



Escola de Ciências e Tecnologia

Departamento de Química

Licenciatura em Biotecnologia

**A técnica FISH aplicada á
deteção de fungos filamentosos
que colonizam os bens patrimoniais**

Teresa Charrua Rosmaninho

Orientação: Professora Doutora Ana Teresa Caldeira

Doutora Marina González Pérez

Relatório de Estágio

Évora, Setembro 2016



Escola de Ciências e Tecnologia

Departamento de Química

Licenciatura em Biotecnologia

**A técnica FISH aplicada á
deteção de fungos filamentosos
que colonizam os bens patrimoniais**

Teresa Charrua Rosmaninho

Orientação: Professora Doutora Ana Teresa Caldeira

Doutora Marina González Pérez

Relatório de Estágio

Évora, Setembro 2016

Agradecimentos

À vida, por permitir sensações como a de atingir um objetivo.

À Marina Perez, que admiro como orientadora e pessoa, pela sua capacidade de imprimir a maior simplicidade nas coisas mais complexas, pela disponibilidade que sempre demonstrou e pela sua capacidade humana impar.

À professora Dr. Ana Teresa Caldeira pela disponibilidade no esclarecimento de dúvidas no decorrer do estágio.

Aos meus pais e ao meu namorado pela extrema compreensão, carinho e paciência e por me terem dado força e incentivo para contornar os obstáculos.

A toda a equipa de professores e colaboradores do Laboratório Hércules que sempre se mostraram disponíveis para ajudar e tirar dúvidas durante o decorrer do meu estágio.

Este trabalho é financiado por Fundos Nacionais através da FCT –Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito do projeto “MICROTECH-ART – Desenvolvimento de uma Ferramenta Analítica para deteção de Microrganismos que proliferam no Património Cultural” (PTDC/BBB-IMG/0046/2014).

Resumo

A conservação do nosso património e tudo o que nele existe está constantemente em perigo devido a contínua ação de fatores físicos, químicos e biológicos a que estão submetidos desde a sua construção até aos dias de hoje.

Sendo os microrganismos residentes assíduos dos bens patrimoniais e agentes ativos na sua biodeterioração, é urgente o desenvolvimento de técnicas na área molecular e biotecnológica que permitam a sua deteção e identificação para poder desenvolver estratégias adequadas para elimina-los ou impedir a sua proliferação no património.

Uma das técnicas com potencial para a qualificação e quantificação de microrganismos, e mais concretamente, de microrganismos metabolicamente ativos, é a Hibridação *In Situ* Fluorescente (FISH).

No presente trabalho foi investigada a possível aplicação e otimização da técnica para a deteção de fungos filamentosos nos bens patrimoniais.

Palavras-chave

Fungos filamentosos; Permeabilização; RNA-FISH; Bens Patrimoniais; Fluorocromos.

Abstract

The conservation of our heritage and all that it includes, is constantly in danger due to the continuous action of physical, chemical and biological factors that they face from its construction until now.

Microorganisms are colonizers of cultural heritage goods and active agents in their biodeterioration. Thus, the development of molecular and biotechnological techniques that allow their detection and identification, is urgent as they will allow the development of appropriate strategies to eliminate them or prevent their proliferation in heritage objects.

One of the techniques with potential for qualification and quantification of microorganisms and more specifically, for metabolically active microorganisms, is the Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH) technique.

In the present work, it was investigated the possible application and optimization of this technique for the detection of filamentous fungi in cultural heritage goods.

Keywords

Filamentous Fungi; Permeabilization; RNA-FISH; Cultural Heritage; fluorochromes.

Listas de abreviaturas

PBS - Tampão Fosfato-Salino

FISH - Hibridação Fluorescente *In Situ*; Fluorescence *In Situ* Hybridization

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

rRNA – Ácido Ribonucleico Ribossomal

RNA - Ácido Ribonucleico

MEA – Extrato de Malta Agar; Malt Extract Agar

Enquadramento do projeto e objetivos

Relevância da deteção dos fungos filamentosos nos bens patrimoniais e do desenvolvimento de estratégias que o permitam de forma simples e barata.

A técnica de Hibridação *In Situ* parece uma alternativa ideal porque permite a deteção e identificação de microrganismo que proliferam nos bens patrimoniais, com a vantagem não ser uma técnica invasiva, preservando o nosso património.

No laboratório HERCULES está a otimizar-se a técnica para que esta seja aplicada em vários materiais e assim conseguir identificar quais os organismos responsáveis pela deterioração do património.

Dentro deste contexto, o foco principal deste trabalho foi estudar a aplicabilidade da técnica RNA-FISH na deteção de fungos filamentosos em bens patrimoniais, detetar as limitações e otimizar as condições para consegui-lo de forma eficaz.

Deste modo, os principais objetivos deste trabalho foram:

- Investigar a eficácia de vários métodos de permeabilização celular e as condições necessárias para conseguir uma boa hibridação do RNA destes microrganismos com as sondas FISH fluorescentes, de modo a otimizar a técnica.
- Estudar tanto a autofluorescência dos fungos filamentosos como de diferentes materiais usualmente utilizados na construção de objetos artísticos para determinar as possíveis limitações da técnica RNA-FISH na deteção de fungos filamentosos no Património Cultural.

Índice

1	Introdução	1
1.1	Fungos filamentosos	1
1.1.1	Características	1
1.1.2	Onde proliferam e como?	1
1.1.3	Efeitos benéficos e nocivos associados	2
1.1.4	Parede celular e permeabilização	3
1.1.5	Autofluorescência dos fungos filamentosos	4
1.2	Hibridação <i>In Situ</i> fluorescente	4
1.2.1	Em que consiste a técnica e como tem evoluído?	4
1.2.2	Variantes da técnica FISH	5
1.2.3	RNA-FISH	6
1.2.4	Fundamento e etapas	6
1.2.5	Sondas RNA-FISH	8
1.2.6	Aplicações da técnica RNA-FISH na microbiologia	8
1.2.7	Vantagens e desvantagens	9
1.3	A técnica RNA-FISH na detecção e análise de fungos filamentosos nos bens patrimoniais	10
2	Metodología	11
2.1	Estratégia	11
2.1.1	Local de realização	11
2.1.2	Duração do projeto	11
2.1.3	Modelo biológico	11
2.1.4	Sondas RNA-FISH	11
2.1.5	Técnicas e métodos utilizados	11
2.2	Organigrama	12
2.3	Procedimento	13
2.3.1	Visualização das estruturas reprodutoras dos microrganismos	13
2.3.2	Avaliação da autofluorescência dos fungos filamentosos objeto de estudo	13
2.3.3	Avaliação da eficiência de dois métodos para recuperar os esporos de fungos filamentosos de rampas	13
2.3.4	Avaliação de vários métodos para uma fixação/permeabilização eficaz dos esporos para a sua aplicação na técnica RNA-FISH	13
2.3.5	Avaliação da autofluorescência dos fungos filamentosos.	15

2.3.6	Aplicação da técnica RNA-FISH usando o melhor método de fixação determinado previamente na detecção de várias espécies de fungos filamentosos.....	15
2.3.7	Avaliação da possibilidade de detetar os fungos filamentosos que colonizam os materiais do património utilizando a técnica RNA-FISH	16
3	Resultados e discussão	17
3.1	Visualização das estruturas reprodutoras dos microrganismos	17
3.2	Avaliação da autofluorescência dos fungos filamentosos objeto de estudo.....	18
3.3	Avaliação da eficiência de dois métodos para recuperar os esporos de fungos filamentosos de rampas.....	19
3.4	Avaliação de vários métodos para uma fixação/permeabilização eficaz dos esporos para a sua aplicação na técnica RNA-FISH.	19
3.4.1	Influência do tempo de crescimento na eficácia da técnica FISH na detecção de fungos filamentosos.....	20
3.4.2	Aplicação da técnica RNA-FISH, usando o melhor método de fixação determinado previamente, na detecção de várias espécies de fungos filamentosos.....	21
3.4.3	Avaliação da possibilidade de detetar os fungos filamentosos que colonizam os materiais do património utilizando a técnica RNA-FISH	22
4	Conclusões	25
5	Perspectivas futuras.....	27
	Referências Bibliográficas	29
	Anexos	31

Índice de figuras

Figura 1. Estruturas de um fungo filamentosos.	1
Figura 2. Desenvolvimento do micélio (a) e estrutura reprodutora: Esporângio (b) [3].	2
Figura 3. Passos básicos para a Hibridação In Situ Fluorescente [24].	7

Índice de tabelas

Tabela 1. Estruturas dos fungos filamentosos objeto de estudo.	17
Tabela 2. Autofluorescência dos fungos filamentosos sob estudo em diferentes momentos do seu crescimento.	18
Tabela 3: Percentagem de esporos fluorescentes obtidos aplicando a técnica RNA-FISH variando os métodos de permeabilização.	20
Tabela 4. Resultados obtidos na aplicação do melhor método de permeabilização (M5) em combinação com a técnica RNA-FISH para a detecção de esporos e hifas de fungos filamentosos com sondas específicas e não específicas assim como para os correspondentes brancos.	21
Tabela 5. Resultados obtidos na aplicação do método de permeabilização mais eficaz (M5) em combinação com a técnica RNA-FISH. Visualização de esporos e hifas fluorescentes de fungos filamentosos com a sonda EUK516-Cy3 usando o filtro TRITC.	22
Tabela 6 Detecção de autofluorescência em vários materiais presentes em bens patrimoniais.	23

1 Introdução

1.1 Fungos filamentosos

1.1.1 Características

Os fungos filamentosos (Figura 1) são um grupo diverso de organismos eucariotas. O termo 'fungos filamentosos' é usado para espécies produtoras de filamentos tais como as hifas. Esta característica é usada para os distinguir das leveduras, que são essencialmente fungos unicelulares com células vegetativas. Os fungos filamentosos desempenham um papel fundamental na natureza sendo os principais decompositores nos variados habitats em que se encontram [1]. São também organismos importantes para entender o desenvolvimento eucariótico e têm sido frequentemente explorados na indústria [2].



