

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E BIOMEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS APLICADAS À
FARMÁCIA

EDILAINE MARTINS MORATTO

Estudo físico-químico e histológico de pulmões de camundongos *Swiss*
infectados com *Paracoccidioides brasiliensis*

Maringá
2011

EDILAINE MARTINS MORATTO

Estudo físico-químico e histológico de pulmões de camundongos *Swiss*
infectados com *Paracoccidioides brasiliensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia
Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Luzmarina Hernandes
Co-Orientadora: Prof.^a Dr.^a Terezinha Inez Estivalet Svidzinski

Maringá
2011

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

M831e

Moratto, Edilaine Martins

Estudo físico-químico e histológico de pulmões de camundongos *Swiss* infectados com *Paracoccidioides brasiliensis* / Edilaine Martins Moratto. -- Maringá, 2011.

51 f. : il. col., figs., tabs.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Luzmarina Hernandez.

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Terezinha Inez Estivalet Svidzinski.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, 2011.

1. *Paracoccidioides brasiliensis*. 2.

Paracoccidioides brasiliensis - Pulmão - Estudo experimental. 3. Paracoccidioidomicose - Espectroscopia FTIR-PAS. 4. Pulmão - Morfologia. 5. Pulmão - Histologia. 6. Apoptose - TUNEL - *Paracoccidioides brasiliensis*. 7. Espectroscopia Fotoacústica de Infravermelho por Transformada de Fourier. 8. Histopatologia. I. Hernandez, Luzmarina, orient. II. Svidzinski, Terezinha Inez Estivalet, co-orient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina. Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia. IV. Título.

CDD 21.ed. 611.018924

AMMA-00056

FOLHA DE APROVAÇÃO

EDILAINE MARTINS MORATTO

Estudo físico-químico e histológico de pulmões de camundongos *Swiss*
infectados com *Paracoccidioides brasiliensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof^ª Dr^ª Luzmarina Hernandes
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof^ª Dr Antonio Medina Neto
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr^ª Eliana Valéria Patussi
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Mauro Luciano Baesso
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Edilson Nobuyoshi Kaneshima
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 22 de dezembro de 2011.

Local de defesa: Sala 104, Bloco H-79, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, pela saúde, fé e perseverança. A meus pais, pelo amor incondicional. Ao meu noivo, aos meus irmãos e amigos pelo incentivo a busca de novos conhecimentos. A todos os professores que contribuíram para a minha formação, em especial à minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Luzmarina e a minha co-orientadora Prof^a. Dr^a. Terezinha. Vossas presenças foram essenciais para concretização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me concedido vida e saúde para cumprir o meu objetivo.

Aos meus pais, Daniel e Lídia, pelo imenso amor que dedicaram à minha existência e constante estímulo que me proporcionaram.

Aos meus irmãos, Eliéder e Edmara, aos meus cunhados, Jessé e Érica e ao meu futuro esposo, Fábio, que doaram seus ombros e suas palavras, incentivando-me nas horas mais difíceis.

Aos amigos dos Laboratórios de Histologia Animal e de Micologia Médica, meus sinceros agradecimentos.

As técnicas do Laboratório de Histologia Animal da Universidade Estadual de Maringá, Maria Euride Carlo Cancino e Maria dos Anjos Fortunato pelo suporte técnico.

Ao Prof. Dr. Mauro Baesso, a Prof^a. Dr^a. Franciele Sato e ao mestrando Gutierrez do Departamento de Física pela oportunidade que me consideraram de desenvolver este estudo histopatológico juntamente com o grupo de estudos de fenômenos fototérmicos.

A minha co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Terezinha pela eterna paciência em acompanhar todos os ritmos deste trabalho. Obrigada pelo apoio científico e emocional, pelos conhecimentos científicos, pelos ensinamentos de vida, companheirismo, amizade e dedicação.

E a minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Luzmarina, cujas valiosas orientações permitiram a conclusão deste trabalho. Obrigada pelas oportunidades oferecidas a mim. Muito obrigada por fazer parte da minha vida pessoal e da minha formação profissional. Obrigada pelos conhecimentos científicos, pelos ensinamentos de vida, companheirismo, amizade, dedicação e confiança transmitidos no decorrer dessa jornada.

EPÍGRAFE

As raízes do estudo são amargas,
mas seus frutos são doces.

(ARISTÓTELES)

Estudo físico-químico e histológico de pulmões de camundongos *Swiss* infectados com *Paracoccidioides brasiliensis*

RESUMO

Este estudo teve por objetivo correlacionar os espectros de absorção óptica, obtidos por meio de Espectroscopia Fotoacústica de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-PAS), de pulmão de camundongos infectados por *P. brasiliensis*, com a morfologia pulmonar após 1, 2, 4 e 8 semanas de infecção via veia caudal. Foi obtido um isolado de *P. brasiliensis* (Pb18), que foi revertido para a fase de levedura para infecção experimental. Foram utilizados 24 camundongos *Swiss*, distribuídos em quatro grupos. Os animais foram infectados com 0,1 mL de suspensão fúngica, contendo 2×10^6 células leveduriformes de Pb18 e mortos após 1, 2, 4 e 8 semanas de infecção. Os pulmões foram removidos e seccionados em duas partes para: processamento histológico de inclusão em parafina, coloração com H&E, impregnação pela prata segundo Gomori-Grocott e estudo imunohistoquímico de detecção *in situ* da fragmentação do DNA (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated UTP nick end labelling*, TUNEL), e análise por FTIR-PAS. Foi observado a presença de infiltrado inflamatório em todas as semanas. Houve uma redução da amida I na 2^a semana; o grupamento -CH₃ diminuiu no decorrer do período experimental. A redução do fosfato assimétrico e dos grupamentos C-C/C-O foi coincidente com o aumento de morte celular programada principalmente na 4^a semana. As oscilações na frequência de células TUNEL-positivas podem estar relacionadas com variações na intensidade de infecção, de acordo com a resposta imunológica do hospedeiro. Alterações detectadas nas bandas de absorção óptica obtidas por FTIR-PAS têm sido associadas com mudanças em estruturas moleculares provocadas pelo fungo. Nossos resultados sugerem que espectroscopia FTIR-PAS pode tornar-se uma técnica promissora para o estudo da paracoccidioidomicose.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*. Morfologia. Apoptose. Espectroscopia Fotoacústica de Infravermelho por Transformada de Fourier.

Physico-chemical and histological study the lungs of Swiss mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*

ABSTRACT

This study aimed to correlate the optical absorption spectra, obtained by Fourier Transform Infrared Photoacoustic Spectroscopy (FTIR-PAS), lung of mice infected with *P. brasiliensis*, with the lung morphology after 1, 2, 4 and 8 weeks of infection by caudal vein. This study aimed to correlate, in the lungs infected with Pb, the optical absorption spectra obtained via Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy, with the structural changes after 1, 2, 4 and 8 weeks of infection. We obtained an isolate of *P. brasiliensis* (Pb18), which was reverted to the yeast phase to experimental infection. We used 24 Swiss mice, divided into four groups. The animals were infected with 0.1 mL of fungal suspension containing 2×10^6 yeast cells of Pb18 and killed after 1, 2, 4 and 8 weeks of infection. The lungs were removed and sectioned into two parts for: histological processing in paraffin, stained with H & E, silver impregnation second Gomori-Grocott and immunohistochemical study of in situ detection of DNA fragmentation (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated UTP nick end labeling, TUNEL), and analysis by FTIR-PAS. We observed the presence of inflammatory infiltrate in all week. There was a reduction of the amide I in the second week. The grouping-CH₃ decreased during the trial period. Reduction of the asymmetric phosphate group and the C-C / C-O was coincident with increased programmed cell death mainly in the fourth week. The oscillations in the frequency of TUNEL-positive cells may be related to variations in the intensity of infection, according to the host immune response. Changes detected in the optical absorption bands obtained by FTIR-PAS have been associated with changes in molecular structure caused by the fungus. Our findings suggest that FTIR-PAS spectroscopy can become promising technique for the study of paracoccidioidomycosis.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*. Morphology. Apoptosis. Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy.

Dissertação elaborada e formatada conforme
as normas das publicações científicas:

Analytica Chimica Acta (artigo 1)

Disponível em: <http://goo.gl/HLbLd>

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I.....	10
1.1	Introdução.....	10
1.2	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier.....	12
1.2.1	Espectroscopia Fotoacústica de Infravermelho por Transformada de Fourier.....	13
1.3	Justificativa.....	14
1.4	Objetivos.....	15
1.4.1	Objetivo Geral.....	15
1.4.2	Objetivo Específico.....	15
1.5	Referências Bibliográficas.....	15
2	CAPÍTULO II.....	20
2.1	Espectroscopia fotoacústica como método de estudo da paracoccidiodomicose.....	21
3	CAPÍTULO III.....	43
3.1	Perspectivas Futuras.....	43
	ANEXOS.....	44

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) afeta mais de 10 milhões de pessoas nas regiões endêmicas da América Latina⁽¹⁾. A taxa de incidência anual desta micose entre a população brasileira é estimada em 1-3 por 100.000 habitantes e a mortalidade é de aproximadamente 0,14 por 100.000 habitantes, destacando-se como oitava causa de morte por doença predominantemente crônica ou repetitiva, entre as doenças infecciosas e parasitárias e a mais elevada taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas⁽²⁾. No Paraná, corresponde à quinta causa de óbitos por doenças dessa natureza e é onde está registrada a maior taxa de mortalidade por PCM do Sul e Sudeste do Brasil, cerca de 3,52 óbitos por 1.000.000 de habitantes⁽²⁾.

