

*Padrão Resposta Preliminar às Questões Discursivas
Biólogo – Micologia/Cultura de Células*

Questão 1

- a) Porque apresenta uma maior concentração de fatores de crescimento e uma baixa concentração de imunoglobulinas.
- b) Pode ser utilizada em proporção de 1:1, ou seja, 10%. Nessa proporção, os fatores de crescimento do soro fetal serão suficientes, com troca periódica do meio.
- c) A glicose pode ser colocada no lugar do soro sanguíneo bovino em ensaios curtos de interação (até 12 horas), quando elementos do soro são indesejáveis. Ou seja, quando o soro pode interferir no experimento ou conter na sua composição moléculas que queremos determinar experimentalmente. Somente nestes casos a glicose pode ser usada no lugar do soro fetal como complemento do meio de cultura. No entanto, a glicose não substitui o soro fetal na manutenção em rotina de uma cultura de células.

Questão 2

- a) 1. Corante fluorescente DAPI;
2. Iodeto de propídeo.
- b) DAPI: microscópio de fluorescência. O DAPI, por resultar em fluorescência azul ao se ligar à cromatina (DNA) é detectado por microscopia de fluorescência, com um filtro específico para seu comprimento de onda de absorção de luz UV e emissão de fluorescência. Observa-se, então, o padrão de fluorescência no núcleo da célula, pois em células apoptóticas a cromatina encontra-se condensada.

Iodeto de propídeo: citômetro de fluxo, para contagem das células com alta fluorescência (apoptóticas) e das células de baixa fluorescência (viáveis). A relação entre células totais e as que emitem fluorescência (alta e baixa) permite determinar o percentual de células apoptóticas na população celular. O iodeto de propídeo também marca o DNA, no entanto,

por ser uma molécula grande não penetra nas células com membrana intacta (viáveis), mas sim em células apoptóticas que sofrem alterações na permeabilidade da membrana plasmática.

Questão 3

- a) Definição: Dimorfismo é a capacidade de alguns fungos de apresentar duas formas morfológicas diferentes (leveduriforme ou filamentosa) na dependência da temperatura.
Espécies: *Paracoccideoides brasiliensis*, *Sporothrix schenckii*; *Histoplasma capsulatum*.
- b) Descrição: São microrganismos eucarióticos unicelulares, de forma arredondada ou ovalada. Podem apresentar reprodução sexuada ou assexuada, dependendo da espécie.
Espécie: *Cryptococcus neoformans*.
- c) Descrição: É a unidade estrutural dos fungos filamentosos. A hifa é uma estrutura tubular de paredes paralelas que pode ser septada (hifa septada) ou não (hifa não septada ou cenocítica). As hifas podem ser hialinas ou demácias, dependendo da espécie.
Espécie: e *Aspergillus fumigatus*.
- d) A – *Paracoccideoides brasiliensis*;
B – *Aspergillus fumigatus*;
C – *Cryptococcus neoformans*.

Questão 4

- a) Determinação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Após sacrifício do animal, é feita a assepsia local, os órgãos são retirados assepticamente, macerados em tampão fisiológico, e a suspensão é plaqueada em placas de Petri contendo meio de cultivo sólido para crescimento das colônias do fungo de interesse. Após dias de cultivo é contado o número de colônias e determinada a carga fúngica, levando em consideração o peso do órgão, o volume final da suspensão e o volume da alíquota plaqueada para contagem de colônias.
- b) Uma capela de segurança nível 2 (capela de fluxo laminar). O tipo de capela depende do agente infeccioso. No caso da questão, são microrganismos classe 2. O uso da capela de fluxo laminar garante a proteção do ambiente, impedindo a dispersão de

aerossóis, do operador, que deve usar EPI (equipamentos de proteção individual). A manipulação do animal no fluxo laminar garante a assepsia na retirada dos órgãos.

- c) Sacrifício em câmara de CO₂. É utilizado por ser indolor e não causar sofrimento do animal.

Questão 5

- a) Câmara de contagem com retículo de Neubauer ou Câmara de Neubauer, também conhecidos como hemocitômetros.

Constam de uma peça de vidro espesso contendo rebaixamento na parte central, que é separado das partes laterais por duas pequenas valetas. Nessa peça está gravado o retículo de Neubauer, que é formado por nove quadrados de 1mm² de área, e a profundidade é de 0,1 mm, cada um. Os nove quadrados estão subdivididos em: (a) quatro quadrados chamados externos, subdivididos em 16 pequenos quadrados (1/16 mm²); (b) um quadrado central subdividido em 25 pequenos quadrados (1/25 cm²), sendo cada um destes, por sua vez, dividido em outros 16 quadrados menores (1/400 mm²).

- b) Dependendo do tamanho da célula, são utilizados na contagem os quatro quadrados externos ou o quadrado central. Devido ao seu tamanho, as leveduras devem ser contadas nos quatro quadrados externos e os monócitos no quadrado central.

As suspensões celulares precisam ser diluídas para contagem, pois células em excesso levam a erros na contagem. A diluição deve ser feita em solução salina tamponada. Para determinação da viabilidade as células, são diluídas na presença do corante azul de tripan. As células viáveis não são coradas, distinguindo-as, assim, das células inviáveis, que são coradas em azul, não devendo ser contadas.

- c) Deve-se contar mais de 1 mm² para se ter uma média de contagem celular, minimizando variações na distribuição de células por quadrante, que podem gerar erros de contagem.

Fórmula: células/mm³ = células por mm² / área contada (mm²) X profundidade X diluição.