



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ANA RAQUEL COLARES DE ANDRADE

**BANCO DE IMAGENS ULTRAESTRUTURAIS DE ESPÉCIES FÚNGICAS DE
IMPORTÂNCIA MÉDICA**

FORTALEZA

2016

ANA RAQUEL COLARES DE ANDRADE

**BANCO DE IMAGENS ULTRAESTRUTURAIS DE ESPÉCIES FÚNGICAS DE
IMPORTÂNCIA MÉDICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A565b Andrade, Ana Raquel Colares de.
Banco de imagens ultraestruturais de espécies fúngicas de importância médica / Ana Raquel Colares de Andrade. – 2016.
77 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2016.
Orientação: Profª. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro.

1. microscopia eletrônica de varredura. 2. patógenos fúngicos. 3. micologia médica. I. Título.

CDD 570

ANA RAQUEL COLARES DE ANDRADE

**BANCO DE IMAGENS ULTRAESTRUTURAIS DE ESPÉCIES FÚNGICAS DE
IMPORTÂNCIA MÉDICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

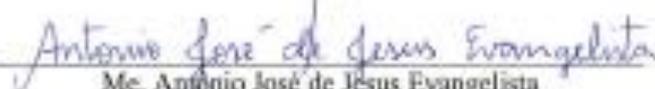
Orientador: Prof. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro

Aprovada em 12/12/2016

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro (Orientadora)


Prof. Dra. Maria Izabel Gallão


Me. Antônio José de Jesus Evangelista

AGRADECIMENTOS

A Deus, que é a minha esperança, minha alegria. De onde me vem tudo!

A minha família, fonte de todo amor. Em especial aos meus pais, por todo o esforço e dedicação em fazerem de mim quem sou hoje.

A meu namorado e futuro noivo, Natan Pinheiro, pela paciência, compreensão e suporte em todos os momentos.

Aos poucos e bons amigos que permitiram partilhar de suas vidas comigo, para sermos e crescermos juntos.

A esta universidade, direção e administração que oportunizaram a janela que hoje vislumbro um horizonte superior.

Aos professores do curso de Ciências Biológicas, que tanto se dedicaram e se dedicam para a formação não só de profissionais, mas de pessoas. A professora Maria Izabel Gallão, por todo o aprendizado, de conteúdo e de vida, muito obrigada pelo incentivo, não só em ser uma boa profissional, mas em ser uma pessoa melhor a cada dia. A professora Vania Maria Maciel Melo, que por seu exemplo de profissional, me impulsionou a seguir os caminhos da microbiologia. A professora Erika Freitas Mota, pelas partilhas de vida e de conhecimento.

A minha orientadora professora Rossana de Aguiar Cordeiro, pela confiança, suporte, incentivo, exemplo de pessoa e profissional. É de docentes como você que nós precisamos! Nossa jornada continua...

Ao Centro Especializado de Micologia Médica e seu corpo docente, Dr. Júlio Sidrim, professora Sâmia Brilhante, professor Marcos Fábio, professora Rossana de Aguiar Cordeiro que tanto se esforçam no desenvolvimento deste Centro, em fornecer toda estrutura necessária para o desenvolvimento dos trabalhos.

Aos amigos do CEMM, em especial Rosana Serpa e Antônio José de Jesus Evangelista (Tony), que desde que cheguei foram meu suporte, meu alívio, a quem eu podia recorrer, sempre. Dra. Silviane Praciano, Gláucia Guedes, Jonathas Sales, Terezinha de Jesus (Tetê), por todo o carinho e ajuda. Edmilson Correia e Vandbergue Santos, pelo enorme auxílio nesse trabalho. E todos os outros, pela partilha dos cafés, dos bolos de pote, das conversas, do conhecimento.

A Central Analítica da UFC, e todos os seus profissionais, pelo suporte e por possibilitar o desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro, que permitiu que este projeto fosse posto em prática.

Aos companheiros de turma, por dividirem momentos de alegria, de tensão, desespero, de alívio, enfim...por todos os momentos. E os tesouros que encontrei (Jônatas Franco, Patrícia Bruna, Luciana Furtado e Jessica Arrais), agradeço a vocês que me amarem como sou. Em vocês encontrei o sentido verdadeiro da amizade.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

RESUMO

Patógenos fúngicos vem ganhando a atenção da comunidade científica mundialmente, sobretudo pelo aumento da incidência das micoses, acometendo principalmente pacientes imunocomprometidos. Assim, é necessário o conhecimento dos aspectos morfofisiológicos desses patógenos a fim de compreender as doenças que eles causam. A fotomicrografia pode ser usada como suporte na pesquisa, no estudo, no reconhecimento das estruturas fúngicas espécies-específicas e como ferramenta no ensino-aprendizagem da Micologia. A diversidade ultraestrutural dos fungos observada por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) permite a identificação destes de uma forma mais precisa, diferentemente de outros métodos de análise. Nesse contexto, o presente estudo objetivou confeccionar um banco de imagens de espécies fúngicas de importância clínica no suporte ao ensino e pesquisa que envolve a micologia médica. Para tanto, foram feitas as imagens de cultivos de leveduras, fungos filamentosos e dimórficos, bem como biofilmes e amostras clínicas utilizando MEV. As amostras em lâminas foram fixadas com 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato (0,15M), com azul de alcian (0,1%), por até 18 horas a 4°C. Em seguida, foram desidratadas com séries ascendentes de etanol, tratadas hexametildisilazano e secas em dessecador por no mínimo 24 horas. As lâminas foram recobertas com 10 nm de ouro e observadas em microscópio eletrônico de varredura FEI Inspect S50. A técnica permitiu a visualização das estruturas espécies-específicas dos fungos estudados. A confecção deste banco de imagens possibilitou uma maior obtenção de informações acerca dos aspectos ultraestruturais das espécies podendo proporcionar o aprimoramento no processo de ensino-aprendizagem, bem como na pesquisa em micologia médica.

Palavras-chaves: microscopia eletrônica de varredura; patógenos fúngicos; micologia médica.

ABSTRACT

Fungal pathogens have been gaining the attention of scientific community worldwide mainly due to the increased incidence of mycoses, affecting mostly immunocompromised patients. Thus, it is necessary to know the morphophysiological aspects of these pathogens in order to understand the diseases they cause. Photomicrography can be used as support in research, in the study, in the recognition of species-specific fungal structures, and as a teaching-learning tool in mycology. Fungal ultrastructural diversity observed through Scanning Electron Microscopy (SEM) allows fungal identification in a more precise way, unlike other methods of analysis. In this context, the present study aimed to compile a database of clinical relevant fungal species aiming the support of teaching and research that involves medical mycology. Thus, images of yeast, filamentous and dimorphic fungi cultures, as well as biofilms and clinical samples, were prepared using SEM. Samples were fixed with 2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer (0.15M), with alcian blue (0.1%), for up to 18 hours at 4 °C. Then, they were dehydrated with ascending series of ethanol, treated with hexamethyldisilazane and dried in a desiccator for at least 24 hours. Samples were coated with 10 nm of gold and observed on a FEI Inspect S50 scanning electron microscope. The technique allowed the visualization of species-specific structures of the fungal used. The creation of this image bank made it possible to obtain more information about the ultrastructural aspects of the fungal species analysed, which could provide improvement in the teaching-learning process as well as in mycological medical research.

Keywords: scanning electron microscopy; fungal pathogens; medical mycology.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Características gerais dos fungos.....	11
1.2 Fungos como patógenos.....	13
1.2.1 Micoses superficiais propriamente ditas.....	14
1.2.2 Micoses superficiais cutâneas.....	15
1.2.3 Micoses profundas subcutâneas.....	16
1.2.4 Micoses profundas sistêmicas.....	17
1.2.5 Fungos contaminantes.....	20
1.2.6 Biofilmes fúngicos.....	20
1.3 Diagnóstico laboratorial das doenças fúngicas.....	21
1.4 A fotomicrografia no suporte ao estudo da microbiologia.....	22
1.5 A Microscopia Eletrônica de Varredura.....	22
1.6 Justificativa.....	24
1.7 Objetivo.....	24
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
2.1 Amostras.....	25
2.2 Cultivo das Amostras.....	25
2.2.1 Cultivo de fungos leveduriformes.....	26
2.2.2 Cultivo de fungos filamentosos e dimórficos.....	27
2.3 Preparo de biofilmes fúngicos.....	27
2.4 Processamento de amostras para visualização na microscopia Eletrônica de Varredura.....	27
2.5 Amostras clínicas.....	27
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
3.1 <i>Malassezia</i> sp.....	29
3.2 Dermatófitos.....	29
3.2.1 <i>Microsporum</i> spp.....	30
3.2.2 <i>Trichophyton</i> spp.....	30
3.3 <i>Rhizomucor</i> sp.....	31
3.4 <i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i>	32
3.5 <i>Candida</i> spp.....	33
3.6 <i>Trichosporon inkin</i>	33

3.7 <i>Cryptococcus</i> spp.....	33
3.8 <i>Fusarium solani</i>	33
3.9 <i>Penicillium</i> sp.....	33
3.10 <i>Syncephalastrum</i> sp.....	34
3.11 Biofilmes.....	34
3.12 Fotomicrografia didática.....	35
4. CONCLUSÕES.....	37
REFERÊNCIAS.....	38
APÊNDICE A - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura.....	42
APÊNDICE B - Imagens Coloridas de Microscopia Eletrônica de Varredura.....	66

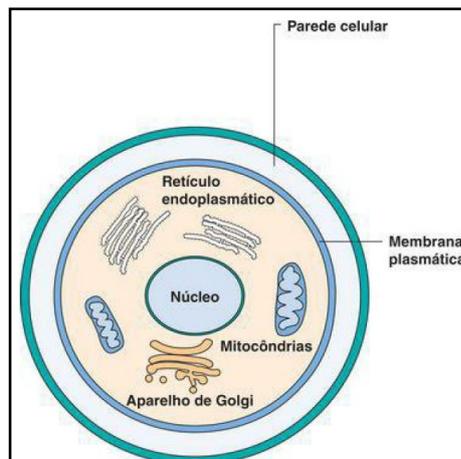
1. INTRODUÇÃO

1.1 Características gerais dos fungos

Fungos são organismos eucarióticos, heterotróficos que ocupam os mais diversos ambientes, inclusive fazendo parte da microbiota humana. Possuem importância ecológica, decompondo a matéria orgânica, transformando-a em elementos assimiláveis; e econômica, tendo aplicação em diversas áreas, como a alimentícia e farmacêutica.

Os fungos apresentam parede celular composta de glucanas, mananas, quitina, proteínas e lipídios, sendo a quitina o principal componente estrutural (ZAITZ *et al.*, 2012). Já a membrana plasmática contém esteróis na forma de ergosterol, diferentemente da célula animal, onde se encontra colesterol. Segundo Zaitz *et al.* (2012), essa diferenciação concebe um importante sítio de ação de alguns antifúngicos, que atuam na síntese do ergosterol. A figura 1 mostra o aspecto estrutural das células fúngicas.

Figura 1 - Estrutura esquemática de uma célula fúngica.



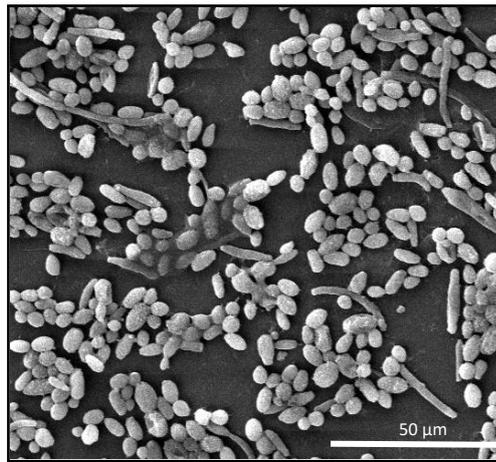
Fonte: Murray, 2009.

De acordo com Sidrim e Rocha (2004), a caracterização morfológica primária dos fungos se dá por sua apresentação estrutural. Dessa forma, podem ser divididos em leveduras (formas unicelulares), fungos filamentosos (formas multicelulares), e dimórficos - que podem apresentar-se como leveduriformes ou filamentosos dependendo da temperatura em que foram submetidos durante o crescimento (SIDRIM E ROCHA, 2004).

As leveduras, em geral, apresentam o formato oval ou arredondado (figura 2) e podem reproduzir-se de forma assexuada ou sexuada (ZAITZ *et al.*, 2012). Podem também formar pseudo-hifas ou hifas verdadeiras, como algumas espécies do gênero *Candida* sp.

(MURRAY, 2009; SIDRIM E MOREIRA, 1999). No caso de *C. albicans*, por exemplo, ocorre o que se chama de pleomorfismo. A espécie forma hifas verdadeiras, independente da temperatura em que o fungo está exposto (SIDRIM E MOREIRA, 1999). As leveduras produzem colônias arredondadas, pastosas, ou mucoides em meios sólidos (MURRAY, 2009).

Figura 2: Aspecto morfológico de leveduras



Fonte: elaborado pelo autor

Os fungos filamentosos são multicelulares, com células tubulares, denominadas hifas, das quais, o conjunto chama-se micélio (ZAITZ *et al.*, 2012). As hifas podem ser classificadas em cenocíticas - ocas e multinucleadas - ou septadas - divididas por septos ou paredes transversais (MURRAY, 2009). Zaitz *et al.* (2012), estabelecem as colônias (figura 3) desse tipo fúngico como podendo ser algodonosas, aveludadas, pulverulentas, entre outros, com muitos tipos de pigmentação.

Figura 3 - Colônia de fungo filamentoso



Fonte: elaborado pelo autor

Sidrim e Rocha (2004) reconhecem que a caracterização secundária dos fungos é tida a partir da presença de estruturas que são encontradas em algumas espécies fúngicas, mas em outras não, como estruturas de frutificação e de ornamentação. Esta caracterização é crucial na diferenciação e classificação fúngica (SIDRIM E ROCHA, 2004).

1.2 Fungos como patógenos

Os fungos tem sido considerados como umas das principais causas de doenças em humanos nos últimos 30 anos e vêm ganhando grande atenção da comunidade científica por causa do aumento no número de micoses, que acometem, principalmente, pacientes imunocomprometidos ou que possuem doenças de base. Como descrito por Murray (2009) os fungos atuam, em imunocomprometidos, principalmente, como patógenos oportunistas, gerando infecções invasivas, com morbidade e mortalidade consideráveis.

As doenças fúngicas oportunistas são atribuídas, principalmente, a fungos que participam da microbiota do hospedeiro. Contudo, qualquer fungo presente no ambiente é um patógeno fúngico em potencial a depender de diversas condições, entre elas, os fatores de virulência do fungo, o sistema imune do hospedeiro e a interação parasita-hospedeiro. Geralmente, esses micro-organismos causam infecções em indivíduos imunossuprimidos ou que portem aparelhos protéticos implantados e cateteres (MURRAY, 2009). *Candida* sp. é um dos patógenos oportunistas mais comuns, tendo conhecimento também do acometimento de doenças por *Cryptococcus* sp. e *Aspergillus* sp.

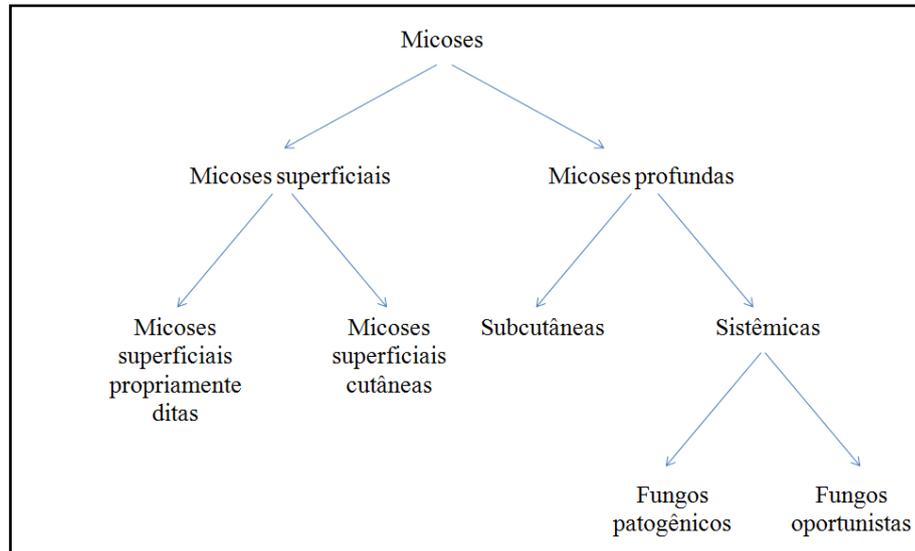
O acometimento de doenças por espécies fúngicas pode se dar de forma superficial ou profunda (ZAITZ *et al.*, 2012). Como informa Zaitz *et al.* (2012), as infecções superficiais podem ser propriamente ditas ou cutâneas; e as profundas podem ser subcutâneas ou sistêmicas.

As infecções superficiais propriamente ditas acometem a camada córnea ou cutícula do pelo, em que a resposta imune celular do hospedeiro é mínima ou ausente e raras vezes é sintomática, tornando-a crônica (ZAITZ *et al.*, 2012). Micoses superficiais cutâneas acometem a pele, pelos e unhas. Estas infecções podem provocar uma resposta do hospedeiro e se tornar sintomáticas (MURRAY, 2009).

As micoses profundas subcutâneas ocorrem da inoculação do fungo através de um trauma e acometem as camadas mais profundas da pele, como a derme, córnea e tecido conjuntivo (MURRAY, 2009). Por fim, as micoses profundas sistêmicas ocorrem pela inalação do fungo, que se for dimórfico, é caracterizada como infecção sistêmica por fungo

patogênico, se não, é dita como infecção sistêmica por fungo oportunista (ZAITZ *et al.*, 2012).

Figura 4 - Esquema da classificação clínica das micoses.



Fonte: Baseado em ZAITZ *et al.*, 2012.

1.2.1 *Micoses superficiais propriamente ditas*

Dentre esse grupo de micoses tem-se a tinea nigra (*Hortaea werneckii*), piedra branca (*Trichosporon* sp.), piedra preta (*Piedraia hortae*) e a pitiríase versicolor (*Malassezia* sp.). A tabela 1 informa os principais atributos desses acometimentos.

A pitiríase versicolor é causada por fungos do gênero *Malassezia*, leveduras constituintes da microbiota cutânea humana. São espécies lipodependentes e polimórficas, que podem invadir as células queratinizadas das camadas superficiais da pele e causar micose (SIDRIM E ROCHA, 2004). Moraes, Paes e Holanda (2009) afirmam que as placas hipo ou hiperpigmentadas, aparecem porque o fungo causa alteração na produção de melanina nas regiões em que estão colonizando. Sidrim e Rocha (2004) confirmam que essa alteração de pigmentação se dá por causa da presença do ácido azelaico, que interfere na melanogênese.

Um aspecto interessante quando se observa a colonização de *Malassezia* spp. na pele é a formação do colarete, que, segundo Sidrim e Rocha (2004) corresponde à dobra da parede restante da célula conidiogênica na região da produção dos fialoconídios. Essa formação é consequência da divisão entre a célula mãe e filha, que são divididas por um septo, e a célula filha, após ser separada por fissão, deixa uma cicatriz (colarete), de onde surgem sucessivas células filhas (ASHBEE E EVANS, 2002).

Tabela 1 - características fundamentais das micoses superficiais.

Nome	Agente	Características
Tinea nigra	<i>Hortaea werneckii</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Acomete o estrato córneo da pele é referida como infecção benigna e assintomática; • Lesões de cor escura com bordas bem definidas e sem descamação que aparecem na palma das mãos e algumas vezes, na planta dos pés.
Piedra branca	<i>Trichosporon</i> sp.	<ul style="list-style-type: none"> • Caráter assintomático, benigno e de baixo contágio. • Infecta cabelo e pelos nas regiões pubianas, perianais, axilares e faciais.
Piedra negra	<i>Piedraia hortae</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Presente preferencialmente no couro cabeludo. • Nódulos de coloração escura, fortemente aderidos aos pelos.
Pitiríase versicolor	<i>Malassezia</i> sp.	<ul style="list-style-type: none"> • De caráter benigno e crônico, evidenciada por placas hipo ou hiperpigmentadas, com bordas bem limitadas e que podem cobrir extensas áreas do corpo.

Fonte: SIDRIM E ROCHA, 2004

1.2.2 Micoses superficiais cutâneas

Doenças cutâneas podem ser ocasionadas por fungos dermatófitos, por exemplo. Os dermatófitos são fungos filamentosos e um dos mais importantes causadores de micoses na pele. As dermatofitoses ocorrem se houver lesão cutânea ou escoriação que permita a inoculação de um fragmento de hifa ou artroconídio que é depositado sobre a pele. Ela penetra na camada córnea e gerando uma lesão macroscópica, de aspecto circular, na maioria das vezes (SIDRIM E ROCHA, 2004).

Os dermatófitos causadores de micoses cutâneas são dos gêneros *Microsporum* sp., *Trichophyton* sp. e *Epidermophyton* sp. Esses fungos são chamados queratinofílicos porque usam da queratina como nutriente durante a infecção da pele (PERES, 2010). Ainda segundo Peres (2010), a transmissão das dermatofitoses ocorre a partir do contato direto com animais e humanos que estão infectados, ou por contato indireto por fômites contaminados; e as formas clínicas vão variar dependendo da espécie fúngica causadora e do sítio anatômico acometido. Com relação à variações das manifestações clínicas, a resposta do hospedeiro mediante o

contato com o patógeno, pois a interação do parasita com o hospedeiro, sua microbiota, a resposta imunológica, e outros aspectos, podem afetar o modo como a micose se manifesta.

As diversas formas de dermatofitoses são citadas como tineas, e são classificadas de acordo com o sítio anatômico e a estrutura afetada (MURRAY, 2009). A tabela 2 refere-se à classificação das dermatofitoses.

Tabela 2 - Classificação das dermatofitoses.

Nome	Local de acometimento
<i>Tinea capitis</i>	Couro cabeludo, sobrancelhas e cílios
<i>Tinea corporis</i>	Pele glabra ou macia
<i>Tinea cruris</i>	Região inguinal (grandes pregas)
<i>Tinea pedis</i>	Regiões interdigitoplantares
<i>Tinea manum</i>	Regiões interdigitopalmares
<i>Tina unguium</i> ou onicomicose	Unhas

Fonte: MURRAY, 2009

1.2.3 Micose profundas subcutâneas

Dentre as micose subcutâneas, encontra-se a zigomicose, que é originada de fungos saprófitos que pertencem à classe dos zigomicetos. As zigomicoses podem ser subdivididas em Mucormicose e Entomoftromicose, a depender do agente causador, Ordem *Mucorales* ou *Entomophthorales*, respectivamente (SIDRIM E ROCHA, 2004). Fungos do gênero *Rhizomucor* sp. estão incluídos na Ordem *Mucorales*, logo causam a Mucormicose. Essa doença apresenta quadros clínicos distintos, desde um aspecto cutâneo/subcutâneo até uma forma disseminada. Sidrim e Rocha (2004) afirmam que a gravidade do quadro clínico está relacionada a fatores como o grau de resistência do hospedeiro, da quantidade de inóculo e dos fatores de virulência do micro-organismo.

Outra doença relevante é a causada pelo complexo *Sporothrix schenckii*, um fungo dimórfico; a esporotricose define-se por ser uma doença subcutânea e crônica, podendo ocasionar úlceras em sua fase tardia (LARSSON, 2011). Como descrito por Sidrim e Rocha (2004), comumente caracteriza-se por uma infecção benigna limitada à pele e tecido subcutâneo, no entanto, pode disseminar-se para órgãos e tecido interno, em casos raros, pode ser sistêmica, tendo início no pulmão. A tabela 3 mostra outros tipos de micose subcutâneas.

Tabela 3 – outras micoses subcutâneas.

Nome	Agente	Características
Entomoftoromicose	Ordem <i>Entomophthorales</i>	• Subcutânea crônica, centro-facial ou visceral.
	Classes <i>Ascomycetes</i>	• A evolução do quadro clínico compromete gânglios, músculos e articulações.
Hialo-Hifomicose	<i>Coelomycetes</i> <i>Hyphomycetes</i> <i>Basidiomycetes</i>	
Rinosporidiose	<i>Rinosporidium</i> <i>seeberi</i>	• Massa polipoide na cavidade nasal ou orofaringe.
	Gêneros <i>Madurella</i> spp.	• Lesões nodulares na pele e tecido subcutâneo que podem fistulizar.
Micetoma	<i>Curvularia</i> spp. <i>Fusarium</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp.	
Cromomicose	Família	• Cromomicose: lesões nodulares ou em placa.
Feo-Hifomicose	<i>Dematiaceae</i>	• Feo-Hifomicose: Nódulos com secreção purulenta no local da inoculação do fungo.

Fonte: SIDRIM E ROCHA, 2004

1.2.4 Micoses profundas sistêmicas

O fungo dimórfico *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* causa a micose sistêmica cosmopolita histoplasmose. A infecção ocorre da inalação do fungo, tendo como foco inicial o pulmão (TRABULSI, 1999). Em geral, em paciente imunocompetentes, a histoplasmose é incomum e possui evolução satisfatória na maioria dos casos, causando uma fungemia subcutânea; no entanto, em paciente imunocomprometidos, como os soropositivos, a infecção é dita disseminada e grave (FORTALEZA, 2004).