A PCM afeta principalmente trabalhadores rurais⁽³⁾, desenvolve-se lentamente e é assintomática e, por vezes, tem um período de incubação longo. Em geral, quando o paciente procura ajuda médica, as lesões estão já estabelecidas⁽⁴⁾.

Assim, sua importância para a saúde pública está ligada aos custos sociais e econômicos derivados não só da atividade da doença, mas também das lesões secundárias frequentes, que são uma causa comum de incapacidade ao trabalho e por geralmente levar à morte quando não tratada⁽⁵⁾. Além disso, acomete principalmente a população economicamente ativa⁽⁶⁾ e na faixa etária entre 30 e 50 anos de idade, embora cerca de 10% dos casos da doença ocorram até os 20 anos de idade e os demais ocorram em idade mais avançada⁽⁷⁾.

Na infância, a infecção e a doença se distribuem uniformemente entre ambos os sexos, mas entre os adultos a PCM acomete cerca de 10 a 15 homens para 1 mulher. As mulheres entre a menarca e a menopausa são menos afetadas porque *P. brasiliensis* apresenta receptores para o 17- β -estradiol em seu citoplasma, de forma que o hormônio feminino se liga e inibe a transformação de micélio em levedura⁽⁸⁾.

Paracoccidioides brasiliensis (Pb) é um fungo termicamente dimórfico⁽⁹⁾. Na natureza apresenta-se na forma filamentosa que produz conídios, as estruturas responsáveis pela infecção humana⁽¹⁰⁾. O sistema respiratório é considerado a principal porta de entrada da infecção, e após a instalação de um foco inicial no pulmão, pode ocorrer a disseminação para outras regiões do organismo por via linfática ou hematogênica^(10,11,12).

Os modelos experimentais em animais têm contribuído para o conhecimento da resposta imune do hospedeiro a esta infecção^(13,14,15,16). Com o uso de animais tem sido possível definir alguns dos principais parâmetros envolvidos na susceptibilidade à infecção e melhor entender as relações parasito-hospedeiro, as ações terapêuticas e o estabelecimento de prognóstico da infecção paracoccidioidomicótica.

A virulência pode ser estudada por meio da infecção experimental de animais susceptíveis ao fungo, apresentando as mesmas características de cronicidade e generalização das doenças observadas no homem. A influência da virulência de *P. brasiliensis* na relação parasita-hospedeiro pode ser evidenciada pelas diferentes manifestações clínicas da PCM, incluindo padrão de formação do granuloma e órgãos envolvidos⁽¹⁷⁾.

O pulmão é o órgão mais freqüentemente acometido. A infecção causa severas modificações hemodinâmicas comprometendo anatomicamente o órgão^(18,19). A doença é caracterizada por uma inflamação granulomatosa crônica e fibrose, que visa isolar o agente infectante^(20,17,21,22). Os pacientes apresentam um espectro de manifestações clínicas que variam de forma benigna e localizada a severa e disseminada⁽¹⁷⁾. Os sintomas compreendem tosse seca, posteriormente produtiva, e dispnéia aos esforços.

Outros locais freqüentemente envolvidos na infecção sistêmica incluem os linfonodos, glândulas supra-renais, intestinos e Sistema Nervoso Central (SNC). As seqüelas mais limitantes desta micose incluem quadros de insuficiência pulmonar crônica, doença de Addison e linfangiectasia com má-absorção intestinal⁽²³⁾.

Microorganismos patogênicos utilizam uma variedade de estratégias moleculares para subverter os mecanismos das células hospedeiras e invadí-las^(24,25). Embora não seja considerado tradicionalmente um típico patógeno intracelular, a capacidade do Pb em se aderir e invadir fagócitos não profissionais tem sido reconhecida^(26,27). *P. brasiliensis* pode entrar em células epiteliais *in vitro*^(27,28) e *in vivo*^(29,30).

A adesão de propágulos infecciosos às células hospedeiras é um passo crucial para a invasão, colonização e crescimento do Pb que pode ainda desenvolver vários fenótipos dependendo da cepa, do hospedeiro e de outros fatores⁽²⁶⁾.

A habilidade de patógenos em induzir a apoptose de fagócitos deve ser um importante fator de virulência, para tanto, devem diminuir os mecanismos de defesa da célula hospedeira. *P. brasiliensis* e outros fungos podem explorar a apoptose fagocítica para sua própria vantagem e sua residência⁽³¹⁾.

1.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) tem emergido como uma técnica promissora para diagnóstico clínico, pois permite identificar alterações bioquímicas em amostras sem a necessidade de reagentes ou manipulação complicada da amostra⁽³²⁾. É um método rápido para detectar processos biológicos, como a apoptose e realizar análises bioquímicas de células e tecidos^(33,34). A FTIR com fotoacústica acoplada é utilizado para fazer espectroscopia na região do infravermelho próximo, médio e longínquo, no espectro eletromagnético⁽³⁵⁾.

O funcionamento do FTIR tem por base o interferômetro de Michelson (Figura 1), que contém um espelho móvel um fixo e um semi-transparente (*beamsplitter*). À medida que o feixe de luz incide o *beamsplitter*, parte do feixe é direcionada para os dois espelhos, os quais contribuem para a geração de uma diferença de caminho óptico percorrido pelos feixes refletidos em ambos os espelhos. Dessa forma, quando esses feixes alcançam o detector estão em diferença de fase, originando assim um interferograma. Uma transformada de Fourier converte o sinal assim obtido que resulta em espectros semelhantes ao da espectroscopia convencional⁽³⁵⁾.

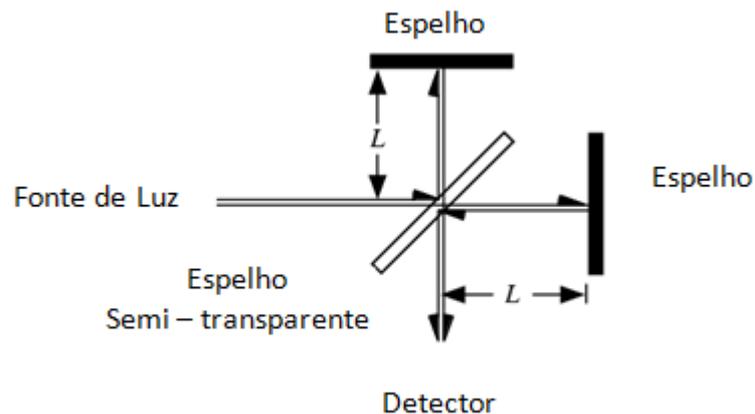


Figura 1. Modelo do interferômetro de Michelson adaptado de Wartewig & Neubert⁽³⁶⁾

A substituição de monocromadores pelo interferômetro de Michelson em instrumentos FTIR permite que a totalidade da faixa de radiação chegue simultaneamente na amostra com enorme ganho de tempo, permitindo resoluções extremamente altas. O resultado de várias varreduras é combinado para diminuir o ruído, e espectros excelentes podem ser obtidos com pequena quantidade de amostra⁽³⁷⁾.

A obtenção dos espectros pelo infravermelho se dá de três formas: absorção/transmissão, reflexão e emissão. No modo de absorção/transmissão a radiação atravessa a amostra. No modo de reflexão o feixe atravessa a amostra e é refletido após absorção parcial da radiação, e o modo de emissão é aquele onde o aquecimento da amostra faz com que as moléculas da mesma emitam comprimentos de onda característicos⁽³⁵⁾.

A formação de um pico ou banda de absorção de uma determinada ligação química é desencadeada quando as ligações químicas dos componentes das amostras estudadas ressonam nas mesmas frequências que a radiação de infravermelho (IR) incidente⁽³⁷⁾.

Este método se baseia no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibração específicas as quais correspondem a níveis de energia da molécula (chamados nesse caso de *níveis vibracionais*). Tais frequências dependem principalmente da forma da superfície de energia potencial da molécula, da geometria molecular e das massas dos átomos⁽³⁸⁾.

O movimento dos átomos que constituem as moléculas resulta em rotações e vibrações moleculares. As vibrações detectáveis no infravermelho são classificadas em estiramentos e deformações angulares, sendo que esses movimentos determinam as vibrações de características moleculares⁽³⁸⁾.

Cada uma das vibrações apresenta suas definições, sendo que os estiramentos envolvem a variação da distância interatômica de dois átomos, e pode ser de dois tipos: simétrico ou assimétrico⁽³⁸⁾. Já as deformações que envolvem os ângulos das ligações moleculares recebem o nome de deformações angulares, que também apresentam características diferentes dependendo do tipo de movimento apresentado, sendo elas simétricas ou assimétricas⁽³⁸⁾.

Como deformações simétricas podem classificar as que acontecem no plano ou fora dele, recebendo os nomes de “ ρ , *rocking*” ou balanço, e “ ω , *wagging*” ou sacudida, respectivamente. Além das deformações simétricas, existem aquelas que apresentam comportamento assimétrico, sendo elas torção fora do plano (“ τ , *twisting*” ou torção) e tesoura no plano (“ δ , *scissoring*” ou tesoura)⁽³⁸⁾.