Figura 1. Estruturas de um fungo filamentosos.

Os fungos filamentosos asseguram a sua sobrevivência e dispersão através da produção de esporos. A sua diversidade está diretamente relacionada com os vários tipos de esporos que produzem [4].

1.1.2 Onde proliferam e como?

Os fungos filamentosos são organismos aeróbios e não conseguem crescer bem em condições em que o oxigénio é limitado. Desenvolvem-se a partir de esporos localizados nas extremidades das hifas. Quando estes entram em contacto com uma superfície hospedeira os esporos desenvolvem tubos germinativos que darão origem as hifas. Ao conjunto das hifas germinadas a partir dos esporos chamamos micélio (Figura 2 a) que por sua vez produz hifas aéreas [3]. São estas hifas aéreas que permitem aos fungos filamentosos terem uma reprodução assexuada, uma vez que é na sua extremidade que se encontram os esporângios (Figura 2 b). Estes contém milhares de

esporos, que após o amadurecimento se libertam da estrutura sendo estes clones do seu progenitor [3].

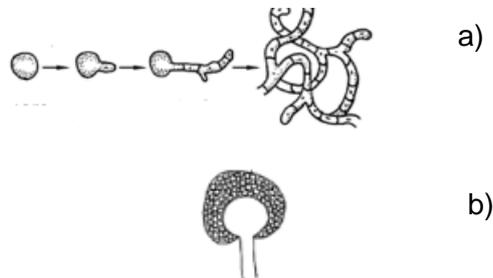


Figura 2. Desenvolvimento do micélio (a) e estrutura reprodutora: Esporângio (b) [3].

Os fungos filamentosos podem viver durante anos num estado latente, são microrganismos muito comuns e os seus esporos podem ser encontrados em quase todos os ecossistemas sendo facilmente espalhados pelo ar [3,5].

A grande capacidade de adaptação de alguns fungos filamentosos permite-lhes colonizar ambientes com as mais diversas condições, ar, solo, água, vegetação em decomposição, interior de sistemas de ventilação e ambientes gélidos, nos alimentos, na flora gastrointestinal, na pele e em bens patrimoniais, entre outros [3,6,7]. A proliferação destes microrganismos está associada tanto a efeitos benéficos como nocivos.

1.1.3 Efeitos benéficos e nocivos associados

Os fungos filamentosos são microrganismos importantes nas áreas da indústria e da medicina. Podemos destacar efeitos benéficos tais como a segregação de uma vasta gama de enzimas e metabolitos principais e secundários que são usados na fermentação para uso industrial de processamento de alimentos, por exemplo, a fabricação de várias qualidades de queijos e na produção de alimentos substitutos da carne e por outro lado na medicina, na fabricação de antibióticos [1,8].

Apesar dos numerosos efeitos benéficos, estes microrganismos possuem também o seu “lado escuro” podendo provocar também diferentes efeitos nocivos tais como patogenicidade, alergias, decomposição de alimentos e biodeterioração de materiais.

A existência de contaminações por parte de fungos filamentosos no corpo humano está associada a diferentes doenças, alergias e infeções [3][6]. Alguns dos alimentos que ingerimos, com elevado teor de açúcar ou pH baixo, são superfícies de crescimento ótimas para fungos filamentosos. A presença nos alimentos favorece a decomposição dos mesmos e a aparição de substâncias tóxicas tais como as micotoxinas [9].

Devido a sua capacidade de sobrevivência, de adaptação e de crescimento em locais com baixas concentrações de matéria orgânica e reduzida humidade assim como de formar esporos resistentes, os fungos filamentosos são a principal causa de degradação de bens patrimoniais da mais diversa natureza [7,10,11]. A proliferação dos fungos filamentosos nos bens patrimoniais produz danos estéticos e estruturais: formação de biofilmes, descoloração dos materiais, aparição de fendas entre outros que caracteriza estes fungos na destruição do património é o mecanismo de acidólise que é caracterizado pela excreção de ácidos orgânicos [7].

Como consequência destes inúmeros efeitos nocivos, há um interesse considerável no desenvolvimento de estratégias específicas para detetar a presença e proliferação destes microrganismos [12].

1.1.4 Parede celular e permeabilização

A parede celular dos fungos filamentosos é responsável pela forma característica das células. É forte e flexível para os proteger de mudanças osmóticas e ambientais e permitir a adaptação às mudanças morfológicas das células, como por exemplo durante o crescimento das mesmas [13]. Os componentes maioritários são polissacarídeos tais como glucano e quitina, e componentes matriciais tais como proteínas e polímeros de manose (mananos) [14].

A dificuldade para corar os conídios e os esporos é atribuída às características das paredes celulares que estes microrganismos possuem, pois são espesas e muito resistentes para que sirvam de proteção contra agentes físicos, químicos e biológicos que sejam prejudiciais à sua sobrevivência [15]. Para contornar estas dificuldades e para conseguirmos ter acesso ao meio intracelular [16], desenvolveram-se estratégias de permeabilização eficientes tanto para detetar antígenos como para corar as células com corantes fluorescentes, com sondas FISH que permitem a aplicação das mesmas em várias espécies de fungos. As estratégias utilizadas para este fim passam pela desidratação por adição de álcoois, surfactantes, ou choque osmótico. Mas apenas o método de permeabilização com base na adição Triton X-100, EDTA e β -mercaptoenol,

seguido de uma exposição de stress hiperosmótico obteve sucesso na permeabilização de fungos filamentosos para aplicação a técnica FISH [12].

1.1.5 Autofluorescência dos fungos filamentosos

Chamamos autofluorescência à luz emitida pelos microrganismos na presença de radiação ultravioleta. O conhecimento da existência de autofluorescência em fungos filamentosos é vantajoso na medida em que pode, em alguns casos, permitir a identificação dos organismos sem a utilização de corantes especiais. No entanto, na maioria das vezes, estes sinais de autofluorescência são fracos ou inexistentes impossibilitando a sua identificação [17].

Os resultados de alguns estudos indicam que a autofluorescência dos fungos e outros microrganismos esta associada às condições de crescimento, como por exemplo os alimentos que têm disponíveis ou os materiais onde se depositam, ou até os próprios métodos de fixação que por vezes deixam resíduos fluorescentes depositados nas membranas [18].

Para à aplicação de técnicas de coloração fluorescente, na técnica FISH e estudos imunológicos, entre outras técnicas moleculares, a autofluorescência dos fungos pode ser um problema a contornar [18].

1.2 Hibridação *In Situ* fluorescente

1.2.1 Em que consiste a técnica e como tem evoluído?

Hoje em dia a Hibridação *In Situ* Fluorescente (FISH) é o método mais utilizado para a identificação de cadeias nucleotídicas específicas *in situ* [19]. Com esta técnica, é possível identificar sequências específicas de DNA ou RNA em vários genomas, uma vez que as sondas FISH hibridam com as sequências de nucleótidos específicas alvo dos microrganismos em estudo [20]. Esta técnica é muito útil tendo em conta a ampla variedade de aplicações e o seu melhoramento ao longo dos anos [19].

A técnica de Hibridização *In Situ* foi originalmente desenvolvida por dois grupos independentes em 1969. Naquela época, a incorporação do isótopo radioativo era o único método disponível para a deteção da sonda, e a autoradiografia era o único meio de deteção de sequências hibridadas. Desde então, a técnica sofreu varias mudanças. O maior avanço deu-se em 1980 com a rápida melhoria na clonagem molecular e técnicas de marcação não radioativas [21]. A técnica não radioativa, com marcadores fluorescentes, mais estáveis do que os isotópicos, tornou a técnica mais segura e rápida ao mesmo tempo que aumentou a resolução devido á fluorescência celular [21] (o primeiro gene de cópia única para ser mapeado utilizando a Hibridação *In Situ* não

isotópica foi realizada utilizando microscopia de contraste de fluorescência em 1985 [21]).