Essa doença pode representar uma das primeiras manifestações da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida - AIDS (BORGES, 1997). Tal fato é citado por Sidrim e Rocha

(2004), que confirmam que essa doença constitui um sério problema em indivíduos imunocomprometidos, principalmente os portadores do HIV, podendo apresentar manifestações graves, que progridem rapidamente.

A paracoccidiodomicose, coccidiodomicose e blastomicose também são micoses profundas causadas por fungos dimórficos (tabela 4).

Tabela 4 – Outras micoses profundas.

Nome	Agente	Características
Paracoccidiodomicose	<i>Paracoccidiodes brasiliensis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Micose sistêmica mais comum na maioria dos países da América Latina; • Atingem pulmões, nariz, boca, faringe, gânglios linfáticos, pele, tubo digestivo etc.
Coccidiodomicose	<i>Coccidioides immitis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • A mais infecciosa das micoses; • Formas: Pulmonar aguda, assintomática, cutânea primária e disseminada.
Blastomicose	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Encontrada principalmente nos Estados Unidos e Canadá; • Formas: Pulmonar aguda e crônica; Cutânea de evolução crônica; Cutânea de inoculação primária; Disseminada.

Fonte: SIDRIM E ROCHA, 2004

1.2.4.1 Micoses profundas causadas por fungos oportunistas

Quase todas as espécies fúngicas podem vir a ser patógenos eficazes, tendo em vista alguns aspectos relacionados ao micro-organismo e ao hospedeiro. Muitos deles possuem fatores de virulência que, combinados com a disbiose do hospedeiro, podem levar à infecções invasivas profundas. Uma das doenças fúngicas de caráter oportunista é a causada por leveduras, como as do gênero *Candida* sp.

As espécies do gênero *Candida* sp. são as mais abundantes na microbiota humana e são detectadas no trato respiratório superior, na conjuntiva, estômago e intestino e no trato

genito-urinário (SIDRIM E ROCHA, 2004). *Candida* sp. são os patógenos mais frequentemente isolados de infecções fúngicas humanas; aproximadamente 90% de todos os isolados do gênero correspondem às espécies: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* (SILVA *et al.*, 2012). Estas infecções continuam a ser uma importante causa de mortalidade em pacientes imunocomprometidos e aqueles submetidos a procedimentos invasivos (BORMAN *et al.*, 2009).

As leveduras como as do gênero *Candida* sp., produzem diversos fatores de virulência, no entanto, o desenvolvimento de uma infecção só é favorecido por uma combinação de fatores, dentre eles, o estado imune do hospedeiro (SIDRIM E ROCHA, 2004). Como certificam Sidrim e Rocha (2004), as micoses são provavelmente iniciadas por modificações na relação parasita-hospedeiro; desde infecções superficiais, onde há a modificação do pH, por exemplo, até infecções sistêmicas, em que a alteração maior está associada à imunossupressão. Outras doenças oportunistas são descritas na tabela 5.

Tabela 5 – Outras micoses oportunistas

Doença	Agente	Descrição
Tricosporonose	<i>Trichosporon</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> • Infecções invasivas de quadro sistêmico. • Pacientes imunocomprometidos e neutropênicos, geralmente oncológicos. • Indivíduos acometidos geralmente apresentam quadro febril inespecífico.
Criptococose	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Ubíquo do ambiente urbano. Pode fazer parte da microbiota transitória humana; • Fatores de virulência: termotolerância, presença de cápsulas, produção de melanina. • três formas clínicas (pulmonar regressiva, pulmonar progressiva e disseminada).
Aspergilose	<i>Aspergillus</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> • Aquisição da doença relacionada a pacientes gravemente imunossuprimidos; • Lesões clínicas polimórficas (pápulas, nódulos, abscessos, granulomas etc). • Ex: Aspergiloma, aspergilose pulmonar, sinusite aspergilar

Fusariose	<i>Fusarium</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> • Encontrado no solo, água e plantas; • Pode causar desde micoses cutâneas até sistêmicas; • Endoftalmite é a apresentação mais frequente.
------------------	----------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Fonte: LACAZ *et al.*, 2003 *apud* CONNEPI, 2010; SIDRIM E ROCHA, 2004.

1.2.5 Fungos contaminantes

Ainda podemos citar fungos encontrados no ambiente e que são de grande relevância no acometimento de manifestações alérgicas do trato respiratório, tais como rinite, sinusite alérgica, asma, entre outros (LACAZ, 1984 *apud* SOUZA; VIEIRA; GOMES, 2008). Esses fungos anemófilos também podem ser contaminantes da rotina micológica, compreendendo uma grande diversidade de gêneros que colonizam distintos ambientes, e desenvolvem estruturas reprodutivas como esporos e conídios, que veiculam-se pelo ar, sendo dispersos muito facilmente e com alto potencial de contaminação (SIDRIM E MOREIRA, 1999 *apud* SOUZA; VIEIRA; GOMES, 2008). Como exemplo descritos neste trabalho temos *Penicillium* sp. E *Syncephalastrum* sp.

1. 2.6 Biofilmes fúngicos

Os biofilmes são definidos como comunidades bacterianas aderidas à superfícies ou interfaces (COSTERNON, 1995). A capacidade de aderir a superfícies e formar biofilmes é um dos fatores de virulência mais estudados na micologia. Tendo em vista esse fato, Dunne (2002) afirma que a formação de biofilmes é motivo de preocupação na clínica, pois uma vez estabelecido, há aumento do desenvolvimento da infecção, atuando como reservatório fúngico e aumento da resistência a drogas antimicrobianas.

As doenças ocasionadas por biofilmes ocorrem mais frequentemente em pacientes portadores de dispositivos invasivos ou implantes, como cateteres e próteses, que funcionam como substrato para a formação dessas estruturas. Os biofilmes estão relacionados a infecções crônicas que costumam recidivar e que apresentam refratariedade terapêutica (DONLAN, 2001).

A resistência a antifúngicos é um dos fenótipos mais importantes expressos por biofilmes. Em estudos *in vitro*, foi exposto que biofilmes fúngicos necessitam de concentrações muito mais altas para serem inibidos que células fúngicas planctônicas (TOBUDIC, 2012).

1.3 Diagnóstico laboratorial das doenças fúngicas

O conhecimento dos aspectos morfofisiológicos dos patógenos é relevante para o ensino e pesquisa, no laboratório, bem como para o diagnóstico micológico e tratamento do paciente, na clínica. Os métodos mais utilizados na identificação de patógenos fúngicos compreendem análise da estrutura morfológica e testes bioquímicos. Apesar dos métodos automatizados estarem em expansão nas pesquisas, estes ainda são onerosos e, para o diagnóstico micológico, o uso destes é ainda mais limitado.

De acordo com Oliveira (2015), o diagnóstico está baseado no isolamento e identificação do fungo por meio da cultura, dita como padrão-ouro na micologia. A taxonomia dos fungos também está baseada, tradicionalmente, em aspectos morfológicos e citológicos (MORAES; PAES; HOLANDA, 2009). Sidrim e Rocha (2004) afirmam que para a identificação de leveduras é necessário observar características micromorfológicas, padrão enzimático e necessidades nutricionais. Já para fungos filamentosos, a micromorfologia é o padrão fundamental para identificação, mas em alguns casos, as necessidades nutricionais devem ser observadas (SIDRIM E ROCHA, 2004). Tortora (2010) também afirma que fungos multicelulares são identificados a partir de seu aspecto, incluindo as características da colônia e dos conídios.

Outro detalhe importante relativo à identificação desses patógenos é bem ressaltado por Murray (2009) que relata a importância de não só saber se o paciente possui uma infecção fúngica, mas identificar o agente da infecção para que sejam dados melhores tratamento e apoio clínico.

Para Xavier (2009), é importante existir uma estreita cooperação entre clínica e rotina micológica para assegurar um diagnóstico mais acurado e um tratamento adequado. No entanto, relata o autor, é frequente que esses profissionais ainda trabalhem de forma independente no senso de diagnosticar a doença infecciosa. Essa falha acarreta em dados clínicos incompletos, e conseqüentemente, o retardo ou não obtenção do diagnóstico que prolonga a enfermidade no paciente (XAVIER, 2009).

Ainda segundo Murray (2009), o exame direto das amostras clínicas é considerado o meio mais rápido e de baixo custo para o diagnóstico das infecções fúngicas. O exame direto consiste na pesquisa da presença de fungos nas amostras obtidas ou na cultura feita a partir do material coletado. Esse processo permite a identificação do fungo, através de suas características morfológicas, em primeiro momento. Nesse âmbito, é necessário o

conhecimento dessas estruturas pelo laboratorista/pesquisador para que o fungo seja identificado mais facilmente, acelerando o diagnóstico e tratamento do paciente.

1.4 A fotomicrografia no suporte ao estudo da microbiologia

Desde que Robert Hooke iniciou seus estudos observando a cortiça no microscópio, que o estudo da Biologia está intimamente entrelaçado com o uso de meios para observação de estruturas invisíveis a olho nu. Para o registro dessas observações, vários estudiosos, ao longo de todo o desenvolvimento das ciências biológicas, usaram figuras para reproduzir o que viam. O avanço tecnológico permite que hoje seja possível visualizar estruturas antes inimaginavelmente vistas.

A fotografia digital é uma das grandes inovações das últimas décadas e ao longo dos anos 2000, a fotomicrografia tem sido usada em várias áreas do conhecimento, com finalidades diversas, principalmente na área das ciências biológicas, com a finalidade de compreender melhor os processos envolvidos na dinâmica da vida.

O uso de imagens no desenvolvimento da aprendizagem é de grande relevância, principalmente quando se relaciona a organismos de difícil identificação. Sontag (1981) *apud* Yamamura e Souza (2009), afirmam que o uso da fotografia permite ampliar e transformar as noções sobre o que é importante observar. Essa seleção do que se deve observar é crucial na pesquisa e ensino em micologia.

Maria Inês Machado, doutora em Ciência pela USP, explica que a fotomicrografia é uma técnica usada na obtenção de imagens ampliadas permitindo analisar detalhes de estruturas não visíveis a olho nu, e que a qualidade e ampliação da imagem em fotomicrografia vai depender do tipo de microscópio (DUZETT, 2016).

A fotomicrografia pode ser usada como suporte na pesquisa, no estudo, no reconhecimento das estruturas fúngicas espécies-específicas e como ferramenta no ensino-aprendizagem da micologia. Além disso, é um método de aprendizagem muito comum no ensino, sendo utilizado também na comprovação de diversos resultados obtidos na pesquisa. Assim como afirma Freire (1996), as imagens como recurso didático, qualificam o processo de ensino-aprendizagem e possibilitam a construção do conhecimento.

1.5 A Microscopia Eletrônica de Varredura

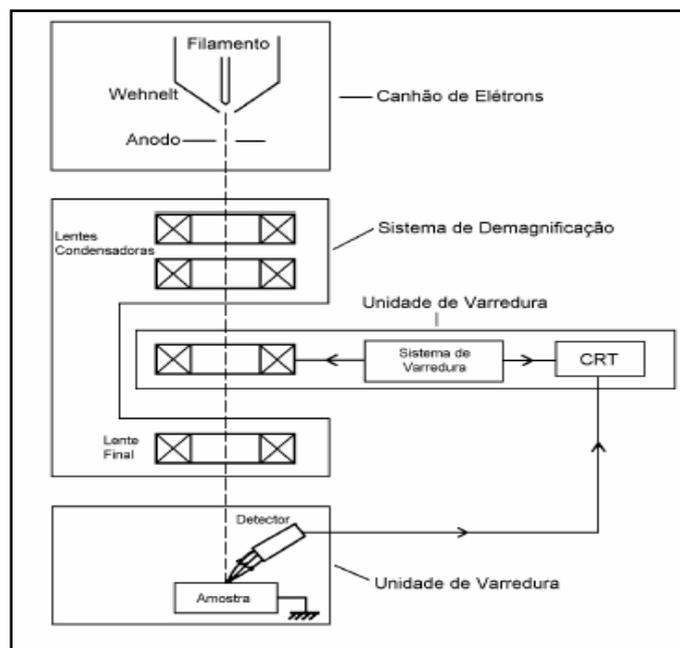
O desenvolvimento e melhoramento da microscopia eletrônica são relacionados de maneira íntima com o progresso das Ciências Biológicas, no último século (GALLETI, 2003).

Como afirma Maliska (2015), há cada vez mais, por meio da comunidade científica, a necessidade de se observar, analisar, compreender e explicar os fenômenos que ocorrem à escala micrométrica.

A microscopia de varredura é um tipo de microscopia eletrônica que produz imagens por meio da emissão de um feixe de elétrons que “varre” a superfície da amostra. É possível observar, por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV), a diversidade ultraestrutural de micro-organismos como os fungos, e isso permite a identificação dos patógenos de uma forma mais precisa, diferentemente de outros métodos de análise.

Para bem entender do funcionamento desse sistema, é necessário saber de seus componentes. O MEV possui elementarmente a coluna ótico-eletrônica (composta pelo canhão de elétrons e o sistema de demagnificação), a unidade de varredura, a câmara onde ficam as amostras, o sistema de detectores e o de visualização da imagem (figura 5) (MALISKA, 2015).

Figura 5- Representação esquemática dos componentes do MEV. (CRT – sistema de processamento das imagens).



Fonte: Maliska, 2015.

Maliska (2015) descreve os constituintes da coluna ótico-eletrônica: o canhão de elétrons gera os elétrons primários; as lentes condensadoras apontam o feixe de elétrons primários; as bobinas promovem o desvio do feixe de elétrons primários na horizontal ou

vertical em uma dada região da amostra, e ainda as bobinas que realizam as correções de astigmatismo. É importante que toda a coluna esteja sob vácuo durante a emissão do feixe de elétrons primários (MALISKA, 2015).

A varredura dos feixes é uma unidade ajustável ao nível de detalhes a serem observados na amostra. O aumento da varredura da imagem é a relação entre o tamanho da imagem no vídeo e o tamanho da área varrida (MALISKA, 2015). Quanto maior o aumento, menor é a área varrida, com uma precisão de detalhes maior.

A interação do feixe de elétrons com a amostra gera vários tipos de radiações, tais como os elétrons secundários e retroespalhados (MALISKA, 2015). Com a varredura do feixe de elétrons primários na amostra, sinais são fornecidos e vão sofrendo modificações de acordo com as variações na superfície da amostra. Os elétrons secundários são responsáveis por prover a imagem de topografia da superfície da amostra e a obtenção das imagens em alta resolução, já os retroespalhados geram a imagem que caracteriza a variação de composição (MALISKA, 2015).

Em contraste com a microscopia ótica, amplamente utilizada, o MEV permite a observação de materiais biológicos com uma ampliação e clareza muito maior, por alcançar aumentos bem mais significativos que a microscopia ótica (MALISKA, 2015).

O uso da microscopia eletrônica permite uma compreensão totalmente ampliada sobre os objetos de estudo, evidenciando e clareando ideias a respeito da ultraestrutura das células (GALLETI, 2003).

1.6 Justificativa

Devido a necessidade do conhecimento ultraestrutural das espécies fúngicas de importância médica, a confecção de um banco de imagens desses espécimes torna-se um método útil de entedimento, sendo usado como um recurso no ensino-aprendizagem e pesquisa na micologia médica.

1.7 Objetivo

O presente estudo teve como objetivo confeccionar um banco de imagens de patógenos fúngicos de importância clínica como um suporte à pesquisa e ao ensino-aprendizagem da micologia médica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostras

Para a confecção desse banco de imagens foram utilizadas cepas (Tabela 4) gentilmente cedidas pelos pós-graduandos do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM). Também foram usadas cepas para a produção de biofilmes fúngicos (*Candida* spp., *Trichosporon inkin*, *Fusarium solani*, dermatófitos). As amostras clínicas de raspados de pele e pelo humanos foram cedidas pela médica micologista do Hospital Universitário Walter Cantídio. As amostras chegaram até o CEMM para identificação laboratorial de rotina e, após liberação de laudo micológico, o material biológico remanescente foi liberado, de forma anônima, para uso neste projeto.

Tabela 6 - Relação de microrganismos estudados

Fungos	Espécie
Leveduras	<i>Candida albicans</i> *
	<i>C. parapsilosis</i>
	<i>C. krusei</i>
	<i>C. tropicalis</i>
	<i>Trichosporon inkin</i> *
	<i>Cryptococcus</i> spp.*
Filamentosos	<i>Microsporium canis</i>
	<i>M. gypseum</i>
	<i>Trichophyton rubrum</i>
	<i>T. mentagrophytes</i>
	<i>T. tonsurans</i>
	<i>Fusarium solani</i>
	<i>Penicillium</i> sp
	<i>Rhizomucor</i> sp
	<i>Syncephalastrum</i> sp**
Dimórfico	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i>

*sem origem definida

** amostra ambiental

2.2 Cultivo das amostras

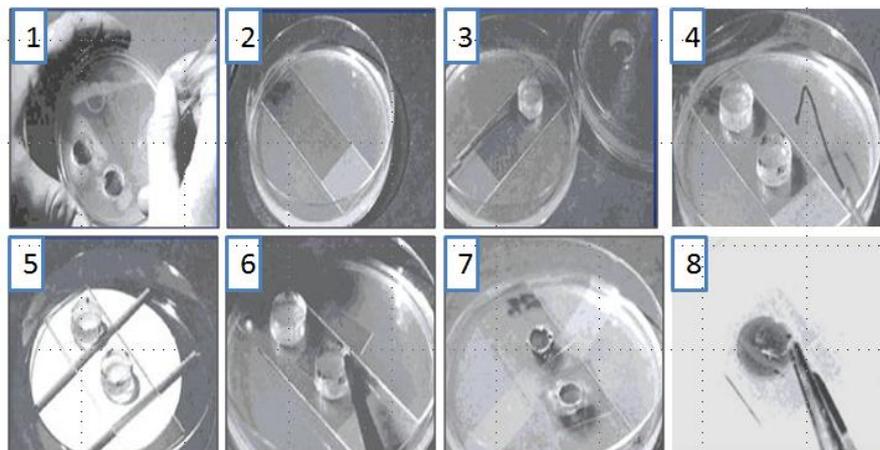
Para a obtenção das imagens, foi realizada a técnica do microcultivo, baseada em Sidrim e Rocha (2004), para todas as cepas analisadas, excetuando-se as amostras clínicas e

biofilmes. De acordo com Brasil (2013) a morfologia microscópica é mais bem visualizada em fungos filamentosos com a técnica de microcultivo que preserva a disposição original dos conídios sobre as hifas e mantém íntegras certas estruturas formadoras de esporos.

Foi colocado sobre uma lâmina estéril (26 mm x 76mm), contida em uma placa de Petri também estéril, um cubo de meio sólido, especificado para diferentes tipos fúngicos. A lâmina foi posta sobre um suporte, constituído de outra lâmina e dois bastões de plástico (Figura 6).

Os fungos foram semeados a partir de repiques recentes, nos quatro lados do cubo de ágar. Após isso, o cubo foi recoberto com uma lâmina estéril própria para a microscopia eletrônica, denominada Thermanox®. Para evitar a dessecação do meio de cultura durante o crescimento do fungo, foi feita uma câmara úmida, adicionando-se ao fundo placa de Petri um volume equivalente a 1ml de salina estéril com auxílio de uma pipeta Pasteur.

Figura 6 – Passo a passo de microcultivo de fungo filamentososo.



2.2.1 Cultivo de fungos leveduriformes

Para as leveduras foram utilizados dois métodos distintos. No primeiro, foi feito microcultivo em Ágar Corn Meal para *Candida* sp., Ágar batata para *Cryptococcus* spp. e Ágar malte para *Trichosporon inki*. Foram feitas três estrias em cada cubo e depois a lâmina Thermanox® foi posta em cima do cubo de Ágar. No segundo método, a cultura previamente crescida nos meios supracitados foi colocada em contato direto com lâmina Thermanox® por 1 hora. As cepas foram cultivadas por até quatro dias a 25°C. O microcultivo feito com as leveduras foi uma adaptação da técnica convencional, descrita por Sidrim e Rocha (2004).

2.2.2 Cultivo de fungos filamentosos e dimórficos

Para os fungos filamentosos, foram utilizados os meios Ágar Lactrimel ou Ágar Batata. O procedimento para o fungo dimórfico foi realizado de mesma maneira que para os filamentosos, pois este foi cultivado em sua forma filamentosa. O cultivo dessas cepas se deu por até 14 dias a 25° C.

2.3 Preparo de biofilmes fúngicos

Os biofilmes foram formados diretamente sobre as lâminas Thermanox[®] e/ou lentes Alphicon[®] em placas de polipropileno de 24 poços. O inóculo inicial de 1×10^6 células/ml foi formado, em meio RPMI e cultivado por até 72h a 35°C. O período de adesão se deu de 4h a 6h, e após isso, os biofilmes foram lavados com PBS estéril e novamente preenchidos com RPMI até o tempo final de incubação (em estufa a 35°C).

2.4 Processamento de amostras para visualização na microscopia Eletrônica de Varredura

Decorrido o período de incubação, as lâminas foram fixadas com 10% de glutaraldeído em tampão cacodilato (0,15M), com azul de alcian (0,1%), *overnight* a 4°C. Depois, as amostras foram lavadas com tampão cacodilato por duas vezes, e desidratados com séries alcoólicas ascendentes: 50, 70, 80, 95 e 100% de etanol, por 10 minutos e duas vezes cada. Após, as amostras foram desidratadas com hexametildisilazano durante 30 minutos e secos ao ar *overnight* e armazenadas em dissecador. Posteriormente, as lâminas foram recobertas com 10 nm de ouro (Emitech Q150T) e observadas em microscópio eletrônico de varredura FEI Inspect S50, em alto vácuo a 15 kV, localizado na Central Analítica da Universidade Federal do Ceará – UFC.

2.5 Amostras clínicas

Amostras de pele e pelo humanos foram armazenadas em geladeira -20°C e posteriormente foram fixadas com tampão de fixação (glutaraldeído 10% e tampão cacodilato) por 24h a 4°C. Para a desidratação, as amostras foram lavadas com tampão cacodilato (duas vezes), posteriormente centrifugadas (10 min e 4200rpm) e lavadas com álcool (50, 70, 80, 95 e 100%), 10 minutos e duas vezes cada. A cada lavagem, as amostras eram centrifugadas novamente para que nenhum material fosse perdido. Por fim, ficaram em

estufa a 35° por 20 min e tratadas com HMDS, por 30min. Antes da retirada do HMDS, mais uma vez, as amostras foram colocadas na centrífuga.

Da mesma maneira como as amostras de fungos filamentosos, leveduriformes e biofilmes, as amostras clínicas foram recobertas com 10 nm de ouro (Emitech Q150T) e observadas em microscópio eletrônico de varredura FEI Inspect S50, em alto vácuo a 15 kV, localizado na Central Analítica da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Algumas das imagens obtidas foram coloridas em *Photoshop* como um recurso didático.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme observado durante a análise das amostras no MEV, as melhores imagens foram obtidas quando o processamento se deu com glutaraldeído acrescido de Azul de Alcian a 0,1%. Essa combinação proporcionou uma melhor preservação das estruturas fúngicas. Por se ligar às moléculas da parede celular do fungo, este corante conferiu maior estabilidade e proteção, evitando danos maiores quando as amostras passavam pelo processo de desidratação. Pires, Travassos e Gärtner (2004) confirmam a observação feita dizendo que, pelo fato do Azul de Alcian conferir insolubilidade ao material, estes não são afetados por posteriores tratamentos com água ou álcool.

3.1 *Malassezia* sp.

A figura 1 (Apêndice A) evidenciou a colonização do agente causador da pitíriase versicolor em pele. Nas fotomicrografias, observaram-se, sobre as escamas, filamentos curtos e curvos de paredes grossas (figura 2 – Apêndice A) e a presença de leveduras ovais agrupadas (figura 3 – Apêndice A). Estas leveduras possuem tamanho aproximado de 3µm x 1 µm. Essas constatações corroboram com a literatura que relata que, ao exame microscópico direto, encontram-se filamentos curtos de parede espessas, levemente curvados e irregulares com leveduras esféricas ou ovais agrupadas em cachos (SIDRIM E ROCHA, 2004).

Outra característica muito importante observada na microscopia eletrônica foi a formação do colarete (figuras 1 e 3 – Apêndice A), que consiste em uma cicatriz consequente da divisão entre células mãe e filha. Essa formação é um achado característico de *Malassezia* sp.

3.2 Dermatófitos

A *tinea capitis* e o parasitismo de cabelo são algumas das manifestações clínicas de infecções por dermatófitos. As figuras 4 e 5 (Apêndice A) mostraram raspado de pele e pelo colonizados por leveduras com aspecto artroconidiado e filamentos finos e longos. No parasitismo do pelo (figuras 6 e 7- Apêndice A) observou-se a formação de muitos artroconídios bem pequenos (aproximadamente 1 µm) localizados externamente ao pelo em um arranjo em mosaico. Essa observação é confirmada pelos relatos de Sidrim e Rocha (2004) que ratificam o parasitismo do tipo ectotrix microspórico com as características apresentadas acima (presença de artroconídios de tamanho pequeno arranjados em mosaico).

