*, mantendo sua osmolaridade equilibrada. Este protocolo se mostrou semelhante ao protocolo 1, mas com a adição da sacarose, também notamos uma boa preservação das células, porém já com uma pequena presença de resíduos, que talvez possam corresponder a vestígios da MEC. Estes foram mais facilmente visualizados na cepa 44A, crescida sobre CVC (figura 10 C e D, seta).

Aparentemente para a cepa ATCC10231, o protocolo 2 (figura 9) apresenta os mesmos resultados que o protocolo de rotina (figuras 7 e 8), já para a cepa 44A conseguimos notar resquícios de uma possível MEC (figura 10-B a D) no processamento realizado no CVC.

Como não foi possível uma boa visualização da MEC e o pouco que conseguimos só foi possível em uma cepa (44A), partimos para o terceiro protocolo.

No protocolo 3 (vermelho de rutênio) (figuras 11 e 12) obtivemos uma boa preservação do material em si, porém com muitos precipitados.

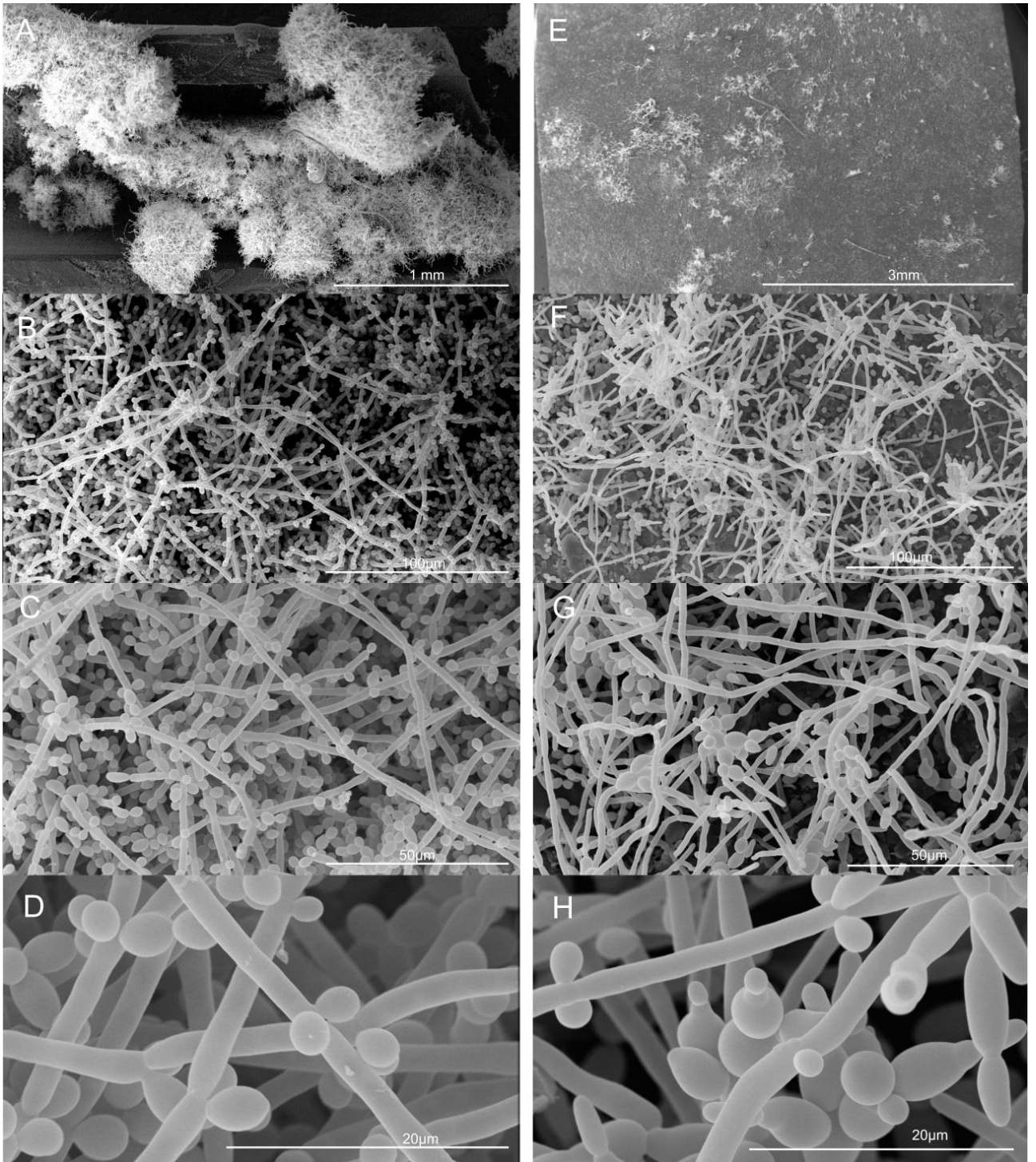


Figura 7: Biofilme de *Candida albicans* ATCC10231 apresentado em aumentos progressivos. Presença de leveduras e hifas aderidas às superfícies de cateter (A a D) e de cupon (E a H) processadas conforme o protocolo 1 (rotina). Visualização no Quanta 250 em alto vácuo.

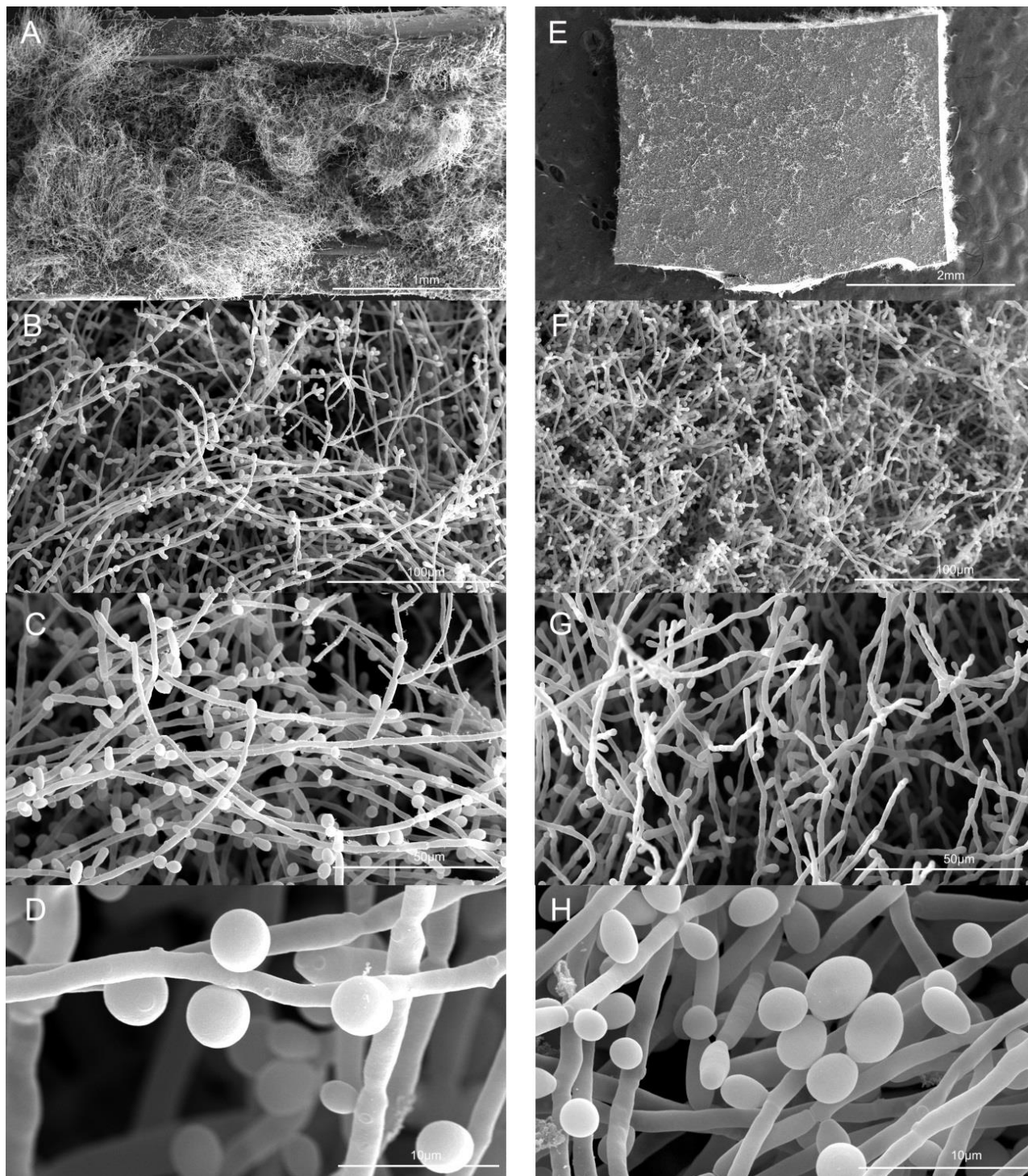


Figura 8: Biofilme de *Candida albicans* 44A apresentado em aumentos progressivos. Presença de leveduras e hifas aderidas às superfícies de cateter (A a D) e de cupon (E a H) processadas conforme o protocolo 1 (rotina). Visualização no Quanta 250 em alto vácuo.

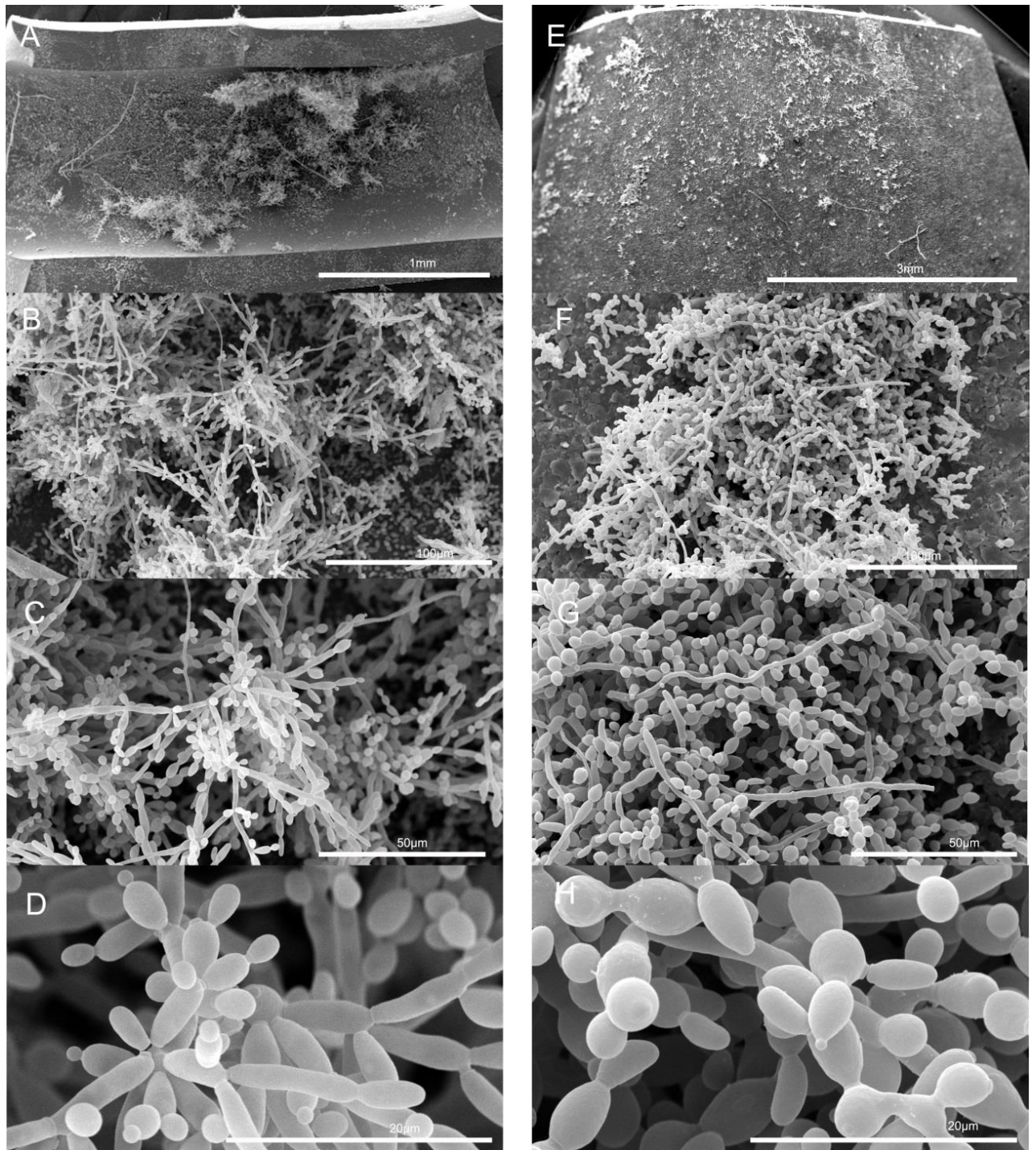


Figura 9: Biofilme de *Candida albicans* ATCC10231 apresentado em aumentos progressivos. Presença de leveduras e hifas aderidas às superfícies de cateter (A a D) e de cupon (E a H) processadas conforme o protocolo 2 (sacarose). Visualização no Quanta 250 em alto vácuo.