1.2.1 Espectroscopia Fotoacústica de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-PAS)

A técnica de FTIR-PAS tem permitido monitorar mudanças nos espectros de absorção óptica em estudos *ex vivo* graças à possibilidade de explorar, no infravermelho, as características de absorção óptica como se fosse a impressão digital das moléculas⁽³⁹⁾. Além

disso, tem contribuído para a detecção das alterações estruturais de vários componentes moleculares das células e para o diagnóstico de morte celular programada⁽⁴⁰⁾.

A Espectroscopia Fotoacústica é uma técnica baseada no efeito do mesmo nome, descoberto por Alexander Graham Bell em 1880⁽⁴¹⁾. Consiste na conversão da luz modulada em onda periódica de energia térmica, o que produz ondas de pressão que são captadas por um microfone⁽³⁷⁾. Para a realização das análises as amostras são colocadas em uma célula fechada contendo gás hélio. A célula contém um microfone acoplado (Figura 2). A radiação infravermelha é modulada e incide sobre a amostra, e com o aquecimento e resfriamento da amostra, ondas de pressão são criadas devido a ação modulada da radiação, as quais são captadas pelo microfone e convertidas em espectros de absorção⁽⁴²⁾.

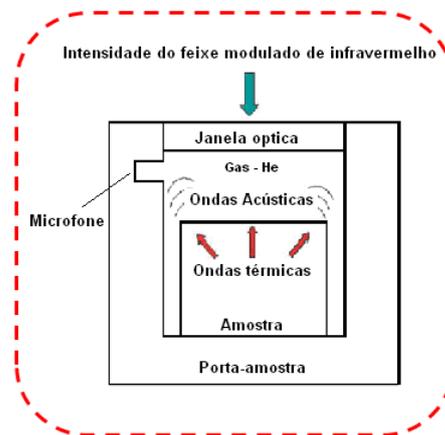


Figura 2. Esquema de uma célula fotoacústica, adaptada de Wartewig & Neubert⁽³⁶⁾

1.3 JUSTIFICATIVAS

A paracoccidiodomicose representa um importante problema de Saúde Pública pelo seu alto potencial incapacitante e pela quantidade de mortes prematuras que provoca quando não diagnosticada e tratada oportunamente.

A patologia geralmente está associada à co-morbidades, o que contribui para a realização do diagnóstico tardio e favorece o desenvolvimento de lesões secundárias que requerem alto custo social ligado ao tratamento e/ou as incapacidades associadas.

Considerando que:

- a) os mecanismos não estão bem estabelecidos e o desenvolvimento do processo patológico da doença não está completamente elucidado;

- b) recentemente a organização morfológica temporal dos granulomas em camundongos infectados foi descrita; e que a apoptose induzida por Pb tem um importante papel na hiporesponsividade antígeno-específica de células T;
- c) a espectroscopia no infravermelho tem sido considerada uma valiosa ferramenta para o estudo de moléculas biológicas tais como proteínas, lipídeos, peptídeos, ácidos nucleicos e outras, possibilitando diagnóstico de muitas doenças, como o câncer de pulmão, doença de Parkinson e de Alzheimer. Além disso, é uma técnica promissora por sua sensibilidade, baixo custo e simplicidade;
- d) até o momento, não há estudos correlacionando as alterações morfológicas de órgãos infectados por Pb com os espectros obtidos por FTIR- PAS.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo Geral

Este estudo teve por objetivo correlacionar os espectros de absorção óptica, obtidos por meio de Espectroscopia Fotoacústica de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-PAS), de pulmão de camundongos infectados por Pb, com a morfologia pulmonar após 1, 2, 4 e 8 semanas de infecção via veia caudal.

1.4.2 Objetivo específico:

Em pulmões de camundongos *Swiss* infectados por Pb 18, nos períodos de 1, 2, 4 e 8 semanas após a infecção:

- Analisar as alterações morfológicas decorrentes da infecção;
- Avaliar a ocorrência de apoptose;
- Identificar alterações físico-químicas por meio da FTIR-PAS.

1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Restrepo A, McEwen JG, Castañeda E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol* 2001;39(3):233-41.
2. Coutinho ZF, Silva D, Lazera M, Petri V, Oliveira RM, Sabroza PC, Wanke B. *Paracoccidioidomycosis* mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saude Publica* 2002;18(5):1441-54.

3. Barrozo LV, Benard G, Silva ME, Bagagli E, Marques SA, Mendes RP. First description of a cluster of acute/subacute paracoccidioidomycosis cases and its association with a climatic anomaly. *Plos Negl Trop Dis* 2010; 4(3):e643:1-4.
4. Kerr IB, Araripe JR, Oliveira PC, Lenzi HL. Paracoccidioidomycosis: a sequential histopathologic study of lesions in experimentally-infected rats. *Rev Inst Med Trop* 1988; 30:336-50.
5. Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Mota NGS,. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop* 1987;20:129-32.
6. Wanke B, Aidê MA. Paracoccidioidomycosis. *Mycoses Continuing Education Course. J Bras Pneumol* 2009;35(12):1245-49.
7. Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho FQ, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. Consenso em paracoccidioidomycose. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006;39(3):297-10.
8. Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover P, Feldman D, Stevens DA. Estrogens inhibit mycelium to yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect Immunol* 1984;46:346-53.
9. Lutz A. Uma micose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas. *Bras Med* 1908; 22:121-24.
10. McEwen JG, Bedoya V, Patiño MM, Salazar ME, Restrepo A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *J Med Vet Mycol* 1987;25:165-75.
11. Pereira M, Bailão AM, Parente JÁ, Borges CL, Salem-Izacc SM, Soares CM de A. Preferential transcription of *Paracoccidioides brasiliensis* genes: host niche and time-dependent expression. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104(3):486-91.
12. Nogueira SV, Fonseca FL, Rodrigues ML, Mundodi V, Abi-Chacra EA, Winters MS, Alderete JF, Soares CM de A. *Paracoccidioides brasiliensis* Enolase Is a Surface Protein That Binds Plasminogen and Mediates Interaction of Yeast Forms with Host Cells. *Infection and Immunity* 2010;78(9):4040-50.
13. Moscardi-Bacchi M, Franco MF. Experimental paracoccidioidomycosis in mice.II. Intraperitoneal infection after previous sensitization. *Rev Inst Med Trop* 1981;23:204-11.

14. Brummer E, Sugar AM, Stevens DA. Immunological activation of polymorphonuclear neutrophils for fungal killing: studies with murine cells and *Blastomyces dermatitidis* in vitro. *J Leukoc Biol* 1984; 36(4): 505-520.
15. Restrepo S, Tabares AM, Restrepo A. Activity of two different triazoles in a murine model of paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop* 1992; 34(2):171-76.
16. Singer-Vermes LM, Caldeira CB, Burger E, Calich VL. Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among the dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses. *Clin Exp Immun* 1993; 94: 75-79.
17. Franco M, Peracoli MT, Soares A, Montenegro R, Mendes RP, Meira DA. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr Top Med Mycol* 1993; 5: 115-49.
18. Bitterman PB, Adelberg S, Crystal RG. Mechanisms of pulmonary fibrosis. Spontaneous release of the alveolar macrophage-derived growth factor in the interstitial lung disorders. *J Clin Invest* 1983;72:1801-13.
19. Friedman SL. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993; 328(1):1828-35.
20. Miyaji M, Nishimura K. Granuloma formation and killing functions of granuloma in congenitally athymic nude mice infected with *Blastomyces dermatitidis* and *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia* 1983; 82(3): 129-41.
21. Franco L, Najvar L, Gomez BL, Restrepo S, Graybill JR, Restrepo A. Experimental pulmonary fibrosis induced by *Paracoccidioides brasiliensis* conidia: measurement of local host responses. *Am J Trop Med Hyg* 1998;58: 424-30.
22. Da Silva FC, Svidzinski TIE, Patussi EV, Cardoso CP, Dalalio MMO, Hernandez L. Morphologic Organization of Pulmonary Granulomas in Mice Infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Am J Trop Med Hyg* 2009;80(5):798-804.
23. Brasil. Paracoccidioidomicose. In *Doença infecciosas e Parasitárias*. Ministério da Saúde, 4^a Edição. Brasília/DF; 2004. p. 246-248.
24. Clerc P, Sansonetti PJ. Entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells: evidence for directed phagocytosis involving actin polymerization and myosin accumulation. *Infect Immun* 1987;55(11):2681-88.
25. Finlay BB, Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiology Review* Washington 1989;53:210-30.
26. Mendes-Giannini MJ, Taylor ML, Bouchara JB, Burger E, Calich VL, Escalante ED, Hanna SA, Lenzi HL, Machado MP, Miyaji M, Monteiro Da Silva JL, Mota EM,