3.2.1 *Microsporium* spp.

As fotomicrografias relativas à *Microsporium canis* revelaram a presença de macroconídios com maior espessura no centro, atenuando-se em direção às extremidades (figura 8 – Apêndice A). Pode-se identificar a superfície desses elementos com aparência rugosa (figura 9 – Apêndice A). De acordo com Sidrim e Rocha (2004), os organismos do gênero *Microsporium* sp. apresentam macroconídios, que estão divididos por septos e com a superfície de aspecto verrucoso. Em *Microsporium canis* há uma grande quantidade de macroconídios fusiformes, de paredes grossas. Não foram observadas presença de microconídios, pois como relatam Sidrim e Rocha (2004), estes ocorrem com menor frequência no gênero.

Nas figuras 10 e 11 (Apêndice A), observaram-se estruturas características de *Microsporium gypseum*. Essa espécie apresentou macroconídios de formato alongado regular (figura 10 – Apêndice A) com seis septos (figura 11 – Apêndice A). Observou-se também a extremidade distal arredondada do macroconídio (figura 11 – Apêndice A). Sidrim e Rocha (2004) dão prova desse achado quando descrevem os macroconídios de *M. gypseum* como estruturas simétricas, com três a sete septos, extremidades arredondadas e superfície rugosa. Apresentam paredes finas, tanto dos septos como as externas. Oliveira (2014) também aponta como característica desse grupo a parede fina dos macroconídios.

3.2.2 *Trichophyton* spp.

Como afirma Sidrim e Rocha (2004), o aspecto mais característico em organismos do gênero *Trichophyton* sp. é a presença de microconídios piriformes, ovalados ou redondos, que podem estar dispostos em acladium ou cachos.

Nas análises realizadas em *Trichophyton rubrum*, verificou-se a presença de microconídios dispostos em acladium (figura 12 – Apêndice A), que significa que estes estão dispostos intercalando-se na hifa. Estes microconídios possuíam formato de gota ou pêra, delicados e regulares. Notou-se também a septação das hifas. Esses achados são reiterados com a literatura de Oliveira (2014) que descreve a micromorfologia desses micro-organismos como hifas septadas e microconídios em gotas pequenas implantados alternadamente na hifa.

Em *Trichophyton tonsurans* pode-se encontrar características semelhantes de microconídios achados em *T. rubrum*. A diferença ocorreu no formato dos microconídios, que em *T. tonsurans* não apresentou um aspecto piriforme regular, tendo alguns apresentados com um molde mais ovalado ou arredondados (figura 13 – Apêndice A). Esse achado é comum,

pois Sidrim e Rocha (2004) declaram que a apresentação micromorfológica desse grupo se dá pela presença de numerosos microconídios dispostos em *acladium*, de aspecto grosseiro, sem homogeneidade de dimensão e forma entre eles. Clamidoconídios intercalares, hifas em raquete e arthroconídios não foram observados nas análises realizadas.

Também foi possível observar nas imagens (figura 13 – Apêndice A), que as hifas apresentaram-se colabadas, resultado ocorrido, possivelmente, devido ao processamento de secagem para observação em MEV. Esse resultado podia ser melhorado se, no fim do processo de desidratação, tivesse sido usado o Ponto Crítico, ao invés do HMDS. Esse método é de fácil uso e seguro, quando comparado com outros métodos de secagem e é o mais utilizado na maioria dos laboratórios (SANTOS, 2011). O Ponto Crítico é um aparelho que permite a secagem final dos materiais biológicos a serem analisados em MEV.

Na figura 14 (Apêndice A) observa-se como o microconídio está disposto na hifa de *T. tonsurans*. Essa fotomicrografia mostrou que o microconídio não está ligado diretamente à hifa, mas há uma haste que sustenta o microconídio. A conidiogênese nesse grupo dos dermatófitos se dá de forma tálica, que é quando toda a célula conidiogênica dá origem ao microconídio, como ocorre com a formação de arthroconídios (conidiogênese ártrica) e macroconídios e microconídios (conidiogênese holotálica) (SIDRIM E ROCHA, 2004).

As características marcantes encontradas em *Trichophyton mentagrophytes*, foram a presença de microconídios arredondados e reunidos, formando cachos (figura 15 – Apêndice A). Esse fato apoia a informação dada por Sidrim e Rocha (2004) que estabelecem uma estrutura exuberante para esse grupo, com grande quantidade de microconídios arredondados e agrupados, dando a aparência de cachos. Pode-se encontrar também macroconídios em forma de charuto, com até seis septos (SIDRIM E ROCHA, 2004). No entanto, nas análises feitas não foram encontradas essas estruturas.

Ainda, hifas em espiral, que são estruturas de ornamentação encontradas de forma exclusiva – patognomônica – em *T. mentagrophytes*, foram vistas (figura 16 – Apêndice A). Outras estruturas de ornamentação também podem ser avistadas nesse grupo, como órgãos nodulares, hifas em raquete e clamidoconídios intercalares (SIDRIM E ROCHA, 2004).

3.3 *Rhizomucor* sp.

Nas imagens obtidas desse fungo, constatou-se a presença de esporângios, esporangiósporos, hifas em estolão e rizoides. Assim como relata Sidrim e Rocha (2004), os esporângios encontram-se sustentados pelos esporangióforos, que se conectam com os

rizoides por hifas estolões que raramente apresentam septações (figura 17 – Apêndice A). Os esporangiósporos ficam protegidos pelo esporângio, no entanto, como observado na figura 18 (Apêndice A), visualizamos apenas os esporangióporos, devido a possível degradação do esporângio no processamento de desidratação e secagem para a obtenção das imagens.

3.4 *Histoplasma capsulatum var. capsulatum*

Os achados respectivos a esse patógeno caracterizaram-se pela presença abundante de macroconídios (figuras 19 e 20 – Apêndice A) conectados à hifas por uma segmentação dela e com projeções digitiformes em sua superfície. Sidrim e Rocha (2004) relatam que esse fungo dimórfico apresenta macro e microconídios em sua forma filamentosa, que os microconídios são ovalados, com paredes lisas, localizados em conidióforos que estão em ângulo reto com a hifa vegetativa. Os microconídios não foram observados nas fotomicrografias. Os macroconídios são denominados, na literatura, como macroconídios tuberculados ou estalagmosporos por apresentarem projeções digitiformes em toda a sua superfície, semelhantes a tubérculos (SIDRIM E ROCHA, 2004).

3.5 *Candida spp.*

Nas análises dos organismos do gênero *Candida spp.*, foram observadas estruturas como: blastoconídios, isolados e em brotamento, e pseudo-hifas. Na figura 21 (Apêndice A), observam-se blastoconídios arredondados de *Candida albicans* sem a formação de pseudo-hifas. No entanto, podem apresentar a formação de pseudo-hifas em seus achados microscópios, assim como afirma Sidrim e Rocha (2004).

A figura 22 (Apêndice A) mostra blastoconídios de *Candida krusei*, com a formação de pseudo-hifas. Os blastoconídios apresentados são ovais, dispostos na extremidade da pseudo-hifa. As pseudo-hifas encontradas nesse grupo são alongadas e delgadas (BRASIL, 2013).

A formação de pseudo-hifas em *Candida parapsilosis* pode ser visualizada nas figuras 23 e 24 (Apêndice A). É necessária a atenção na verificação da constrição na formação da pseudo-hifa, pois pode ser confundida com a formação do tubo germinativo. Segundo Sidrim e Rocha (2004) é preciso ter cuidado de não confundir tubos germinativos com pseudo-hifas. O tubo germinativo é asseptado, e não há constrição no ponto de inserção entre a estrutura da parede celular da projeção crescente e o blastoconídio, já a pseudo-hifa

apresenta constrição no ponto de inserção entre as estruturas da parede celular da projeção crescente e o blastoconídios (SIDRIM E ROCHA, 2004).

3.6 *Trichosporon inkin*

Nesse achado presenciou-se a formação de arthroconídios a partir da fragmentação da hifa (figura 25 - Apêndice A). Também podendo ser denominados de artrósporos, esses elementos são derivados da desagregação ou desarticulação da parede celular nas hifas (SIDRIM E ROCHA, 2004). Ainda, de acordo com Oliveira (2014), os arthroconídios são conídios que se formam pelo desmembramento das hifas septadas.

3.7 *Cryptococcus spp.*

Nas imagens obtidas de *Cryptococcus neoformans*, foi visualizado o fenômeno de brotamento celular dos blastoconídios (figura 26 - Apêndice A). Notou-se também a aparência mais grosseira da superfície celular dessa espécie. Essa nota é confirmada pelo relato de Sidrim e Rocha (2004) que estabelecem as células dessa espécie com aspecto globoso, e superfície levemente rugosa ou lisa, classificando o tipo de brotamento como basipetal.

Em *C. gattii* evidenciou-se o aspecto rugoso da superfície celular. Bem como também pode ser visto elementos de adesão entre as células no período de formação de biofilmes (figura 27 - Apêndice A). Esse fato corrobora com o discurso de Higa (2016) que elenca algumas etapas na formação de biofilme como a secreção de substâncias responsáveis na manutenção da adesão na superfície e da camada que envolve o biofilme, também há início da formação de microcolônias e do desenvolvimento da arquitetura do biofilme maduro.

3.8 *Fusarium solani*

A micromorfologia de *F. solani* é bem característica. Notou-se a presença dos microfialoconídios (figuras 28 e 29 – Apêndice A) possuindo a forma de canoa ou meia lua e com no mínimo dois septos. Esses elementos reafirmam as descrições achadas na literatura, de que os microfialoconídios de *F. solani* são bisseptados ou multisseptados e fusiformes (SIDRIM E ROCHA, 2004).

3.9 *Penicillium sp.*

Na fotomicrografia de *Penicillium sp.* (figuras 30 e 31 – Apêndice A) foi possível observar o arranjo das hifas hialinas septadas, com os conidióforos, fiáldes em formato de

garrafa e conídios esféricos dispostos em cadeias. A literatura tem relatado encontrar grande número de hifas hialinas septadas, conidióforos simples ou ramificados, hialinos ou pigmentados; células conidiogênicas em formato de garrafa (fiálides) e conídios em cadeias de extensão variável (SIDRIM E ROCHA, 2004).

3.10 *Syncephalastrum* sp.

Sidrim e Rocha (2004) caracterizam esse grupo no aspecto micromorfológico com a presença do esporangióforo principal com ramificações laterais curtas e, na extremidade destas, encontram-se vesículas saculiformes (merosporângios) com cadeias de esporos (merósporos). Nas figuras 32 e 33 (Apêndice A) não foi possível observar o merosporângio recobrimo os merósporos. Este deve ter sido perdido quando do processamento para a obtenção das imagens em MEV. Porém, foi possível observar o esporangióforo e merósporos.

3.11 Biofilmes

Nas figuras 34 e 35 (Apêndice A) foi possível observar a organização de *Candida* spp. em biofilme. Na figura 34 mostrou um biofilme maduro (crescimento de 48h) de *Candida tropicalis* em lâmina de Thermanox®. Na fotomicrografia viu-se uma grande quantidade de blastoconídios que estão, aparentemente, aderidas firmemente ao substrato. Já a figura 35 (*C. albicans*) evidenciou outro aspecto dos biofilmes formados por *Candida* spp. que é a presença de blastoconídios associados a hifas ou pseudo-hifas. Douglas (2004) confirma esse achado relatando que após o crescimento por 48h encontra-se em biofilmes de *Candida* sp., aglomerados de blastoconídio, hifas e pseudo-hifas.

A figura 36 (Apêndice A) demonstrou a cinética de crescimento do biofilme de *Trichosporon inkin* formado sobre lâmina de Thermanox® nos tempos de 4h, 24h, 48h e 72 horas. Dessa forma, pode-se verificar as etapas do biofilme estabelecidas para esse grupo desde o início, com a adesão celular até a formação de canais de água com grande quantidade de material amorfo. A formação dos biofilmes confere ao micro-organismo uma resistência elevada aos antifúngicos e à imunidade do hospedeiro, tendo esse material amorfo, que é a matriz extracelular produzida pelas próprias células, como um dos fatores que mais favorecem ao estabelecimento desses fenótipos (FLEMING, 2007).

Outro aspecto importante dos biofilmes pode ser discutido com a análise da figura 37 (Apêndice A) que mostrou como é o morfotipo do biofilme de *T. inkin* cultivado sobre cateter por 48h. Além de uma grande quantidade de material amorfo (matriz extracelular), um

entrelaçado de células e pseudo-hifas ser visto na figura. Di Bonaventura *et al.* (2006) relata a grande capacidade de adesão dos biofilmes de *T. inkin* em substratos abióticos, como cateteres e próteses. Fleming (2007) ainda disserta sobre a funcionalidade dessa matriz, que preserva melhor as células do biofilme, impedindo, por exemplo, que antifúngicos penetrem e cheguem até às células, tornando tratamentos menos eficazes.

Os canais de água puderam ser visto também em biofilme de *T. inkin* e revelam um estágio mais maduro do biofilme (figura 38 – Apêndice A). Esses canais existem para que haja a troca de nutrientes, oxigênio e metabólitos. Hallstoodley-Costerton e Stoodley (2004) afirmam que esses canais são característicos de biofilmes maduros e que funcionam como um sistema de circulação e entrega de nutrientes, da superfície para o interior do biofilme.

A figura 39 (Apêndice A) aponta as características do biofilme de *Fusarium solani* formado sobre uma lente de contato Alphafilcon® em 48h de cultivo. Observou-se um tapete denso de hifas. Segundo Imamura e colaboradores (2007), a atividade metabólica, espessura e arquitetura desses biofilmes depende do tipo de lente sobre o qual é formado. Ainda, é possível que o aumento da incidência de ceratites ocasionadas por *Fusarium* sp. sejam provenientes da formação de biofilmes nas lentes, nos estojos das lentes ou no tecido córneo.

Recentemente descobriu-se a capacidade de formação *ex vivo* de biofilmes por fungos dermatófitos (COSTA-ORLANDI, 2014). Estudos nesse âmbito estão em expansão, no sentido de saber se a formação pode ocorrer no cenário *in vivo*. Apesar de poucos relatos em infecções, é sabido da propensão desses fungos de também formarem biofilmes. A figura 40 (Apêndice A) mostrou um biofilme de *Trichophyton tonsurans* formado sobre unha humana e a figura 41 (Apêndice A) revelou biofilme de *Microsporum gypseum*, inclusive apresentando seus macroconídios fusiformes.

3.12 Fotomicrografia didática

As figuras do Apêndice B foram tratadas em programa computacional Photoshop para que recebessem coloração e suas estruturas fossem mais bem evidenciadas e compreendidas. Estudos reportam que o cérebro atenta mais para as informações das imagens quando estas são coloridas. Esse fato promove uma maneira mais eficaz de aprendizado. Guimarães (2004) ressalta que a cor é usada na transmissão da informação e não como informação (cor-informação), pois ela comunica, promove a compreensão e informa, permitindo a construção de significados. Oliveira (2009) confirma esse fato e ressalta que a utilização das cores adequadas em imagens exprime uma possibilidade maior de envolvimento no aprendizado.

Imagens como as das figuras 5, 7, 10 e 14 (Apêndice B) favoreceram o entendimento de estruturas distintas, com cores diferentes para cada uma delas, concedendo ao indivíduo que olha a imagem uma clareza maior das partes de um todo. As cores também evidenciaram estruturas que não foram possíveis de serem observadas com tanta nitidez, quando comparadas com as matizes em contraste de cinza, como nas figuras 1, 4, 13, 18 e 20 (Apêndice B).

4. CONCLUSÕES

- A construção desse banco de imagens possibilita o melhor entendimento das estruturas fúngicas, bem como facilita a identificação morfológica e ultraestrutural dos espécimes microbiológicos;
- Essas imagens também contribuem sendo suporte na explanação de resultados em diversos experimentos, mostrando-os de forma mais evidente e clara;
- O processo de ensino-aprendizagem também é favorecido com uso desse banco de imagens, pois permite a compreensão de elementos antes difíceis de serem entendidos.

REFERÊNCIAS

- ASHBEE, H. R.; EVANS, E. G. V. Immunology of Diseases Associated with *Malassezia* species. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, n.1, p.22-48, 2002.
- BORMAN, M. A.; LINTON, J. C.; OLIVER, D.; PALMER, D. M.; SZEKELY, A.; ODDS, C. F. and JOHNSON, M. E. Pyrosequencing analysis of 20 nucleotides of internal transcribed spacer 2 Discriminates *Candida parapsilosis*, *Candida metapsilosis*, and *Candida orthopsilosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.47,n. 7, p. 2307-2310, 2009.
- BORGES, A. S.; FERREIRA, M. S.; SILVESTRE, M. T. A.; NISHIOKA, S. A.; ROCHA, A. Histoplasmose em pacientes imunodeprimidos: estudo de 18 casos observados em Uberlândia, MG. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** vol.30, n.2, p. 119-124, 1997.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. **Módulo 8: Detecção e identificação de fungos de importância médica** /Agência Nacional de Vigilância Sanitária.– Brasília: Anvisa, 2013.
- CONGRESSO NORTE-NORDESTE DE PESQUISA E INOVAÇÃO (CONNEPI), **Tricosporonose: Etiologia, Manifestações Clínicas, Diagnósticos Laboratoriais, Epidemiologia e Tratamento**. Alagoas: Connepi, 2010. Disponível em: <<http://connepi.ifal.edu.br/ocs/index.php/connepi/CONNEPI2010/paper/viewFile/1134/634>>. Acesso em: 12 out. 2016.
- COSTA-ORLANDI, C.B.; SARDI, J. C. O.; SANTOS, C. T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. In vitro characterization of *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* biofilms. **Biofouling**, [s.l.], v. 30, n. 6, p.719-727, 2014.
- COSTERTON, J W; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Microbial Biofilms. **Annual Review Of Microbiology**, [s.l.], v. 49, n. 1, p.711-745, out. 1995.
- DI BONAVENTURA, G.; POMPILIO, A.; PICCIANI, C.; IEZZI, M.; D'ANTONIO, D.; PICCOLOMINI, R. Biofilm formation by emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii*: development, architecture and fungal resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.50, n.10, p. 3269-3276, 2006.
- DONLAN, R. M. Biofilms and device-associated infections. **Emerging. Infect. Dis.**, v. 7, p.277-281, 2001.
- DOUGLAS, J. L. *Candida* biofilms and their role in infection. **Trends in Microbiol**, v. 11, p. 30-36, 2004.
- DUNNE, W.M. Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? **Clin Microbiol Rev.** v. 15, p. 155-166, 2002.
- DUZETT, P. **A arte da fotomicrografia**. Disponível em: <<http://duzettdistrict.com.br/a-arte-da-fotomicrografia/>>. Acesso em: 10 out. 2016.

FLEMING, H. C.; NEU, T. R.; WOZNIAK, D. J. The EPS matrix: “the house of biofilm cells”. **J. Bacteriol.** v.189, n.22, p.7945-7947, 2007

FORTALEZA, S. C. B.; LOPES, S. K. A.; BANDEIRA, T. J.; NOGUEIRA, T. N. A. G.; HOLANDA, M. A. Histoplasmose disseminada aguda em indivíduo imunocompetente. **J bras pneumol.** v.30, n.3, p.270-273, 2004.

FREIRE, P. **Pedagogia da autonomia: Saberes necessários à prática educativa.** São Paulo: Paz e Terra, 1996.

GALLETI, S. R. Introdução a Microscopia Eletrônica. **Biológico,** São Paulo, v. 65, n. 1/2, p.33-35, 2003.

GUIMARÃES, L. **A Cor Como Informação,** São Paulo: Annablume, 3ª ed. 2004.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J.W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology,** v. 2, p. 95- 108, 2004.

HIGA, J. S. **Biofilmes bacterianos: vivendo em comunidade.** Disponível em: <http://www.icb.usp.br/bmm/ext/index.php?option=com_content&view=article&id=158:biofilmes&catid=12:geral&lang=br>. Acesso em: 13 nov. 2016.

IMAMURA, Y.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K.; LATTIF, A, A.; SZCZOTKA-FLYNN, L. B.; PEARLMAN, E.; LASS, J. H.; O’DONNELL, K.; GHANNOUM, M. A. *Fusarium* and *Candida albicans* Biofilms on Soft Contact Lenses: Model Development, Influence of Lens Type, and Susceptibility to Lens Care Solutions. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy,** v. 52, n. 1, p.171-182, 2007.

LARSSON, C. E. Esporotricose. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.,** São Paulo, v. 48, n. 3, p. 250-259, 2011.

MALISKA, A.M. **Microscopia Eletrônica de Varredura.** Disponível em: <http://www.usp.br/nanobiodev/wp-content/uploads/MEV_Apostila.pdf>. Acesso em: 27 jun. 2015.

MORAES, A. M. L.; PAES, R. A.; HOLANDA, V. L. Micologia. In: MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde.** Rio de Janeiro: Epsjv; Ioc, p. 399-496. 2009.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica.** 6 ed. Ed. Elsevier, 2009.

OLIVEIRA, N. M. F.; COUTINHO, F. A. A influência das cores na identificação e interpretação de imagens no ensino de Ciências. *In:* VII Enpec – Encontro Nacional em Pesquisa Educação em Ciências. **Anais do VII Enpec – Encontro Nacional em Pesquisa Educação em Ciências.** Florianópolis, 2009.

OLIVEIRA, J. C. **Tópicos em Micologia Médica**. Rio de Janeiro, 2014.

OLIVEIRA, J. C. **Micologia Médica ao Microscópio** - Respostas: Fungos e outros microrganismos de interesse no diagnóstico micológico. Vol.4, Rio de Janeiro: 2015

PERES, N. T. A.; MARANHÃO, F. C. A.; ROSSI, A.; MARTINEZ-ROSSI, N. M. Dermatofitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. **An Bras Dermatol.**; p. 657-667, 2010.

PIRES, N. A.; TRAVASSOS, F. S.; GÄRTNER, F. **Atlas de Patologia Veterinária**; Lidel; Porto, p. 157-171, 2004.

SANTOS, J. M. **Curso de Microscopia Eletrônica de Varredura de Fitonematóides**, UNESP/Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. 2011. Disponível em: <<http://nematologia.com.br/wp-content/uploads/2011/08/scan02.pdf>>. Acesso em: 29 out. 2016.

SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 1999.

SIDRIM J.J.C., ROCHA, M.F.G., **Micologia Médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanaba Koogan p. 135-161, 2004.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W. & AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiol Rev.** v. 36, p. 288-305, 2012.

SOUZA, A. E. F.; VIEIRA, K. V. M.; GOMES, L. F. A. V. Isolamento e identificação da microbiota fúngica anemófila em diversos setores do centro de ciências biológicas e da saúde da Universidade Estadual da Paraíba. **Revista de Biologia e Farmácia**, Alagoas, v. 2, n. 2, p.31-49, 2008.

TOBUDIC, S.; LASSNIGG, A.; KRATZER, C.; GRANINGER, W.; PRESTERL, E. Antifungal activity of amphotericin B, caspofungin and posaconazole on *Candida albicans* biofilms in intermediate and mature development phases. **Mycoses.** v.53, n.3, p.208-14, 2010.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, CL. **Microbiologia**. 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3ed, São Paulo: Atheneu, 1999.

XAVIER, M. O.; OLIVEIRA, F. M.; SEVERO, L. C. Capítulo 1: diagnóstico laboratorial das micoses pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, [s.l.], v. 35, n. 9, p.907-919, set. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-37132009000900013>. Acesso em: 11 out. 2016.

YAMAMURA, M. H.; SOUZA, M. I. P. O. O ensino de fotografia no curso de Medicina Veterinária. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 2, p.461-470, 2009.