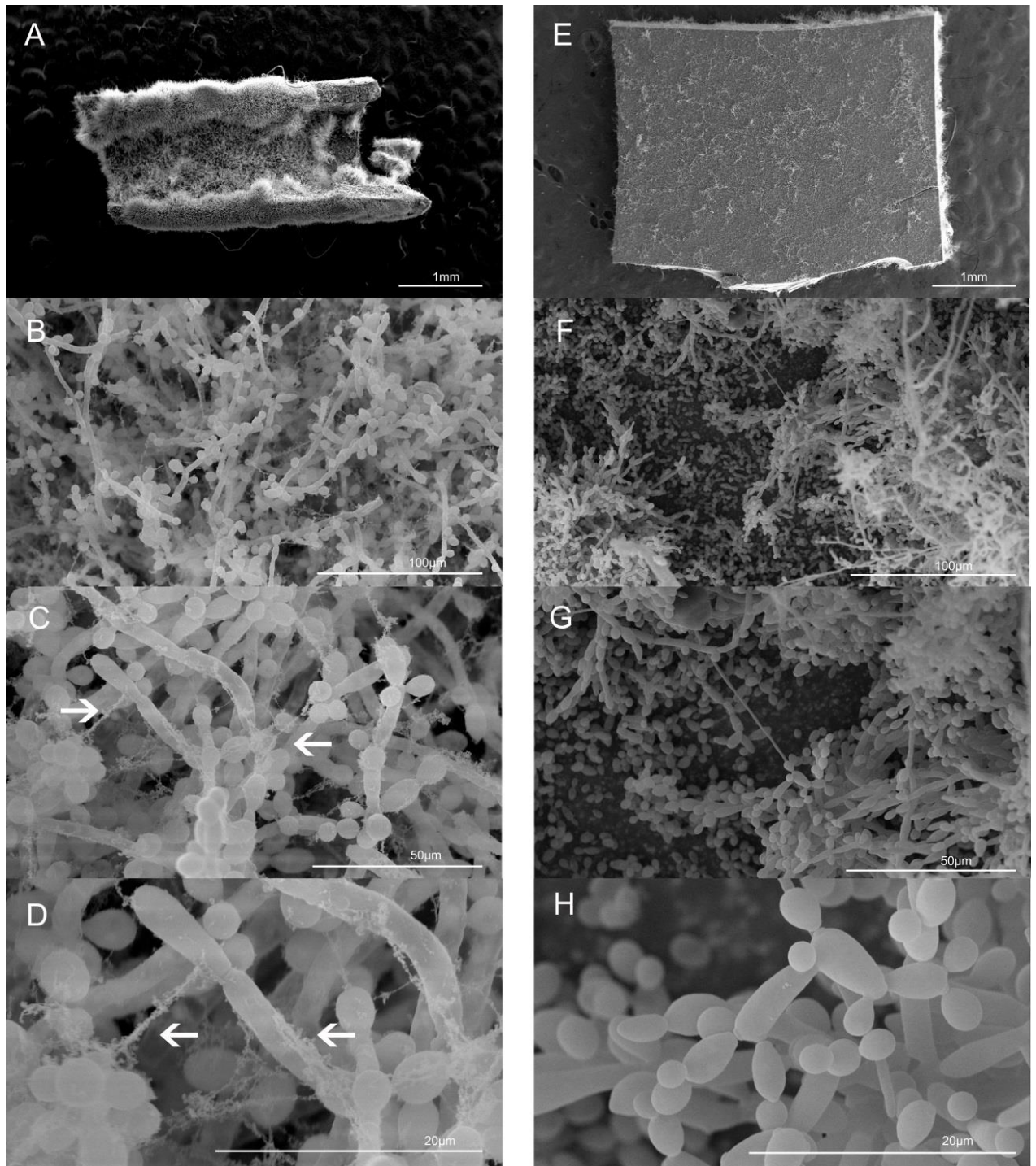


Figura 10: Biofilme de *Candida albicans* 44A apresentado em aumentos progressivos. Presença de leveduras e hifas aderidas às superfícies de cateter (A a D) e de cupon (E a H) processadas conforme o protocolo 2 (sacarose). Setas indicando resquícios de MEC. Visualização no Quanta 250 em alto vácuo.

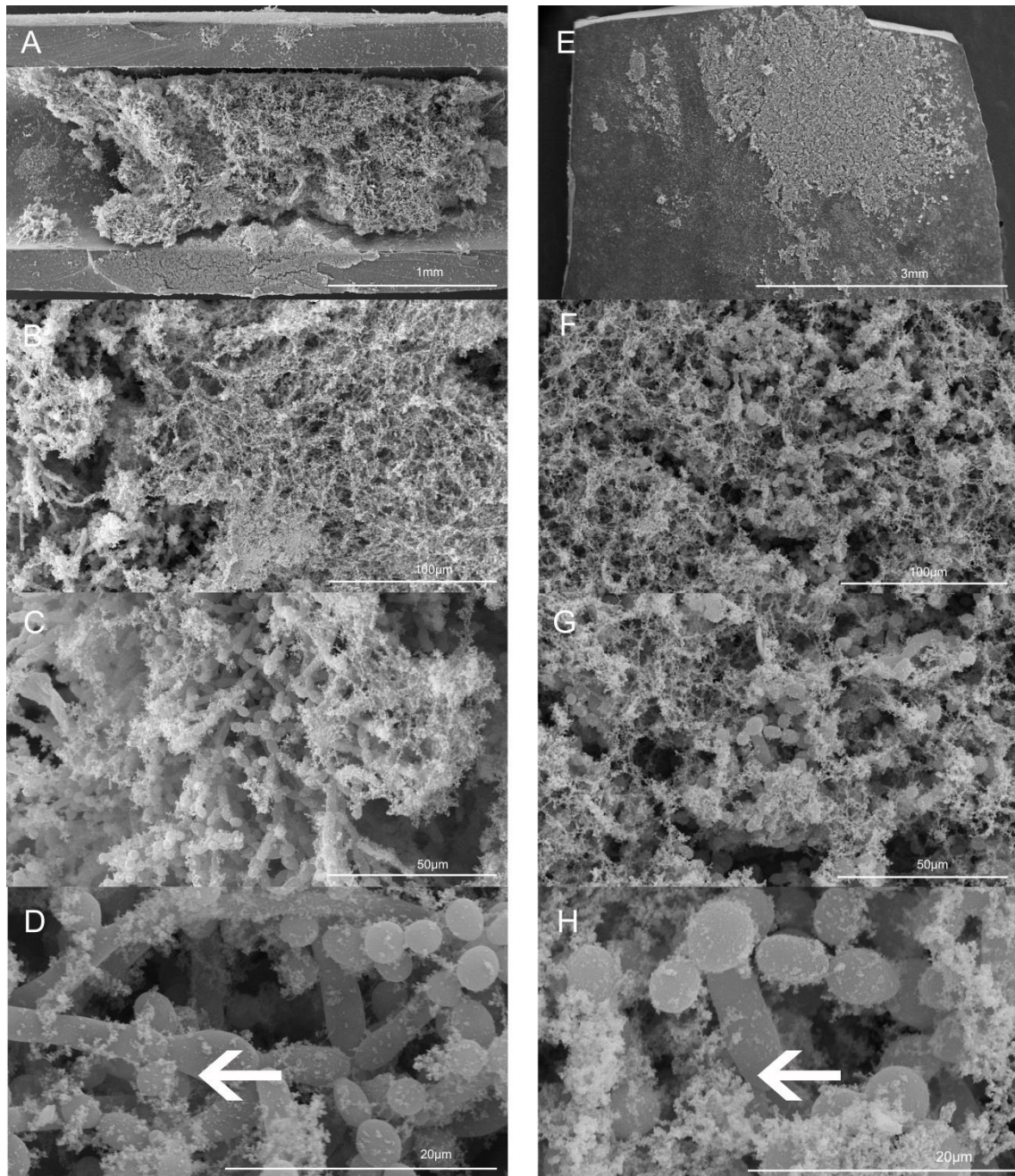


Figura 11: Biofilme de *Candida albicans* ATCC10231 apresentado em aumentos progressivos. Presença de leveduras e hifas aderidas às superfícies de cateter (A a D) e de coupon (E a H) processadas conforme o protocolo 3 (vermelho de rutênio). Setas indicando formação de precipitados. Visualização no Quanta 250 em alto vácuo.