Na fase final dos anos 1980 o uso da técnica FISH sofreu um crescimento exponencial, sendo usada em laboratórios, tanto para investigação e diagnóstico como aplicado a muitas questões biológicas. No entanto, esse entusiasmo diminuiu à medida que as limitações da técnica se tornaram um obstáculo [21].

No início de 1990, os avanços na tecnologia começaram a contornar alguns dos obstáculos e limitações, tais como, a captura de imagem e o desenvolvimento de softwares de computador resolvendo o problema desvanecimento do sinal ao usar fluorocromos. Uma das limitações do método anterior das FISH era a incapacidade de distinguir mais do que uma sequência simultaneamente. A introdução da técnica FISH com vários corantes superou essa limitação, mas seria ainda prejudicado pelo número limitado de fluorocromos disponíveis. Em seguida, a marcação combinada foi introduzida, consistindo na marcação de uma sonda com mais do que um nucleótido com vários fluorocromos [21].

Isto foi demonstrado em 1992, quando três fluorocromos, juntamente com microscopia de imagem digital foram utilizados para detetar simultaneamente sete sondas de DNA em células metafásicas. Em 1996, o objetivo de visualizar todos os 22 diferentes autossomas humanos e os dois cromossomos sexuais usando 24 cores diferentes foi alcançado pelo desenvolvimento de conjuntos de filtros de epifluorescência e software de computador para detetar e discriminar 27 sondas de DNA hibridaram simultaneamente [21].

1.2.2 Variantes da técnica FISH

As variantes resultantes da combinação da técnica FISH com outras técnicas analíticas permitem adequar a análise aos resultados pretendidos, ao tipo de amostra e ultrapassar algumas das dificuldades encontradas de forma habitual no uso da técnica. Algumas destas variantes são: a CLASI-FISH, RING-FISH, FISH-DVC, MW-FISH, MAR-FISH, CARD -FISH, RCA-FISH, e spike-FISH, entre outras.

- MAR-FISH: A técnica consiste na captação de substratos específicos por microrganismos em condições *in situ*. Pode ser diretamente determinada utilizando substratos radiomarcados com [³H] ou [¹⁴C] em combinação com microautoradiografia. O desenvolvimento da técnica MAR-FISH representa um avanço significativo na investigação da atividade microbiana e a sua diversidade,

porque a absorção de substratos específicos pode estar diretamente relacionada com a identidade filogenética dos organismos [22].

- CARD-FISH (Catalyzed Reporter Deposition –FISH): Refere-se a sondas marcadas com peroxidase de rabano (HRP), enzimas de tamanho molecular elevado, que são usadas durante a fase de hibridação, seguido por uma técnica de amplificação com base em (CARD), que consiste na adição de moléculas de tiramina ligadas a fluorocromos que hibridam com as anteriores sondas ligadas a HRP [23,24].
- RING-FISH: Este método foi usado pela primeira vez para a identificação de bactérias com base no seu RNA ribossomal [25]. Envolve a utilização de sondas polirribonucleicas que são multiplamente marcadas com marcadores moleculares, e é caracterizada pelos sinais fluorescentes em forma anelar na periferia das células. Estes sinais em forma de anel são a consequência da dobragem da sonda de RNA de cadeia moleculares simples em estruturas secundárias, o que resulta na formação de uma rede de sondas em redor das células durante a hibridação celular [23].

1.2.3 RNA-FISH

A técnica de RNA-FISH é reconhecida pela utilização de um oligonucleótido ligado a um ou mais marcadores fluorescentes (fluorocromos). Os oligonucleótidos utilizados são complementares de determinada região de RNA das células viáveis uma vez que este é inexistente em células não viáveis. Esta técnica permite a deteção de RNA no interior das células, e deste modo a deteção e identificação de microrganismos a níveis taxonómicos diferentes (desde o domínio até a espécie e subespécie), dependendo da especificidade da sonda usada [26–29].

Os fluorocromos mais utilizados englobam-se nos derivados das fluoresceínas (6-FAM e Oregon Green), cianinas (Cy3, Cy5 e Cy7), coumarinas e rodaminas (Texas Red e Rhodamine Green™). Durante a hibridação, as sondas penetram nas células e ligam-se à sua sequência alvo, tornando a célula fluorescente [30,31].

1.2.4 Fundamento e etapas

A técnica RNA-FISH foi desenvolvida com o objetivo de identificar células individuais *in situ*, e não está baseada na amplificação dos ácidos nucleicos através da Reação em Cadeia da Polimerasa (PCR) [26].

Normalmente os protocolos das várias técnicas FISH incluem quatro passos fulcrais para uma boa execução, sendo eles a fixação e permeabilização das células, a hibridação, a lavagem e a detecção de células fluorescentes (Figura 3) [26]. A duração varia, indo desde 2h a 4 até alguns dias [12].

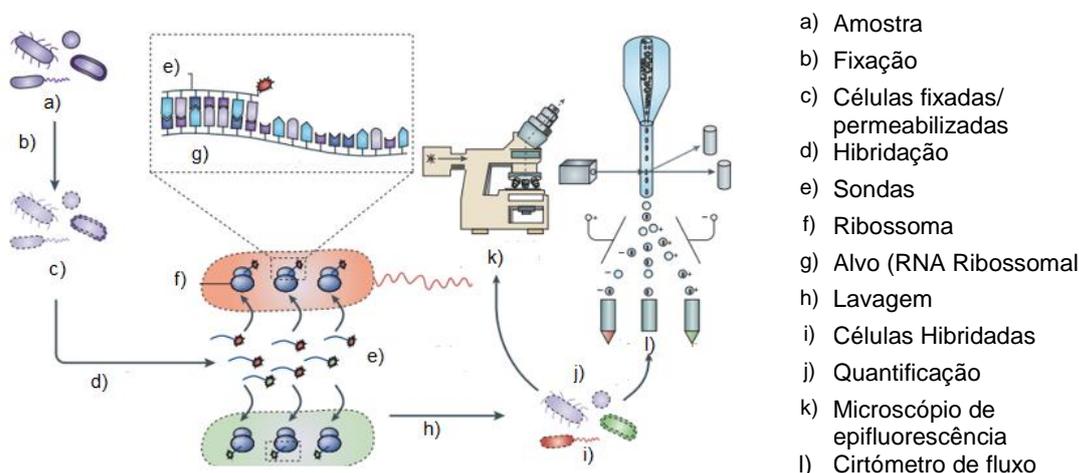


Figura 3. Passos básicos para a Hibridação In Situ Fluorescente [24].

1.2.4.1 Permeabilização e fixação celular

As células precisam de ser fixadas e permeabilizadas para que a estrutura celular fique estável e ocorra penetração da sonda fluorescente no interior da célula, mas também, para que o RNA fique protegido da degradação provocada pelas RNAses endógenas [20]. Uma boa fixação é aquela que permite uma boa entrada da sonda no meio intracelular, de modo a conseguir uma posterior hibridação da sonda com o máximo de fragmentos de RNA complementar e também manter a integridade da célula [32,33].

Para a permeabilização das células podem-se utilizar vários métodos experimentais com diferentes fixantes [12,15,33]. É frequente o uso de agentes de precipitação, como etanol ou metanol, ou de agentes polimerizantes, como os aldeídos (paraformaldeído) [20].

1.2.4.2 Hibridação

A hibridação é um passo fundamental para que a sonda hibride com a sequência de RNA complementar que se encontra no interior da célula. A hibridação deve processar-se sob condições controladas para que a ligação seja eficiente e específica da sonda com a sequência complementar. Para tal fim é adicionado o tampão de hibridação (HB) que permite controlar alguns dos fatores que influenciam a

especificidade da hibridação: pH, concentração de cátions monovalentes e presença de solventes orgânicos. As condições têm de ser previamente otimizadas de acordo com as particularidades das sondas utilizadas. A temperatura é um fator crucial que também é controlado, colocando as amostras num banho-maria a 37-50°C durante um intervalo de tempo compreendido entre 30 min e varias horas [26].

1.2.4.3 Lavagem

Esta etapa tem como objetivo remover a sonda em excesso ou ligações indesejadas que possam ter ocorrido durante a hibridação [20].

1.2.4.4 Detecção de células fluorescentes

A visualização da fluorescência das células hibridadas com as sondas FISH é conseguida através da utilização de radiações UV que incidem nos fluorocromos presentes nas sondas, excitando-os e permitindo-nos a sua deteção. Sendo assim as técnicas que nos permitem fazer este trabalho são a microscopia de fluorescência, a fluorometria ou a citometria de fluxo, entre outras [34].