ZAITS, C.; CAMPBELL, I.; RUIZ, L. R.B.; FRAMIL, V. M. S. **Compêndio de Micologia Médica**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

APÊNDICE A – IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

❖ <i>Malassezia</i> spp. -----	Figuras 1-3
❖ Dermatófitos -----	Figuras 4-16
❖ Zigomicetos -----	Figuras 17-18
❖ <i>Histoplasma capsulatum</i> -----	Figuras 19-20
❖ <i>Candida</i> spp. -----	Figuras 21-24
❖ <i>Trichosporon inkin</i> -----	Figura 25
❖ <i>Cryptococcus</i> spp. -----	Figura 26-27
❖ <i>Fusarium</i> spp. -----	Figuras 28-29
❖ <i>Penicillium</i> spp. -----	Figuras 30-31
❖ <i>Syncephalastrum</i> sp. -----	Figuras 32-33
❖ Biofilmes -----	Figuras 34-41

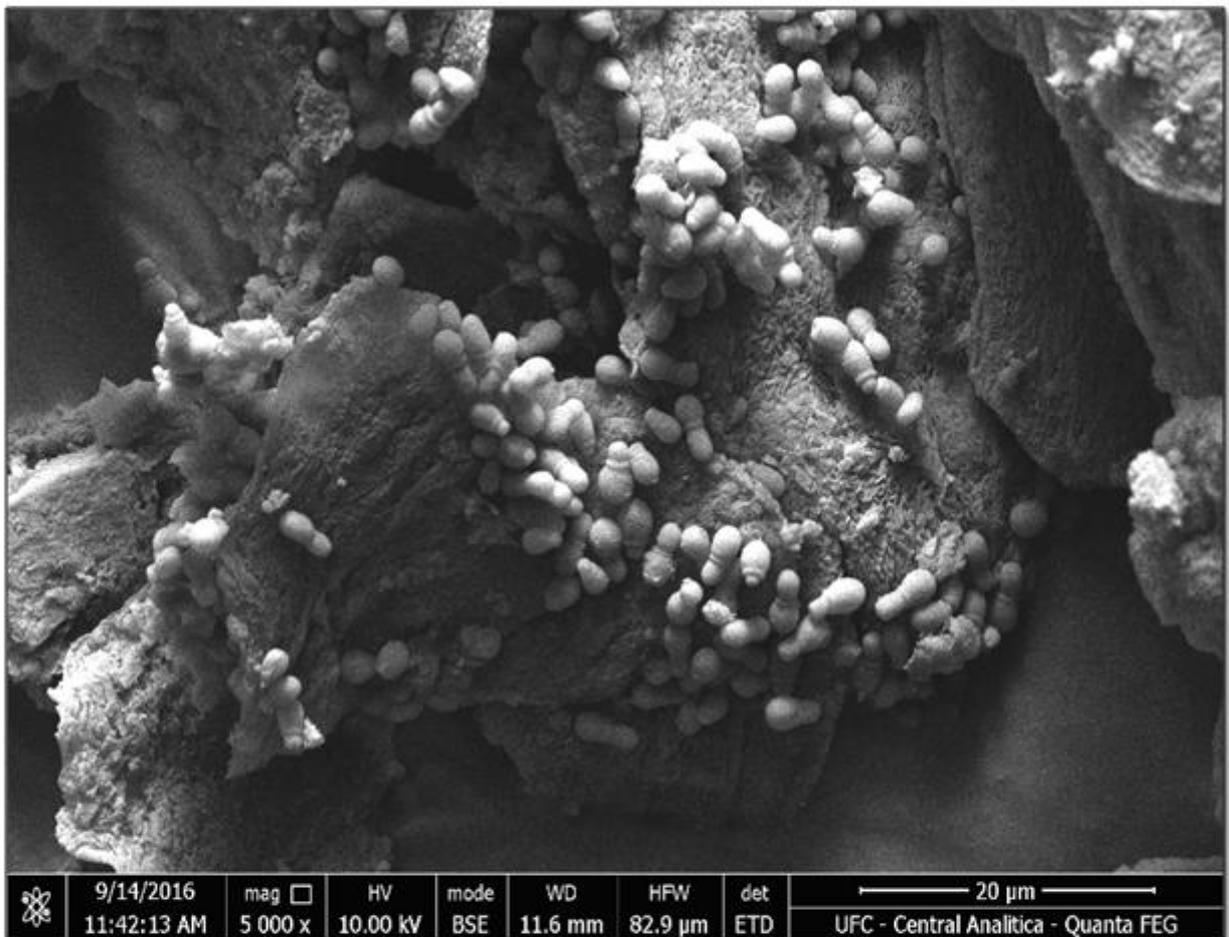


Figura 1. Raspado de pele de paciente com pitíriase versicolor. Visualização de numerosos blastoconídios ovais de *Malassezia* sp. em brotamento com colarete. Aumento: 5.000x

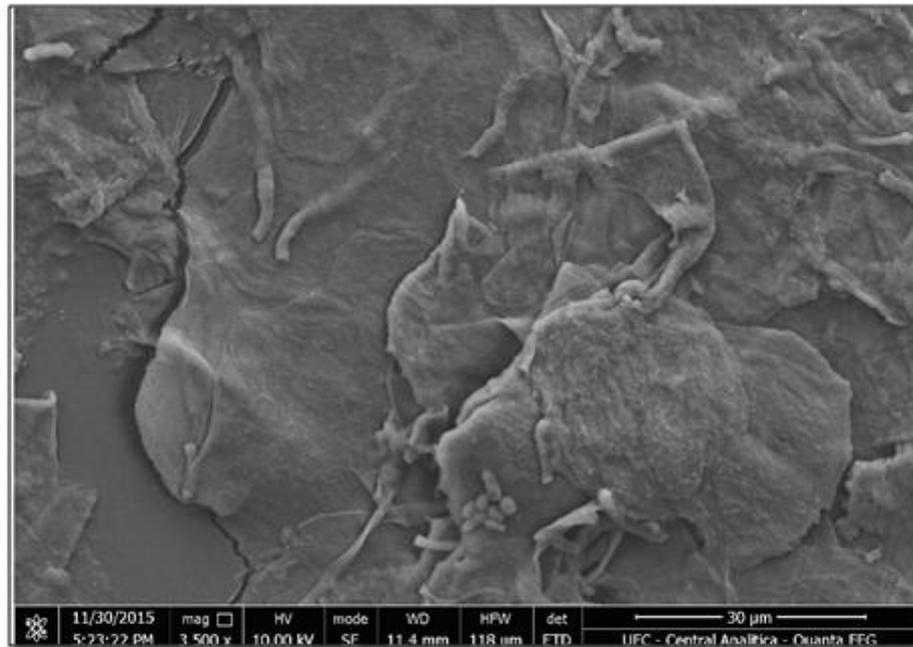


Figura 2. Raspado de pele de paciente com pitíriase versicolor. Visualização de hifas curtas e curvas e blastoconídios ovais de *Malassezia* sp. Aumento: 3.500x

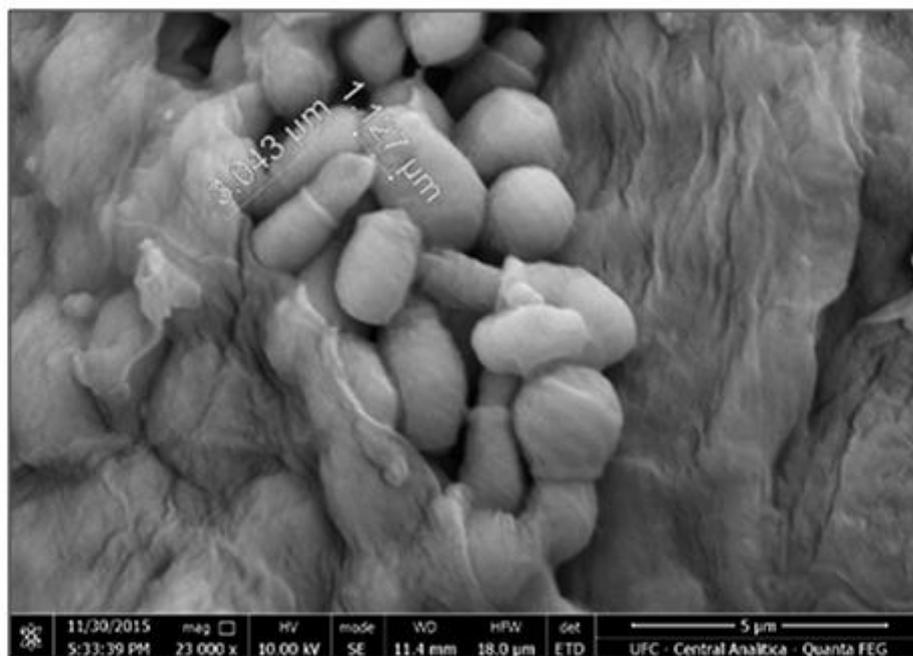


Figura 3. Detalhe dos blastoconídios de *Malassezia* sp. em paciente com pitíriase versicolor. Aumento: 23.000x

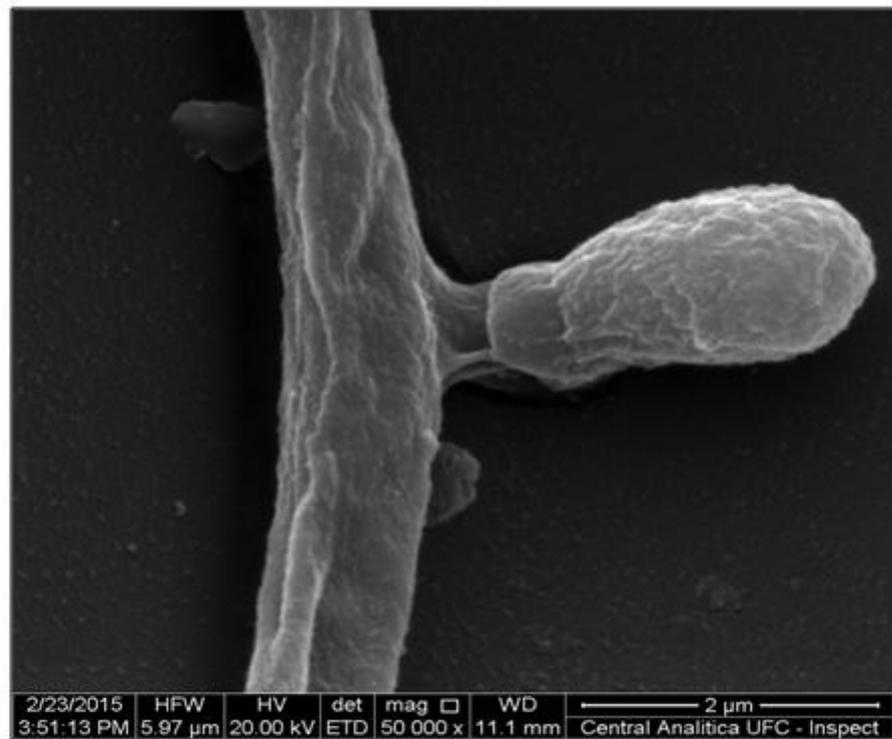


Figura 14. Detalhe da inserção do microconídio de *Trichophyton tonsurans* na hifa. Aumento 50.000x.

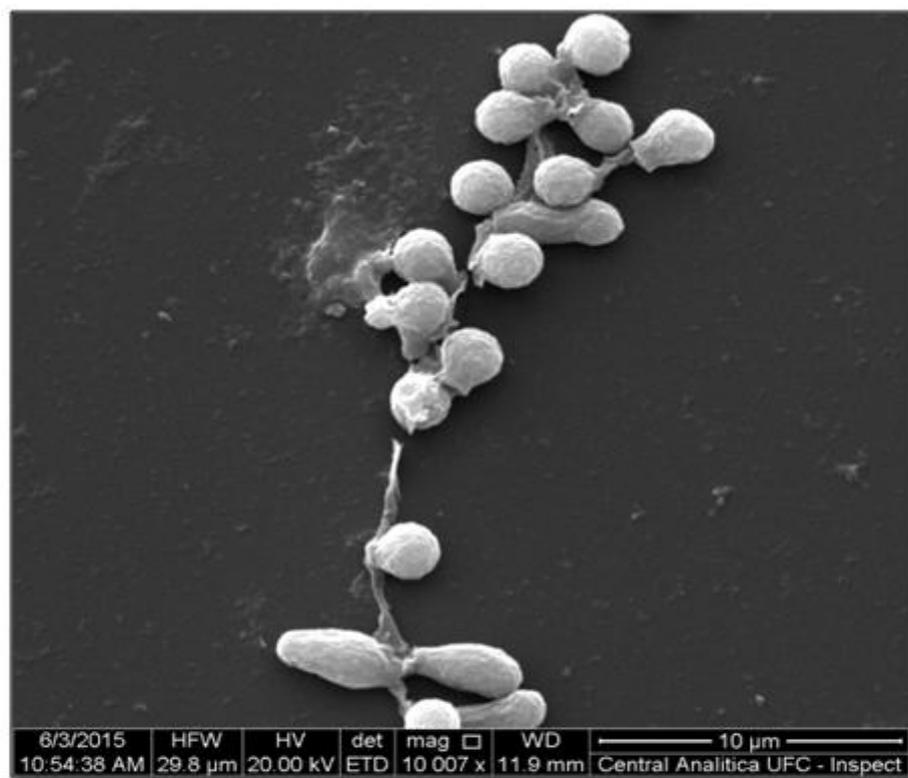


Figura 15. Microconídios arredondados de *Trichophyton mentagrophytes* agrupados em cacho. Aumento 10.000x

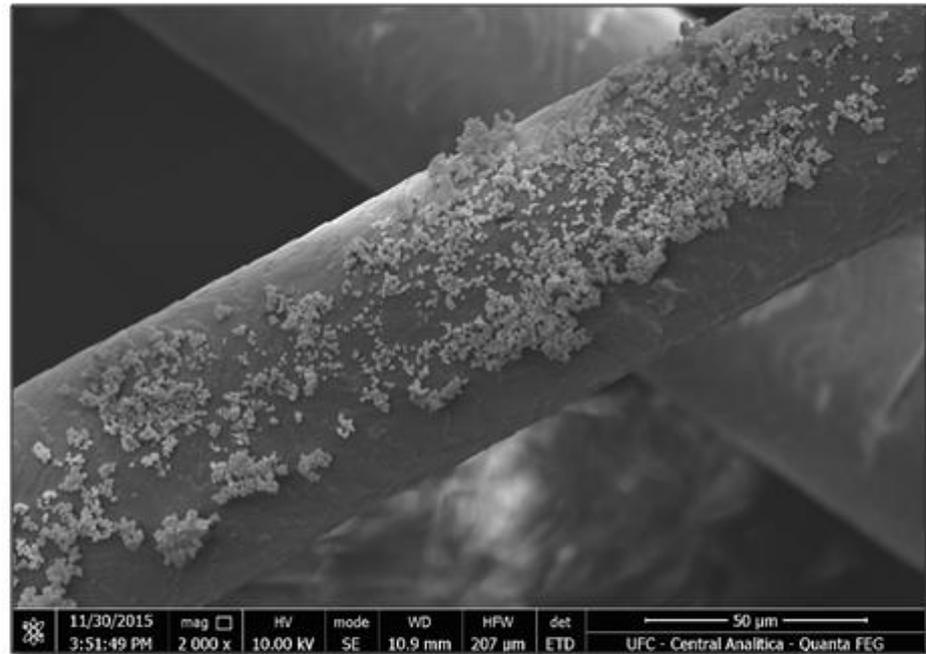


Figura 6. Parasitismo ectotrix microspórico em cabelo humano
Aumento 5.000x

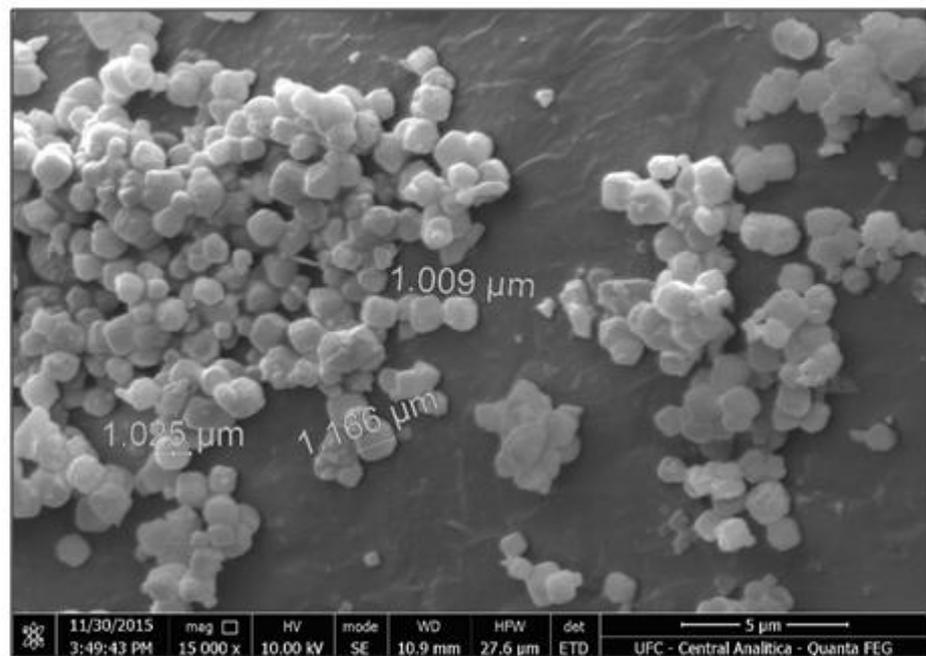


Figura 7. Detalhe dos atroconídios em parasitismo ectotrix.
Aumento 15.000x



Figura 8. Macroconídio de *Microsporum canis* com formato fusiforme característico. Aumento 10.000x

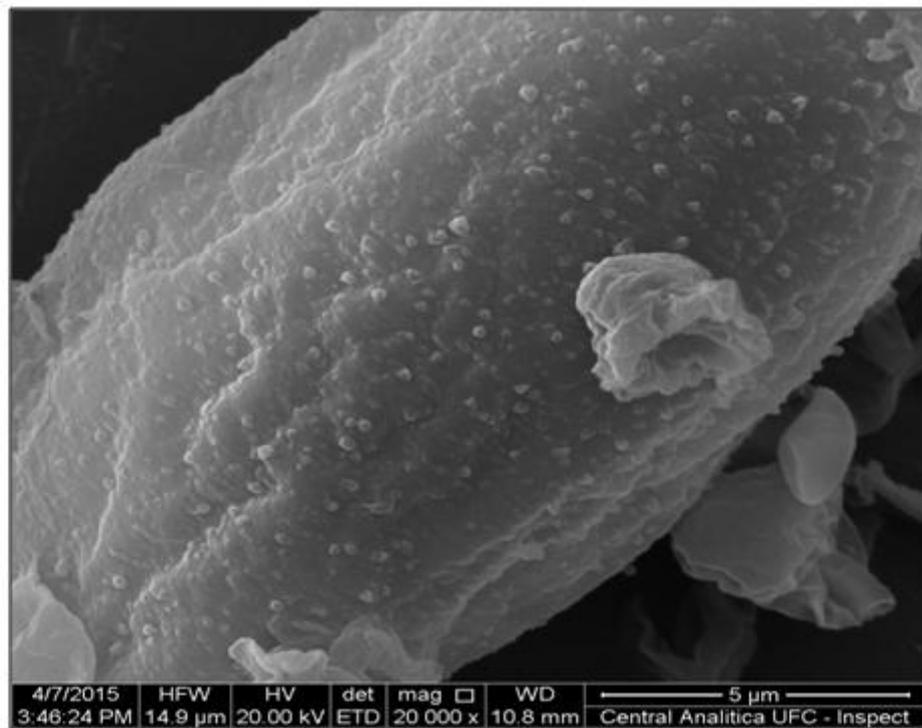


Figura 9. Detalhe do macroconídio fusiforme de *Microsporum canis*, revelando rugosidades na superfície celular. Aumento 20.000x

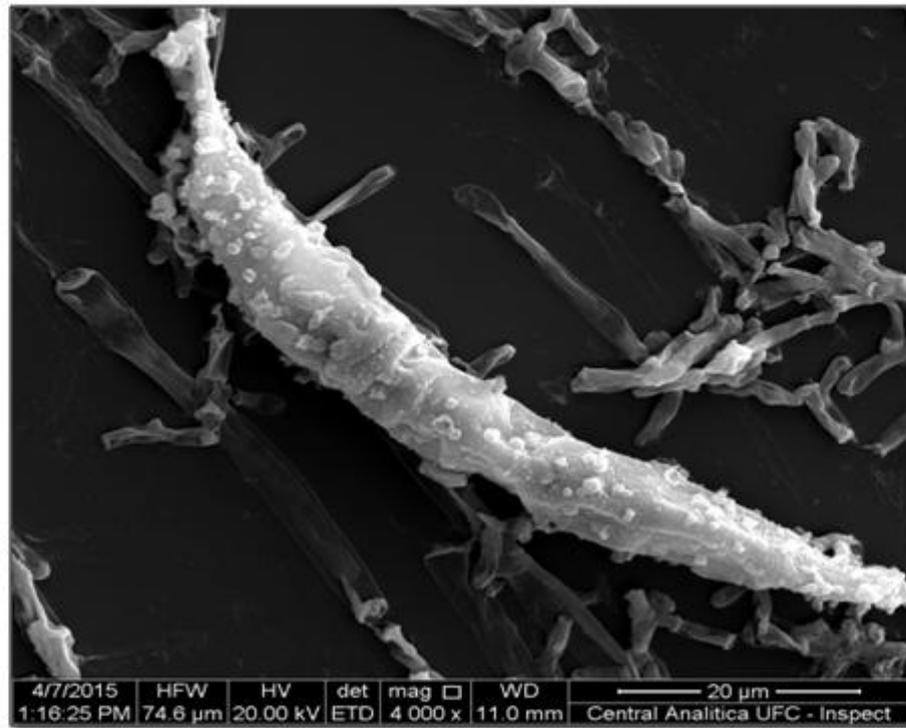


Figura 10. Macroconídio de *Microsporium gypseum* com formato alongado característico. Aumento 4.000x



Figura 11: Detalhe do macroconídio de *Microsporium gypseum* mostrando as circunvoluções que marcam os septos internos. Observa-se a extremidade distal arredondada característica. Aumento 4.000x

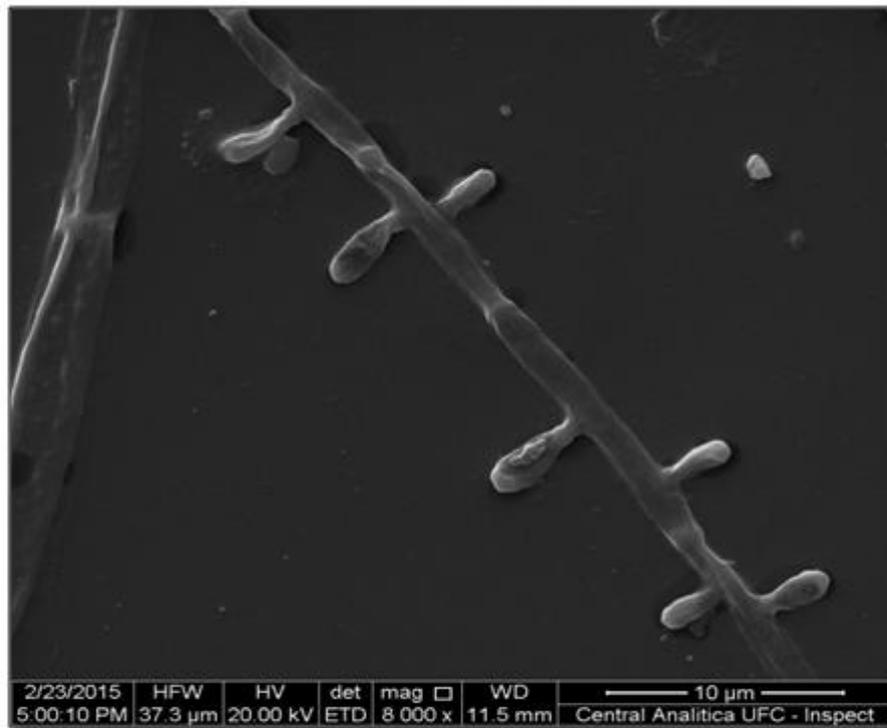


Figura 12. Microconídios piriformes de *Trichophyton rubrum* dispostos em *acladium*. Aumento 8.000x

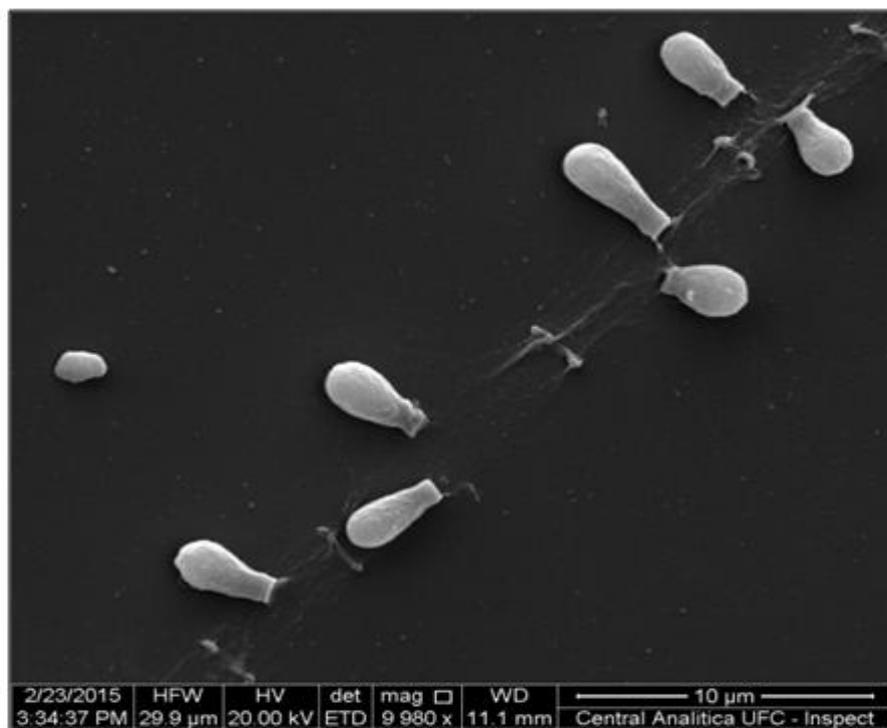


Figura 13. Microconídios piriformes e arredondados de *Trichophyton tonsurans* dispostos em *acladium*. Aumento 10.000x

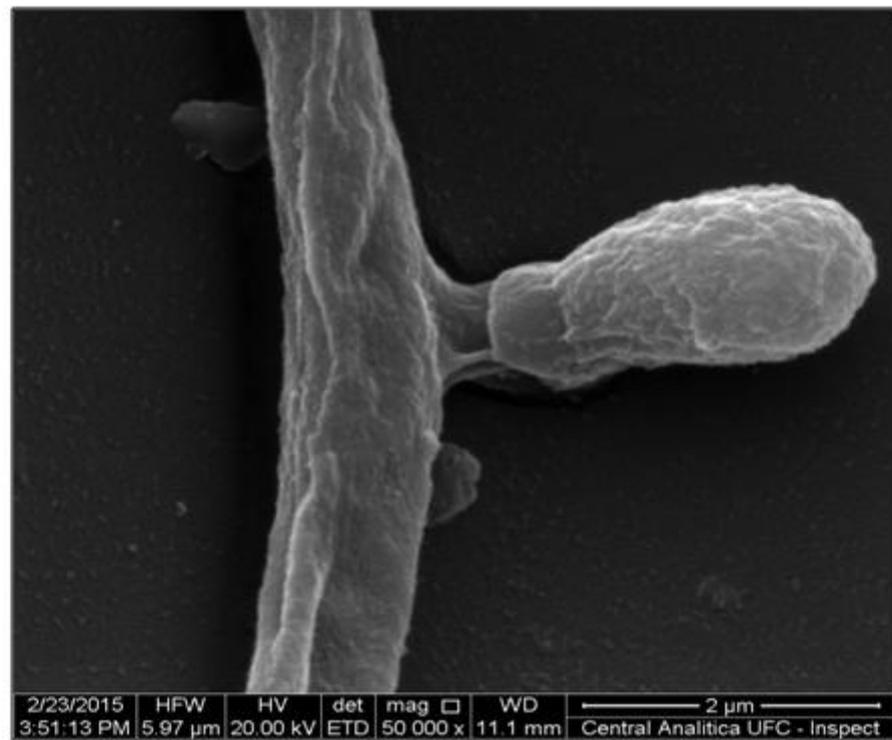


Figura 14. Detalhe da inserção do microconídio de *Trichophyton tonsurans* na hifa. Aumento 50.000x.