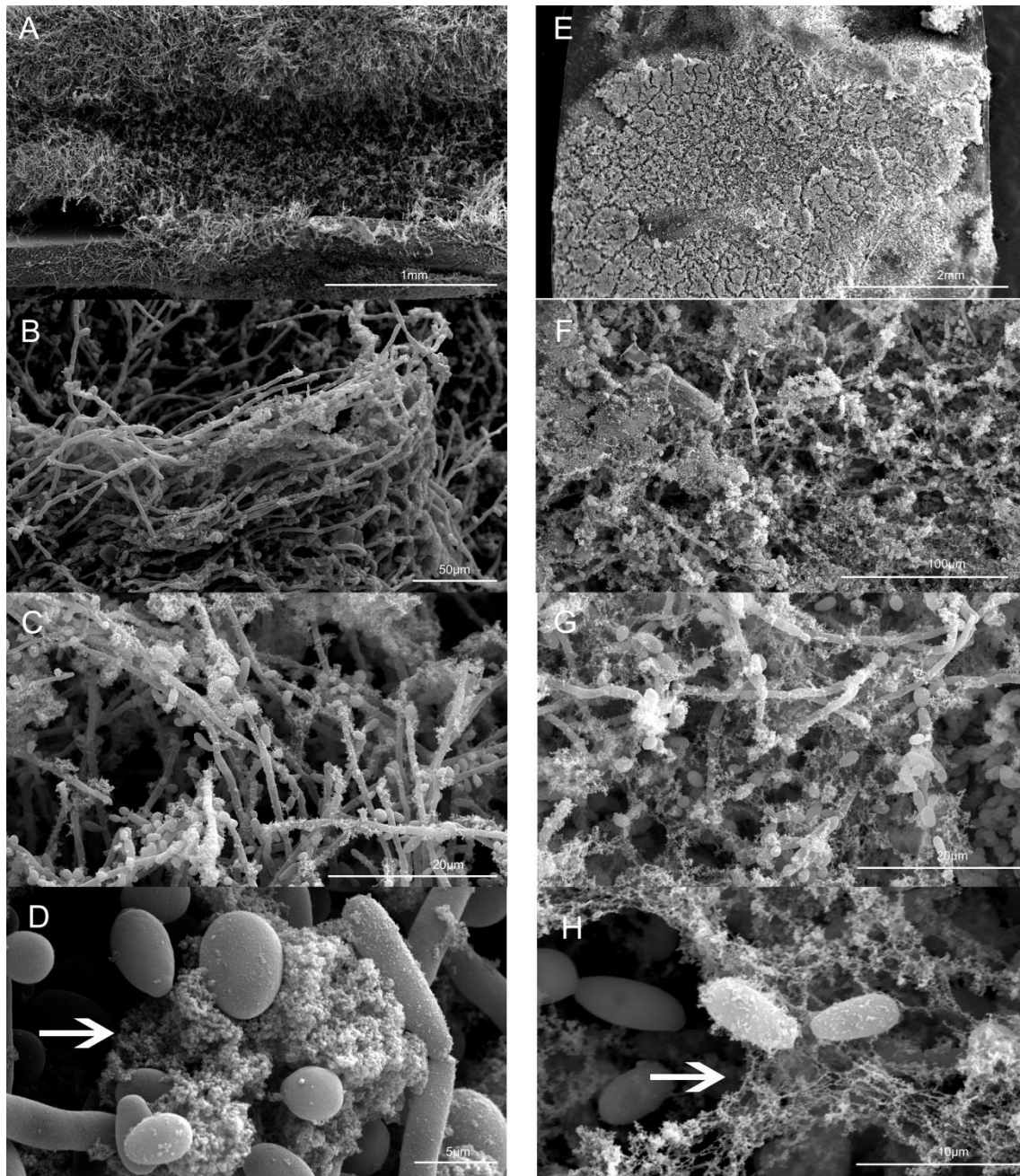


Figura 12: Biofilme de *Candida albicans* 44A apresentado em aumentos progressivos. Presença de leveduras e hifas aderidas às superfícies de cateter (A a D) e de cupon (E a H) processadas conforme o protocolo 3 (vermelho de rutênio). Setas indicando formação de precipitados ou resquícios de MEC. Visualização no Quanta 250 em alto vácuo.

Para a cepa ATCC10231, notamos, tanto no CVC como no silicone, que parece haver um resíduo de MEC ou uma formação de precipitado, uma vez que o que aparece por cima das leveduras e hifas não possui a característica de uma trama e sim de pequenos grumos (figura 11-B a D e F a H). Quando observamos a cepa 44A (figura 12-A a D), vemos que no CVC fica mais clara a presença de precipitados, principalmente, quando vista em grandes aumentos (figura 12-D). Porém quando observamos o cupon da cepa 44A notamos ter tido tanto precipitação como a formação de uma trama, que nos indicaria a presença da MEC.

Para testar se o que víamos no protocolo do vermelho de rutênio era realmente precipitado testamos diversas concentrações do vermelho de rutênio descrito na metodologia e realizamos o mesmo processamento com células planctônicas (figura 13). Quando realizamos esse processamento podemos observar que também nas células planctônicas há a presença dessas tramas/precipitados o que nos indica que quando observamos isto no CVC ou no cupon estamos observando precipitados, uma vez que as células planctônicas não formam biofilme, portanto não poderiam apresentar MEC.

Como os resultados ainda não se mostravam satisfatórios realizamos um quarto protocolo (ácido tânico) (figuras 14 e 15).

Com este protocolo 4 podemos observar uma possível MEC (figuras 14-D, F e G e 15-D, G e H), porém, devido ao grande número de agregados, também, não consideramos este resultado satisfatório.

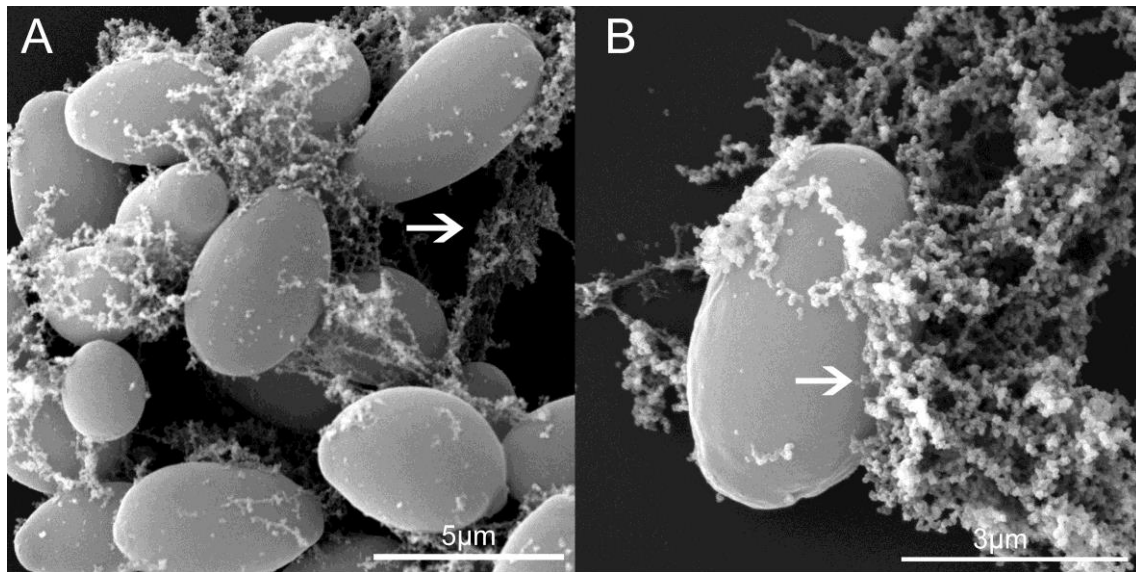


Figura 13: Células planctônicas de *Candida albicans* ATCC10231 processadas com o protocolo 3 (vermelho de rutênio) apresentando leveduras cobertas por precipitados (setas indicando). Visualização no Quanta 250 em alto vácuo.

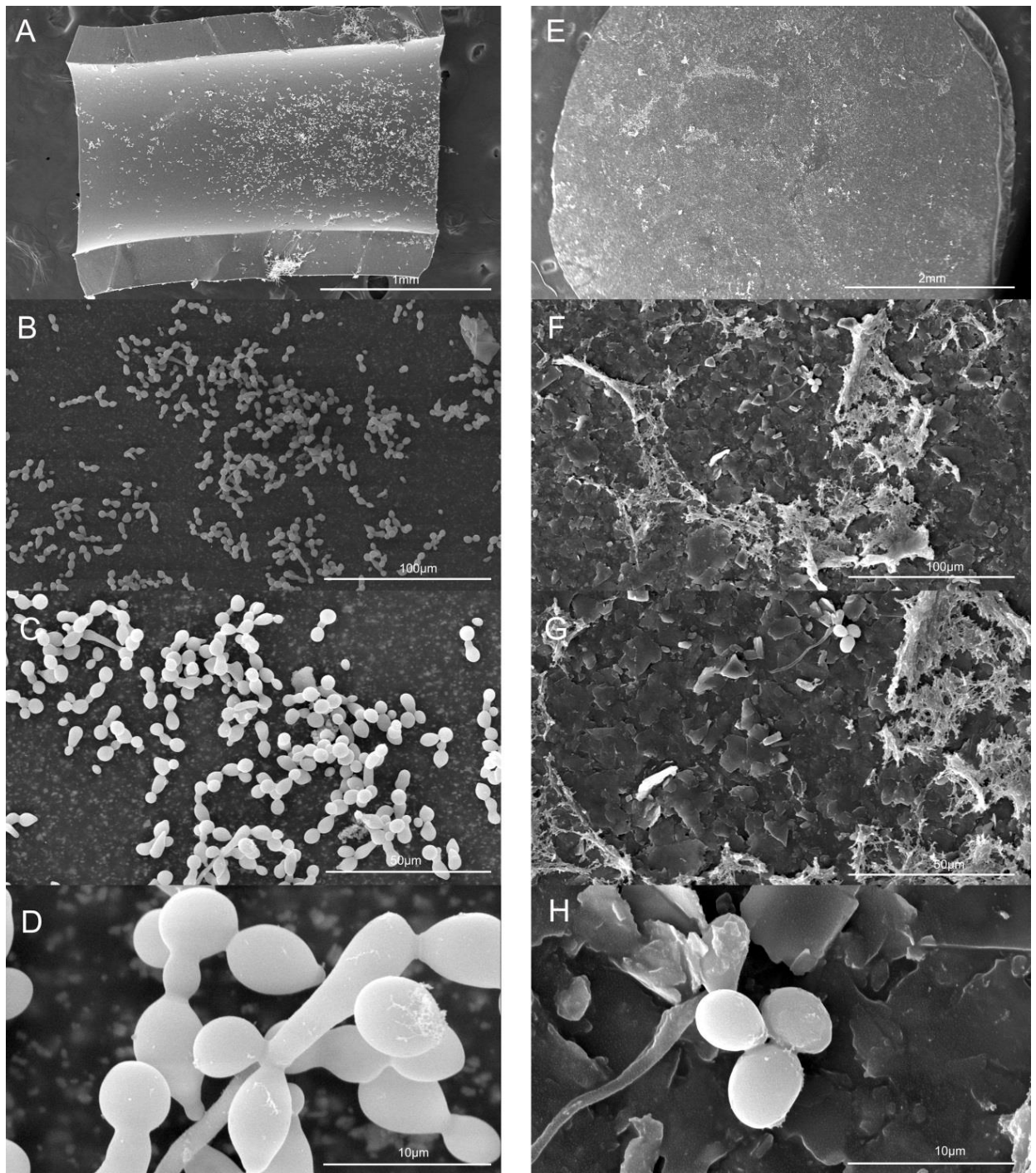


Figura 14: Biofilme de *Candida albicans* ATCC10231 apresentado em aumentos progressivos. Presença de leveduras e hifas aderidas às superfícies de cateter (A a D) e de cupon (E a H) processadas conforme o protocolo 4 (ácido tânico). Visualização no Quanta 250 em alto vácuo.