- Restrepo A, Restrepo S, Tronchin G, Vincenzi LR, Xidieh CF, Zenteno E. Pathogenesis II: fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. *Med Mycol* 2000; 38: 113-23.
27. Hanna SA, Da Silva JLM, Mendes Giannini MJS. Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. *Microbes and Infection* 2000; 2: 877-884.
 28. Mendes-Giannini MJS, Ricci LC, Uemura M, Toscano E, Arns CW. Infection and apparent invasion of Vero cells by *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Myco* 1994;32:189-95.
 29. Brito T, Furtado JS, Castro RM, Manini M. Intraepithelial parasitism as an infection mechanism in human paracoccidioidomycosis. *Vir Arch Pathol Anat* 1973;361:129-38.
 30. Tuder RM, Ibrahim R El, Godoy CE, De Brito T. Pathology of the human pulmonary paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 1985;92:179-88.
 31. Cacere CR, Romano CC, Mendes Giannini MJS, Duarte AJS, Benard G. The Role of Apoptosis in the Antigen-Specific T Cell Hyporesponsiveness of Paracoccidioidomycosis Patients. *Clinical Immunol* 2002;105(2):215-22.
 32. Liu KZ, Xu M, Scott DA. Biomolecular characterisation of leucocytes by infrared spectroscopy. *Br J Haematol* 2007;136:713-22.
 33. Zhou J, Wang Z, Sun S, Liu M, Zhang H. A rapid method for detecting conformational changes during differentiation and apoptosis of HL60 cells by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Biotechnol. Appl Biochem* 2001;33:127-32.
 34. Zelig U, Kapelushnik J, Moreh R, Mordechai S, Nathan I. Diagnosis of cell death by means of infrared spectroscopy. *Biophys J* 2009;97(7):2107-14.
 35. Skoog DA, Holler JF, Nieman AT. *Princípios de análise instrumental*. 5ª ed. Bookman: Porto Alegre, 2002.
 36. Wartewig S, Neubert RH. Pharmaceutical applications of Mid-IR and Raman spectroscopy. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57(8):1144-70.
 37. Cahen D, Bults G, Gaty H, Malkin S. Photoacoustic in life sciences. *J Biochem Biophys Methods* 1980;3:293-310.
 38. Sala O. *Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho*. Editora Unesp: São Paulo, 1996.
 39. Berbic F, Nogueira AC, Neto AM, Natali MR, Baesso ML, Matioli G. Use of photoacoustic spectroscopy in the characterization of inclusion complexes of

- benzophenone-3-hydroxypropyl- β cyclodextrin and ex vivo evaluation of the percutaneous penetration of sunscreen. *Eur J Pharm Biopharm* 2011;79(2):449-57.
40. Di Giambattista L, Pozzi D, Grimaldi P, Gaudenzi S, Morrone S, Castellano AC. New marker of tumor cell death revealed by ATR-FTIR spectroscopy. *Anal Bioanal Chem* 2011;399(8):2771-78.
 41. Bell AG. On the Production and Reproduction of Sound by Light: the Photophone. *Am J Sci* 1880;20:305-24.
 42. Ingle JD, Crouch S. Spectrochemical techniques on the horizon. In.: *Spectrochemical analysis*. New Jersey: Prentice Hall 1988;17:525-41.

CAPÍTULO II

Artigo: Espectroscopia fotoacústica como método de estudo da paracoccidiodomicose

1 **Espectroscopia fotoacústica como método de estudo da paracoccidiodomicose**

2

3 Edilaine Martins Moratto^a, Mauro Luciano Baesso^b, Francielle Sato^b, Gutierrez Rodriguês de
4 Morais^b, Terezinha Inez Estivalet Svidzinski^c, Luzmarina Hernandes^a

5

6 ^a Departamento de Ciências Morfológicas, Laboratório de Histologia e Histotécnica Animal.
7 Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.
8 edilainemm@gmail.com; lhernandes@uem.br

9 ^b Departamento de Física, Laboratório de Estudo de Fenômenos Fototérmicos. Centro de
10 Ciências Exatas. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.
11 mlbaesso@dfi.uem.br, fsato@email.com, moraisgr@gmail.com

12 ^c Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Laboratório de Micologia Médica.
13 Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.
14 terezinha.svidzinski@gmail.com

15

16 **Resumo**

17 Este estudo teve por objetivo correlacionar os espectros de absorção óptica, obtidos por meio
18 de Espectroscopia Fotoacústica de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-PAS),
19 de pulmão de camundongos infectados por *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), com a
20 morfologia pulmonar após 1, 2, 4 e 8 semanas de infecção via veia caudal. Foram utilizados
21 24 camundongos machos da linhagem *Swiss*, distribuídos em quatro grupos de seis. Os
22 animais foram inoculados, por meio da veia caudal lateral, com de 0,1 mL de suspensão
23 fúngica, contendo 2×10^6 células leveduriformes de Pb18. Os animais foram mortos após 1,
24 2, 4 e 8 semanas de infecção. O lobo superior esquerdo do pulmão foi isolado, fixado e
25 processado para inclusão em parafina. Os cortes foram corados com H&E, para estudo

26 histopatológico, impregnado pela prata segundo Gomori-Grocott para localização e
27 identificação do fungo e pelo método imunohistoquímico de detecção *in situ* da fragmentação
28 do DNA (TUNEL) para a análise da ocorrência de morte celular programada. Os lobos
29 inferiores e médios direito foram encaminhados para análise físico-química por FTIR-PAS.
30 Houve uma redução da amida I na 2^a semana; o grupamento -CH₃ diminuiu no decorrer do
31 período experimental. Redução do fosfato assimétrico e no grupo C-C/C-O foi relacionada
32 com o aumento de morte celular programada principalmente na 4^a semana. As oscilações na
33 frequência de células TUNEL-positivas podem estar relacionadas com variações na
34 intensidade de infecção, de acordo com a resposta imunológica do hospedeiro. Conclui-se que
35 o pulmão infectado por Pb apresentou alterações estruturais que variaram de acordo com o
36 período de tempo analisado e que as mudanças nas bandas de absorção óptica de vários
37 grupamentos químicos foram uma consequência dessas alterações morfológicas. Nossos
38 resultados sugerem que espectroscopia FTIR-PAS pode se tornar uma técnica promissora para
39 o estudo da paracoccidiodomicose.

40 **Palavras-chave:** *Paracoccidioides brasiliensis*. Morfologia. Apoptose. Espectroscopia
41 Fotoacústica de Infravermelho por Transformada de Fourier.

42

43 Autor para correspondência:

44

45 **Dra Luzmarina Hernandes**

46 lhernandes@uem.br; luzhernandes@gmail.com

47 Telefone: (44) 3011-4706; Fax: (44) 3011-4340

48 Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Ciências Morfológicas

49 Bloco H79 - Sala 108. Avenida Colombo 5790 - CEP: 87020-900

50 Maringá – Paraná – Brasil

51 1. Introdução

52 Métodos espectroscópicos, como Espectroscopia Fotoacústica de Infravermelho por
53 Transformada de Fourier (FTIR-PAS) têm sido utilizados com sucesso por fornecer, por meio
54 das bandas de absorção óptica, informações bioquímicas das moléculas, com a precisão de
55 uma impressão digital [1]. É um método promissor para o diagnóstico clínico, uma vez que é
56 rápido para detectar processos biológicos, é eficaz para análises bioquímicas de células e
57 tecidos [2,3] e ainda permite identificar alterações bioquímicas em amostras sem a
58 necessidade de reagentes ou manipulação complicada da amostra [4]. O monitoramento das
59 mudanças no espectro de absorção tem contribuído para a identificação de fenômenos
60 biológicos importantes como a morte [5] e proliferação celular [6] em células normais [1] ou
61 cancerosas [7,8].

62 A paracoccidiodomicose (PCM), provocada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*
63 (Pb) é uma das principais micoses sistêmicas que compromete mais de 10 milhões de pessoas
64 na América Latina [9]. *Pb* é um fungo termicamente dimórfico que na natureza apresenta-se
65 na forma filamentosa, e produz conídios, as estruturas responsáveis pela infecção humana. O
66 sistema respiratório é considerado a principal porta de entrada da infecção, e após a instalação
67 de um foco inicial no pulmão, pode ocorrer a disseminação para outras regiões do organismo
68 por via linfática ou hematogênica [10,11,12]. No pulmão *Pb* induz o desenvolvimento de
69 granulomas [13] e fibrose [14,15] que comprometem a arquitetura do órgão e
70 conseqüentemente podem prejudicar a função respiratória.

71 Os espectros de absorção óptica de pulmões infectados com *Pb* ainda não foram
72 obtidos e tampouco existe uma correlação entre os espectros obtidos por FTIR-PAS com as
73 alterações estruturais induzidas por *Pb*.

74 Este estudo teve por objetivo correlacionar os espectros de absorção óptica, obtidos
75 por meio de Espectroscopia Fotoacústica de Infravermelho por Transformada de Fourier

76 (FTIR-PAS), de pulmão de camundongos infectados por Pb, com a morfologia pulmonar após
77 1, 2, 4 e 8 semanas de infecção via veia caudal.

78

79 **2. Métodos**

80 *2.1 Isolado Fúngico*

81 Foi obtida uma amostra do isolado de *P. brasiliensis* denominado P(18) da coleção do
82 Departamento de Imunologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e mantido
83 em meio de cultura Fava Neto a 35°C no laboratório de Micologia Médica da Universidade
84 Estadual de Maringá (UEM).

85

86 *2.2 Experimentação Animal*

87 Todos os procedimentos envolvendo o uso de animais foram aprovados pelo Comitê
88 de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UEM sob parecer 116/2010.

89 Foram utilizados 24 camundongos machos da linhagem *Swiss* e com um peso médio
90 de 30 gramas. Com a idade entre 4 e 5 semanas os animais foram transferidos do Biotério
91 Central de Animais da UEM para o Laboratório de Experimentação em
92 Paracoccidiodomicose do Departamento de Ciências Básicas da Saúde da UEM. Os animais
93 foram mantidos em condições ambientais controladas, com uma temperatura de 23 a 24 °C e
94 um ciclo claro/escuro de 12 horas, com livre acesso à água e alimento.