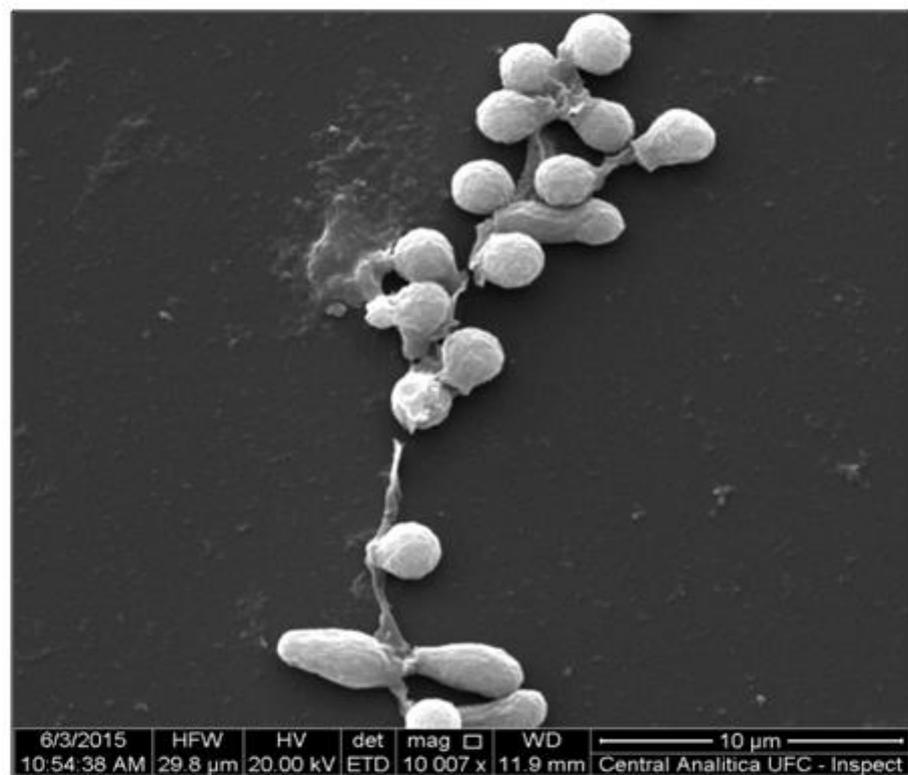


Figura 15. Microconídios arredondados de *Trichophyton mentagrophytes* agrupados em cacho. Aumento 10.000x

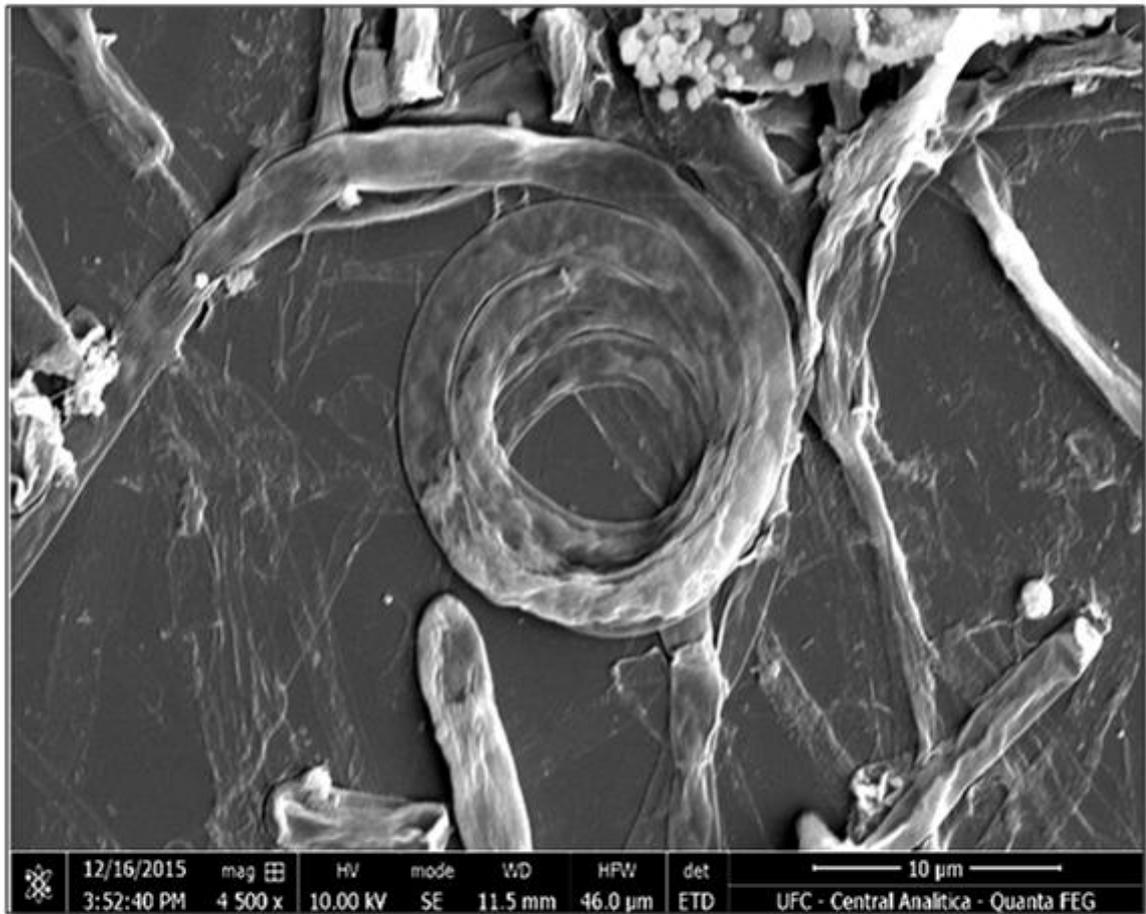


Figura 16. Hifa em espiral. Estrutura de ornamentação característica de *Trichophyton mentagrophytes*. Aumento 4.500x

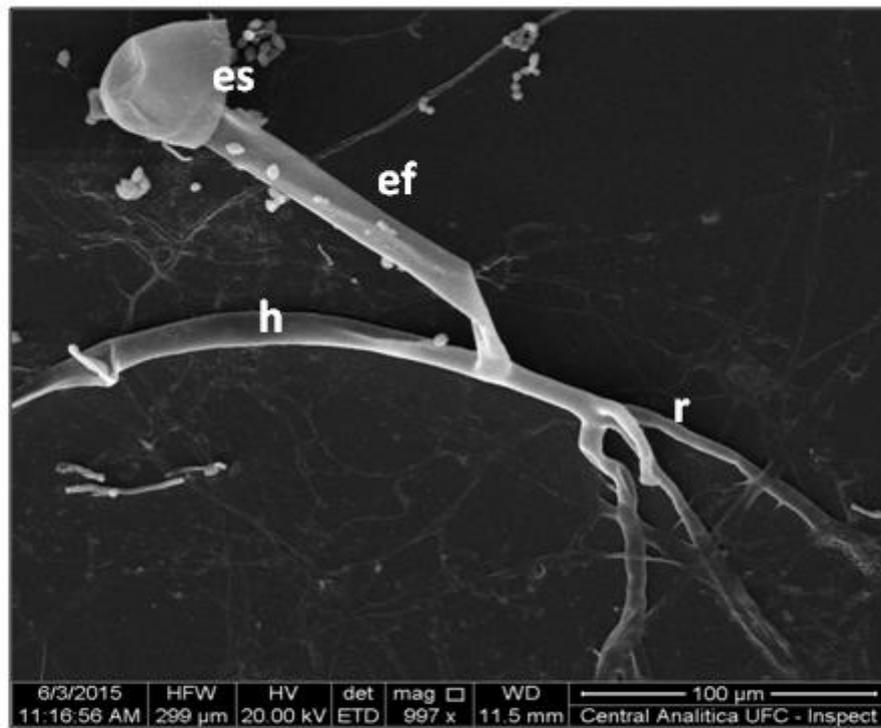


Figura 17. Esporângio (es), esporangióforo (ef), hifas estolões (h) e rizóides (r) de *Rhizomucor* sp. Aumento: 997x

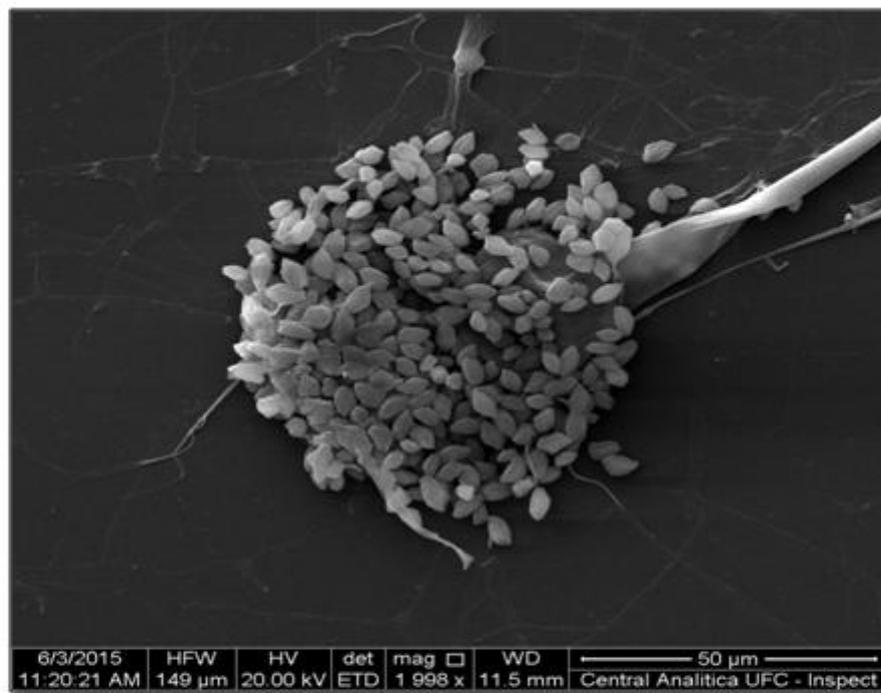


Figura 18. Esporangióporos sem a proteção do esporângio em *Rhizomucor* sp. Aumento: 1998x

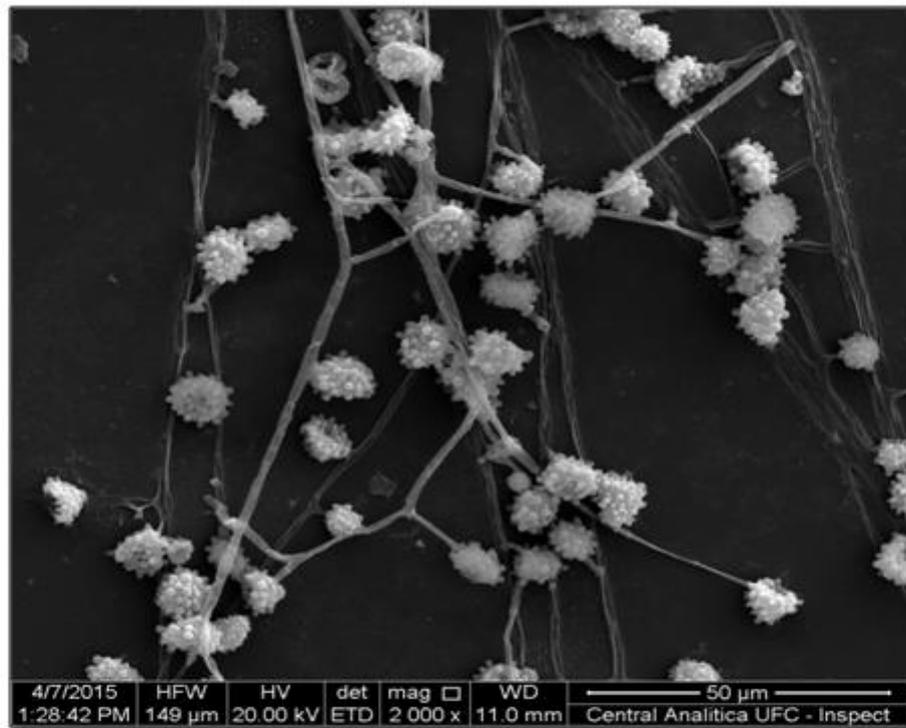


Figura 19. Conjunto de macroconídios tuberculados de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. Aumento: 2.000x

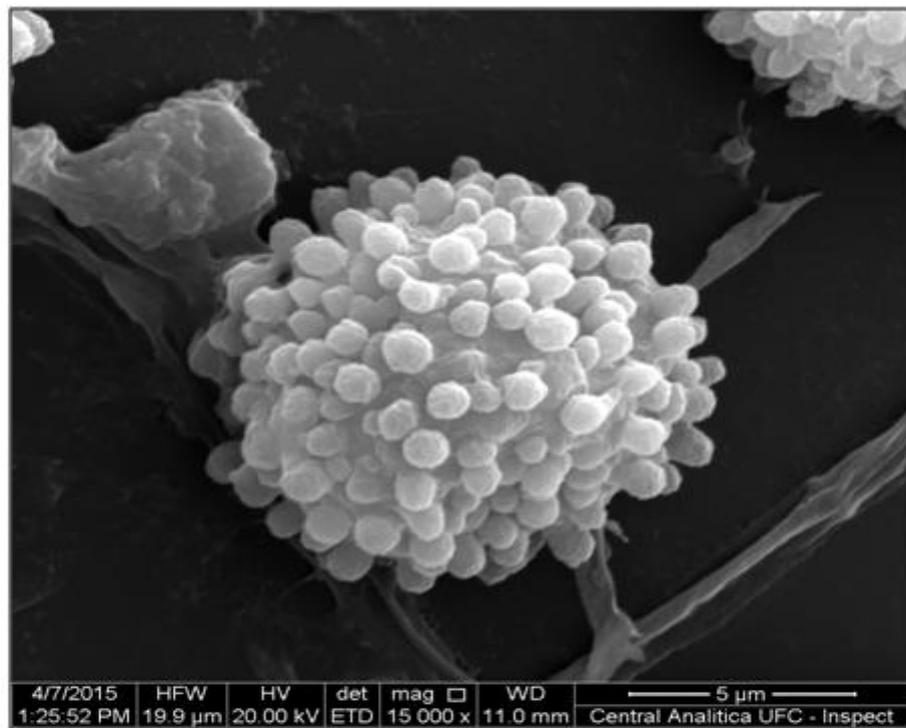


Figura 20. Detalhe do macroconídio tuberculado de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. Aumento: 15.000x

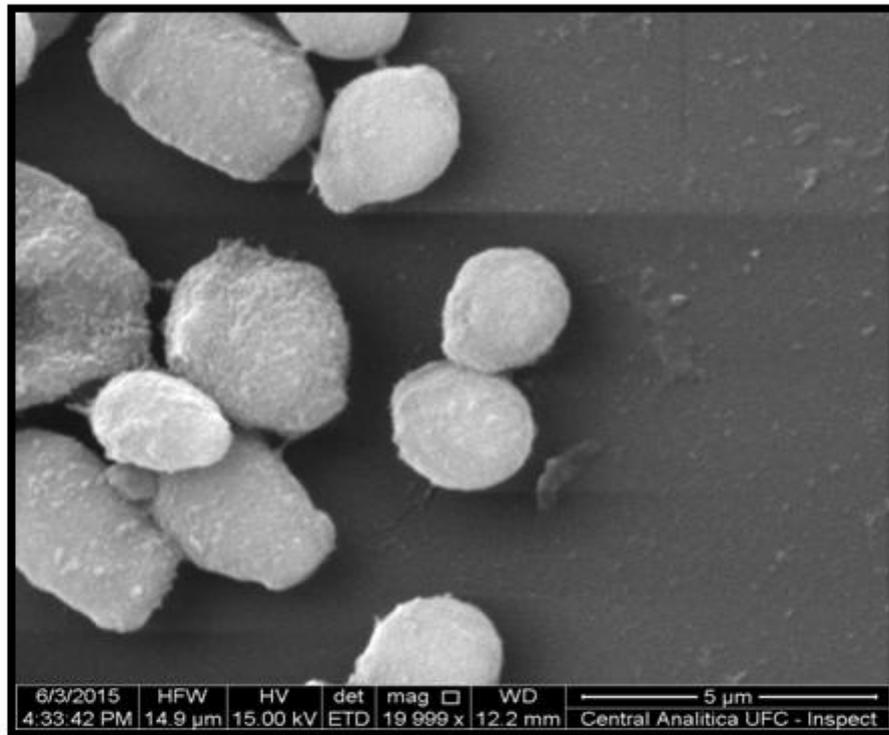


Figura 21. Blastoconídios de *Candida albicans*. Aumento: 19.999x

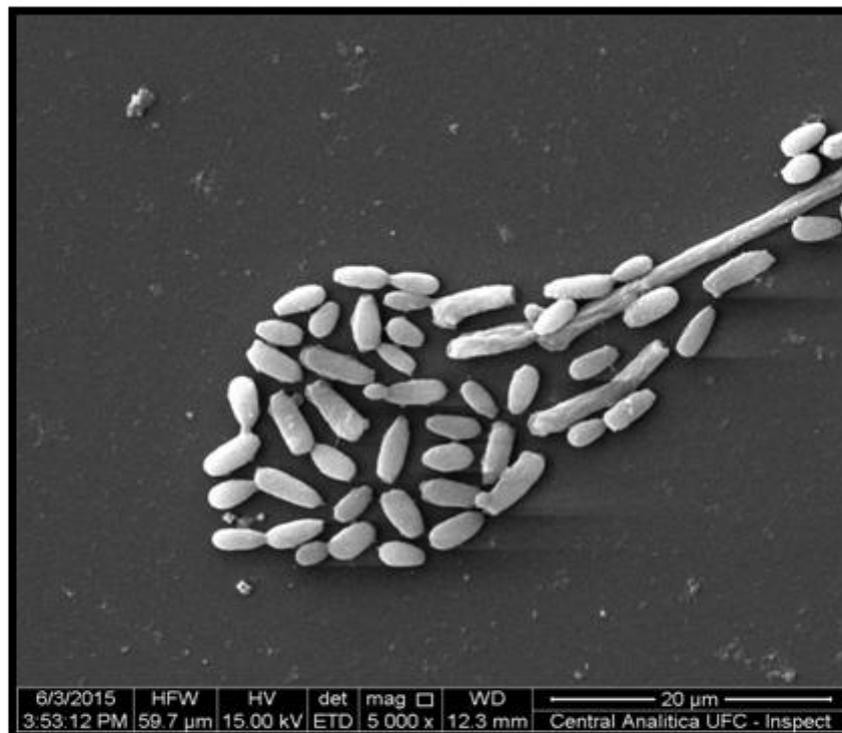


Figura 22. Blastoconídios alongados e pseudo-hifa em *Candida krusei*. Aumento: 5.000x

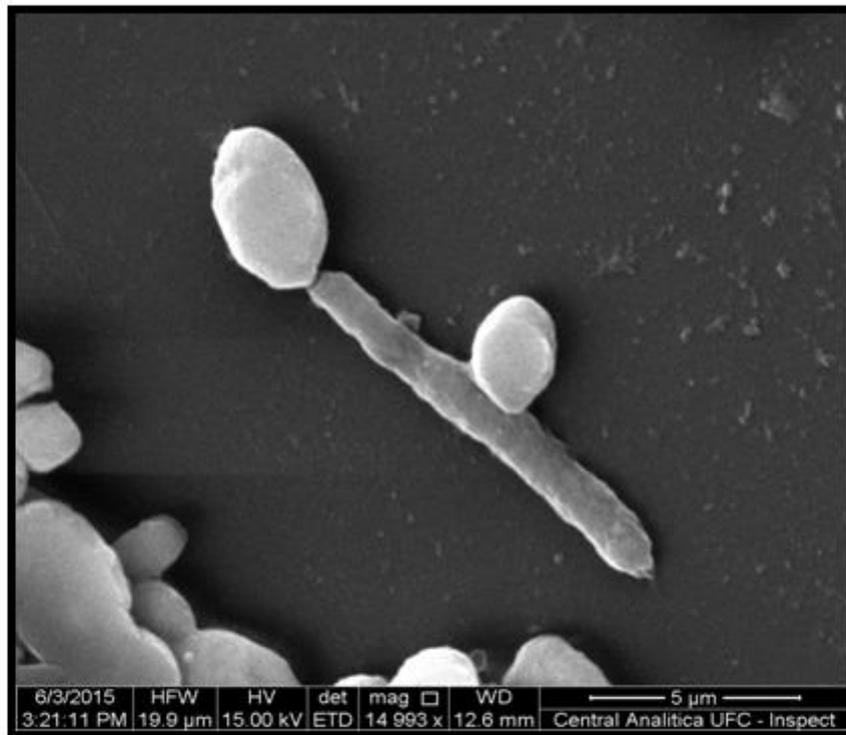


Figura 23. Formação de pseudo-hifa em *Candida parapsilosis sensu lato*. Aumento: 14.993x

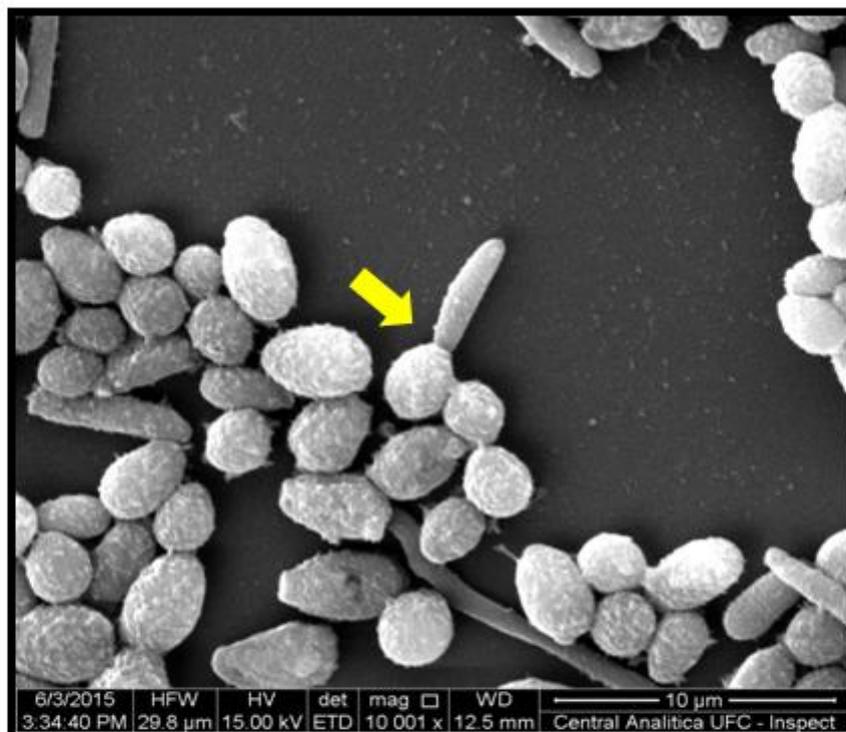


Figura 24. Constrição (seta) que caracteriza a formação de pseudo-hifa em *C. parapsilosis sensu lato*. Aumento: 10.000x