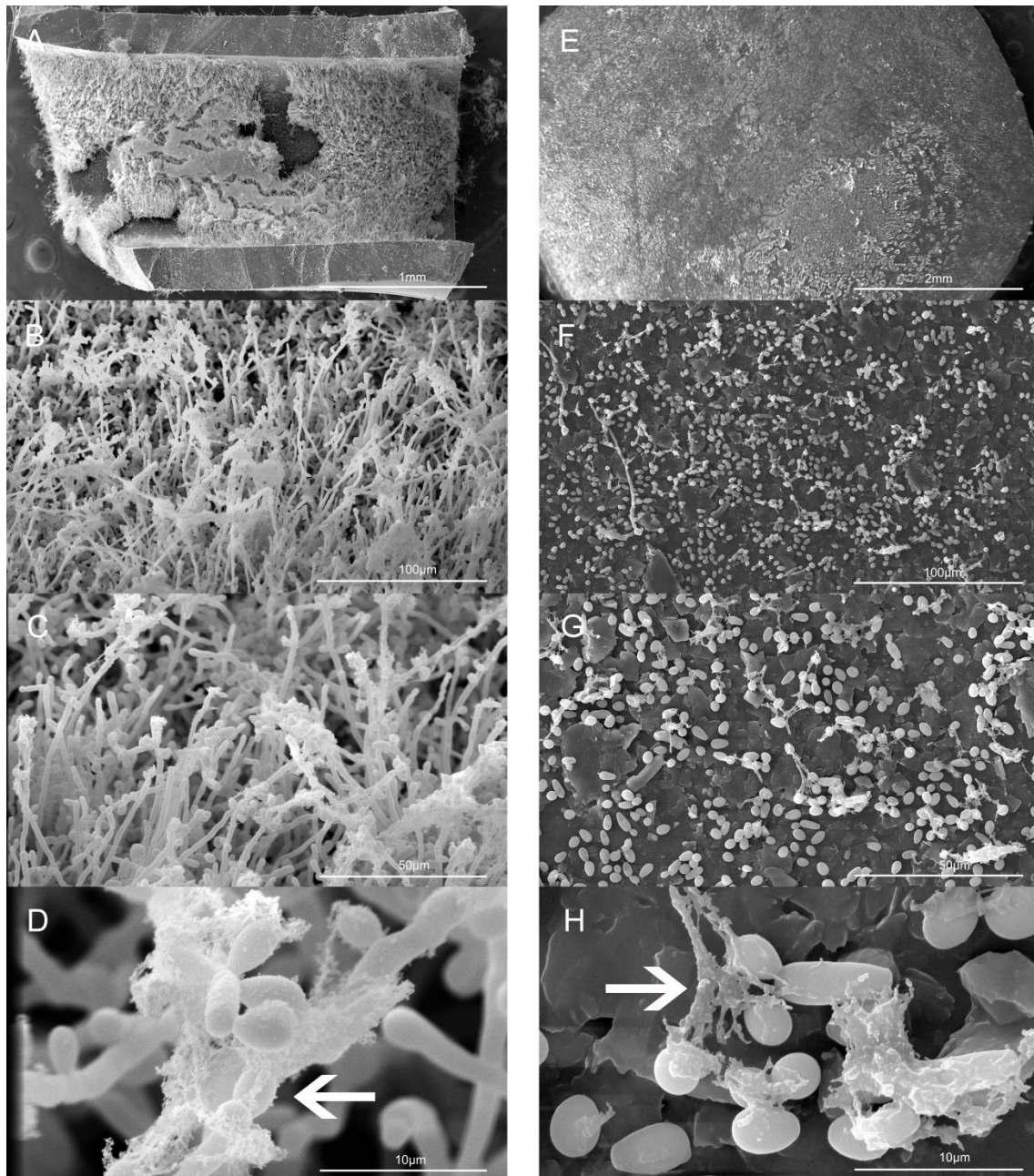


Figura 15: Biofilme de *Candida albicans* 44A apresentado em aumentos progressivos. Presença de leveduras e hifas aderidas às superfícies de cateter (A a D) e de cupon (E a H) processadas conforme o protocolo 3 (vermelho de rutênio). Setas indicando formação de precipitados. Visualização no Quanta 250 em alto vácuo.

4.2 – Observação em modo ambiental, 20KV, pressão 8,77mbar, temperatura 5°C, umidade 91,2%.

Com o insucesso da fixação química partimos para o modo ambiental, observando o material da forma que ele estava durante seu crescimento e desenvolvimento.

Quando observamos por este método conseguimos observar a MEC (figuras 16 e 17). No cateter (figura 16-A a D), notamos uma melhor visualização do material, quando comparado ao cupon (figura 16-E a H), provavelmente devido à superfície do cateter ser côncava e a perda de água acabar sendo mais lenta, enquanto no cupon esta superfície é plana, desidratando de forma mais rápida. Neste método conseguimos visualizar a MEC (figura 16-B a D, G e H) recobrimo as leveduras e formando um “manto” por cima dessas células.

Foi visto para a cepa 44A (figura 17) uma melhor preservação do material no cateter (figura 17-A a D) do que no cupon (figura 17-E a H) e como na MEV (alto vácuo), notamos a formação de um biofilme mais denso do que o formado pela cepa ATCC 10231 (figura 16).

Com este método conseguimos ver que o modo como essas células são crescidas parece ser favorável à formação do biofilme e da MEC, uma vez que conseguimos ver hifas e leveduras bem preservadas (figuras 16 e 17-A e B).

Porém com este método não conseguimos uma boa resolução devido a desidratação do material e condições utilizadas no microscópio, portanto partimos novamente para fixação do material, porém desta vez utilizando a criofixação, onde seria possível ver o material bem preservado e sem uma inicial fixação química que pode alterar o material.

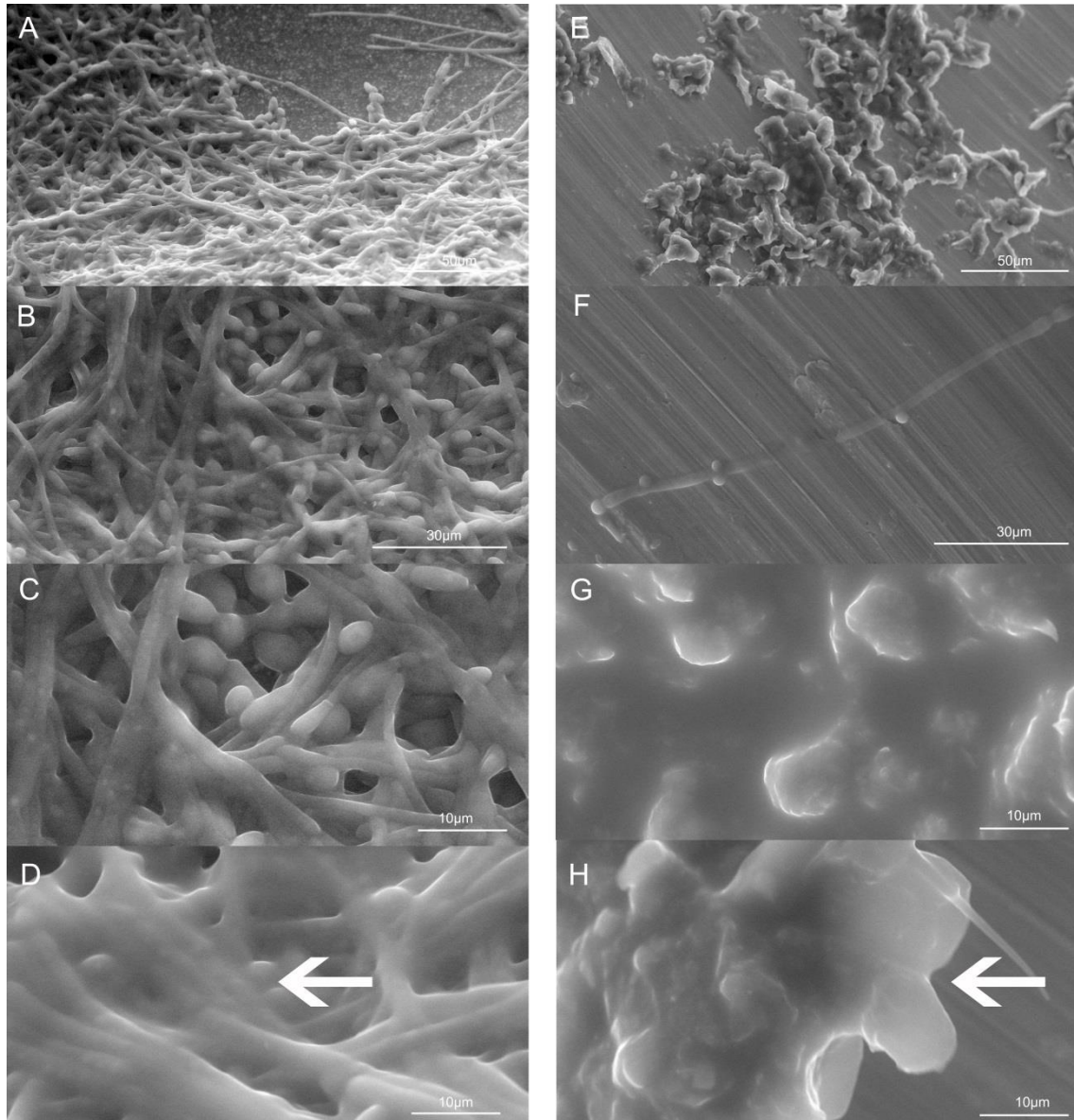


Figura 16: Biofilme de *Candida albicans* ATCC 10231 em aumentos progressivos, nas superfícies cateter (A a D) e cupon (E a H) observadas em microscopia eletrônica de varredura em modo ambiental. Setas indicando a MEC recobrindo as hifas e leveduras. Visualização no Quanta 250 em baixo vácuo.

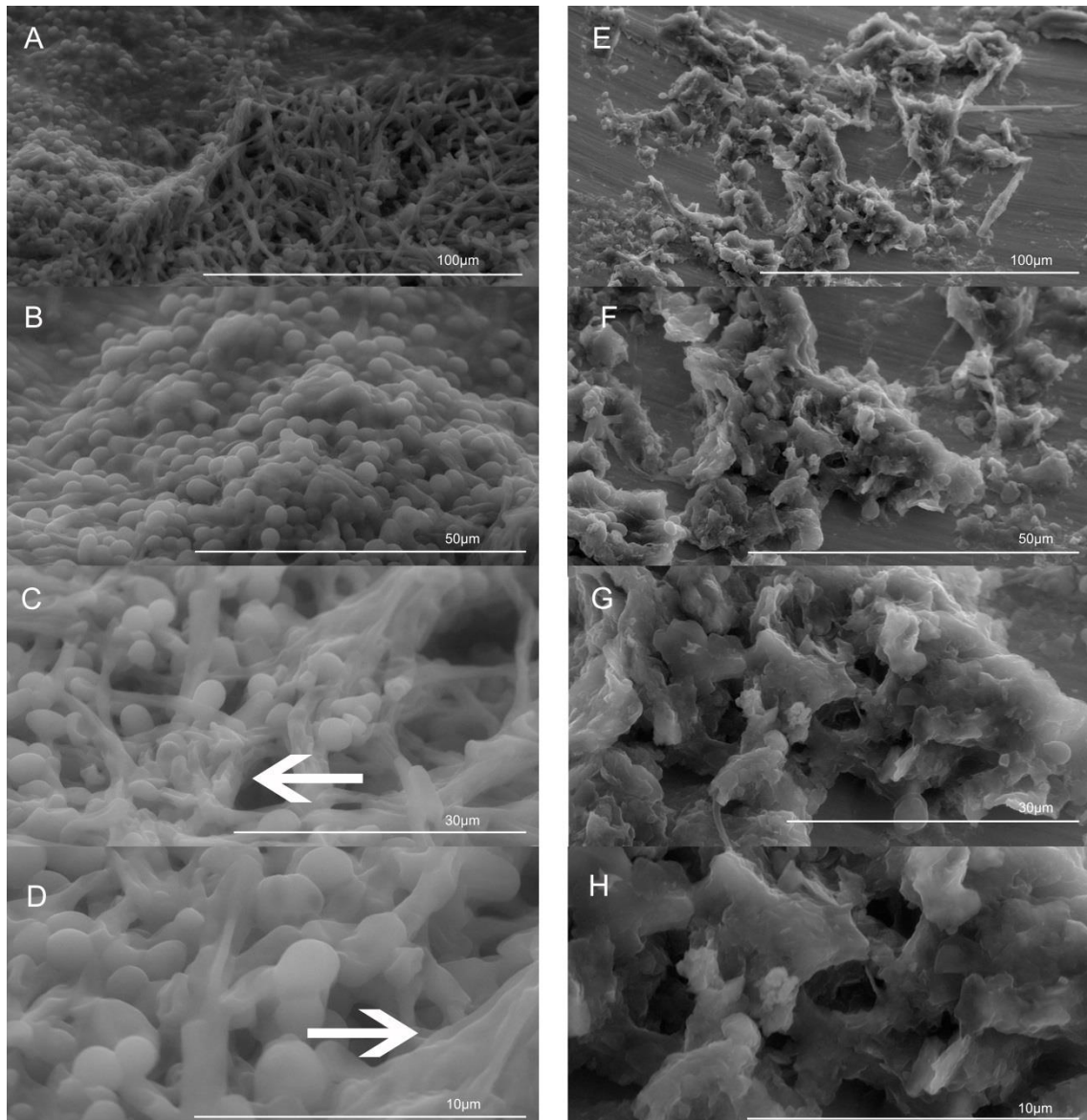


Figura 17: Biofilme de *Candida albicans* 44A em aumentos progressivos, nas superfícies cateter (A a D) e cupon (E a H) observadas em microscopia eletrônica de varredura em modo ambiental. Setas indicando a MEC recobrando as hifas e leveduras. Visualização no Quanta 250 em baixo vácuo.