1.2.5 Sondas RNA-FISH

As sondas RNA-FISH são compostas por um oligonucleótido, complementar de determinada região de RNA alvo que compreende normalmente entre 15 a 25 nucleótidos, ao qual se encontra ligado um ou mais marcadores fluorescentes. Os fluorocromos mais utilizados englobam-se nos derivados das fluoresceínas (6-FAM e Oregon Green) e cianinas (Cy3, Cy5 e Cy7) [27].

1.2.6 Aplicações da técnica RNA-FISH na microbiologia

A técnica FISH é amplamente utilizada na deteção, visualização e contagem das células alvo viáveis presentes numa amostra. Devido à sua rapidez e sensibilidade, esta técnica é considerada uma ferramenta importante para estudos microbiológicos em varias áreas de investigação tais como na área clínica, ambiental e indústria alimentar [26,35].

Na microbiologia ambiental os estudos baseados na técnica FISH têm vindo a ser desenvolvidos com amostras provenientes da água do mar, rios, lagos, solos, plantas e animais, com o objetivo de determinar a diversidade microbiana presente e a sua relação com o meio ambiente [35].

Já na indústria alimentar a técnica RNA-FISH é aplicada com o objetivo de identificar microrganismos presentes nos alimentos que possam ser prejudiciais para a saúde humana, [36].

Na área clínica tem-se vindo a aplicar na identificação de microrganismos patogénicos em comunidades complexas que se encontram na cavidade buca e no aparelho respiratório e gastrointestinal [26,37,38]. Também nesta área é de salientar que a aplicação das técnicas FISH está a ser investigada com intuito de diagnosticar mais fácil e rapidamente as neoplasias [39].

A técnica RNA-FISH tem sido utilizada na deteção e identificação de microrganismos que deterioram obras de arte tanto *ex situ* como *in situ* [40]: i) *ex situ* para deteção de bactérias e fungos em catacumbas romanas, na deteção de bactérias em pinturas e murais medievais danificadas e na determinação do número de microrganismos presentes em amostras de estalactites das cavernas de Sahastradhara [25,41–43]; ii) *in situ* no estudo da distribuição espacial dos microrganismos procariotas em pinturas do século dezasseis [40].

No laboratório de biotecnologia do Laboratório HERCULES está a ser explorada e otimizada com o objetivo de detetar e identificar os microrganismos que abundam nos materiais do património. Para tal fim estão a ser investigadas alternativas para contornar os principais problemas encontrados: nomeadamente a baixa intensidade de fluorescência emitida pelas células e a interferência da autofluorescência dos materiais que se pretendem analisar [44].

1.2.7 Vantagens e desvantagens

A técnica FISH apresenta inúmeras vantagens para a identificação de microrganismos tais como a sua sensibilidade, ser uma técnica quantitativa, permitir a visualização de microrganismos não cultiváveis em laboratório e também a possibilidade de identificação de vários microrganismos diferentes através do uso de vários corantes fluorescentes [45].

No entanto, também é necessário alertar para as desvantagens que esta técnica pode ter em relação aos resultados obtidos, tais como os falsos positivos e falsos negativos [46]. Os falsos positivos ocorrem quando o microrganismo em estudo possui uma autofluorescência elevada, o que pode levar a confundir-lo com uma célula que detenha fluorescência devido à hibridação da sonda no seu interior [46]. Os falsos negativos podem surgir quando as sondas fluorescentes em que o alvo é o RNA ribossomal produzem sinais com baixa intensidade, que pode não ser detetada. Este facto pode ser devido à uma permeabilidade insuficiente da membrana celular (o que vai dificultar a entrada das sondas), condições de hibridação não otimizadas (tais como sondas com uma sequência incorreta ou marcadores não eficazes), ou também ao facto de a célula possuir uma quantidade reduzida de RNA ribossomal. Para além disso, a

estrutura tridimensional dos ribossomas poder ainda dificultar o acesso dos oligonucleótidos aos seus alvos [46,47].

1.3 A técnica RNA-FISH na detecção e análise de fungos filamentosos nos bens patrimoniais

É fundamental detetar os fungos filamentosos nos bens patrimoniais uma vez que a sua proliferação nos mesmos está associada a aparição de danos estéticos e estruturais [11].

No âmbito da conservação e restauro a técnica FISH tem sido aplicada na detecção de fungos filamentosos envolvidos na biodeterioração de superfícies com o objetivo de determinar a espécie. Esta técnica tem a vantagem de ser não destrutiva, ou seja, é possível recolher amostras sem que se danifiquem os materiais que fazem parte do património [11].

Muitas das técnicas FISH utilizam frequentemente sequencias de DNA para identificar os organismos presentes em comunidades microbianas, mas no caso dos fungos filamentosos esta técnica pode ser comprometida devido as suas paredes rígidas. Sendo assim os avanços na investigação da das técnicas FISH demonstraram que a utilização de sondas com RNA seriam mais eficientes não só na detecção e visualização de fungos filamentosos nos materiais mas também na quantificação da sua viabilidade uma vez que a quantidade de RNA de uma célula é proporcional á necessidade que esta tem de sintetizar proteínas metabólicas [11].

Deste modo, neste trabalho pretendeu-se otimizar a técnica RNA-FISH com o objetivo de contornar as dificuldades da permeabilização da parede celular para conseguir uma penetração eficiente das sondas FISH, com o fim de poder utilizar a técnica otimizada na detecção de fungos filamentosos nos bens patrimoniais. Para tal fim, foram também investigadas as possíveis limitações da técnica devidas a autofluorescência dos materiais ou dos próprios fungos filamentosos.

2 Metodología

2.1 Estratégia

2.1.1 Local de realização

Laboratório HERCULES- Herança Cultural Estudos e Salvaguarda, da Universidade de Évora.

2.1.2 Duração do projeto

Aproximadamente 1 semestre (ano letivo 2015/2016).

2.1.3 Modelo biológico

Foram utilizados seis fungos filamentosos, isolados de pinturas murais do Património Cultural português e com conhecida capacidade biodeteriorogénica: *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. e *Exophiala* sp.. Todos eles pertencem a coleção HERCULES-Biotech Lab, Universidade de Évora.

Os microrganismos foram rotineiramente repicados e mantidos em rampas de Extrato de Malta Agar a 4°C.

2.1.4 Sondas RNA-FISH

EUK516-Cy3, EUK516-6FAM e EUK516-Cy5 foram as sondas utilizadas para a deteção de fungos filamentosos na técnica RNA-FISH. Todas estas sondas são sondas comerciais e específicas para eucariotas. Estas sondas estão constituídas pelo primer EUK516 5'-ACCAGACTTGCCCTCC-3' ligado aos vários fluorocromos referidos anteriormente.

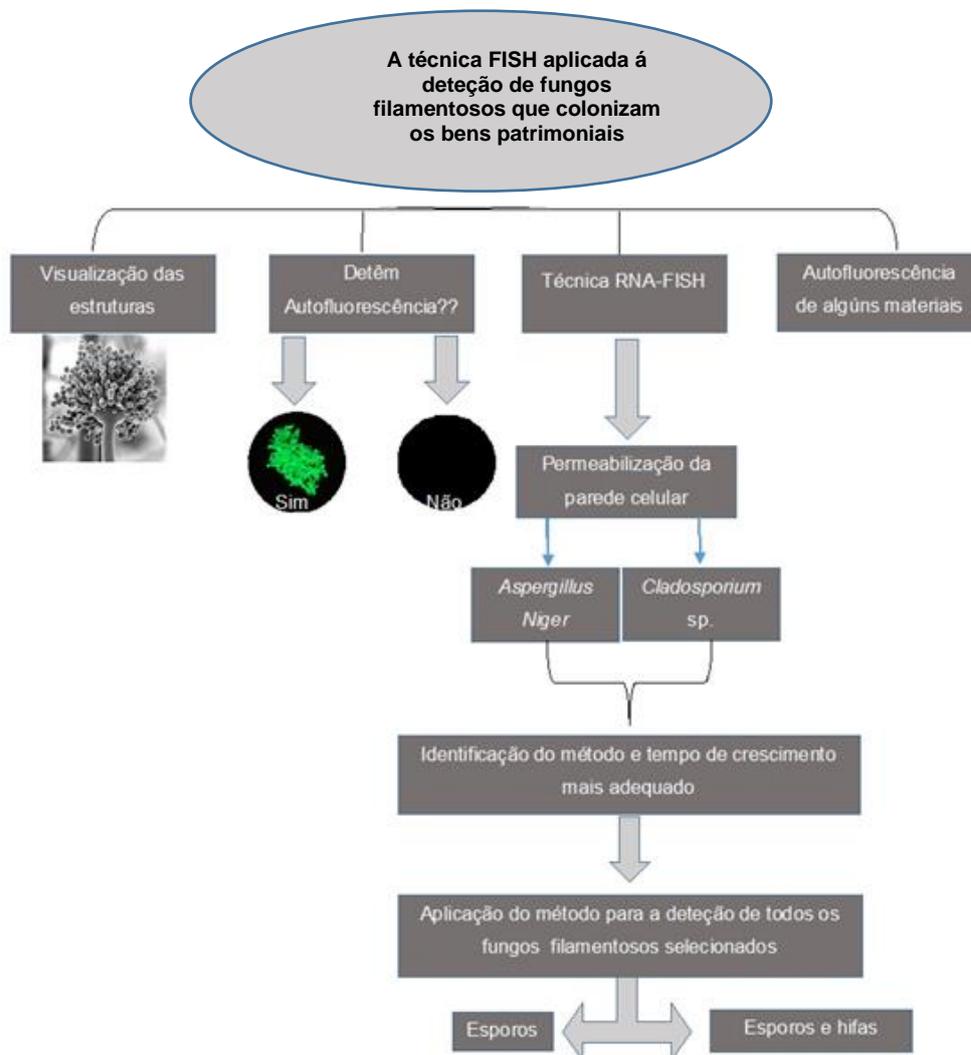
Como controlo negativo foram utilizadas sondas comerciais específicas para eubactérias, sendo estas EUB338-Cy3 e EUB338-6FAM. A sequência do primer EUB338 é 5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'.