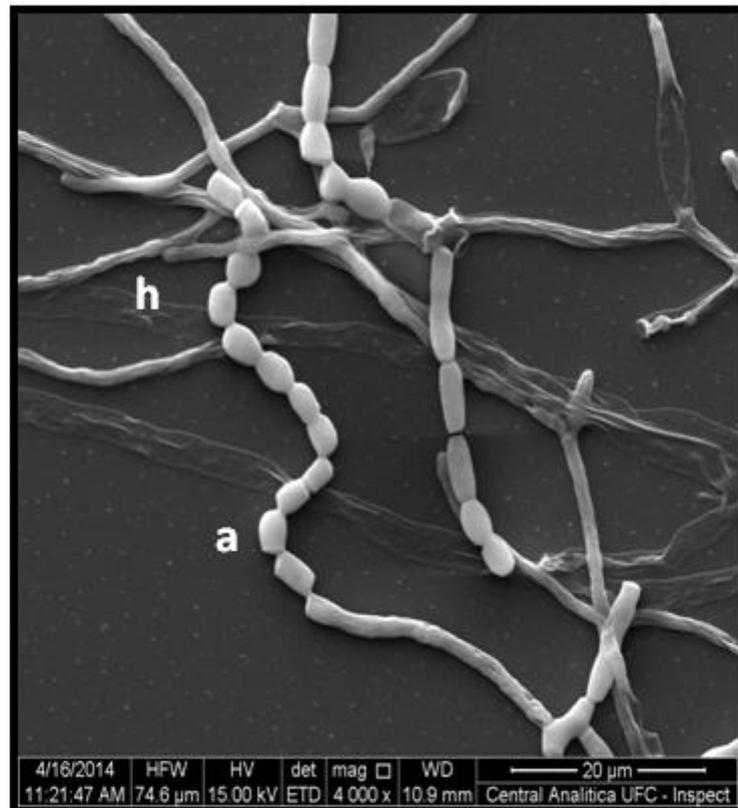


Figura 25. Hifas (h) e arthroconídios (a) em *Trichosporon inkin*. Aumento: 15.000x

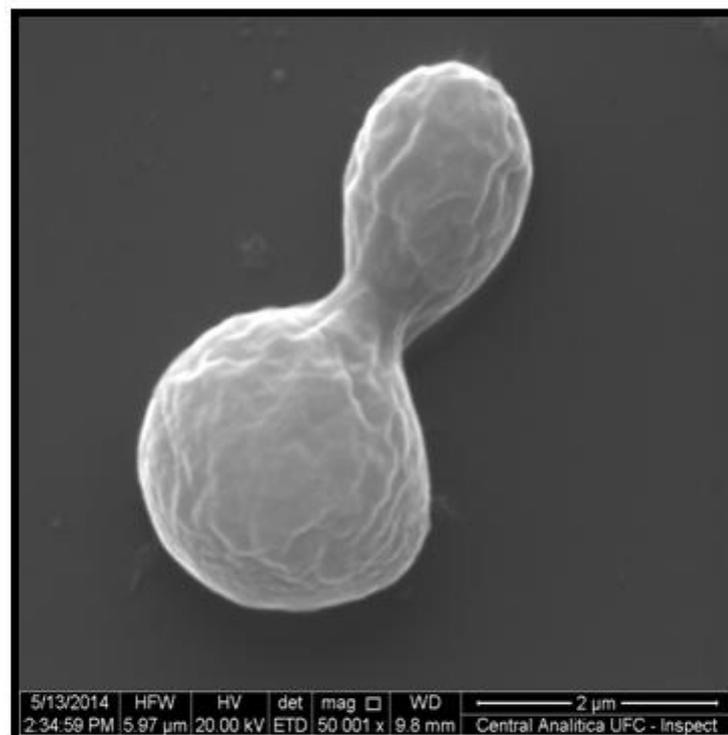


Figura 26. Brotamento celular em blastoconídio de *Cryptococcus neoformans*. Aumento: 50.000x

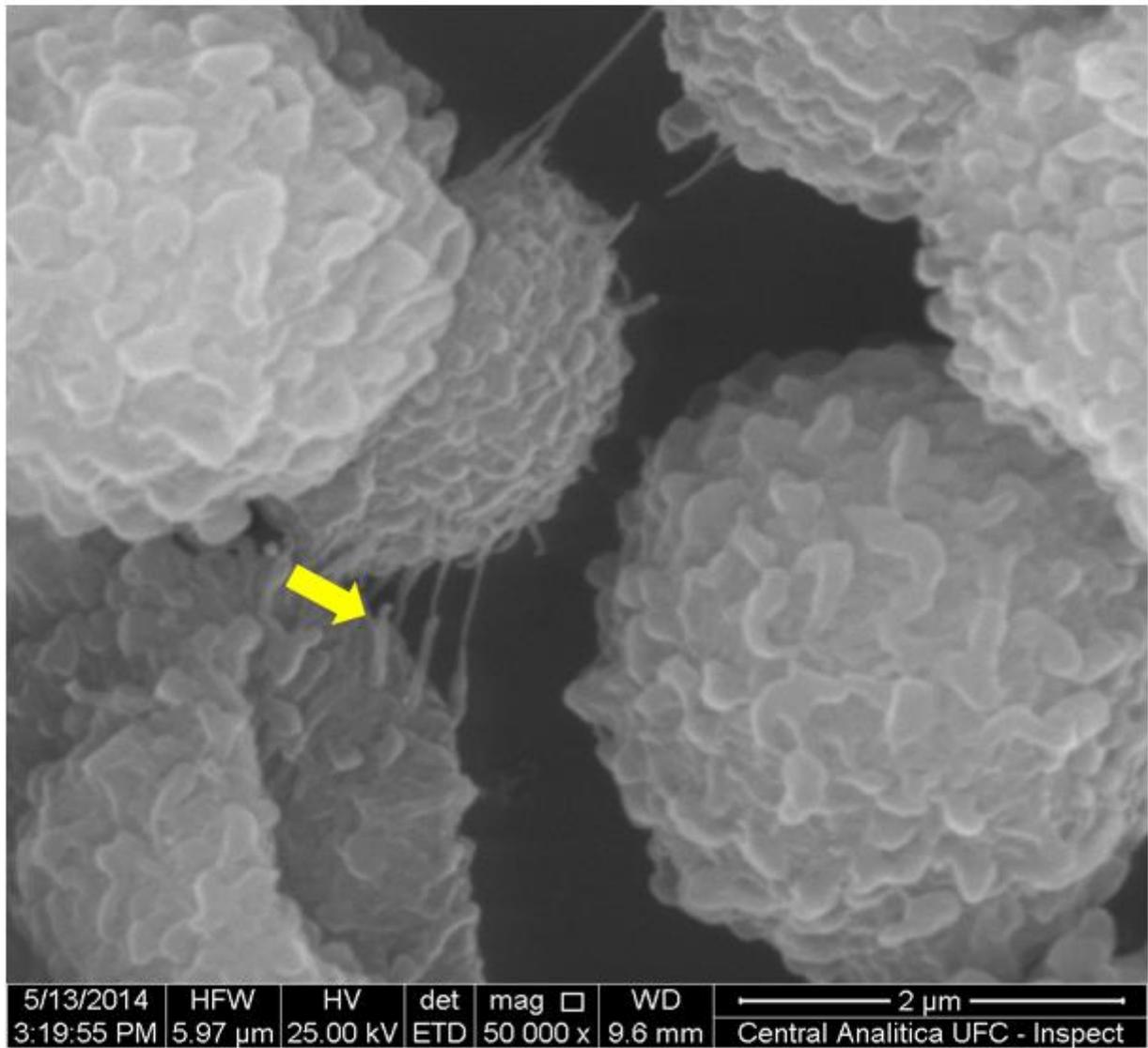


Figura 27. Aspecto superficial das células de *Cryptococcus gattii* em formação de biofilme. Observam-se projeções de adesão entre as células (seta). Aumento: 50.000x

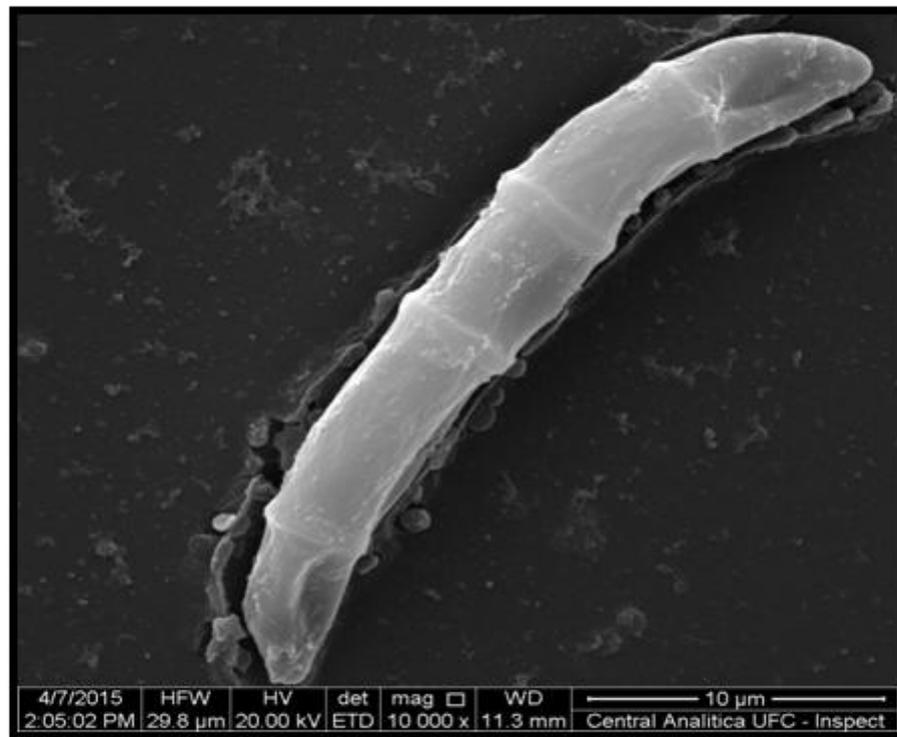


Figura 28. Detalhe do macroconídio de *Fusarium solani*. Aumento: 10.000x

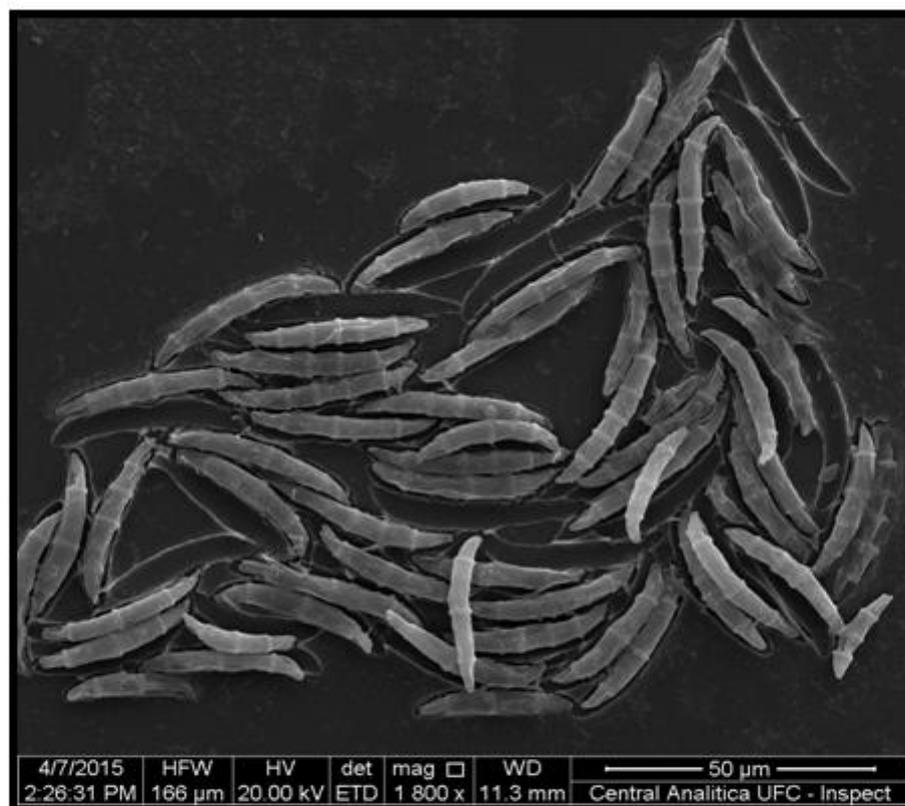


Figura 29. Macroconídios septados com formato de canoa, característicos de *Fusarium solani*. Aumento: 1.800x

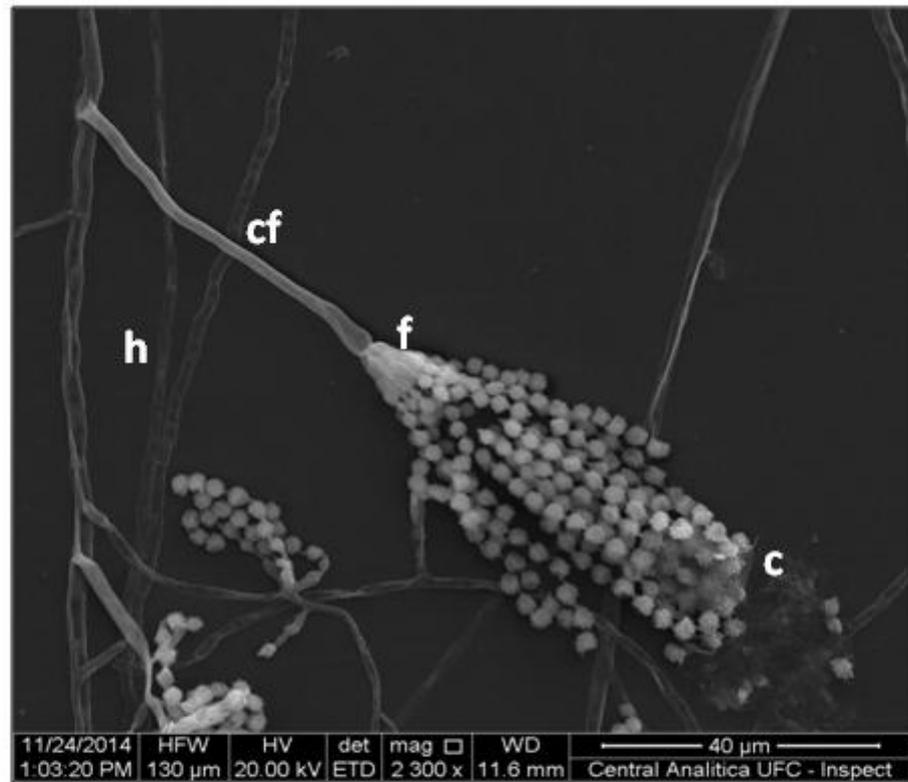


Figura 30. Hifa (h); conidióforo (cf), fiálides (f) e conídios (c) em *Penicillium* sp. Aumento: 2.300x

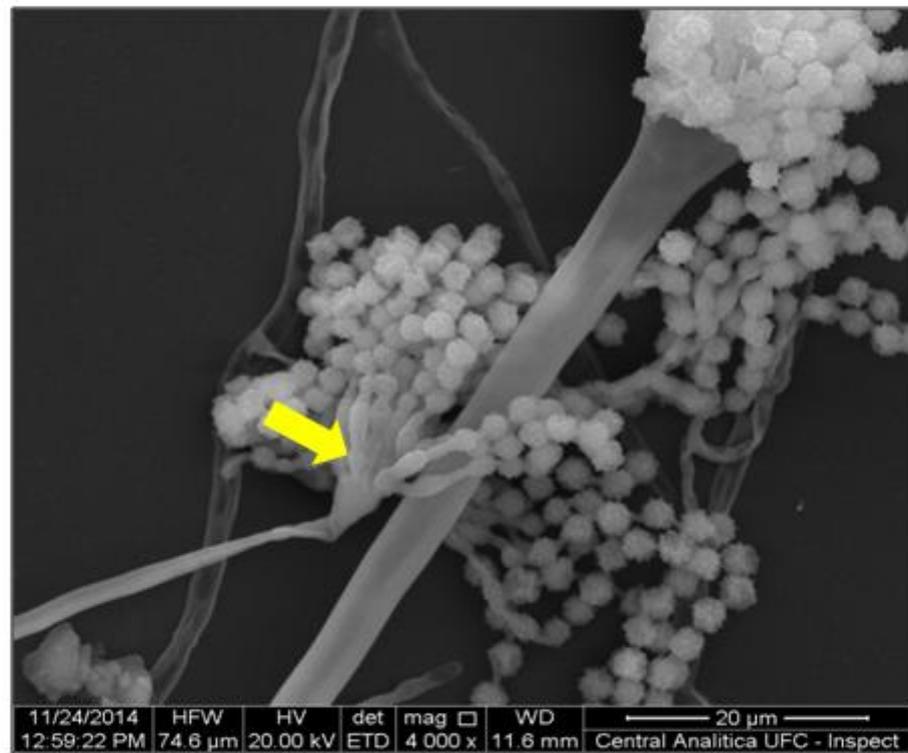


Figura 31. Fiálides em forma de garrafa (seta) em *Penicillium* sp. Aumento:4000x

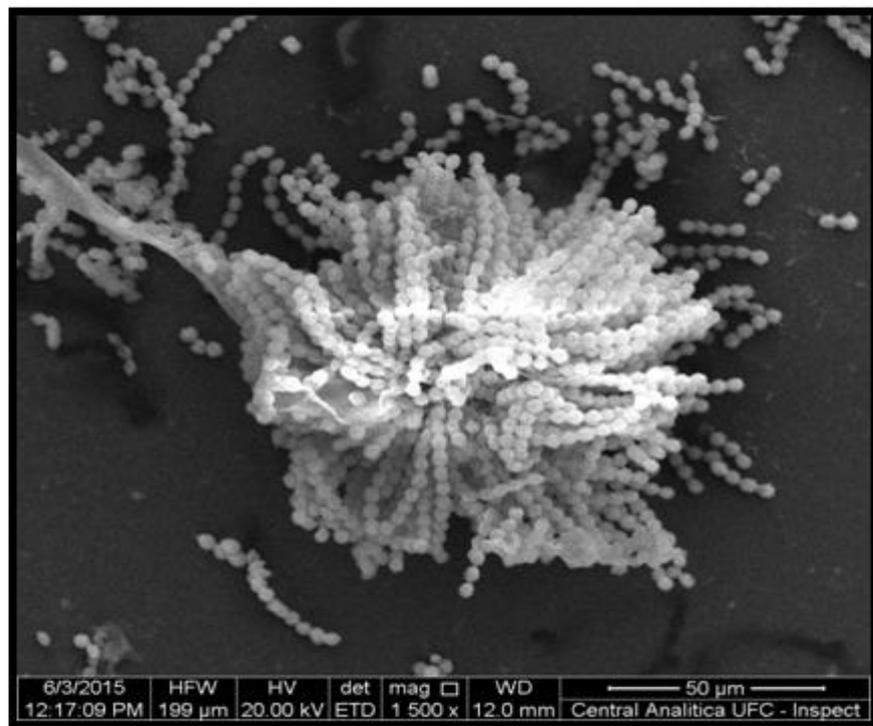


Figura 32. Merósporos sem a proteção dos merosporângios em *Syncephalastrum* sp. Aumento:1.500x

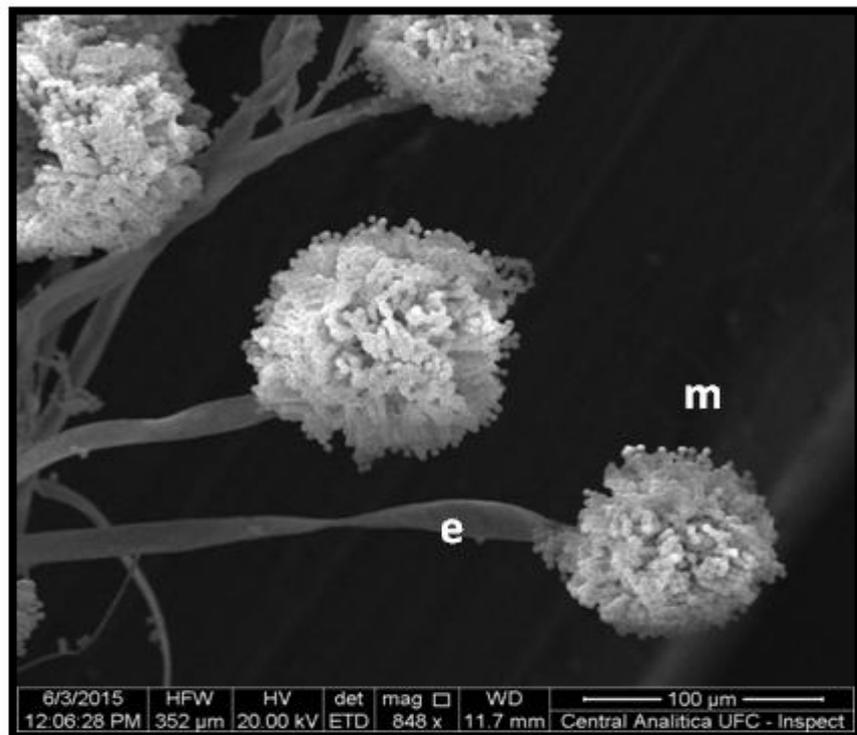


Figura 33. Esporângioforo não septado (e) com merósporos (m) sem a proteção dos merosporângios de *Syncephalastrum* sp. Aumento:848x

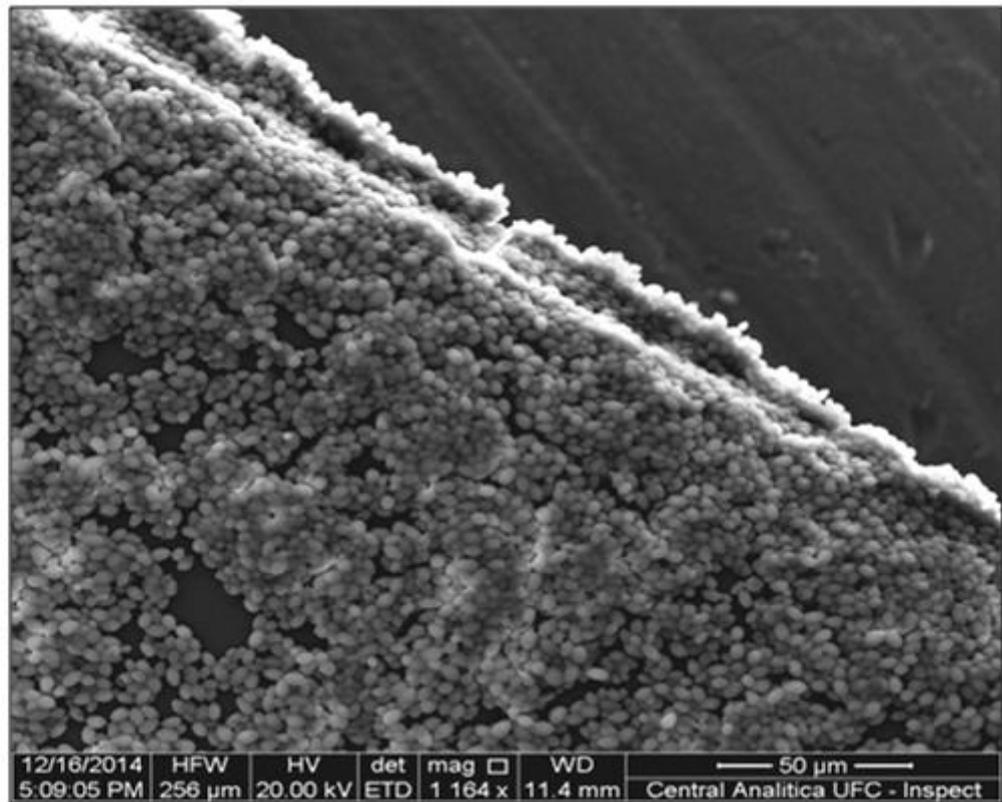


Figura 34. Biofilme maduro de *Candida tropicalis* formado sobre lâmina de Thermanox® por 48h. Aumento: 1.164x s