95

96 *2.3 Infecção dos animais com o isolado fúngico de P. brasiliensis*

97 Os camundongos foram distribuídos em quatro grupos de seis e cada grupo possuía 1
98 animal controle. Os animais foram infectados, por meio da veia caudal lateral, com 0,1 mL de
99 suspensão fúngica, contendo 2×10^6 células leveduriformes de Pb18. Os animais controle
100 receberam 0,1 mL de PBS (pH 7,4), pela mesma via.

101 2.4 Morte dos animais e processamento histológico

102 Os animais, infectados e controle, foram mortos 1, 2, 4 e 8 semanas após a inoculação,
103 com uma sobre dose (3 vezes maior que a dose usual de 40 mg Kg⁻¹) de tiopental sódico
104 (Cristal Pharma BR) na veia caudal lateral. Após a remoção dos pulmões, o lobo superior
105 esquerdo foi separado e fixado em solução de paraformaldeído 4% por 24 horas e processado
106 para inclusão em parafina. Foram feitos cortes semi-seriados de 5 µm de espessura. Os cortes
107 foram corados com H&E para avaliação histológica, impregnado pela prata segundo Gomori-
108 Grocott para identificação do fungo e pelo método imunohistoquímico de detecção *in situ* da
109 fragmentação do DNA (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated UTP nick end*
110 *labelling*, TUNEL) para avaliação da morte celular programada, utilizando o *kit* comercial
111 *ApopTag plus* peroxidase (Chemicon, Temecula CA, EUA). O lobo inferior e médio direito
112 de cada pulmão foi encaminhado para análise por FTIR-PAS.

113

114 2.5 Espectroscopia Fotoacústica de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-PAS)

115 As amostras foram analisadas por espectrômetro FTIR marca Varian, modelo 7000
116 (EUA), utilizando uma célula fotoacústica acoplada. Um feixe modulado de radiação
117 infravermelha proveniente de um interferômetro de Michelson incidiu sobre a amostra em
118 uma célula fechada contendo gás hélio e microfone acoplado (célula fotoacústico MTEC-
119 Modelo 300) (Fig. A) e o efeito fotoacústico foi observado. As ondas de pressão, resultantes
120 do aquecimento e resfriamento da amostra, foram detectadas pelo microfone. Foram
121 realizados 28 *scans* em um intervalo de 4000-400 cm⁻¹, com resolução espectral de 4 cm⁻¹
122 para cada amostra a fim de obter um espectro final.

123 3. Resultados e discussão

124 A Fig. B.1 mostra o espectro de absorção do pulmão de camundongo Swiss sem
125 infecção e a Fig. B.2 ilustra um corte histológico do pulmão de camundongo controle. Os
126 grupamentos químicos registrados nos picos de absorção do FTIR-PAS estão identificados na
127 Tabela A.1.

128 As bandas localizadas nos números de onda $\sim 1087\text{ cm}^{-1}$ e 1234 cm^{-1} são originadas,
129 respectivamente de ligações simétricas e assimétricas do estiramento das vibrações de íons
130 dos grupos fosfato (PO_2^-) que fazem parte do DNA [7,8]. No grupo dos peptídeos foram
131 identificadas as bandas da amida I em 1681 cm^{-1} e amida II em 1545 cm^{-1} [7,8,17,18]. Nos
132 números de onda $\sim 1450, 2854, 2924\text{ cm}^{-1}$, se localizam os alifáticos do grupo $-\text{CH}_3$ que
133 compõe biomoléculas como proteínas, lipídeos e carboidratos [9,17]. A absorção em ~ 972
134 cm^{-1} representa o grupo do C-C/C-O que corresponde ao desoxirribose-ribose [3,5].

135 A Fig. C, mostra o espectro de absorção do pulmão após 1, 2, 4 e 8 semanas de
136 infecção com Pb18 em relação ao grupo controle. As diferenças na intensidade do sinal
137 fotoacústico dos espectros não foram consideradas porque podem ser produzidos por fatores
138 como tamanho da amostra e umidade, que podem influenciar na medida. Para minimizar estes
139 fatores foram obtidas as razões dos picos de intensidade no próprio espectro.

140 Nos pulmões dos camundongos infectados com Pb foram encontradas mudanças
141 conformacionais nas seguintes regiões do espectro de absorção: amida I (1681 cm^{-1}), CH_3
142 (1450 cm^{-1}), fosfato assimétrico (1234 cm^{-1}) e grupo C-C/C-O (972 cm^{-1}) [3,5,7,8].

143 Então, para investigar a evolução temporal das alterações destes grupamentos
144 químicos no período de oito semanas de infecção foi obtida a razão dos espectros de cada
145 grupamento químico para cada semana de infecção, normalizados por uma banda que se
146 mostrou mais estável: a amida II (1545 cm^{-1}), e que corresponde, principalmente, à flexão no

147 plano do grupo funcional N-H presente no grupo amida das proteínas [18]. Paralelamente, as
148 mudanças espectrais foram relacionadas com as observações histológicas.

149 A razão amida I/amida II mostra as alterações ocorridas na amida I em função da
150 amida II no decorrer do período experimental, caracterizada por uma redução na 2^o semana,
151 seguido de uma ascensão até a 8^o semana (Fig. D).

152 Os pneumócitos II produzem colectinas A e D, proteínas do surfactante pulmonar, que
153 têm a capacidade de se ligar a moléculas de superfície expressas por microorganismos e
154 modular várias funções do sistema mononuclear fagocitário, incluindo a internalização e
155 morte dos microorganismos [22]. A lectina ligante de manose (MBL) é uma colectina
156 produzida no fígado. Pode interagir diretamente com receptores de colectinas nas células
157 fagocíticas promovendo a opsonização e fagocitose em processos imunes [23]. A MBL
158 apresenta um papel importante na primeira linha de defesa do hospedeiro contra diferentes
159 microorganismos e desempenha um papel fundamental na ativação do complemento pelo
160 *Paracoccidioides brasiliensis* [24].

161 As colectinas contêm domínios de cisteína no terminal-N [25], o qual em sua fórmula,
162 HS—CH₂—CH (NH₂)—COO, contêm uma molécula de amida I [26].

163 Portanto, o aumento da razão amida I/amida II pode estar refletindo o aumento da
164 produção de colectinas, as quais desempenham um papel importante na resposta imune inata
165 não específica [27], estimulando a quimiotaxia de macrófagos alveolares e funcionando como
166 um ligante de ativação para estimular a fagocitose [22].

167 Desta forma, o aumento da razão amida I/amida II poderia estar relacionada com o
168 aumento de colectinas.

169 Neste trabalho as colectinas não foram quantificadas, mas a resposta inflamatória foi
170 monitorada e apresentou uma evolução temporal. Na primeira semana observaram-se áreas do
171 parênquima pulmonar infiltradas por linfócitos, neutrófilos, plasmócitos e macrófagos (Fig.

172 E.1). A resposta imune foi levemente mais acentuada na segunda semana, em relação à
173 primeira. Nos dois períodos avaliados, a maior parte das leveduras se localizou no parênquima
174 e uma menor quantidade de fungos fragmentados ocupava o interior de macrófagos (Fig. E.2).

175 A resposta inflamatória se intensificou ao longo da quarta e oitava semanas, com
176 aumento de celularidade, presença de neutrófilos, plasmócitos e macrófagos difusamente
177 localizados no parênquima pulmonar. Na oitava semana foram observados grande número de
178 macrófagos com fragmentos de Pb fagocitados (Fig. E.3 e E.4). Não foram observados
179 granulomas em nenhum período, mas houve um princípio de organização (Fig. E.3). O padrão
180 de infecção caracterizou-se por um maior acúmulo de infiltrado inflamatório em áreas
181 próximas a vasos, brônquios e bronquíolos terminais.

182 Dessa forma, considerando que os macrófagos são as células mais envolvidas na
183 defesa contra Pb [28], podemos inferir indiretamente que a evolução da razão amida I/amida
184 II, que tem sido relacionada com o aumento do teor de proteínas [8], acompanhou o processo
185 inflamatório, observado por meio das técnicas histológicas.

186 A Fig. F mostra a razão $-\text{CH}_3$: amida II na qual observa-se que houve um declínio do
187 grupamento CH_3 em função da amida II. Vibrações de estiramento em $-\text{CH}_3$ ($\sim 1450 \text{ cm}^{-1}$)
188 correspondem aos fosfolipídios [9]. A redução dos fosfolipídios pode estar relacionada ao
189 aumento da fosfolipase B, enzima que hidrolisa as ligações éster presentes nos fosfolipídios,
190 um dos fatores de virulência de Pb necessário para eventos iniciais da infecção [29].
191 Entretanto, a fosfolipase está envolvida na modulação da resposta imune inata e adquirida
192 [30], contribuindo na regulação da ativação de macrófagos [31]. Dessa forma, hipotetizamos
193 que a redução progressiva do radical $-\text{CH}_3$ corresponderia à diminuição progressiva de
194 moléculas de fosfolipídeos, resultante do contínuo aumento da fosfolipase que por sua vez
195 representa um reflexo direto na evolução da infecção e indireto da resposta inflamatória.