2.1.5 Técnicas e métodos utilizados

- Repicagem de fungos em meio sólido;
- Permeabilização celular;
- Hibridação *In Situ* Fluorescente (FISH);
- Contagem de células em câmara de Neubauer;
- Microscopia de epifluorescência;

Nota: Todos os ensaios foram realizados na câmara de fluxo laminar quando necessário e foram sempre tomadas as medidas de assepsia fundamentais para todos os experimentos.

2.2 Organigrama



2.3 Procedimento

2.3.1 Visualização das estruturas reprodutoras dos microrganismos

A visualização dos fungos estudados neste trabalho foi feita através da observação macroscópica e microscópica.

Para a visualização microscópica das estruturas reprodutoras foram feitas preparações a fresco utilizando o corante azul-de-metileno, sendo em seguida observadas ao microscópio ótico (Anexo 3).

2.3.2 Avaliação da autofluorescência dos fungos filamentosos objeto de estudo

Para avaliar a autofluorescência dos fungos filamentosos foram preparadas varias rampas dos 5 fungos objeto de estudo em meio MEA (Anexo 2). A avaliação da autofluorescência dos fungos foi feita em 2 tempos de crescimento, 5 dias e 90 dias. Dos fungos *Cladosporium* sp. e *Aspergillus niger* foi também analisada após 180 dias.

Para isso foram recolhidas amostras das rampas com o auxílio de uma ança estéril e colocadas numa lâmina de microscópio com 20 µl de água destilada. As amostras foram visualizadas sob o microscópio de epifluorescência utilizando os diferentes filtros (Anexo 3).

2.3.3 Avaliação da eficiência de dois métodos para recuperar os esporos de fungos filamentosos de rampas

Para esse fim, foram utilizadas duas soluções, uma de PBS 10X e outra de Tween 20/PBS 10X (0,02% v/v). Para avaliar a diferente capacidade de recuperação dos esporos das duas soluções, em duas rampas distintas foram adicionados 15,0 mL das respectivas soluções (3 x 5,0 mL). A suspensão celular resultante foi recolhida num falcon estéril e filtradas com uma gaze tripla para novos falcons. Finalmente, foi determinada a concentração celular das duas suspensões resultantes utilizando a câmara de Neubauer.

2.3.4 Avaliação de vários métodos para uma fixação/permeabilização eficaz dos esporos para a sua aplicação na técnica RNA-FISH

Dadas as dificuldades para permeabilizar os fungos filamentosos, foram avaliados vários métodos de fixação/permeabilização descritos na bibliografia para determinar qual é o mais eficiente. Isto é, qual permite uma melhor permeabilização celular para a entrada das sondas FISH na etapa de hibridação e conseqüentemente, produz uma maior % de células fluorescentes.

2.3.4.1 Métodos de fixação

Para a aplicação de qualquer um dos seguintes métodos de fixação (M1-M5) foram colocadas alíquotas idênticas com 10^6 células em cada um dos microcubos. Após a centrifugação das amostras foi descartado o sobrenadante e aplicados os procedimentos descritos a continuação para fixar as amostras:

- *M1*: Foi adicionado 1,0 mL de Triton X-100 às amostras e estas foram aquecidas durante 30 min a 30°C depois foi adicionado 1,0 mL de gliceros e colocaram-se as amostras em gelo durante 30 min[12].
- *M2*: Foi adicionado 1,0 mL de NaOH às amostras e as amostras foram incubadas durante 30 min a temperatura ambiente[12].
- *M3*: Após a centrifugação as amostras foram colocadas durante 30 s no microondas a temperatura média[15].
- *M4*: Foi adicionado 1,0 mL de etanol 99% às amostras e mantidas a temperatura ambiente durante 1 h[12].
- *M5*: Foi adicionado 1,0 mL de paraformaldeído 4% (p7v) em PBS 10X (Anexo 1) a cada amostra e incubadas durante 10 min a temperatura ambiente[12].
- Foram também feitos ensaios sem aplicar qualquer tipo de fixante.

Após a aplicação de cada um dos métodos descritos, as amostras foram centrifugadas. Uma vez descartado o sobrenadante foram aplicados os restantes passos da técnica RNA-FISH, comuns para todas as amostras.

Todas as centrifugações descritas neste apartado e nos seguintes foram realizadas durante 10 min a 10000 rpm.

2.3.4.2 Hibridação, lavagem e deteção.

- Hibridação: Depois das células estarem fixadas, as amostras foram centrifugadas, foi descartado o sobrenadante e foram adicionados 80,0 μ L de HB (Anexo 1). De seguida é adicionada a sonda pretendida (EUK516-Cy3, EUK516-6FAM e EUK516-Cy5). Para que ocorra a hibridação das sondas com as sequências alvo de RNA dos microrganismos, as amostras são colocadas em banho-maria durante 2 h a 46°C com agitação média. Para além das amostras referidas anteriormente, também foram preparados: i) controlos negativos, adicionando uma sonda não específica para eucariotas (sondas específicas para eubactérias EUB338-Cy3, EUB338-Cy5 e EUB338-6FAM); e ii) os correspondentes brancos (sem adição de sonda).
- Lavagem das células: As amostras foram centrifugadas e de seguida foi descartado o sobrenadante. Para a lavagem foram adicionados 100,0 μ L de HB e imediatamente as amostras foram colocadas 30 min no banho-maria a 46°C com

agitação média. Por último as amostras foram centrifugadas, foi descartado o sobrenadante e foram adicionados 400,0 µL de PBS.

- **Deteção e análise das células fluorescentes:** Para a deteção das células fluorescentes foi utilizado o microscópio de epifluorescência (Anexo 1). Este faz incidir luz ultravioleta que excita os fluorocromos presentes nas sondas hibridadas ao RNA das células sob estudo. Para o estudo dos diferentes fluorocromos é necessária a utilização de filtros para que permitam fazer incidir luz do intervalo de comprimento-de-onda adequado á deteção da fluorescência da sonda nas células. Para calcular a % de esporos fluorescentes foram utilizadas relações entre o número de esporos visíveis e o número de esporos fluorescentes quando expostas a radiação UV, e determinada a percentagem. Foram considerados os valores médios obtidos a partir da análise de seis campos visuais do microscópio.

2.3.5 Avaliação da autofluorescência dos fungos filamentosos.

Para determinar a possibilidade de aplicar a técnica RNA-FISH na deteção de fungos filamentosos, devido á probabilidade de existir autofluorescência por parte dos mesmos, foram analisadas várias espécies de fungos. Para isso fez-se uma preparação para cada fungo filamentoso, colocando 20 µL de água destilada numa lâmina de microscópio e fazendo esfregaços com as amostras dos vários fungos, retiradas por raspagem com uma ança estéril das rampas previamente feitas.

Após a elaboração dos esfregaços, foram todos visualizados no microscópio de epifluorescência com vários comprimentos de onda para que fosse possível detetar a possível autofluorescência dos fungos filamentosos.

2.3.5.1 Influência do tempo de crescimento

Para investigar a influência do tempo de crescimento dos fungos filamentosos na sua autofluorescência, foi analisada a autofluorescência do *Aspergillus iger* e do *Cladosporium* sp. em várias fases de crescimento, 5, 90 e 180 dias aplicando o procedimento descrito previamente.

2.3.6 Aplicação da técnica RNA-FISH usando o melhor método de fixação determinado previamente na deteção de várias espécies de fungos filamentosos

O método de fixação que permitiu a obtenção de melhores resultados foi o método 5. Por isso, para determinar a eficiência da técnica RNA-FISH otimizada utilizamo-la em vários fungos filamentosos. A técnica foi aplicada em amostras contendo esporos ou esporos e hifas de 4 dos 5 fungos filamentosos sob estudo. Foram utilizadas

as sondas específicas para fungos filamentosos EUK516 e para controlo negativo as sondas específicas para bactérias EUB338.