4.3 – Fixação física – observação em MEV alto vácuo, super alta resolução, 1,00KV, Magellan 400 (congelamento por alta pressão) e MEV alto vácuo 15KV, Quanta 250 (congelamento por imersão).

Com os resultados encontrados no modo ambiental realizamos a fixação física para visualizar a MEC com melhores resoluções e de forma mais ampla.

Realizamos o congelamento utilizando as técnicas de CAP e SF (figura 18), como já descritos na metodologia. Entretanto, para estes experimentos, utilizamos apenas os modelos de CVC, onde obtivemos melhor formação de biofilmes. O material congelado se desprende facilmente do cupon e não é possível uma preservação deste material para análises posteriores. Em adição, só utilizamos a cepa 44A, pois esta produz mais biofilme do que a cepa ATCC10231.

Na fixação física, através do CAP, conseguimos observar uma MEC bem preservada, tanto se mantendo por cima das células do biofilme (figura 18-A), como envolvendo e protegendo as células no interior do biofilme (figura 18-B a D).

Podemos notar que a MEC envolve cada levedura como se fosse uma capa de proteção (figura 18-C e D, setas indicando), o que provavelmente seria o motivo do biofilme ser mais resistente a drogas, uma vez que para atingir as leveduras, antes da parede celular, ainda teríamos essa outra camada bem organizada da MEC, aparentemente recobrando e protegendo a célula do ambiente no qual ela se encontra.

É interessante observamos que esta técnica ocasionou fraturas no material (figura 18 – C e D e figura 19 – A e B, setas indicando), provavelmente ocorridas pela abertura do sanduiche feito no congelamento do material. Com esta exposição do material, conseguimos ver parte das leveduras, sem essa camada de biofilme (figura 19 – A e B) e também podemos ver a migração de vesículas (figura 19-B, representada pelo v).

A trama de MEC que reveste as leveduras (figura 20) se mostra bem ramificada e é possível identificar os espaços onde, anteriormente, haviam leveduras (figura 20-B, setas indicando), que se soltaram deste biofilme após a sua maturação, provavelmente, para colonização de novos lugares, como também conseguimos notar a presença dos “caminhos” existentes nesta trama para circulação de água (figura 20-A, representada pelo c).

Este método de fixação física se mostrou bastante eficiente tanto para preservação da MEC, como das células do biofilme, porém por ter apresentado essas fraturas no material, fomos em busca de outra técnica onde não tivéssemos que colocar o CVC dentro de um sanduiche.

Utilizamos a técnica do congelamento por imersão (figura 21) e com ela obtivemos uma confirmação da boa preservação e da presença da MEC assim como no CAP. Podemos notar uma excelente preservação do material e perceber que a levedura está envolvida por essa MEC (figura 21 – C e D, setas indicando). Vemos também que essa camada de biofilme é fina e se sobrepõem sempre acima das leveduras e hifas, sendo possível notar até o seu descolamento das células. (figura 21 – A e B).

É possível observar também a complexidade desta MEC composta por fibrilas que então formarão o filme realmente (figura 22). Podemos notar que estas fibrilas recobrem inicialmente as hifas e leveduras (figura 22 – A), após a junção destas varias fibrilas vão sendo formados os filmes propriamente ditos (figura 22 – B). Através de algumas células que ainda estão no processo de formação deste filme (figura 22 – C e D, setas indicando) podemos notar sua complexidade e modo de formação.

Sendo assim, as técnicas de CAP e CI se complementam e nos mostram excelentes resultados com a visualização da complexidade da MEC e a estrutura das células muito bem preservada abaixo desta MEC também.

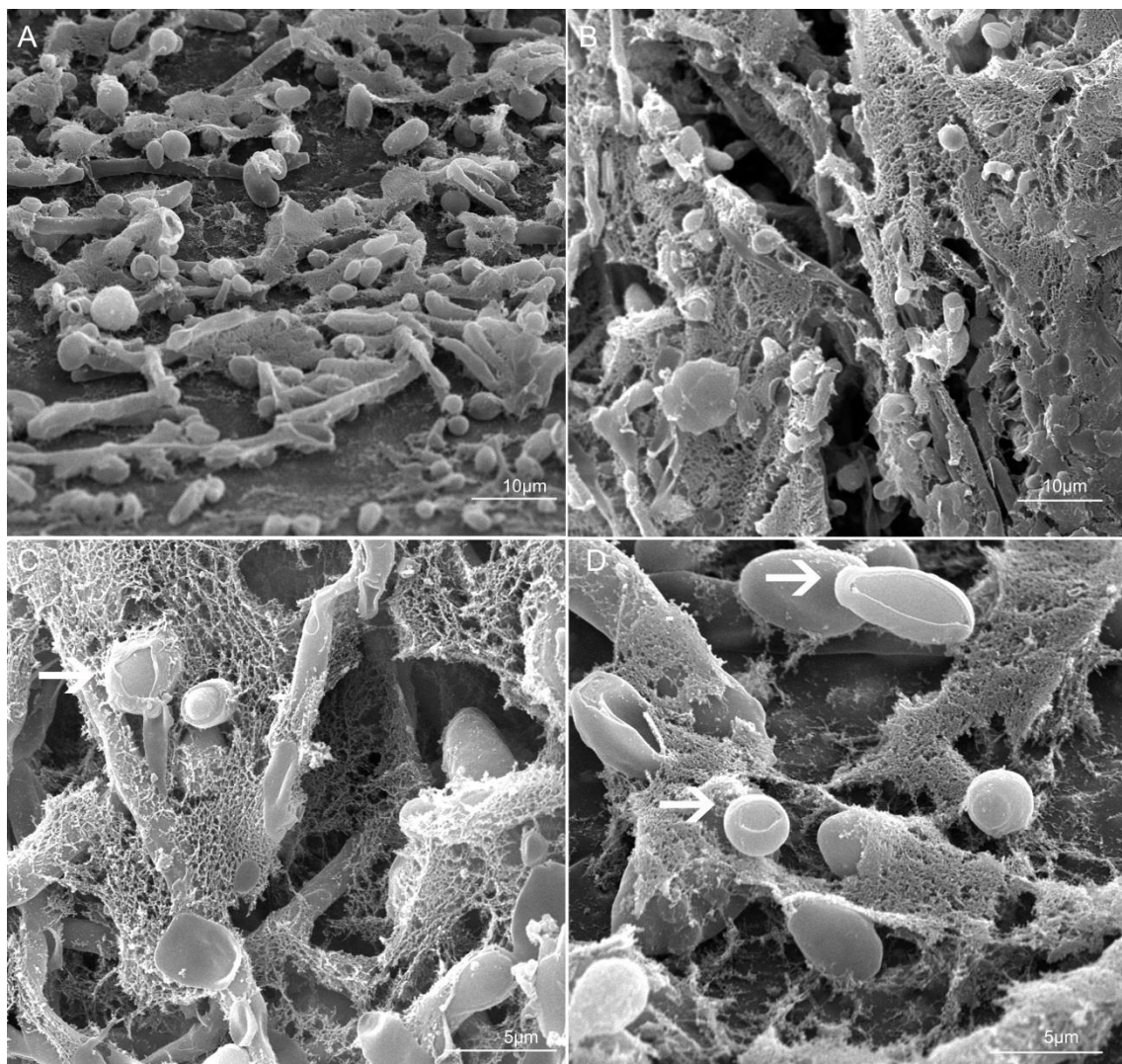


Figura 18: Biofilme de *Candida albicans* 44A apresentando MEC, na superfície cateter (A a D) processadas com congelamento por alta pressão e substituição a frio. Aumentos menores (A e B) e aumentos maiores (C e D). Setas indicando as fraturas ocorridas durante o congelamento. Visualização no Magellan 400 super alta resolução.

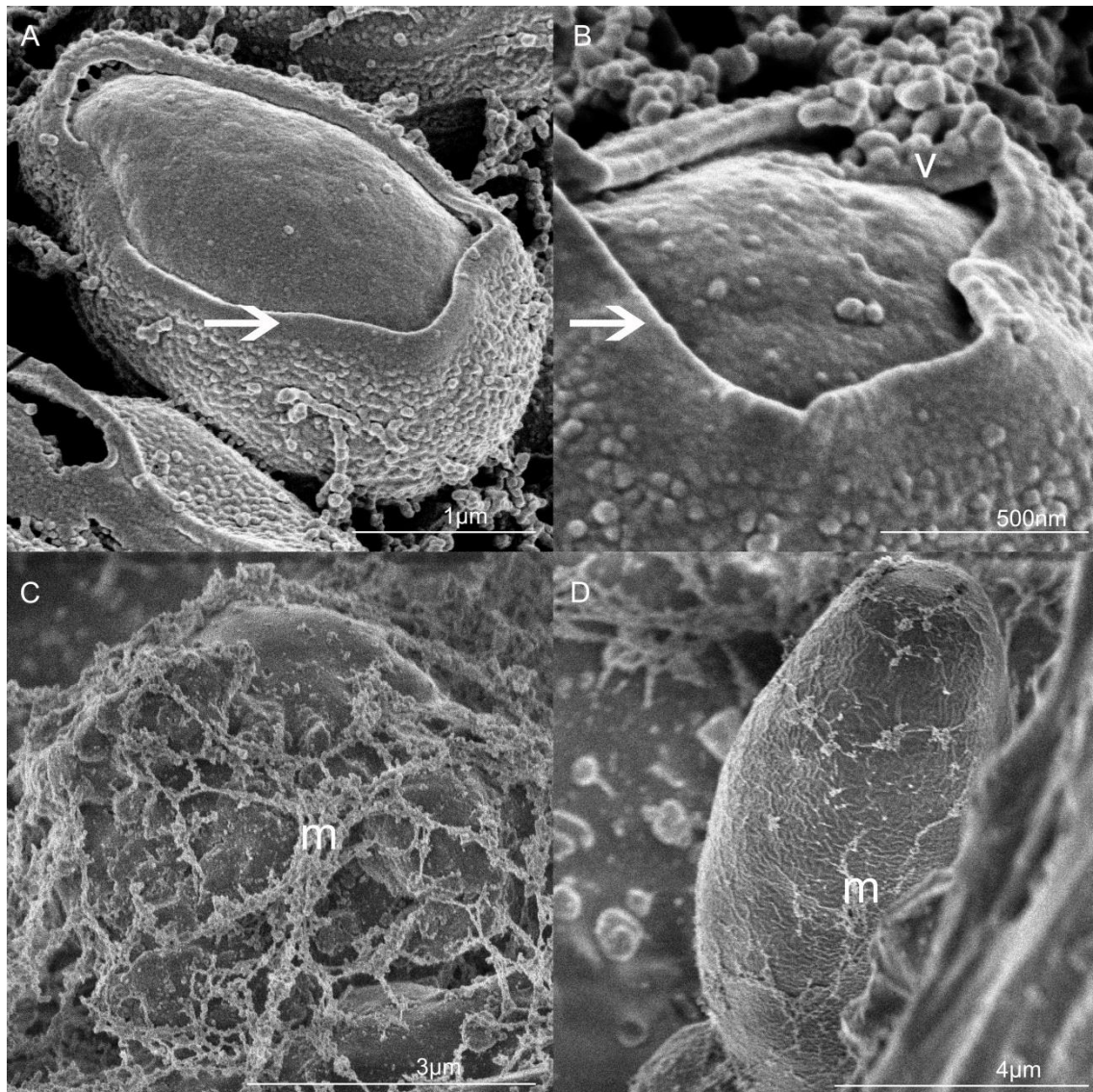


Figura 19: Biofilme de *Candida albicans* 44A apresentando MEC, na superfície cateter (A a D) processadas com congelamento por alta pressão e substituição a frio. Aumentos menores (A e B) e aumentos maiores (C e D). Setas indicando as fraturas ocorridas durante o congelamento. v = vesículas migrando da membrana para a parede e m = MEC. Visualização no Magellan 400 super alta resolução.