196 A razão fosfato assimétrico (1234 cm^{-1}) em função da amida II (1535 cm^{-1}) está
197 ilustrada na Fig. G.1. A diminuição do fosfato assimétrico foi relacionada com o aumento de
198 morte celular programada [2]. A avaliação qualitativa do pulmão corado para TUNEL
199 demonstrou uma maior quantidade de células TUNEL-positivas na 1ª e 4ª semana de
200 infecção, período na qual foram observadas as menores razões PO_2^- : amida II.

201 A intensidade de absorção nas vibrações PO_2^- assimétrica permite avaliar mudanças
202 qualitativas e quantitativas nos fosfolipídeos e ácidos nucléicos [31]. O estudo *in situ* de
203 células cancerosas, por espectroscopia de reflectância total atenuada (FTIR-ATR), tem
204 revelado que no processo de apoptose ocorre um decréscimo na razão fosfato-proteína [8].
205 Além disso, a apoptose tem sido identificada por meio de observação da redução da
206 quantidade de fosfato em fibroblastos malignos utilizando a razão da média das bandas de
207 absorvância dos grupos fosfato assimétrico ($1151\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$) em relação a amida I [7].

208 A diminuição dos grupamentos C-C/C-O (970 cm^{-1}) (Fig. G.2) têm sido relacionada
209 com a mudança na absorvância de DNA e aumento de morte celular programada [3], da
210 mesma forma, a diminuição na absorção de ribose (C-O) foi relacionada com o aumento na
211 frequência de apoptoses [5].

212 As oscilações na frequência de células TUNEL-positivas podem estar relacionadas
213 com variações na intensidade de infecção, de acordo com a resposta imunológica do
214 hospedeiro. Observamos picos de infecção mais intensos com maior frequência de células em
215 apoptose, na 1ª e 4ª semanas. Na 2ª e 8ª semanas, haviam menos células marcadas (Fig. H).

216 Dessa forma, conclui-se o pulmão infectado por Pb apresentou alterações estruturais
217 que variaram de acordo com o período de tempo analisado e que as mudanças nas bandas de
218 absorção óptica de vários grupamentos químicos foram uma consequência dessas alterações
219 morfológicas. Até onde se sabe essa é a primeira vez que foi utilizado FTIR-PAS como

220 método de estudo da paracoccidiodomicose experimental. Nossos resultados sugerem que
221 este método pode se tornar uma técnica promissora para o estudo desta patologia.

222

223 4. Referências

224 [1] F. Berbicz, A.C. Nogueira, A. Medina Neto, M.R. Natali, M.L. Baesso, G. Matioli. Eur
225 J Pharm. Biopharm. 79 (2011) 449-457.

226 [2] J. Zhou, Z. Wang, S. Sun, M. Liu, H. Zhang. Biotechnol. Appl. Biochem. 33 (2001)
227 127-132.

228 [3] U. Zelig, J. Kapelushnik, R. Moreh, S. Mordechai, I. Nathan. Biophys. J. 97 (2009)
229 2107-2114.

230 [4] K.Z. Liu, M. Xu, D.A. Scott. Br. J. Haematol. 136 (2007) 713-722.

231 [5] L. Di Giambattista, D. Pozzi, P. Grimaldi, S. Gaudenzi, S. Morrone, A.C. Castellano.
232 Anal. Bioanal. Chem. 399 (2011) 2771-2778.

233 [6] J.R. Mourant, Y.R. Yamada, S. Carpenter, L.R. Dominique, J.P. Freyer. Biophys. J. 85
234 (2003) 1938-1947.

235 [7] A. Salman, J. Ramesh, V. Erukhimovitch, M. Talyshinsky, S. Mordechai, M. Huleihel.
236 J. Biochem. Biophys. Methods. 55 (2003) 141-153.

237 [8] W. Yang, X. Xiao, J. Tan, Q. Cai. Vibrational Spectroscopy 49 (2009) 64-67.

238 [9] A. Restrepo, J. G. McEwen, E. Castañeda. Med. Mycol. 39 (2001) 233-41.

239 [10] J.G. McEwen, V. Bedoya, M.M. Patiño, M.E. Salazar, A. Restrepo. Med. Vet. Mycol.
240 25 (1987) 165-75.

241 [11] M. Pereira, A.M. Bailão, J.Á. Parente, C.L. Borges, S.M. Salem-Izacc, C.M. Soares de
242 A. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 104 (2009) 486-491.

243 [12] S.V. Nogueira, F.L. Fonseca, M.L. Rodrigues, V. Mundodi, E.A. Abi-Chacra, M.S.
244 Winters, J.F. Alderete, C.M. de A. Soares. Infect. Immun. 78 (2010) 4040-4050.

- 245 [13] F.C. Da Silva, T.I.E. Svidzinski, E.V. Patussi, C.P. Cardoso, M.M.O. Dalalio, L.
246 Hernandes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80 (2009) 798-804.
- 247 [14] L. Franco, L. Najvar, B.L. Gomez, S. Restrepo, J.R. Graybill, A. Restrepo. *Am. J. Trop.*
248 *Med. Hyg.* 58 (1998) 424-430.
- 249 [15] A.M. Cock, L.E. Cano, D. Vélez, B.H. Aristizábal, J. Trujillo, A. Restrepo. *Rev. Inst.*
250 *Med. Trop.* 42 (2000) 59-66.
- 251 [16] S. Wartewig, R.H. Neubert. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 57 (2005) 1144-1170.
- 252 [17] A.L. Brooks, N.I. Afanasyeva, V. Makhine, R.F. Bruch, B. McGregor. *Proc. SPIE* 3596
253 (1999) 140-151.
- 254 [18] N. Afanasyeva, R. Bruch, A. Kano A, V. Makhine. *Subsurface Technol. Appl.* 1 (2000)
255 45-63.
- 256 [19] J.J. Karippal, H.N. Narasimha Murthy, K.S. Rai, M. Krishna, M. Sreejith. *Polym. Bull.*
257 65 (2010) 849-861.
- 258 [20] M. Taraschewski, H.K. Cammenga, R. Tuckermann, S. Bauerecker. *J. Phys. Chem. A.*
259 109 (2005) 3337-3343.
- 260 [21] R. Sindhuphak, S. Issaravanich, V. Udomprasertgul, P. Srisookho, S. Warakamin, S.
261 Sindhuphak, R. Boonbundarlchai, N. Dusitsin. *Gynecol. Oncol.* 90 (2003) 10-14.
- 262 [22] E. Crouch, J.R. Wright. *Annu. Rev. Physiol.* 63 (2001) 521-554.
- 263 [23] M.W. Turner. *Immunol. Today* 17 (1996) 532-540.
- 264 [24] R.G. Toledo, W.D. Da Silva, V.L. Calich, T.L. Kipnis. *Mol. Immunol.* 48 (2010) 26-36.
- 265 [25] S. Hansen, D. Holm, V. Moeller, L. Vitved, C. Bendixen, K. B. Reid, K. Skjoedt, U.
266 Holmskov. CL-46, a novel collectin highly expressed in bovine thymus and liver. *J.*
267 *Immunol.* 169 (2002) 5726-34.
- 268 [26] IUPAC-IUB. International Union of Pure and Applied Chemistry and International
269 Union of Biochemistry. *Pure Appl. Chem.* 56 (1983) 595-624.

- 270 [27] E. Brummer, D.A. Stevens. *Med. Mycol.* 48 (2010) 16-28.
- 271 [28] M. Moscardi-Bacchi, A. Soares, R. Mendes, S. Marques, M. Franco. *J. Med. Vet.*
272 *Mycol.* 27 (1989) 149-158.
- 273 [29] D.A. Soares, R.V. de Andrade, S.S. Silva, A.L. Bocca, S.M. Soares Felipe, S. Petrofeza.
274 *B.M.C. Microbiol.* 10 (2010) 241.
- 275 [30] M.C. Noverr, G.M. Cox, J.R. Perfect, G.B. Huffnagle. *Infect. Immun.* 71 (2003) 1538-
276 1547.
- 277 [31] J. Ramesh, J. Kapelushnik, J. Mordehail, A. Moser, M. Huleihel, V. Erukhimovitch, C.
278 Levi, S. Mordechai. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 51 (2002) 251-261.

APÊNDICES

Tabela A.1 Números de onda (cm^{-1}) dos espectros de absorção obtidos via FTIR-PAS^a dos pulmões de camundongos *Swiss* controle, sadios, injetados intravenosamente com PBS e suas moléculas relacionadas.