2.3.7 Avaliação da possibilidade de detetar os fungos filamentosos que colonizam os materiais do património utilizando a técnica RNA-FISH

Uma vez otimizada a técnica RNA-FISH e estudada a autofluorescência dos fungos filamentosos foi investigada também a autofluorescência de alguns dos materiais que constituem objetos e monumentos do Património Cultural sendo estes madeira, papel 1, argamassa, tecido e algumas pedra definidas.

Para isso foram visualizados no microscópio de epifluorescência para determinar a existência de autofluorescência a diferentes comprimentos de onda.

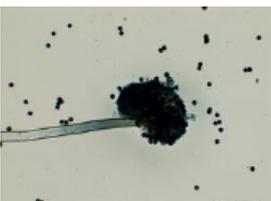
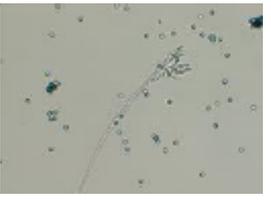
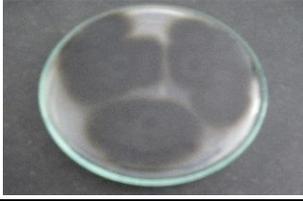
3 Resultados e discussão

3.1 Visualização das estruturas reprodutoras dos microrganismos

Com o fim de estudar a otimização da técnica FISH para a sua aplicação na detecção de microrganismos que colonizam os bens patrimoniais, e mais concretamente dos fungos filamentosos, foram selecionados cinco fungos filamentosos biodeteriogénicos isolados de bens patrimoniais dos géneros: *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.*, *Cladosporium sp.*, *Fusarium sp.*, *Exophiala sp.*.

Na Tabela 1 é possível observar o aspeto macroscópico e microscópico de todos eles.

Tabela 1. Estruturas dos fungos filamentosos objeto de estudo.

Microrganismo	Aspeto das colónias em placas		Aspeto microscópico
	Frente	Verso	
<i>Aspergillus niger</i>			
<i>Exophiala sp.</i>			
<i>Penicillium sp.</i>			
<i>Cladosporium sp.</i>			
<i>Fusarium sp.</i>			

3.2 Avaliação da autofluorescência dos fungos filamentosos objeto de estudo

É conhecido que os fungos filamentosos podem desenvolver autofluorescência devido às condições de crescimento, consoante os alimentos que têm disponíveis ou os materiais onde se depositam. No entanto, também os próprios métodos de fixação, por vezes, deixam resíduos depositados nas membranas, o que pode resultar na fluorescência dos fungos, mesmo que habitualmente esta fluorescência seja reduzida [19].

A autofluorescência natural dos microrganismos é vantajosa na medida em que pode, em alguns casos, permitir a identificação dos organismos sem a utilização de corantes especiais. No entanto, na maioria das vezes, estes sinais de autofluorescência são fracos ou inexistentes impossibilitando a sua identificação [18].

Para avaliar a intensidade de autofluorescência dos fungos filamentosos ao longo do tempo, foi avaliada a autofluorescência dos seis géneros de fungos filamentosos em dois momentos do seu crescimento.

Os resultados indicam (Tabela 2) que em estágios curtos de crescimento não existe autofluorescência, no entanto a autofluorescência de alguns dos fungos estudados aumenta com o passar do tempo, como é o caso do *Fusarium* sp. e *Exophiala* sp..

Tabela 2. Autofluorescência dos fungos filamentosos sob estudo em diferentes momentos do seu crescimento.

Microrganismo	FILTRO					
	FITC		Cy5		TRITC	
	t crescimento (dias)					
	5	90	5	90	5	90
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium</i> sp.	-	-	-	-	-	-
<i>Cladosporium</i> sp..	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium</i> sp.	-	+	-	-	-	+
<i>Exophiala</i> sp.	-	+	-	-	-	++

+ foi detetada fluorescência fraca; ++foi detetada fluorescência forte; - não foi detetada fluorescência

Do *Cladosporium* sp. e do *Aspergillus niger*, foi analisada a autofluorescência também após 180 dias e os resultados evidenciam que não existe autofluorescência em nenhum destes dois microrganismos (resultados não mostrados).

Ao investigar a autofluorescência dos microrganismos é verificado que esta não é um impedimento para utilizar a técnica RNA-FISH na deteção de fungos filamentosos,

pois a fluorescência que adquirem quando têm sondas no seu interior é mais forte do que a autofluorescência dos mesmos, como se verificará posteriormente.

3.3 Avaliação da eficiência de dois métodos para recuperar os esporos de fungos filamentosos de rampas

Avaliou-se a eficiência de dois métodos na recuperação de esporos de fungos filamentosos a partir das rampas em que foram mantidos. Foram determinadas as concentrações celulares obtidas aplicando o mesmo procedimento mas utilizando soluções diferentes para a recolha PBS ou Tween 20/PBS 10X (0,02% v/v). Os resultados indicam que o método de recuperação mais eficiente é aquele que inclui o uso do tensoactivo não-iónico Tween 20, de acordo com a bibliografia existente [17,48].

A solução de Tween 20/PBS 10X (0,02% v/v) permitiu recuperar 7582 células/ μ L em comparação com as 1875 células/ μ L recuperadas utilizando exclusivamente o PBS. De este modo, neste trabalho sempre que necessário recuperar as células de fungos filamentosos das rampas foi utilizado o método mais eficiente.

3.4 Avaliação de vários métodos para uma fixação/permeabilização eficaz dos esporos para a sua aplicação na técnica RNA-FISH.

As células que se pretendem fixar são esporos e hifas de fungos filamentosos. Estes tem como constituintes exteriores uma parede celular e uma membrana plasmática. O objetivo da permeabilização, independentemente do método utilizado, é permitir que as sondas entrem no interior das células e hibridem com o RNA que se encontra no seu interior e assim conseguir a sua deteção.

Dada a dificuldade conhecida para permeabilizar os fungos filamentosos, foram testados vários métodos de fixação descritos na bibliografia existente utilizando dois fungos filamentosos: *Aspergillus niger* e *Cladosporium* sp.. Estes foram escolhidos devido à particular dificuldade de permeabilização que apresentam, previamente referidas em diversos artigos.

Pela impossibilidade de determinar a eficácia de permeabilização das hifas, com os meios disponíveis, decidiu-se estudar a permeabilidade dos esporos (dado que no geral são estruturas menos permeáveis do que as hifas). O método mais eficaz será depois aplicado na deteção de suspensões de esporos e hifas através da técnica FISH.

Os resultados obtidos com as suspensões de esporos mostraram (Tabela 3) que com o *Aspergillus niger* não é possível visualizar quaisquer sinais fluorescentes, logo a

permeabilização da membrana não foi suficiente para permitir a penetração das sondas e a hibridação consequente.

Tabela 3: Percentagem de esporos fluorescentes obtidos aplicando a técnica RNA-FISH variando os métodos de permeabilização.

Microorganismo	Método de fixação	% de esporos fluorescentes					
		<i>t</i> crescimento (días)					
		5		90		180	
		Branco	Sonda*	Branco	Sonda*	Branco	Sonda*
<i>Cladosporium</i> sp.	M1	0	22,06	0	24	0	0
	M2	0	77,6	0	34	0	0
	M3	0	27,38	23,68	23,8	0	0
	M4	7,69	28,70	4,35	31,87	0	0
	M5	0	45,33	10,59	46,15	0	41,73
	-	0	25,23	9,68	17,5	0	0
<i>Arpergillus niger</i>	M1	0	0	0	0	0	0
	M2	0	0	0	0	0	0
	M3	0	0	0	0	0	0
	M4	0	0	0	0	0	0
	M5	0	0	0	0	0	0
	-	0	0	0	0	0	0

- As células não foram fixadas; * A sonda utilizada foi EUK516-Cy3.

No caso do *Cladosporium* sp. independentemente do método de permeabilização utilizado obtiveram-se sempre maiores percentagens de esporos fluorescentes nas amostras em que foi adicionada a sonda do que nos brancos. Isto indica que ocorreu não só a permeabilização/fixação celular mas também a hibridação. Por outro lado também podemos conferir que o método de permeabilização mais eficaz é o método 5, pois este é o único que detêm fluorescência em todas as fazes de crescimento do *Cladosporium* sp..

3.4.1 Influência do tempo de crescimento na eficácia da técnica FISH na detecção de fungos filamentosos

Através da análise dos resultados referentes ao *Cladosporium* sp. é possível verificar que com o aumento do tempo de crescimento, torna-se mais difícil de obter resultados favoráveis em relação á aplicação da técnica RNA-FISH.