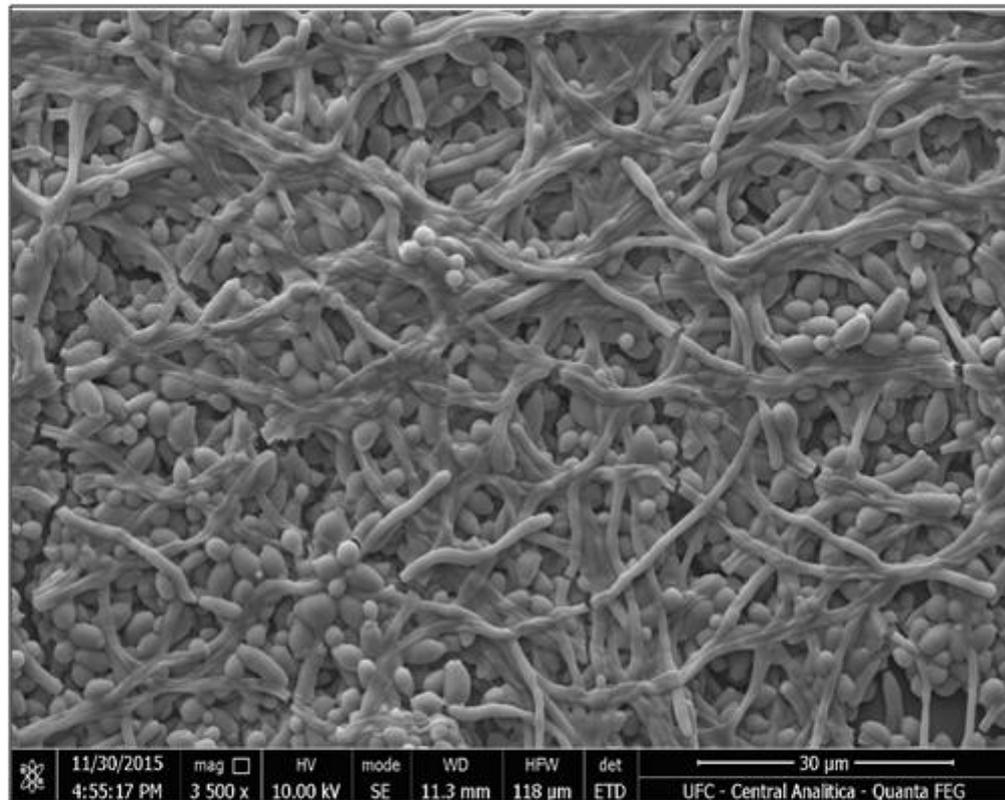


Figura 35. Biofilme maduro de *Candida albicans* formado sobre lâmina de Thermanox® por 48h. Aumento: 3.500x

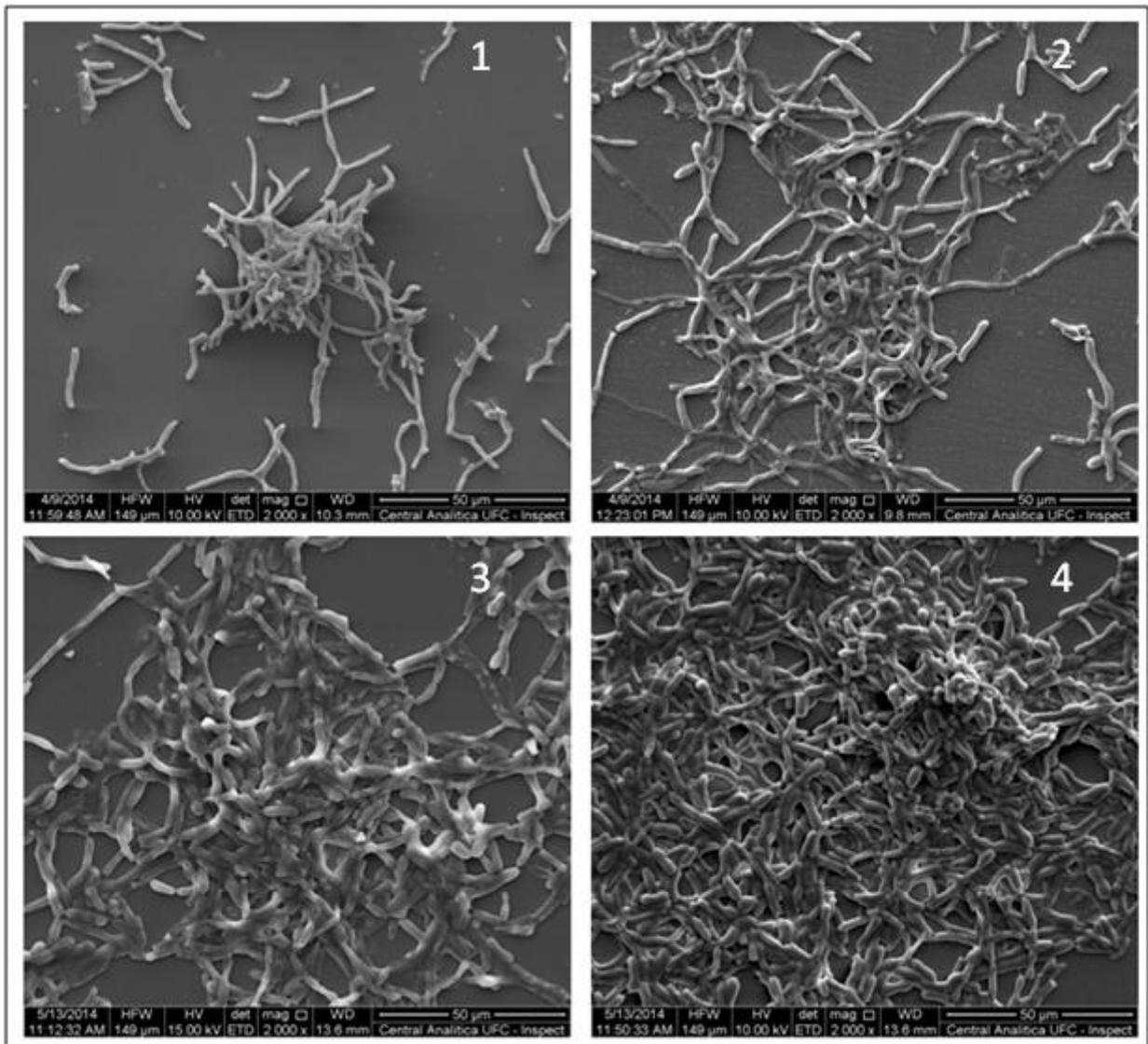


Figura 36. Biofilme de *Trichosporon inkii* formado sobre lâmina de Thermanox® após 4h (1), 24h (2), 48h (3) e 72h (4). Aumento: 2.000x

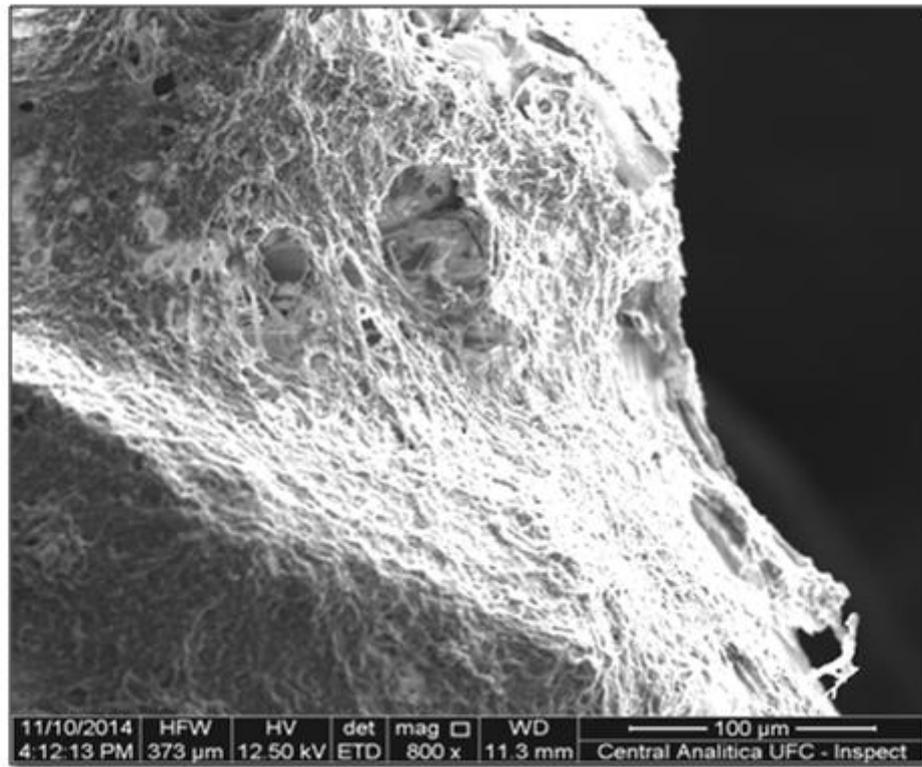


Figura 37. Biofilme maduro de *Trichosporon inkin* formado sobre cateter por 48 horas. Aumento:800x

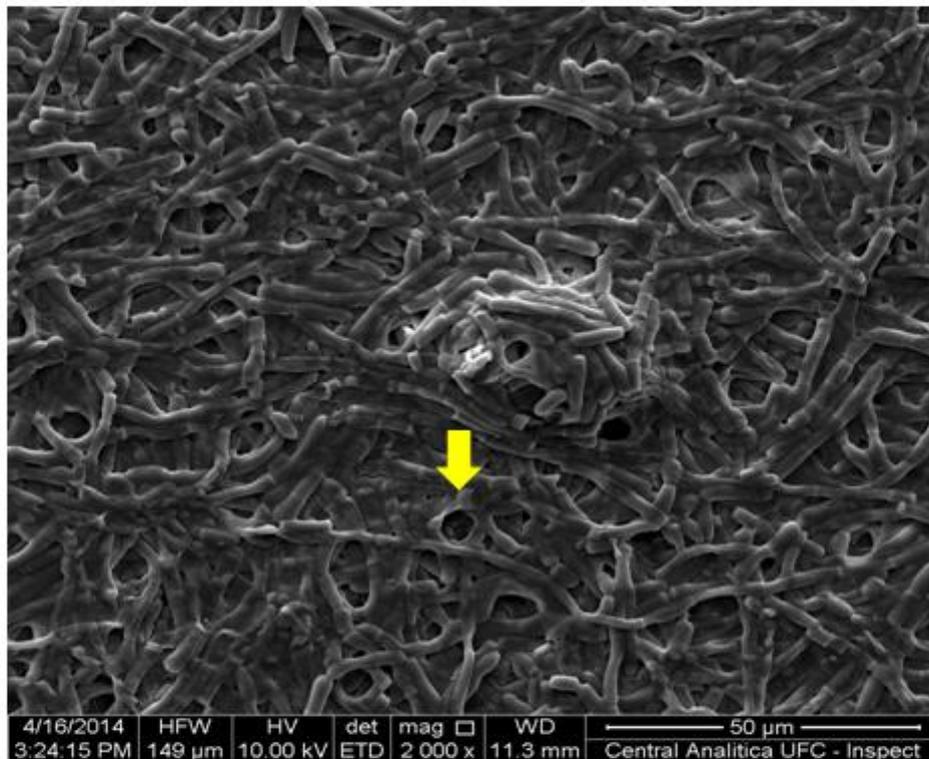


Figura 38. Biofilme maduro de *Trichosporon inkin* com 72 horas de crescimento. Observa-se o canais de água (seta). Aumento:800x

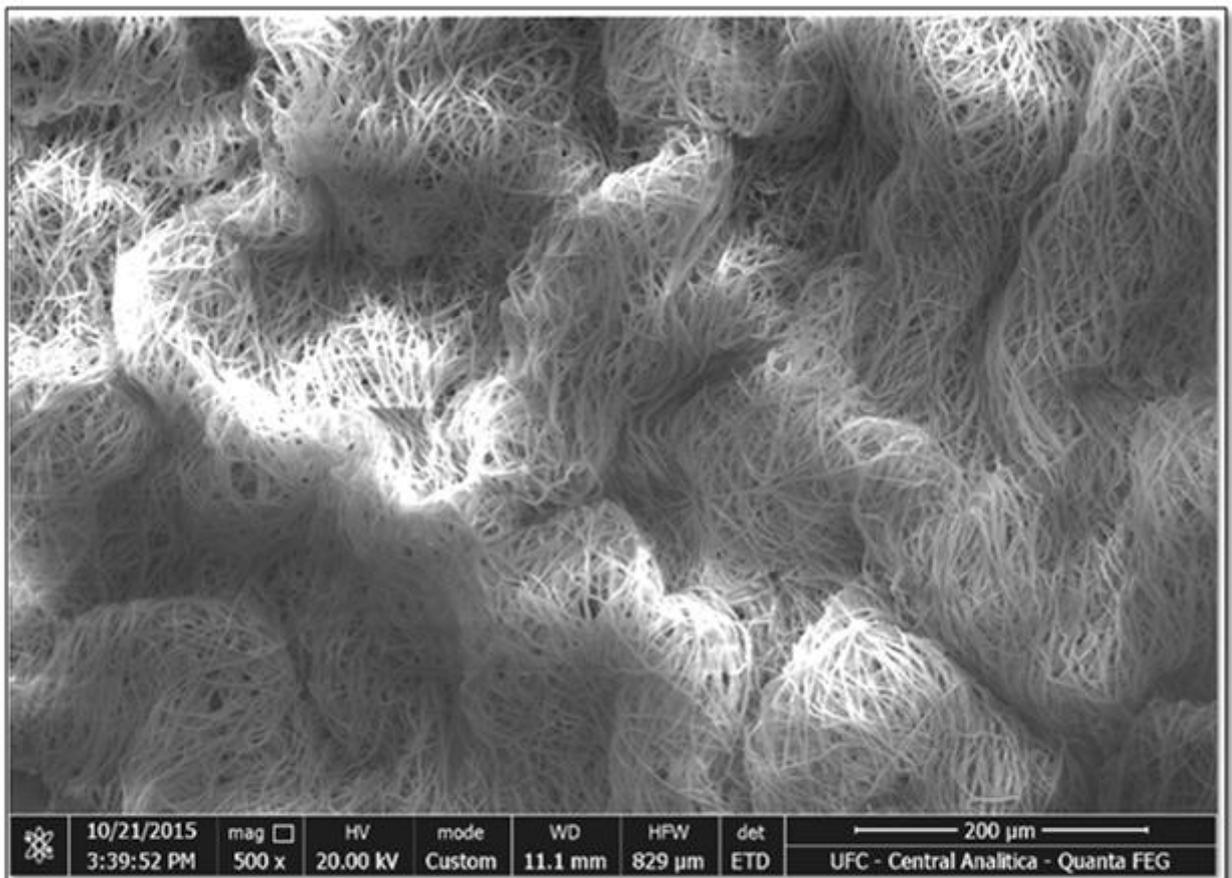


Figura 39. Biofilme maduro de *Fusarium solani* formado sobre lente de contato Alphicon® por 48 horas. Aumento: 2.000x

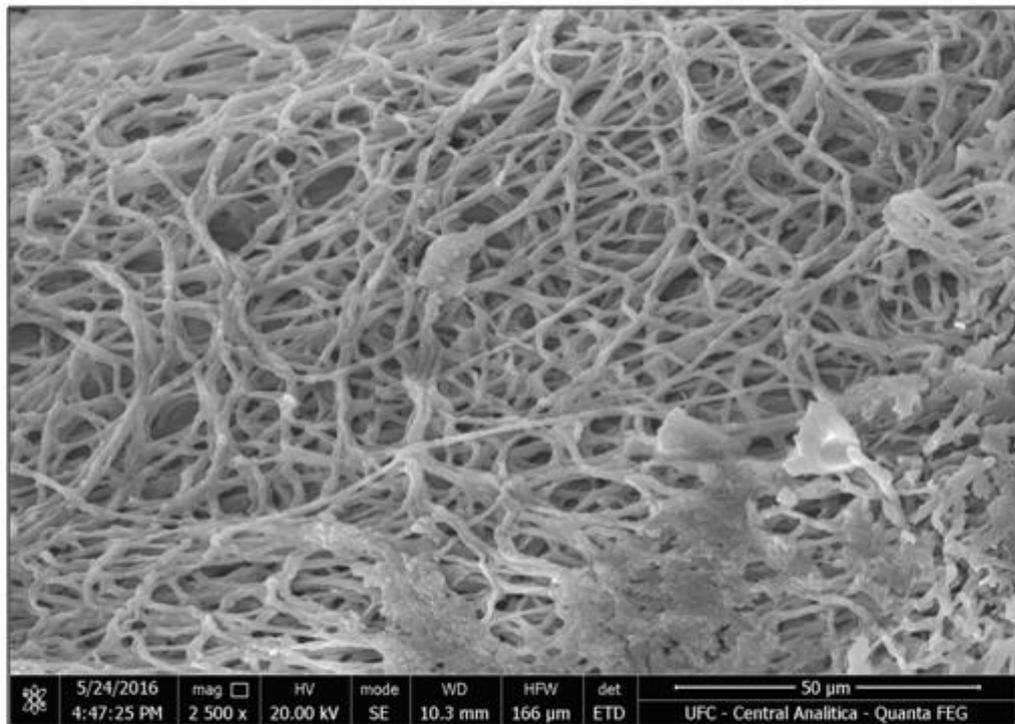


Figura 40. Biofilme de *Trichophyton tonsurans* formado sobre unha. Presença abundante de hifas e material amorfo Aumento:2.500x

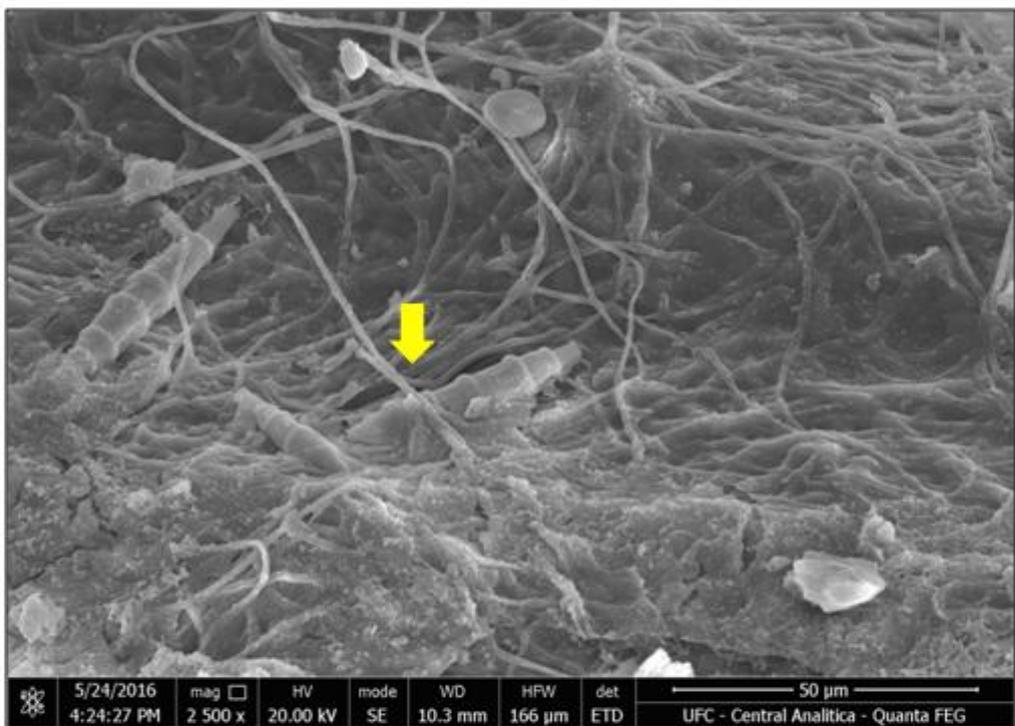


Figura 41. Biofilme de *Microsporium gypseum*. Observa-se a presença de macroconídios fusiformes (seta), hifas e material amorfo Aumento:2.500x

APÊNDICE B - IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA COLORIDAS

❖ Dermatófitos -----	Figuras 1-4
❖ Zigomicetos -----	Figuras 5-6
❖ <i>Histoplasma capsulatum</i> -----	Figuras 7-8
❖ <i>Panicillium</i> sp. -----	Figuras 9 -10
❖ <i>Cryptococcus neoformans</i> -----	Figura 11
❖ <i>Candida</i> spp. -----	Figura 12
❖ <i>Trichosporon inkin</i> -----	Figura 13
❖ <i>Fusarium</i> spp. -----	Figuras 14 - 15
❖ <i>Syncephalastrum</i> sp. -----	Figuras 16 - 17
❖ Biofilmes -----	Figuras 18 – 20



Figura 1. Macroconídio de *M. canis*



Figura 2. microconídio de *T. tonsurans*



Figura 3. Hifa em espiral de *T. mentagrophytes*.

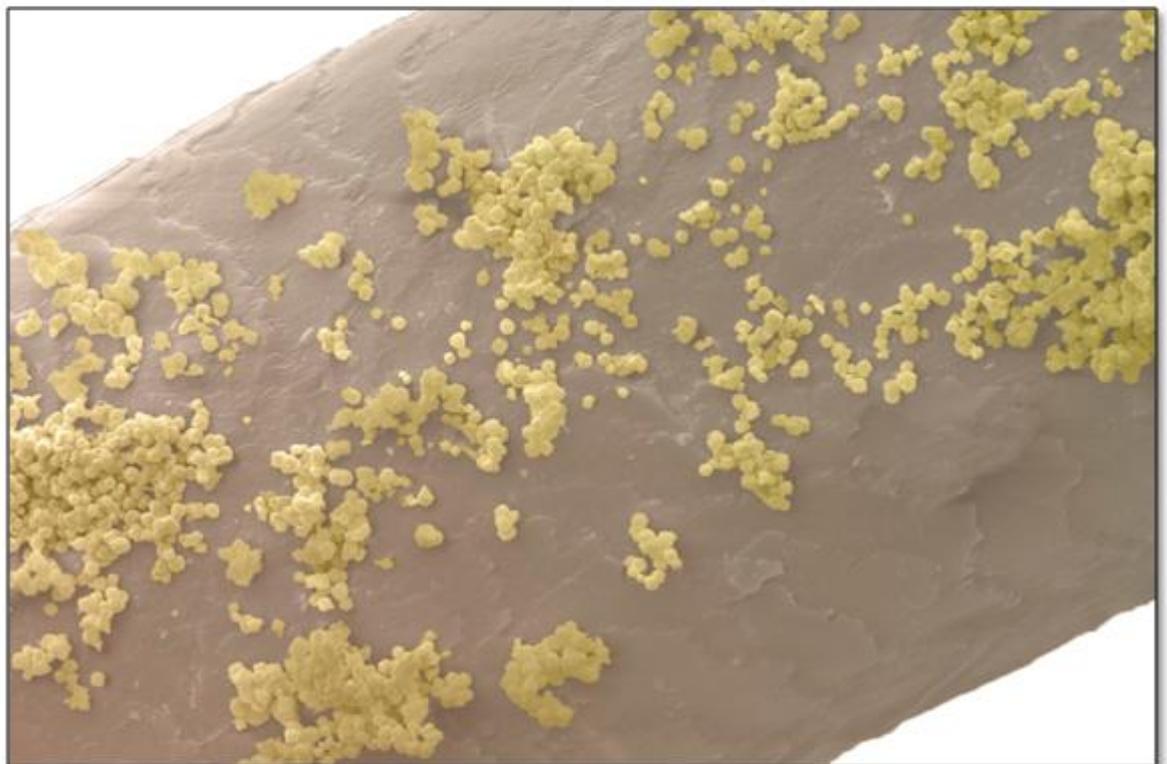


Figura 4. Parasitismo ectotrix microspórico em cabelo.



Figura 5. Rizóides, hifas estolão, esporangióforo, esporângio e esporangiósoros de *Rhizopus* sp.

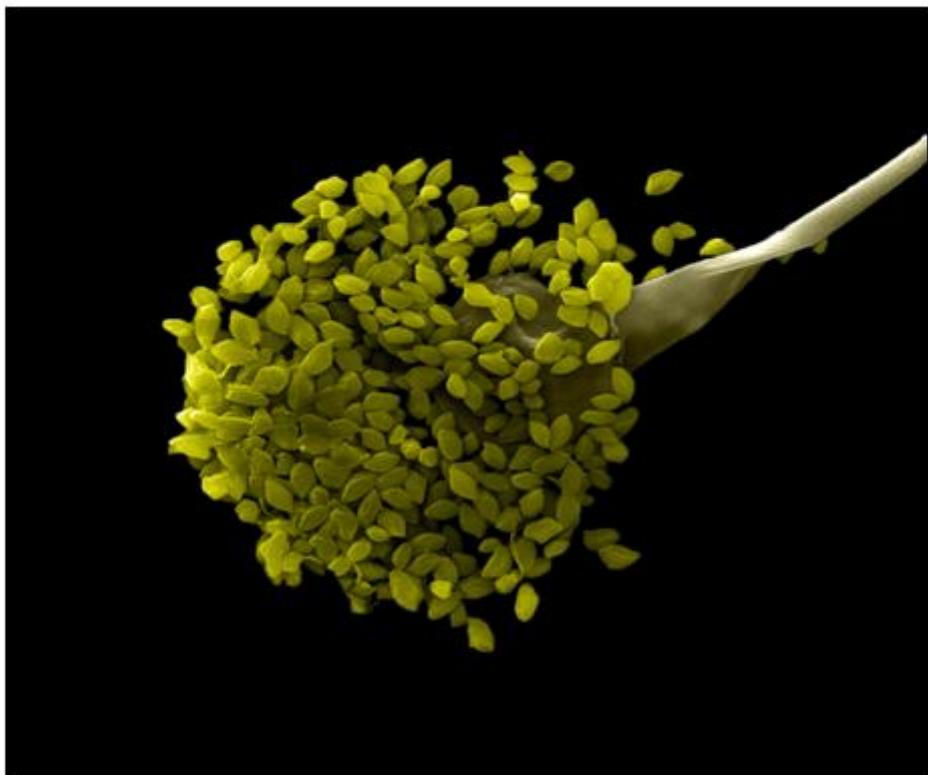


Figura 6. Esporangióforo e esporangiósoros de *Rhizopus* sp.