Números de Onda (cm^{-1})	Atribuições	Maior Contribuições	Referências
3672	Amina, N-H, OH Livre	Proteínas	[19]
2924	CH ₂ anti-simétrico	Proteínas e Lipídios	[16]
2854	CH ₂ simétrico	Proteínas e Lipídios	[16]
2360	CO ₂	Proteínas	[20]
1743	C=O Vibração em estiramento	Proteínas	[18]
1681	Amida I (C=O, C - N, C-C e N-H)	Proteínas	[7,8, 17,18]
~1535	Amida II(N-H, C-N, CN-H)	Proteínas	[8,17,18]
1450	CH ₃ anti-simétrico	Fosfolipídios	[8]
1398	Grupo COO ⁻	Proteínas	[8,21]
~1234	PO ₂ ⁻ anti-simétrico	Ácidos Nucléicos	[7,8]
1087	PO ₂ ⁻ simétrico	Ácidos Nucléicos	[7,8]
972	C-C/C-O	Desoxirribose-ribose	[3,5]

^a Espectroscopia Fotoacústica de Infravermelho por Transformada de Fourier

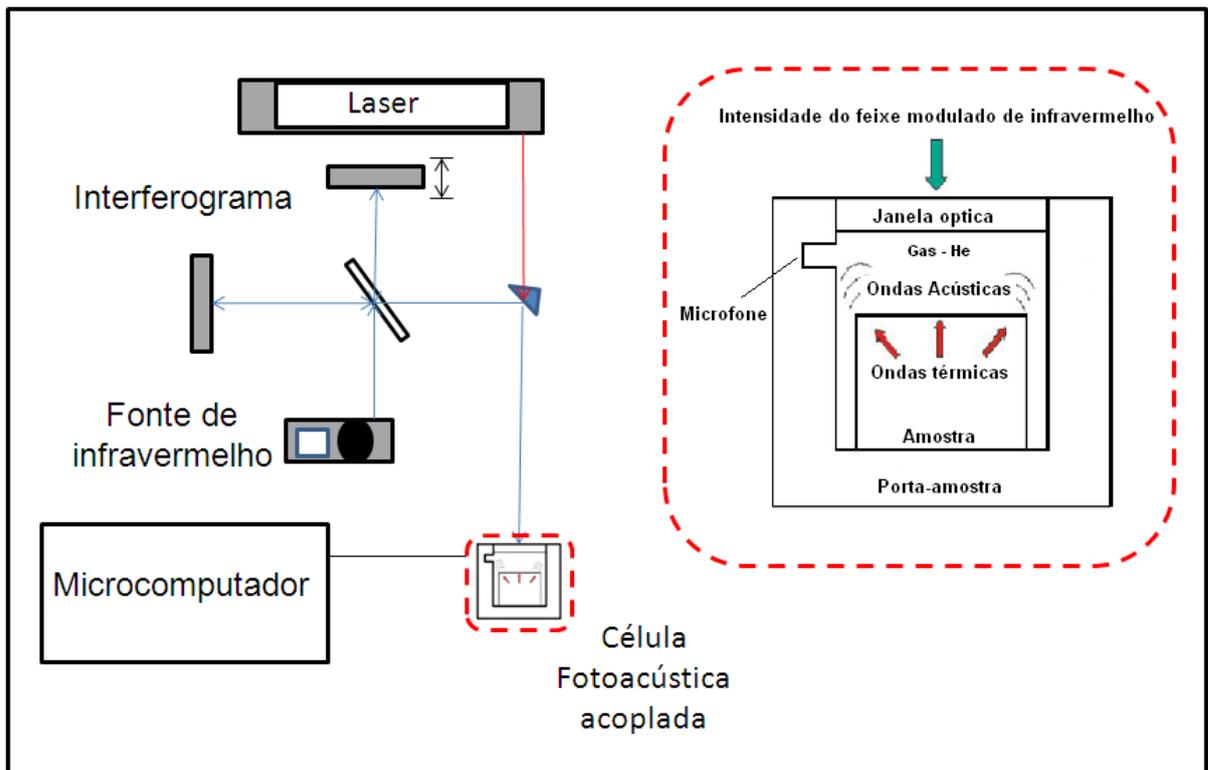


Fig. A Representação esquemática do Espectrômetro Fotoacústico de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-PAS), adaptada de Wartewig & Neubert [16].

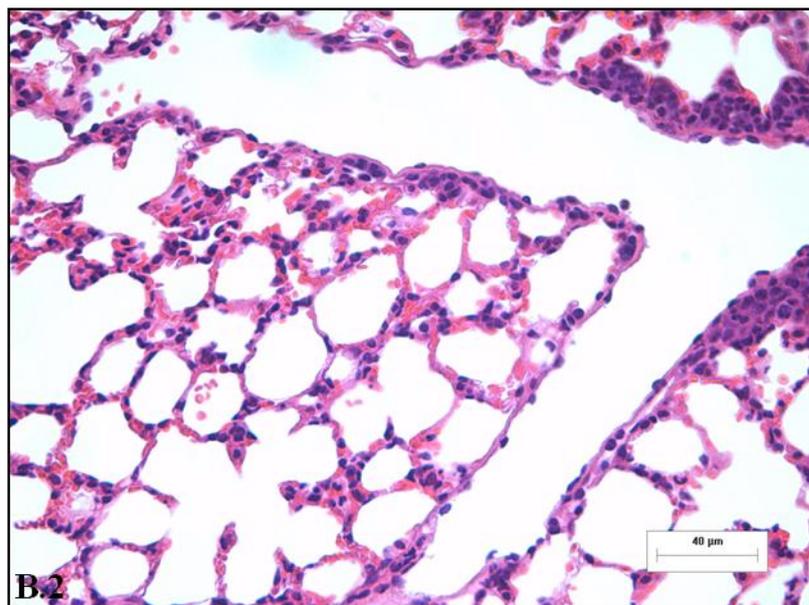
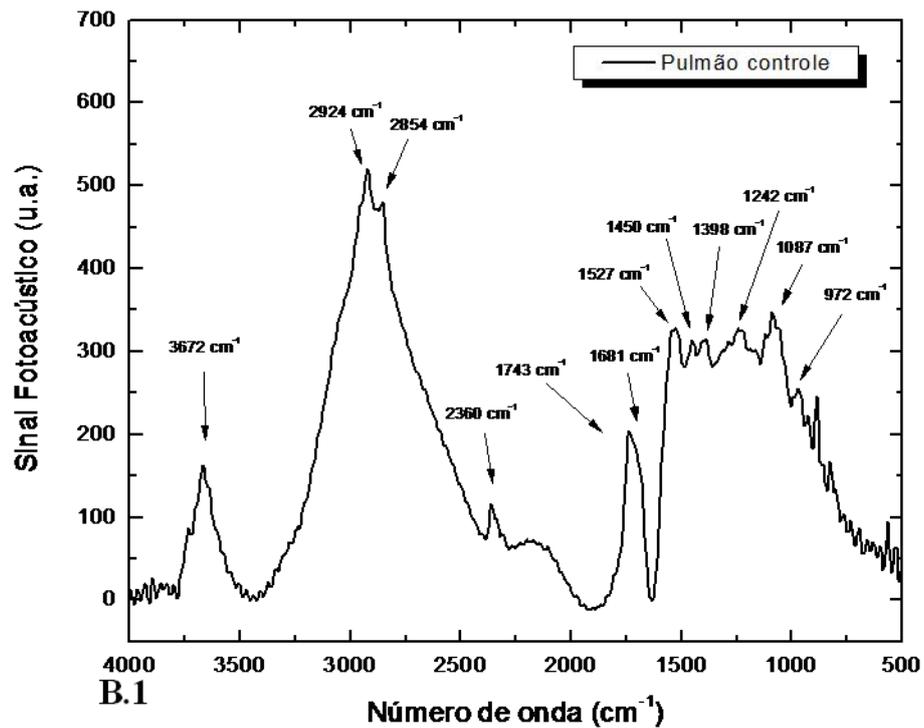


Fig. B Em B.1, está representado o espectro de absorção via FTIR-PAS, do pulmão de camundongos *Swiss* controle, sadios, que foram injetados intravenosamente com PBS; B.2 Fotomicrografia do parênquima pulmonar de camundongo *Swiss* controle. Notar os alvéolos pulmonares com luz ampla. Coloração H&E. Aumento original: 40x

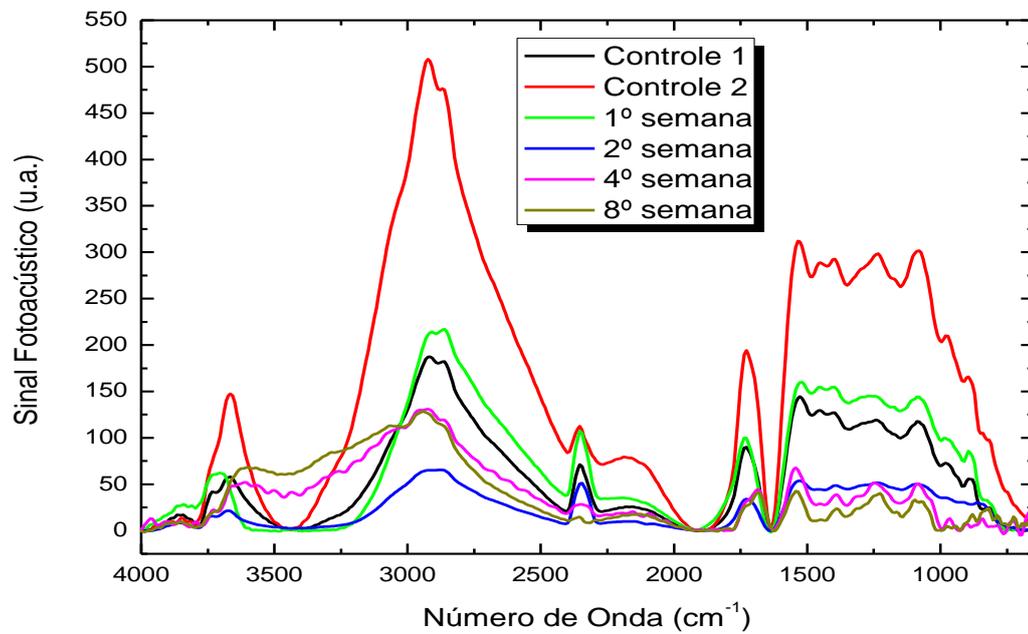


Fig. C Espectro de absorção via FTIR-PAS dos pulmões de camundongos *Swiss* infectados com Pb18, após 1, 2, 4 e 8 semanas e dois espectro de pulmão controle, sem infecção. O espectro de cada semana representa a média das amostras analisadas (5 animais/semanas). Para cada amostra foram realizados 28 *scans* em um intervalo de 4000-400 cm⁻¹, com resolução espectral de 4 cm⁻¹.