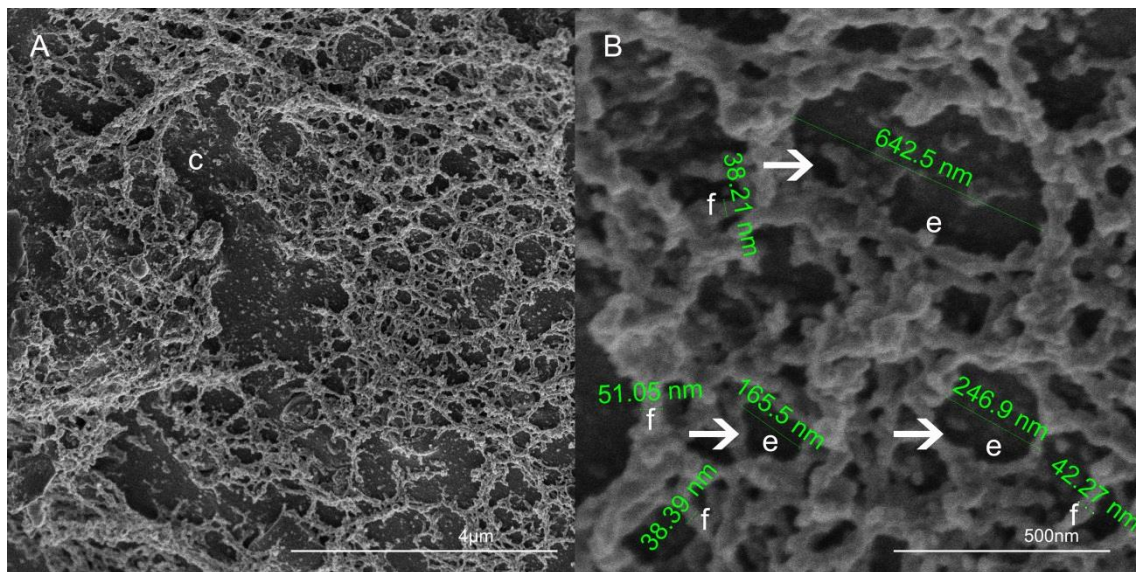


Figura 20: MEC do biofilme de *Candida albicans* 44A na superfície cateter (A e B) processadas com congelamento por alta pressão e substituição a frio. Setas indicando espaços anteriormente ocupados por células. c= “caminho” na MEC por onde corre a água. f= fibrilas com medições. e= espaços com medições. Visualização no Magellan 400 super alta resolução.

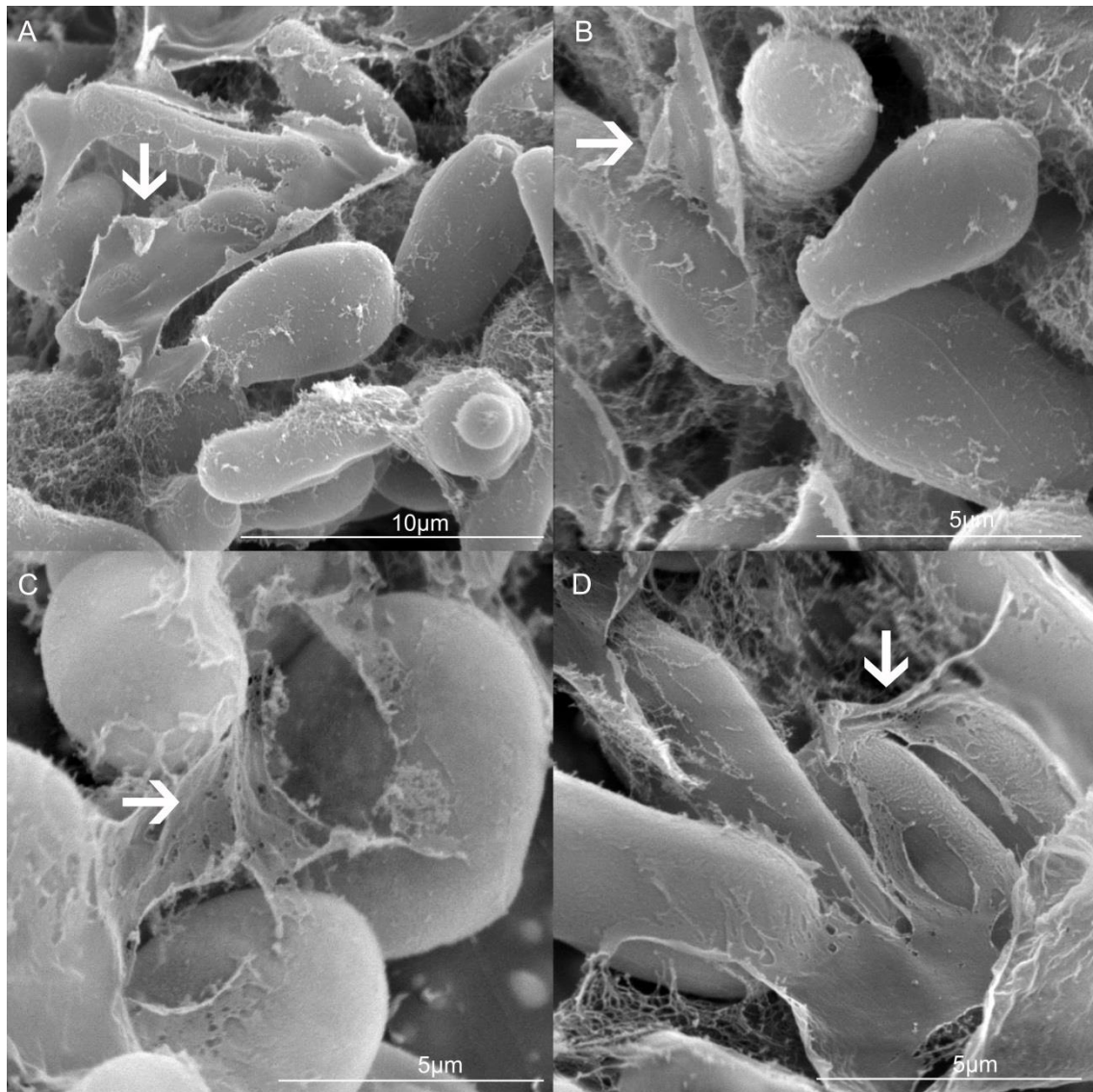


Figura 21: Biofilme de *Candida albicans* 44A na superfície cateter (A a D) processadas com congelamento por imersão e substituição a frio. Setas indicando a MEC recobrando as leveduras. Visualização no Quanta 250 alto vácuo.

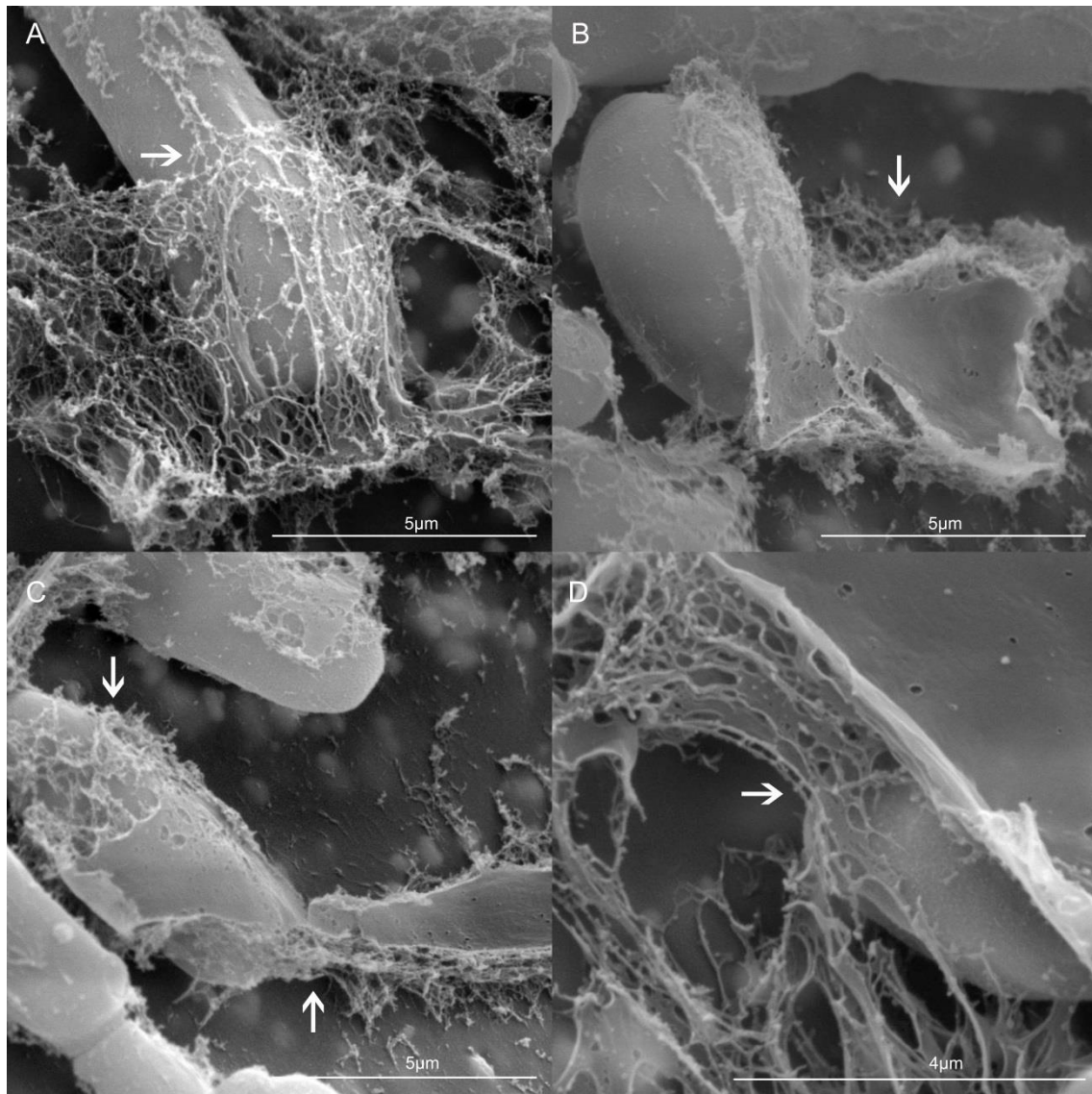


Figura 22: Biofilme de *Candida albicans* 44A na superfície cateter (A a D) processadas com congelamento por imersão e substituição a frio. Setas indicando as fibrilas de formação da MEC. Visualização no Quanta 250 alto vácuo.