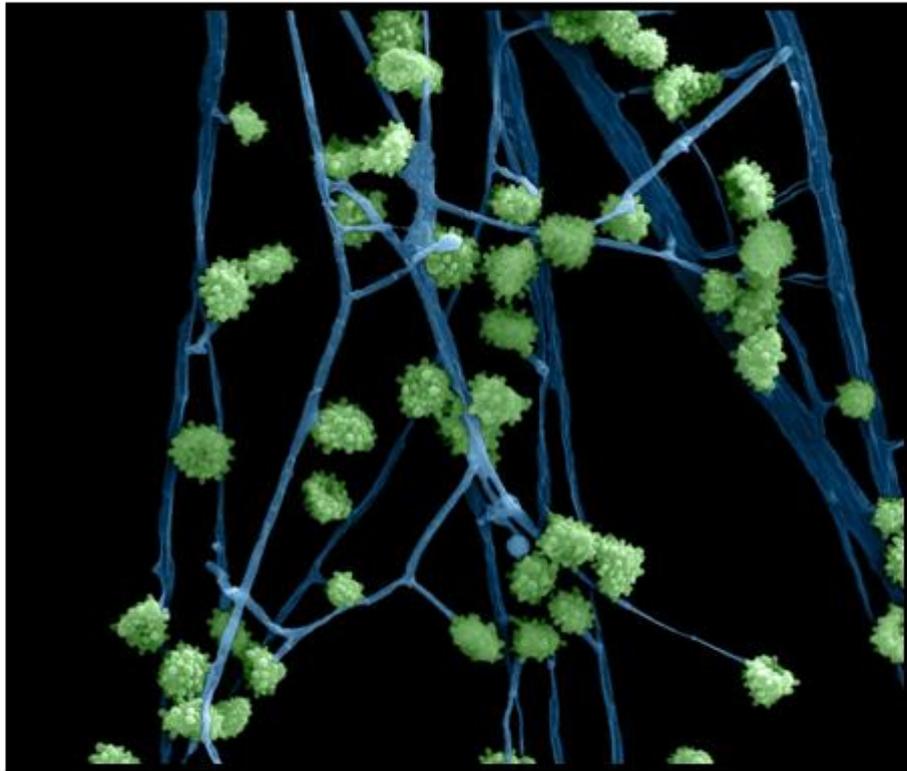


Figura 7. Macroconídios tuberculados de *Histoplasma capsulatum* var *capsulatum*.

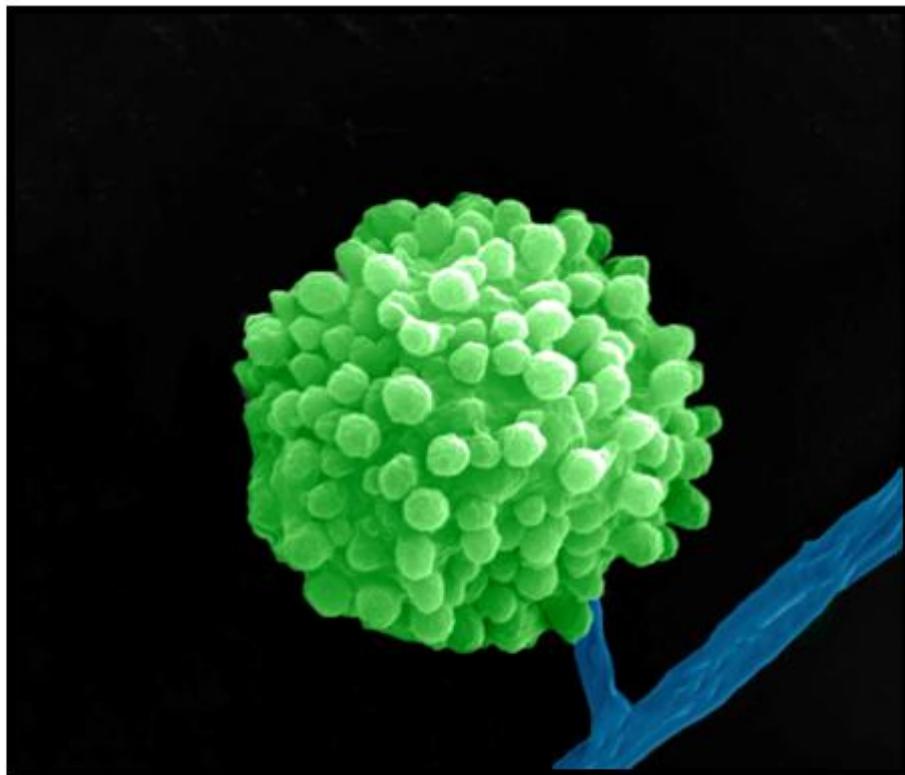


Figura 8. Macroconídio tuberculado (visão ampliada) de *Histoplasma capsulatum* var *capsulatum*.

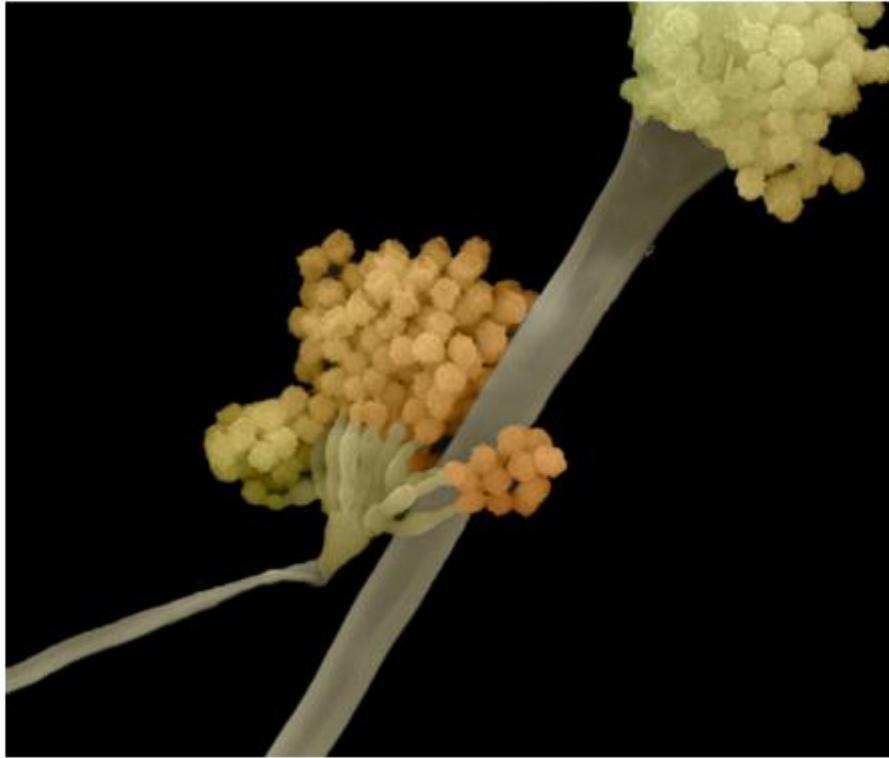


Figura 9. conidióforo, fiálides e conídios em *Penicillium* sp.



Figura 10. conidióforo, fiálides e conídios em *Penicillium* sp.



Figura 11. Brotamento celular em *Cryptococcus neoformans*.

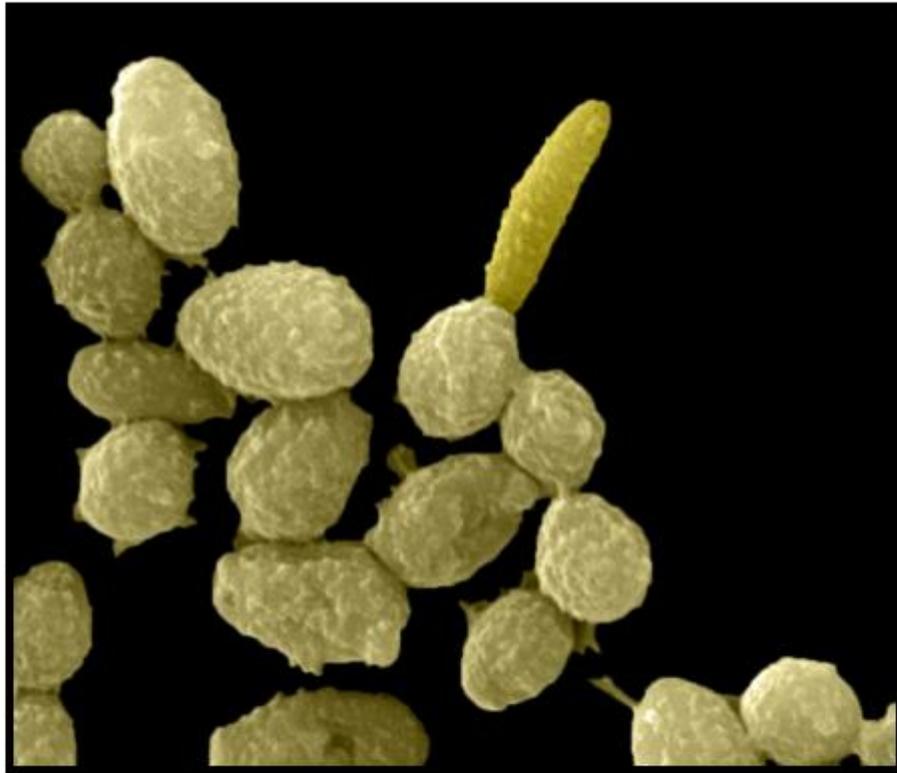


Figura 12. Formação de pseudo-hifa em *C.parapsilosis*.

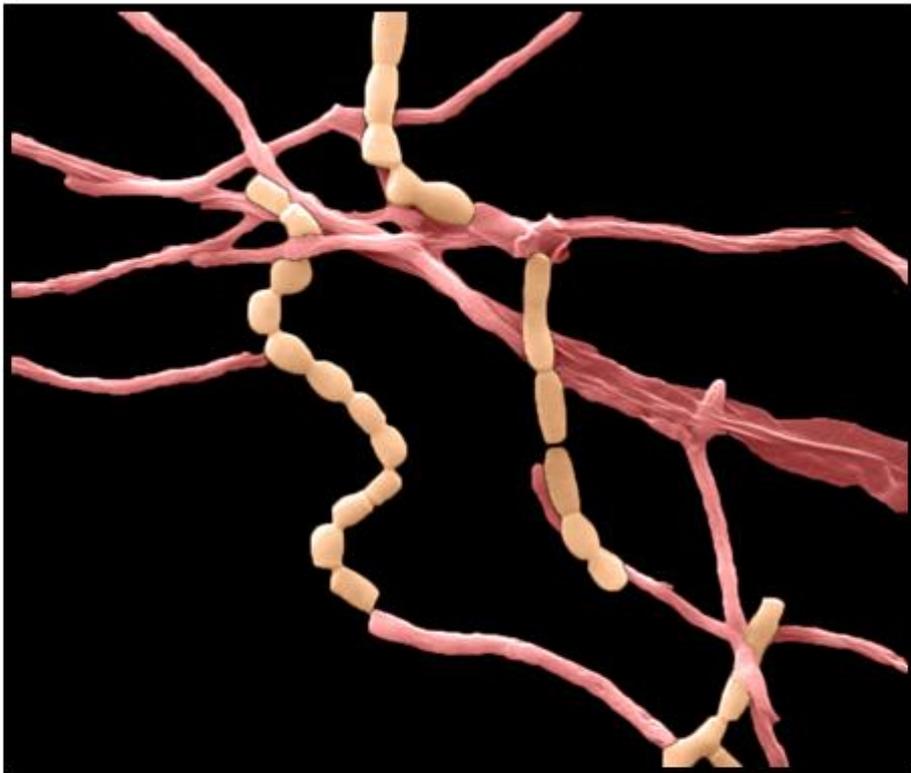


Figura 13. Arthroconídios em formação de *Trichosporon inkai*.

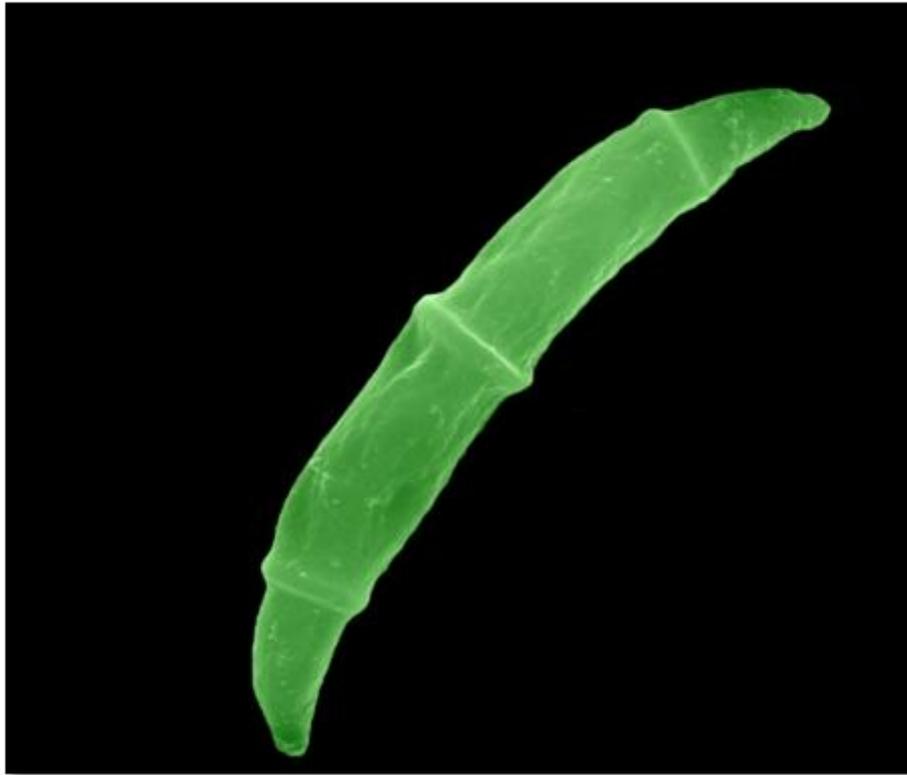


Figura 14. Macroconídios em forma de canoa de *Fusarium solani*.



Figura 15. Aglomerado de macroconídios de *Fusarium solani*.

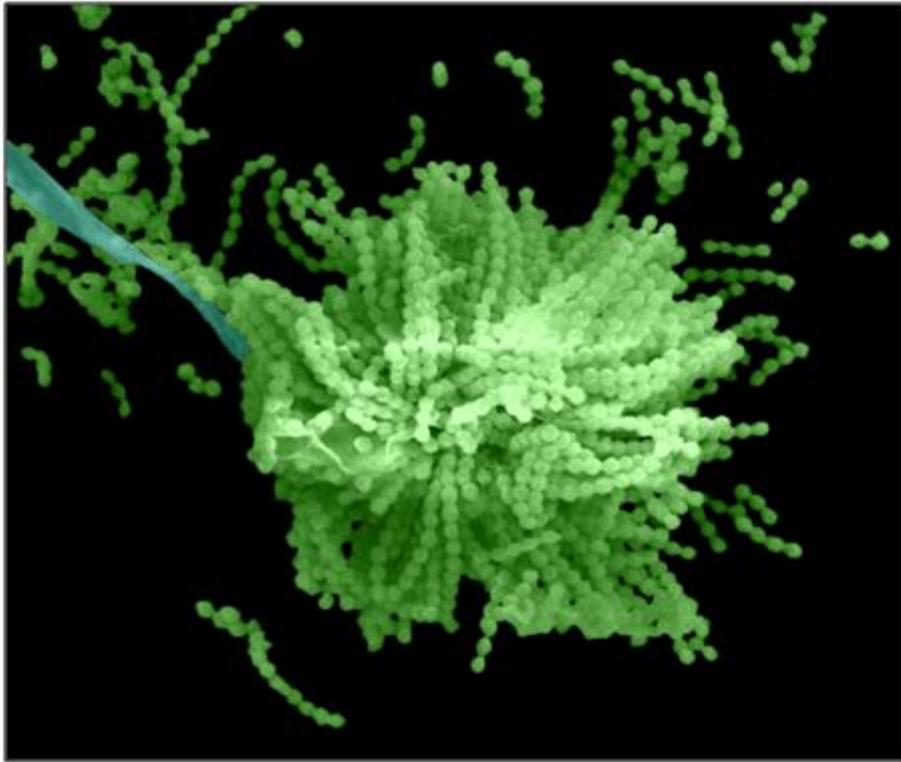


Figura 16. Disposição dos merósporos em *Synccephalastrum* sp.



Figura 17. Esporângióforo, merosporângios e merósporos de *Synccephalastrum* sp.

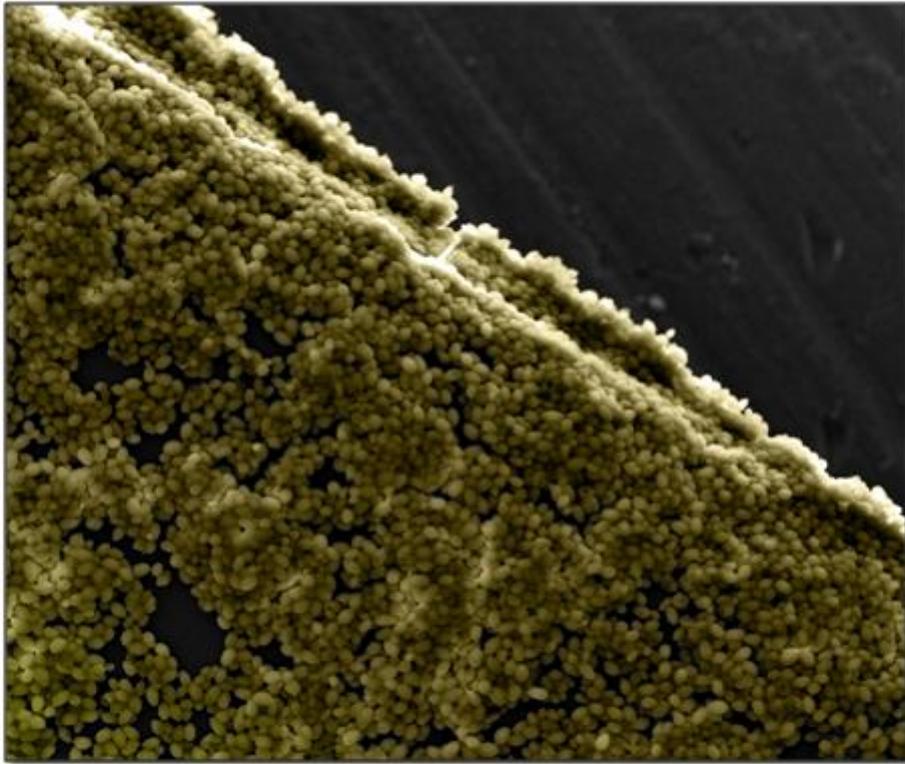


Figura 18. Biofilme de *C.tropicalis*

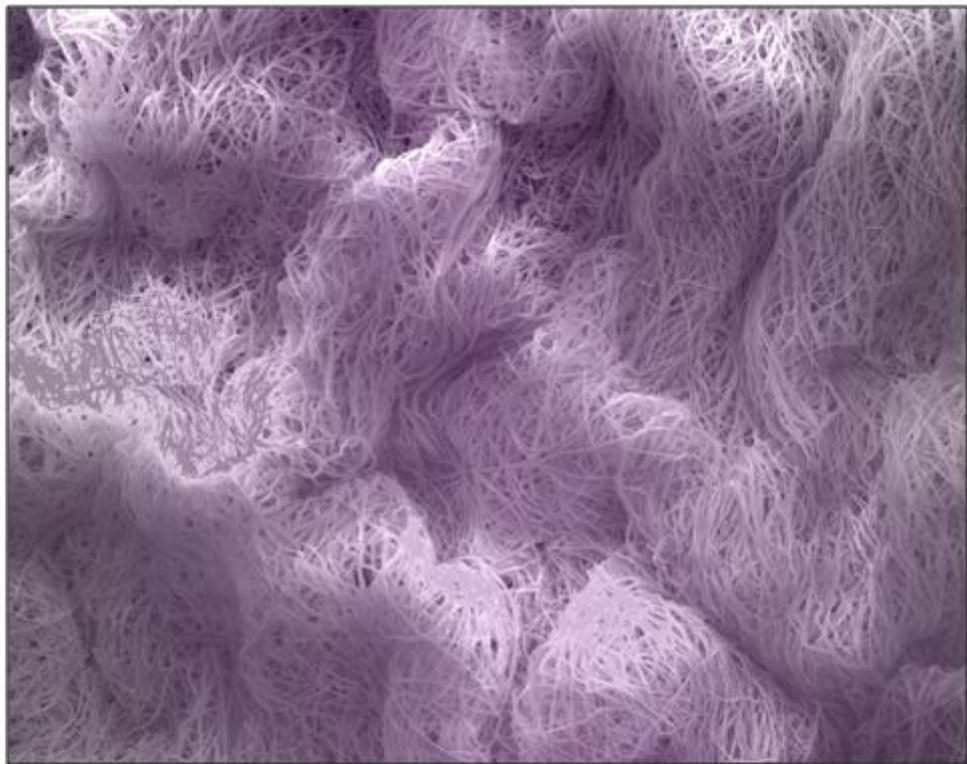


Figura 19. Biofilme de *Fusarium solani*.

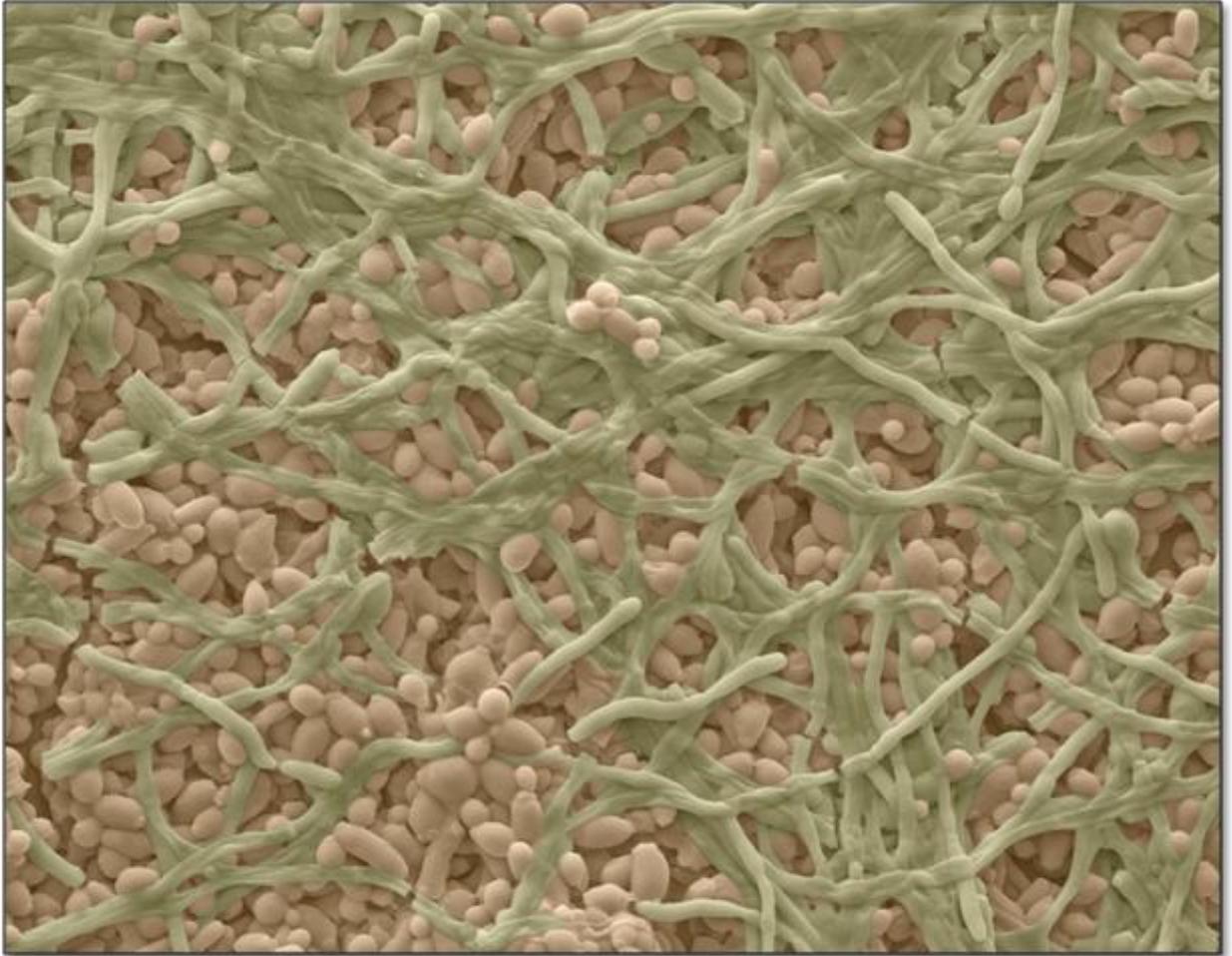


Figura 20. Biofilme de *C.albicans*