No entanto, com o método de permeabilização (M5) foram obtidos bons resultados, independentemente do tempo de crescimento do fungo filamentosos. Aplicando este método é possível detetar através da aplicação da técnica RNA-FISH a presença de esporos para todos os tempos de crescimento investigados, sendo também

por este motivo o método mais eficiente para realizar a permeabilização/fixação dos esporos para a aplicação da técnica RNA-FISH.

3.4.2 Aplicação da técnica RNA-FISH, usando o melhor método de fixação determinado previamente, na detecção de várias espécies de fungos filamentosos

Tendo em conta que o método (M5) foi o método com que obtivemos melhores resultados, utilizámo-lo para a permeabilização de todos os fungos disponíveis. De maneira a confirmar que este seria um bom método para, em combinação com a técnica RNA-FISH, conseguir uma boa penetração das sondas nas paredes celulares dos vários fungos filamentosos em estudo e por consequência sinais fluorescentes.

Quando foram analisadas as amostras que continham apenas esporos, podemos verificar que apenas quando a técnica RNA-FISH é utilizada em complementaridade com a sonda EUK516-Cy3, específica para eucariotas, são obtidos resultados positivos (Tabelas 4 e 5). Utilizando a sonda EUK516-6FAM, não foi possível detetar qualquer sinal de hibridação.

Tabela 4. Resultados obtidos na aplicação do melhor método de permeabilização (M5) em combinação com a técnica RNA-FISH para a detecção de esporos e hifas de fungos filamentosos com sondas específicas e não específicas assim como para os correspondentes brancos.

	Sonda	Filtros	Microrganismo			
			<i>Fusarium</i> sp.	<i>Exophiala</i> sp.	<i>Penicilium</i> sp.	<i>Cladosporium</i> sp.
Esporos	EUK516-6FAM	FITC	-	-	-	-
	EUB338-6FAM	FITC	-	-	-	-
	EUK516-Cy3	TRITC	+	+	+	+
	EUB338-Cy3	TRITC	-	-	-	-
	Branco	FITC	-	-	-	-
TRITC		-	-	-	-	
Esporos e hifas	EUK516-6FAM	FITC	-	-	-	-
	EUB338-6FAM	FITC	-	-	-	-
	EUK516-Cy3	TRITC	+	+	+	+
	EUB516-Cy3	TRITC	-	-	-	-
	Branco	FITC	-	-	-	-
TRITC		-	-	-	-	

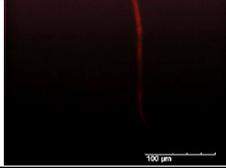
- Não foi detetada fluorescência; + Foi detetada fluorescência.

Foi feito o mesmo estudo, para amostras que continham esporos e hifas, não filtrando as suspensões, e tal como no ensaio anterior apenas obtivemos resultados com a sonda EUK516- Cy3 (Tabelas 4 e 5).

Em ambas as experiencias foi efetuado um controlo negativo, utilizando duas sondas não específicas para fungos, EUB338-6FAM e EUB338-Cy3. Com estas não foi

detetada qualquer sinal fluorescente o que comprova que estas não possuem uma sequência que seja complementar ao RNA intracelular, e portanto não hibrida. Tal como quando não foi adicionada qualquer sonda.

Tabela 5. Resultados obtidos na aplicação do método de permeabilização mais eficaz (M5) em combinação com a técnica RNA-FISH. Visualização de esporos e hifas fluorescentes de fungos filamentosos com a sonda EUK516-Cy3 usando o filtro TRITC.

		Microrganismos			
		<i>Fusarium</i> sp.	<i>Exophiala</i> sp.	<i>Penicilium</i> sp.	<i>Cladosporium</i> sp.
Esporos e hifas	Esporos				
	Hifas				

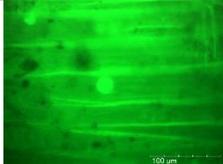
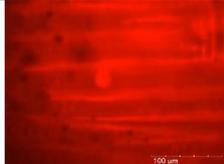
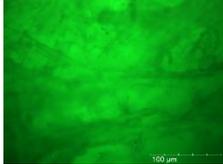
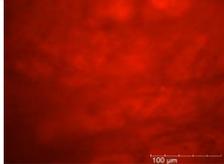
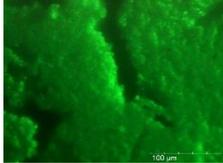
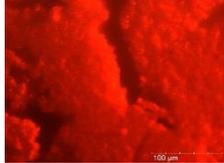
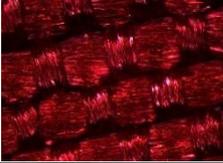
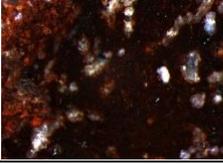
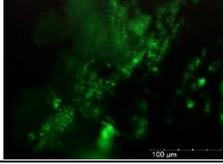
3.4.3 Avaliação da possibilidade de detetar os fungos filamentosos que colonizam os materiais do património utilizando a técnica RNA-FISH

Com a análise de vários materiais que fazem parte da constituição de inúmeros bens patrimoniais, podemos concluir que a aplicabilidade da técnica RNA-FISH com as seria apenas possível em tecido, pois este não apresenta autofluorescência no filtro FITC Tabela 6. No entanto, dado que não tem-se conseguido obter sinais fluorescentes utilizando a sonda EUK516-6FAM na deteção dos fungos filamentosos estudados neste trabalho. É necessário testar sondas que emitam fluorescência neste filtro e encontrar alguma que dê bons resultados na deteção dos fungos filamentosos para poder realizar a deteção destes em tecido.

Nos materiais que apresentam autofluorescência não é possível a aplicação da técnica com as sondas testadas neste trabalho, pois não conseguiríamos detetar os microrganismos. No entanto, nenhum dos materiais apresentou fluorescência significativa utilizando o filtro Cy5 (resultados não mostrados), o que permite pensar que utilizando um corante que emita fluorescência detetável com esse filtro e a técnica RNA-FISH otimizada neste trabalho seja possível aplica-la na técnica FISH aplicada á deteção de fungos filamentosos que colonizam os bens patrimoniais.

Foram realizados ensaios preliminares com a sonda EUK516-Cy5 sem obter bons resultados, mas pensa-se que é devido ao rápido decaimento do sinal fluorescente associado à escassa estabilidade do fluorocromo. Por isso, utilizando corantes mais estáveis é possível consegui-lo.

Tabela 6 Detecção de autofluorescência em vários materiais presentes em bens patrimoniais.

Material	Lupa (0,78x)	Lupa (10x)	Filtros do microscópio	
			FITC	TRITC
Madeira				
Papel 1				
Argamassa				
Tecido				
Pedra L1				
Pedra L4				

4 Conclusões

No presente trabalho investigou-se a técnica FISH aplicada á detecção de fungos filamentosos que colonizam os bens patrimoniais

Ao investigar a autofluorescência dos microrganismos conseguimos verificar que esta não é um obstáculo para nos impedir de utilizar a técnica RNA-FISH na detecção de fungos filamentosos, pois a fluorescência que adquirem quando têm sondas no seu interior é mais forte do que a autofluorescência dos mesmos.

Com a aplicação de vários protocolos de permeabilização celular, podemos concluir que a permeabilização pode tornar-se um obstáculo no que toca a realização da técnica RNA-FISH, pois em alguns fungos filamentosos como o *Aspergillus niger* impede a penetração das sondas e a sua detecção. Isto pode levar à ocorrência de falsos negativos. No entanto, utilizando paraformaldeído como fixante/permeabilizante (método M5) conseguiu-se obter resultados favoráveis na detecção de esporos e esporos/hifas através da aplicação da técnica RNA-FISH, utilizando a sonda EUK516-Cy3 nos seguintes fungos: *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. e *Sporotrix* sp..

Ao estudar a autofluorescência de vários materiais dos bens patrimoniais concluímos que: i) todos os materiais apresentaram autofluorescência sob o filtro TRICT; ii) apenas o tecido não apresenta autofluorescência no filtro FITC. Dado que utilizando a sonda EUK516-6FAM não foi possível detetar os fungos filamentosos estudados fica aberta a possibilidade de testar sondas que emitam fluorescência neste filtro e encontrar alguma que dê bons resultados na detecção dos fungos filamentosos para poder realizar a detecção destes em tecido; iii) A ausência de autofluorescência dos materiais sob o filtro Cy5 permite pensar na possibilidade de usar a técnica RNA-FISH na detecção de fungos filamentosos em materiais do património utilizando uma sonda com um corante que tenha fluorescência nos comprimentos de onda deste filtro.

5 Perspectivas futuras

No futuro espera-se a otimização do protocolo da técnica RNA-FISH na medida em que se determine um método de permeabilização eficiente da parede celular do fungo filamentosso *Aspergillus niger*.

Espera-se poder aplicar a técnica otimizada neste trabalho em alguns dos materiais do Património testados para autofluorescência, utilizando uma sonda similar a sonda EUK516 com um corante similar ao 6FAM em tecido ou qualquer um dos materiais testados aplicando a sonda corada com um corante detetável no filtro do Cy5.