5- DISCUSSÃO

Ao longo dos últimos trinta anos, o desenvolvimento da medicina, dos procedimentos cirúrgicos e dos transplantes, levou a um aumento drástico no número de indivíduos imunocomprometidos, que são mais susceptíveis às infecções fúngicas oportunistas. Pacientes com o sistema imunológico comprometido, como aqueles com infecção por HIV, portadores de doenças hematológicas, pacientes pós-cirúrgicos, pós-transplantados ou em terapia contra o câncer, encontram-se sob maior risco de desenvolver micoses invasivas. Além disso, o uso indiscriminado de agentes antimicrobianos de largo espectro de ação, de agentes imunossupressores e terapia prolongada com corticosteroides também estabeleceu fatores de risco para o desenvolvimento destas infecções (KARKOWSKA-KULETA et al., 2009).

Nessas circunstâncias, espécies de *Candida spp.* são capazes de causar infecções fúngicas invasivas, complicações cada vez mais frequentes em pacientes muito debilitados, sendo frequentemente fatais. Um estudo em um hospital terciário de Recife – PE, realizado por Hinrichsen et al. (2008) mostrou que, em ambiente hospitalar, as principais condições associadas à candidemia de pacientes foram: antibióticoterapia, internação em UTI, presença de cateter venoso central, terapia com corticosteroides, nutrição parental total, administração de bloqueador de receptor H2 (bloqueadores do receptor de histamina do tipo 2, são inibidores da secreção ácida estomacal) e terapia com imunossupressores.

O cateter venoso central é um dispositivo médico utilizado para a administração de líquidos, nutrientes e medicamentos. Eventualmente, o fluído de infusão ou o cateter podem estar contaminados, ou ainda, os microorganismos podem ser introduzidos a partir da pele do paciente ou das mãos contaminadas dos profissionais de saúde. Alternativamente, estes microorganismos, também, podem migrar para o cateter a partir

de uma lesão pré-existente (DOUGLAS, 2003). Todos estes motivos tornam o cateter venoso central uma importante fonte de contaminação para diferentes grupos de pacientes e por isto nos propusemos a desenvolver um modelo de estudo de formação de biofilme de *Candida* em cateter venoso.

Neste trabalho, tentamos estabelecer as melhores metodologias para preservar esse biofilme e sua matriz extracelular, visando entender melhor sua estrutura e a interação com as células que ela recobre. A formação de matriz extracelular em biofilmes tem estado intimamente associada ao aumento da resistência a antifúngicos dos biofilmes quando comparados as células planctônicas que os geraram (MITCHELL, 2012).

Decidimos iniciar o nosso trabalho pela fixação química, a usualmente utilizada para diversos processamento de fungos e protozoários. Começamos pela MEV (alto vácuo), pois o que queríamos observar era a estrutura da MEC, sua superfície e sua forma de recobrimento das leveduras. Sendo assim poderíamos visualizar realmente a forma do biofilme e sua MEC. Observamos com o protocolo 1 (rotina) bons resultados, preservando bem o material (leveduras e hifas) e suas estruturas, porém sem preservar a MEC. A MEC não foi observada em nenhuma das duas cepas estudadas. Acreditamos que durante a fixação do material, a MEC tenha sido extraída.

Com o insucesso deste primeiro método partimos então para o método de sacarose, descrita por Cleare et al. (1999) para a manutenção da cápsula polissacarídica do fungo *Cryptococcus neoformans*. Esta cápsula é constituída basicamente por polissacarídeos, e como a MEC também é composta por polissacarídeos, esperávamos que esta fixação fosse capaz de preservá-la totalmente. Entretanto, o que vimos no nosso material foram apenas resquícios da MEC. Acreditamos que esta fixação seja pouquíssima coisa melhor que a de rotina, uma vez que a sacarose se liga diretamente

aos polissacarídeos e que conseguimos visualizar resquícios de MEC, mas a desidratação ainda foi capaz de extrair a maior parte da MEC.

Partimos então para um terceiro protocolo, muito utilizado para a visualização de MEC de biofilme de bactéria, através da fixação e pós fixação com vermelho de rutênio (VR) (Dustin et al., 2010). Diferentemente dos resultados encontrados para biofilme de bactérias, no biofilme de *C. albicans* notamos a presença de inúmeros precipitados e não da MEC propriamente dita. Inicialmente pensamos que os precipitados encontrados poderiam ser parte da MEC, que teria ficado preservada em algumas regiões. Porém decidimos fazer um controle para verificar se realmente estávamos observando a MEC ou precipitados de VR. A quantidade inicial de VR de 0,5 mg/ml foi reduzida para 0,1mg/ml e mesmo assim continuamos a ver a formação de precipitados em cima das leveduras e hifas. Por fim, decidimos testar o protocolo 3 (vermelho de rutênio) nas células planctônicas (em suspensão), que não estariam secretando matriz e observamos que estas, também, apresentavam precipitações sobre suas células. A fim de não restar nenhuma dúvida, processamos também as nossas superfícies (CVC e cupon de silicone) com VR nas diferentes concentrações testadas e encontramos os mesmos resultados. Sendo assim podemos dizer que aquilo que vemos no biofilme é realmente precipitado, já que este aparece até nas superfícies estéreis processadas.

Como mais este protocolo não se mostrava bom para o nosso objetivo, partimos para o quarto protocolo, o ácido tânico. Chandra et al. (2011) utilizou este protocolo para a visualização de biofilme de *C. albicans* em modelo *in vivo*, de cateteres retirados de animais infectados, portanto resolvemos testar no nosso modelo *in vitro*. O que visualizamos para o nosso material se mostrou de forma diferente daquilo que encontramos na literatura. Observamos uma MEC irregular e mal preservada,

recobrando apenas pequenas partes do material. Em alguns pontos, parecia, também, estar havendo formação de precipitados.

Com a utilização do microscópio no modo ambiental esperávamos ver o material mais perto da realidade possível, já que neste processamento não realizamos nenhum tipo de interferência com fixadores, apenas retiramos o material da cultura e o observamos, como descrito na metodologia deste trabalho.

Segundo Stokes et al. (2008) este método é muito útil para ver o material ainda hidratado mantendo todas as suas características. Deste modo conseguimos visualizar a MEC.

Neste trabalho conseguimos observar a MEC através deste modo de microscopia, porém com baixa resolução. Também ocorre a perda deste material, pois este é colocado completamente hidratado e vai perdendo água aos poucos, perdemos esse material completamente quando ele fica seco.

Uma vez que comprovamos a existência da MEC, porém com baixa resolução partimos então para a fixação física.

Como os protocolos de fixação química não forneceram bons resultados e a modo ambiental apresentou pouca resolução partimos para métodos de fixação física (criofixação) até então não realizada com biofilmes de *C. albicans*.

Nesta etapa utilizamos apenas a cepa 44A, por ser isolado clínico e apresentar uma melhor formação e crescimento do biofilme, como vimos nos processamentos de fixação química e no modo ambiental.

A superfície abiótica utilizada foi apenas o cateter venoso central também, pois este apresentou uma melhor formação e crescimento do biofilme, provavelmente pela sua forma côncava, conferir a capacidade de crescimento 3D, já que o biofilme cresce

em toda a superfície, incluindo as paredes, lados interno e externo do cateter, no silicone, por ser plano, esse crescimento é apenas 2D.

O congelamento no aparelho de congelamento por alta pressão seguiu o protocolo de Vanhecke et al. (2008) já que esta técnica é a melhor para se congelar pequenas amostras biológicas.

Normalmente para esta técnica, segundo Osumi et al. (2006), são utilizadas células em suspensão colocadas diretamente nas moedas de cobre ou são aspiradas por um capilar que é posto nesta moeda. Para o nosso material, fizemos uma secção no CVC de tamanho possível para caber nesta moeda, fazendo um sanduiche com ele. Após essas secções, crescemos o fungo no CVC e o congelamos. Desta forma conseguimos obter excelentes resultados, observando pela primeira vez a MEC do biofilme de *Candida albicans*. Com ótima preservação das células, tanto leveduras quanto hifas e com a manutenção da MEC, encontramos um bom método para fixação do material, porém com a presença de fraturas, o que de um lado era bom, porque proporcionava a visualização do interior das células, mas poderia estar quebrando a estrutura 3D da MEC.

Achamos que estas fraturas ocorreram devido à abertura das moedas de cobre após o congelamento. Quando colocamos o material neste sanduiche e impomos uma alta pressão numa baixíssima temperatura conseguimos um excelente congelamento, porém ao termos o material em contato direto com a superfície da moeda ao congelarmos estamos também unindo o material a esta moeda. Quando abrimos a moeda no aparelho de substituição a frio para continuarmos o nosso processamento, acabávamos criando estas fraturas.

As fraturas se mostraram muito interessantes uma vez que conseguimos perceber a espessura das fibrilas da MEC, que recobre as células, e podemos ver também

pequenas vesículas parecendo estar sendo secretadas da membrana plasmática e sendo direcionadas para a parede celular (figura 19B, indicada pelo v).

Na tentativa de um bom congelamento sem fraturas partimos para o congelamento por imersão, onde prendemos o CVC na pinça da guilhotina e fazemos o congelamento, sem fratura.

Segundo Harris et al., 2000 este congelamento é ideal para MEV e áreas pequenas de congelamento, como materiais colocados direto nas grades de MET, uma vez que sua área de congelamento é de apenas 10 nm. Então, temos uma boa superfície congelada e um interior celular não muito bom.

Após tanto o congelamento por alta pressão, como o congelamento por imersão, partimos para substituição a frio, a fim de trazer este material da forma congelada para a temperatura ambiente, novamente, sem perdemos a qualidade do congelamento.

De acordo com Chander, et al. (2008) o melhor meio de substituição é o OsO₄1% em acetona. Este meio permite uma fixação de parede e membrana. Quando colocamos este material no SF a -90°C o gelo da amostra criofixadas é substituído pelo solvente orgânico, no caso a acetona, quanto mais lenta for essa desidratação, melhor será a penetração do fixador no material e teremos uma melhor preservação. Após a permanência por 48hs nesta temperatura já tivemos toda a troca de água por acetona e podemos começar a aquecer o material gradativamente sem risco de danificá-lo.

Quando elevamos a temperatura os fixadores químicos começam a agir e penetrar na amostra. O ósmio realiza este processo a -70°C e até -30°C temos ainda a penetração deste fixador na amostra, sempre de forma lenta e gradativa. O material é então trazido a temperatura ambiente e processado e observado do modo descrito neste trabalho.

Além dos testes realizados com diferentes fixações também utilizamos modos do microscópio eletrônico de varredura diferentes.

Com a utilização do MEV em alto vácuo para a visualização dos materiais obtidos pelos processamentos de fixação química podemos observar que neste modo obtemos excelentes resultados com imagens apresentando resolução e contrastes bons.

Com o MEV em modo ambiental conseguimos cumprir o objetivo do nosso trabalho, que era a visualização da MEC, que até então, utilizando o modo alto vácuo com processamentos com fixação química não tinha sido possível.

Neste modo conseguimos observar o material *in natura* o que nos possibilita ver a MEC e também as hifas e leveduras, o biofilme como um todo no seu estado natural. A desvantagem deste modo está na desidratação que ocorre com o material, pois este é colocado hidratado no microscópio. A água deste material vai evaporando, portanto perde-se a integridade do material e devido aos parâmetros de vácuo e detectores utilizados a resolução é baixa.

Sendo assim partimos para um MEV de super alta resolução, que combinado com a criofixação conseguiu apresentar excelentes resultados. Com a criofixação também conseguimos observar a MEC. Uma vez que este material está fixado e pode ser observado em alto vácuo obtemos excelente contraste e resolução. Com a utilização do alta resolução conseguimos grandes aumentos com boa resolução apresentando estruturas que não são bem visualizadas no alto vácuo apenas.

Com isto concluímos que a melhor forma de fixar o biofilme é através da criofixação. Com o CAP observamos a MEC e ainda conseguimos fraturar este material expondo seu interior e vesículas migratórias. Com o CI observamos a MEC na sua estrutura como um todo, visualizando as fibrilas que recobrem inicialmente as leveduras e hifas e por cima dessas fibrilas o manto da MEC.