Também se pretende sintetizar sondas específicas para que se possa fazer uma identificação conclusiva em relação às espécies de fungos filamentosos que se possam encontrar em comunidades contaminantes do património.

Referências Bibliográficas

1. M. J. de Groot, P. Bundock, P. J. Hooykaas, and a G. Beijersbergen, *Nat. Biotechnol.* **16**, 839 (1998).
2. S. Chadha and S. P. Kale, *Lett. Appl. Microbiol.* **61**, 238 (2015).
3. M. J. Boss and D. W. Day, *Biological Risk Engineering Handbook: Infection Control and Decontamination* (Lewis Pub, 2003).
4. C. d'Enfert, *Fungal Genet. Biol.* **21**, 163 (1997).
5. M. Shams-Ghahfarokhi, S. Aghaei-Gharehbolagh, N. Aslani, and M. Razzaghi-Abyaneh, *J. Environ. Heal. Sci. Eng.* **12**, 54 (2014).
6. S. Pollastro, R. M. D. M. Angelini, and F. Faretra, *J. Plant Pathol.* **88**, 107 (2006).
7. M. A. de la Torre, G. Gomez-Alarcon, C. Vizcaino, and T. T. Garcia, *Biogeochemistry* **19**, 129 (1992).
8. M. Van De Kamp, A. J. M. Driessen, and W. N. Konings, *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **75**, 41 (1999).
9. D. Bhatnagar, J. Yu, and K. C. Ehrlich, *Chem. Immunol.* **81**, 167 (2002).
10. R. Cruz, P. Álvarez, F. Provoste, K. Ducasse, M. González, G. Wilson, and J. Díaz, *Rev. Chilena Infectol.* **32**, 221 (2015).
11. K. Sterflinger, *Fungal Biol. Rev.* **24**, 47 (2010).
12. F. Villa, F. Cappitelli, P. Principi, A. Polo, and C. Sorlini, *Lett. Appl. Microbiol.* **48**, 234 (2009).
13. H. J. Rogers, H. R. Perkins, and J. B. Ward, in *Microb. Cell Walls Membr.* (Springer Netherlands, Dordrecht, 1980), pp. 469–477.
14. N. I. R. Osheroov and O. Yarden, *Cell. Mol. Biol. Filamentous Fungi* 224 (2010).
15. V. Prigione and V. Filippello Marchisio, *J. Microbiol. Methods* **59**, 371 (2004).
16. A. . Fallis, *J. Chem. Inf. Model.* **588**, 1689 (2010).
17. A. R. Graham, *Am J Clin Pathol* **79**, 231 (1983).
18. B. Graf, U. B. Gobel, and T. Adam, *Mycoses* **41**, 39 (1998).
19. J. M. Levsky and R. H. Singer, *J. Cell Sci.* **116**, 2833 (2003).
20. A. Moter and U. B. Göbel, *J. Microbiol. Methods* **41**, 85 (2000).
21. D. du Sart and K. H. Andy Choo, in *Mol. Biotechnol. Handb.*, edited by R. Rapley and J. M. Walker (Humana Press, Totowa, NJ, 1998), pp. 697–720.
22. Y. Aoi, *J. Biosci. Bioeng.* **94**, 552 (2002).
23. E. V. Volpi and J. M. Bridger, *Biotechniques* **45**, 385 (2008).
24. R. Amann and B. M. Fuchs, *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 339 (2008).
25. J. Pratscher, C. Stichternoth, K. Fichtl, K. H. Schleifer, and G. Braker, *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 802 (2009).
26. B. Bottari, D. Ercolini, M. Gatti, and E. Neviani, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**, 485 (2006).
27. I. Andorra, M. Monteiro, B. Esteve-Zarzoso, H. Albergaria, and A. Mas, *Food Microbiol.* **28**, 1483 (2011).
28. M. Baker, **1372**, 787 (2016).
29. K. Sterflinger and F. Pinzari, *Environ. Microbiol.* **14**, 559 (2012).

30. L. E. Morrison, R. Ramakrishnan, T. M. Ruffalo, and K. A. Wilber, *Methods* **204**, (n.d.).
31. G. Hauptmann, G. Lauter, and I. Söll, *Methods* **1** (2016).
32. A. H. Fischer, K. A. Jacobson, J. Rose, and R. Zeller, *Cold Spring Harb. Protoc.* **3**, (2008).
33. M. Wagner and S. Haider, *Curr. Opin. Biotechnol.* **23**, 96 (2012).
34. R. Amann, B. M. Fuchs, and S. Behrens, *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 231 (2001).
35. J. V. B. Souza, R. Moreira, D. Koshikene, and É. S. Silva, *J. Food, Agric. Environ.* **5**, 3 (2007).
36. J. Maukonen, J. M??tt??, G. Wirtanen, L. Raaska, T. Mattila-Sandholm, and M. Saarela, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 327 (2003).
37. V. A. J. Kempf, K. Trebesius, and I. B. Autenrieth, *J. Clin. Microbiol.* **38**, 830 (2000).
38. V. Raquin, M. Wannagat, K. Zouache, C. Legras-Lachuer, C. V. Moro, and P. Mavingui, *Parasit. Vectors* **5**, 243 (2012).
39. F. Mitelman, *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* **462**, 247 (2000).
40. A. Santos, A. Cerrada, S. García, M. San Andrés, C. Abrusci, and D. Marquina, *Microb. Ecol.* **58**, 692 (2009).
41. S. Baskar, R. Baskar, L. Mauclair, and J. A. McKenzie, *Curr. Sci.* **90**, 58 (2006).
42. F. Fernández-armesto, *Archaeology* 426 (2009).
43. C. Urzì, V. La Cono, and E. Stackebrandt, *Environ. Microbiol.* **6**, 678 (2004).
44. R. Vieira, P. Nunes, S. Martins, M. González, T. Rosado, A. Pereira, A. Candeias, and A. T. Caldeira, *Sci. Technol. Cult. Herit. - Proc. 2nd Int. Congr. Sci. Technol. Conserv. Cult. Heritage, 2014* 257 (2014).
45. I. Douterelo, J. B. Boxall, P. Deines, R. Sekar, K. E. Fish, and C. A. Biggs, *Water Res.* **65**, 134 (2014).
46. C. K. Tsui, J. Woodhall, W. Chen, C. A. Levesque, A. Lau, C. D. Schoen, C. Baschien, M. J. Najafzadeh, and G. S. de Hoog, *IMA Fungus* **2**, 177 (2011).
47. G. Piñar, C. Ramos, S. Rölleke, C. Schabereiter-Gurtner, D. Vybiral, W. Lubitz, and E. B. M. Denner, *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 4891 (2001).
48. A. Michaelsen, F. Pinzari, K. Ripka, W. Lubitz, and G. Piñar, *Int. Biodeterior. {&} Biodegrad.* **58**, 133 (2006).

Anexos

Anexo 1. Soluções:

- Tampão PBS 10x: 76,0 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e; 0,2 g KH_2PO_4 em 1,0 L de água Milli-Q e calibrou-se o pH em 7,2.
- Tampão de hibridação: 300,0 mL NaCl 0,9 M; 20,0 mL Tris-HCl 20 mM; 1,0 mL de SDS 0,01% (p/v) em 1,0 L de água Milli-Q.
- Soro fisiológico: 9,0 g NaCl em 1,0 L de água Milli-Q.
- Azul-de-metileno: 0,01 g de azul-de-metileno; 2,0 g de citrato de sódio em 100,0 mL de água milli-Q. Filtrar a solução com um filtro de 0,2 μm após filtrar com papel de filtro.
- Paraformaldeído: 0,4 g de paraformaldeído; 0,0136 g de KPO_4 dissolvidas em 10 mL de água destilada em banho-maria a 75°C. Após o paraformaldeído estar dissolvido, ajusta-se o pH a 6,8. Adicionaram-se 10.0 μL de triton. A solução é homogeneizada num agitador.

Anexo 2. Meios de cultura:

- MEA: 20,0 g agar; 20,0 g extrato de malte; 1,0 g peptona; 20,0 g de glucose em 1,0 L de água Milli-Q.

Anexo 3. Equipamentos:

- Câmara de fluxo laminar horizontal, Telstar, AH-100, 2014
- Microscópio biológico equipado com uma unidade de alimentação (Motic MXH -100) juntamente com um módulo de episcopia de fluorescência anexado (EF-
- UPR -III) com cubos de filtros de excitação para DAPI, FITC e TRITC, Motic, BA410E, 2014
- Banho de água, Memmert, WNB 14, 2014
- Centrífuga, Biobase, TGL 21M, 2014
- Sistema de Produção de Água ultrapura, Type Solutions, Merck Millipore Milli-Q Integral, 2012
- Câmara, Motic, Moticom Pro 282B, 2014
- Filtros: FITC; TRITC