Concluimos também que o melhor modo de analisar este material é em MEV alto vácuo e quando são necessárias visualizações de estruturas menores, como vesículas o MEV super alta resolução é o mais indicado.

6 - CONCLUSÃO:

- Os processamentos com fixação química preservaram bem as células, porém não mantiveram a matriz extracelular.
- A microscopia eletrônica de varredura no modo ambiental mostrou-nos a matriz extracelular existente, porém com pouca resolução.
- A cepa 44A apresentou uma formação e crescimento maior que a cepa ATCC10231.
- O cateter venoso central é mais favorável ao crescimento do biofilme que os cupons.
- O congelamento por alta pressão associado á substituição a frio se mostrou uma excelente técnica para a preservação da matriz extracelular, além de realizar fraturas na amostra que nos mostram seu interior, permitindo a visualização de membrana e vesículas migratórias.
- O congelamento por imersão associado á substituição a frio se mostrou também uma excelente técnica para a preservação da matriz extracelular e por não induzir fraturas conseguimos visualizar as fibrilas de formação e o filme presente no material, podendo assim ser observado o “bio-filme”.
- O microscópio eletrônico em alto vácuo e o super alta resolução se mostraram os melhores modos para a observação da MEC, sendo o alta resolução indicado para visualização de pequenas estruturas e o alto vácuo para observação do material como um todo.

Com este trabalho conseguimos pela primeira vez, utilizando a criofixação, visualizar a matriz extracelular de biofilme de *Candida albicans* por microscopia

eletrônica de varredura, o que nos abre o caminho para testar este protocolo não só com outras cepas, como também com outros fungos, e também para testar a ação de antifúngicos sobre a matriz extracelular e a estrutura tridimensional do biofilme, que ainda é desconhecida.

7 - REFERÊNCIAS:

AL-FATTANI, M.A.; DOUGLAS, L.J. **Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance.** Journal of Medical Microbiology, v. 55, pt. 8, p. 999-1008, 2006.

ALLEN, T. **Methods in cell biology: Introduction to electron microscopy for biologists.** AP, v.88, 2008.

BAILLIE, G. S.; DOUGLAS, L. J. **Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms.** Journal of Medical Microbiology, v. 48, n.7, p.671-679, 1999.

BECK, S. **Electron microscopy: a handbook of techniques for biologists.** Nassau Community College, 1996.

BOZZOLA J. J., RUSELL, L. D. (1999) **Electron Microscopy: Principles and techniques for biologists.** 1999.

CHANDLER, D. E.; ROBERSON, R. W. **Bioimaging current concepts in light and electron microscopy.** USA: 1º edition, 2009.

CHANDRA, J.; KUHN, D.M.; MUKHERJEE, P.K.; HOYER, L.L.; MCCORMICK, T.; HANNOUM, M.A. **Biofilm formation by the fungal pathogen *C. albicans*: development, architecture, and drug resistance.** Journal Bacteriology, v.183, p. 5385-5394, 2001.

CHANDRA, J.; LONG, L.; GHANNOUM, M.; MUKHERJEE, P. **A rabbit model for evaluation of catheter-associated fungal biofilms.** Virulence, v. 2, n. 5, p. 466-474, 2011.

CLEARE, W.; CASADEVAAL, A. **Scanning electron microscopy of encapsulated and non-encapsulated *Cryptococcus neoformans* and the effect of glucose on capsular polysaccharide release.** Med. Mycol. v. 4, n. 37, p. 235-243, 1999.

COLOMBO, A. L., M. NUCCI, R. SALOMAO, M. L. BRANCHINI, R. RICHTMANN, A. DEROSI, AND S. B. WEY. **High rate of non-albicans candidemia in Brazilian tertiary care hospitals.** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, v. 34, p. 281-286, 1999.

DEDAVID B. A., GOMES C. I., MACHADO G. **Microscopia eletrônica de varredura : aplicações e preparação de amostras : materiais poliméricos, metálicos e semicondutores.** Porto Alegre : EDIPUCRS., 2007.

DÉNERT, C., BONHOMME, J. ***Candida albicans* biofilms: building a heterogeneous, drug-tolerant environment.** Current Opinion in Microbiology, v. 16, p. 1-6, 2013.

DE SOUZA, W. **Técnicas de microscopia eletrônica aplicada as ciências biológicas.** Rio de Janeiro: 3ª edição, 2011.

DOUGLAS L.J. **Candida biofilms and their role in infection.** TRENDS in Microbiology, v. 11, n. 1, p. 30-36, 2003.

DUSTIN, L. W.; BLOEBAUM, R. D. **Observing the biofilm matrix of *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 grow using the CDC biofilm reactor.** Microscopy and Microanalysis, n.16, p.143-152, 2010.

FERA, A.; FARRINGTON, J. E.; ZIMMERBERG, J.; REESE, T. S. **A negative stain for electron microscopic tomography.** Microscopy and Microanalysis, n.18, p. 331-335, 2012

HARRIS, J. R.; ADRIAN, M. **Preparation of thin-film frozen-hydrated/vitrified biological specimens for cryoelectron microscopy.** v. 117, 2000.

HINRICHSSEN, S. L.; FALCÃO, E.; VILELLE, T. A.; COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; MOURA, L.; RÊGO, L.; LIRA, C.; ALMEIDA, L. **Candidemia in a tertiary hospital in northeastern Brazil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v, 41, n.4, p. 394-398, 2008.

ISA L.; LUCAS F.; WEPF R.; REIMHULT E. **Measuring single-nanoparticle wetting properties by freeze-fracture shadow-casting cryo-scanning electron microscopy.** Nature communications, 2011.

KARKOWSKA-KULETA, J.; RAPALA-KOZIK, M.; KOZIC, A. **Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*.** Acta biochimica Polonica, v.56, n.2, p. 211-24, 2009.

KHAN, S.; ALAM, F.; AZAM, A.; KHAN, A. **Gold nanoparticles enhance methylene blue-induced photodynamic therapy: a novel therapeutic approach to inhibit *Candida albicans* biofilm.** International Journal of Nanomedicine, 2012.

KONAMI, M.; FUJIMOTO, K.; TODA T.; OSUMI M. **Characterization and behavior of α -glucan synthase in *Schizosaccharomyces pombe* as revealed by electron microscopy.** Wiley InterScience, v. 20, p. 427-438, 2003.

KUHN, D.M.; GEORGE, T.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P.K.; GHANNOUM, M.A. **Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 46, n. 6, p. 1773-80, 2002.

MITCHELL, A. P., FANNING, S. **Fungal Biofilms.** PlosOne, v. 8, p. 1-4, 2012.

MORPHEW, M. **Practical methods in high-pressure freezing, freeze-substitution, embedding and immunocytochemistry for electron microscopy.** Laboratory for 3-D Fine Structure Dept. of MCD Biology, University of Colorado, 2007.

NING J.; HU, X.; LING, J.; DU, Y.; LIU, Y.; LIU, H.; PENG, Z. ***Candida albicans* survival and biofilm formation under starvation conditions.** Internaciona Endodontic Journal, 2012.

OSUMI M. **Visualization of yeast cells by electron microscopy.** Journal of Electron Microscopy. v.6, n. 61, p. 343-365, 2012.

OSUMI M.; BABA M.; NAITO N.; TAKI. A.; YAMADA N.; NAGATANI T. **High resolution, low voltage scanning electron microscopy of uncoated yeast cells fixed by the freeze-substitution method.** J. Electron Microsc. , v. 37, n. 1, p. 17-30, 1988.

OSUMI M.; KONOMI M.; SUGAWARA T.; TAKAGI T.; BABA M. **High-pressure freezing is a powerful tool for visualization of *Schizosaccharomyces pombe* cells: ultra-low temperature and low-voltage scanning electron microscopy and immunoelectron microscopy.** Journal of electron microscopy, v. 2, n. 55, p. 75-88, 2006.

PADILHA, A. F. **Microscopia eletrônica de transmissão.** PM1-2201 – Engenharia Metalúrgica e de Materiais da EPUSP, 2000.

PESTI, M.; SIPICZKI, M.;PINTER, Y. **Scanning electron microscopy characterisation of colonies of *Candida albicans* morphological mutants.** J. Med. Microbiology, v. 48, p. 167-172, 1999.

RAMAGE, G., SAVILLE, S.P., THOMAS P.D., LOPEZ-RIBOT, J.L. ***Candida* Biofilms: an Update.**Eukaryotic Cell, v.4, n. 4, p. 633-638, 2005.

ROSCOE, D. L., AL-RAWAHI, G. N. **Ten-year review of candidemia in a Candian tertiary care centr: Predominance of non-*albicans Candida* species.** Infect Dis Med Microbiol, v. 24(3), p. e65-e68, 2013.

SAID, M. B., BOUKADIDA J., ABDELJELIL, J. B., SAGHROUNI, F. **Molecular methods for strain typing of *Candida albicans*: a review.** Journal of Applied Microbiology, 114, p. 1559-1574, 2013.

SAKAGUCHI, N.;BABA, T.;FUKUZAWA, M.; OHNO, S. **Ultrastructural study of *Cryptococcus neoformans* by quick-freezing and deep-etching method.** Mycopathologia, v. 121, p. 133-141, 1993.

SCHMIDT-KREY, I.; RUBINSTEIN, J. L. **Electron cryomicroscopy of membrane proteins: specimen preparation two-dimensional crystals and single particles.** NHI Public Access, p. 107-116, 2011.

SENEVIRATNE, C.J.; JIN, L.; SAMARANAYAKE, L.P. **Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review.** Oral Diseases, v.14, p. 582-590, 2008.

SHINGH, R., MISHRA, N. N., PRASAD T., SHARMA N., PAYASI, A. PRASAD, R., GUPTA, D. K. **Pathogenicity and drug resistance In *candida albicans* and other yeast species.** Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, v. 54 (3), p. 201–235, 2007.

STOKES, J. D. **Principles and practice of variable pressure/environmental scanning electron microscopy (VP-ESEM).** Wiley and Sons publication, 2008.

TAN, G.; XU, P.; JOHN, V; HE, J.; MCPHERSON, G.; AGARWAL, V.; BOSE, A. **Cryo-field emission scanning electron microscopy imaging of a rigid surfactant mesophase.** NIH Public Access, p. 10621-10624, 2008.

TIVOL, W. F.; BRIEGEL, A.; JENSEN, G. J. **An improved cryogen for plunge freezing.** NIH Public access, p. 375-379, 2008.

TUMBARELLO, M.; POSTERARO, B.; TRECARCHI, M.E.; FIORI, B.; ROSSI, M.; PORTA, R.; DONATI, K.G.; LA SORDA, M.; SPANU, T.; FADDA, G.; CAUDA, R.; SANGUINETTI, M. **Biofilm Production by *Candida* Species and Inadequate Antifungal Therapy as Predictors of Mortality for Patients with Candidemia.** Journal of clinical microbiology, v. 45, n. 6, p. 1843–1850, 2007.

VANHECKE D.; GRABER W.; STUDER D. **Close-to-native ultrastructural preservation by high pressure freezing.** Methods in cell biology, v. 88, 2008.

WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. ***Cryptococcus neoformans* Melanin and Virulence: Mechanism of Action.** Infection and Immunity, v. 63, n. 8, p. 3131-3136, 1995.

WILLIAMS, C., RAMAGE G., RAJENDRAN, R. SHERRY, L. **Fungal Biofilm Resistance.** International Journal of Microbiology, v. 2012, p. 1-14, 2012.

WILLIAMS, D. B.; CARTER, C. B. **Transmission Electron Microscopy – A textbook for Materials Science.** 2009.