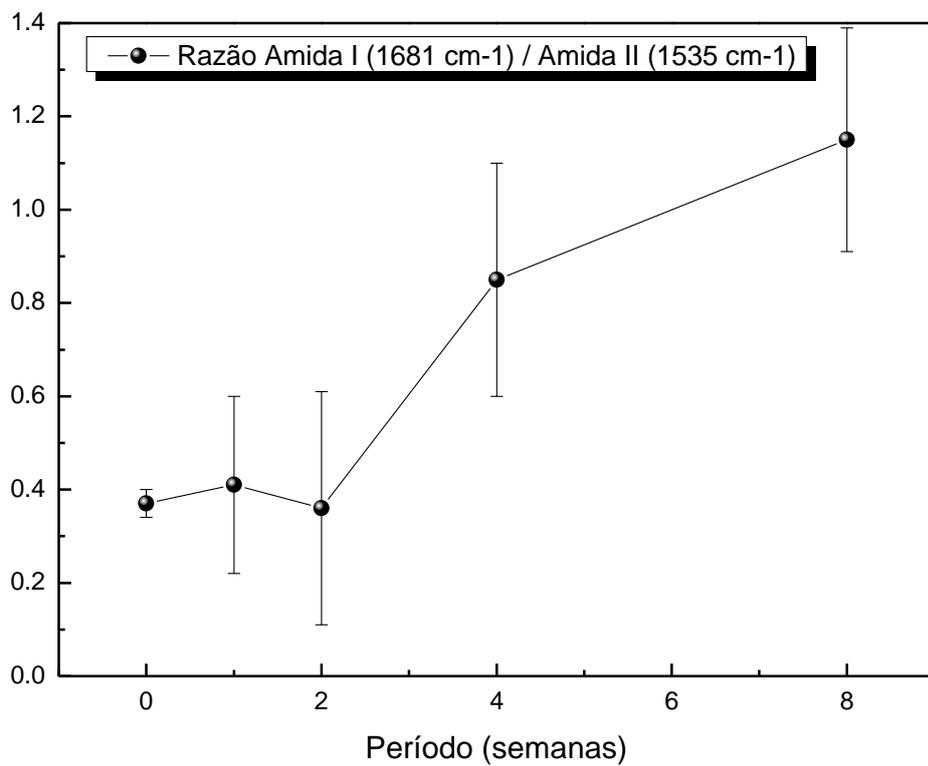


Fig. D Razão Amida I/Amida II obtido do espectro de absorção via FTIR-PAS dos pulmões de camundongos *Swiss* infectados com Pb18, após 1, 2, 4 e 8 semanas. O tempo zero representa o ponto controle da leitura feita em pulmões de camundongos *Swiss* sadios, injetados intravenosamente com PBS.

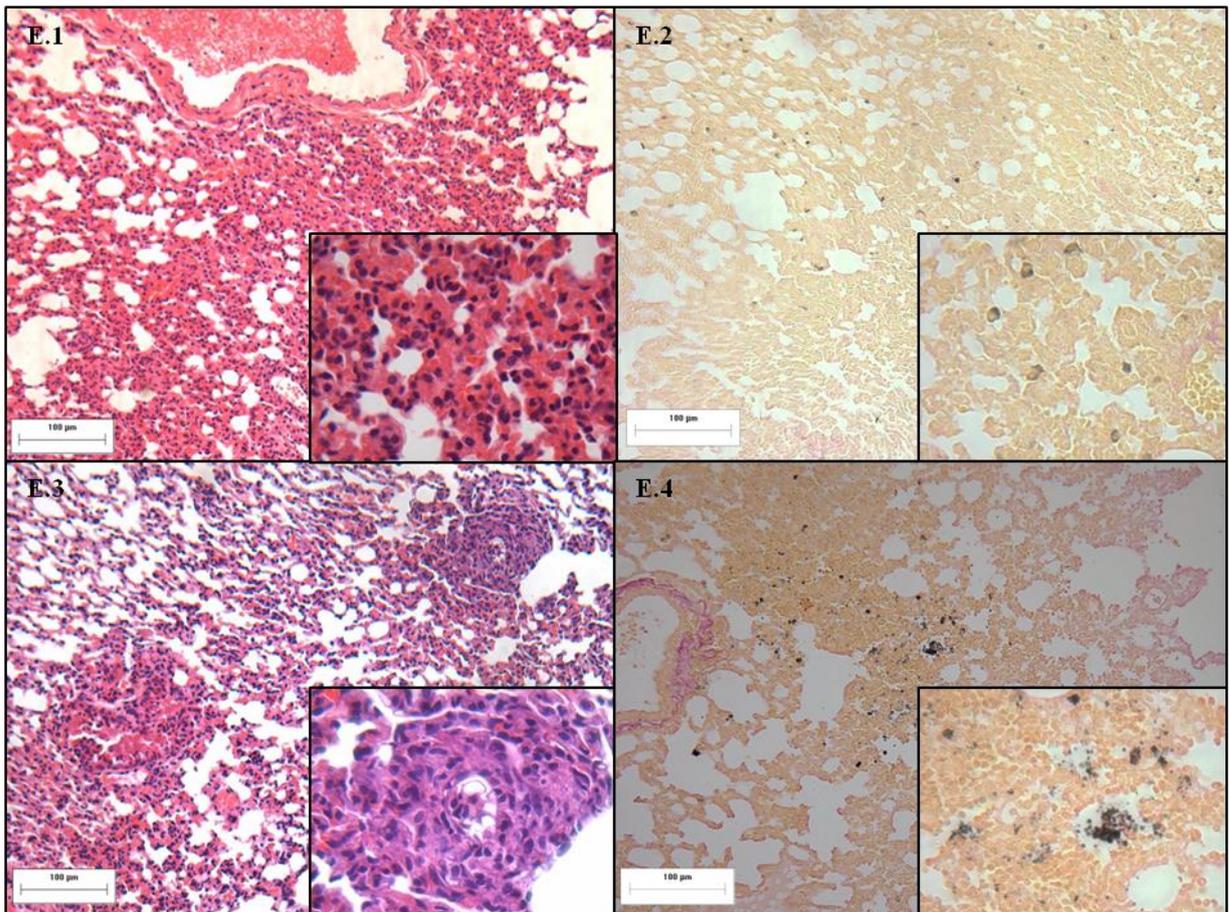


Fig. E Fotomicrografia de pulmões de camundongos *Swiss* infectados com Pb18 durante 2 semanas (E.1 e E.2) e após 8 semanas (E.3 e E.4). Observar aumento na celularidade pulmonar (E.1) e a ocorrência de formas leveduriformes difundidas pelo parênquima (E.2); Na oitava semana notar o granuloma em desenvolvimento onde predominam os macrófagos (E.3) e uma grande quantidade de fragmentos fúngicos dispersos pelo parênquima pulmonar (E.4). E.1 e E.3, corados com H&E; E.2 e E.4, corados com Gomori-Grocott. Aumento Original: 20x e no detalhe (zoom), aumento original de 100x.

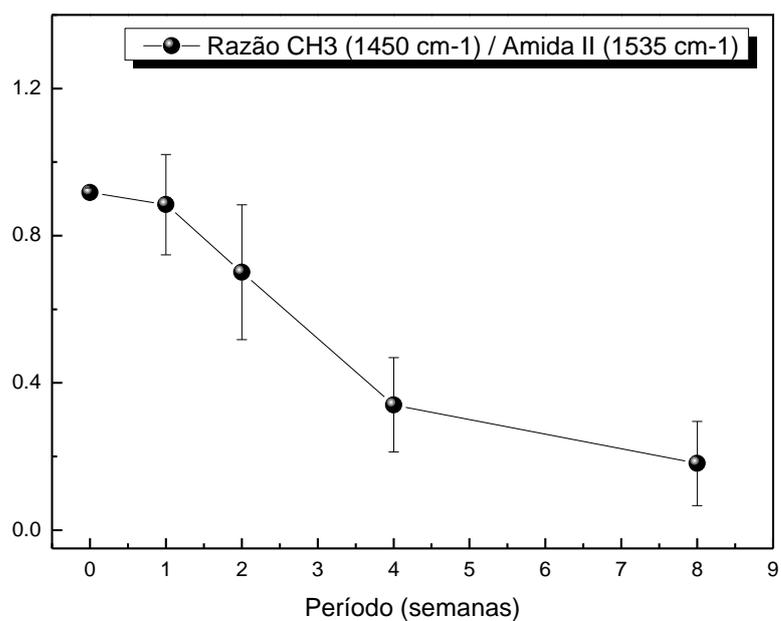


Fig. F Razão do grupo CH_3 pelo grupo da amida II obtido do espectro de absorção via FTIR-PAS dos pulmões de camundongos *Swiss* infectados com Pb18, após 1, 2, 4 e 8 semanas. O tempo zero representa o ponto controle da leitura feita em pulmões de camundongos *Swiss* saudáveis, injetados intravenosamente com PBS.

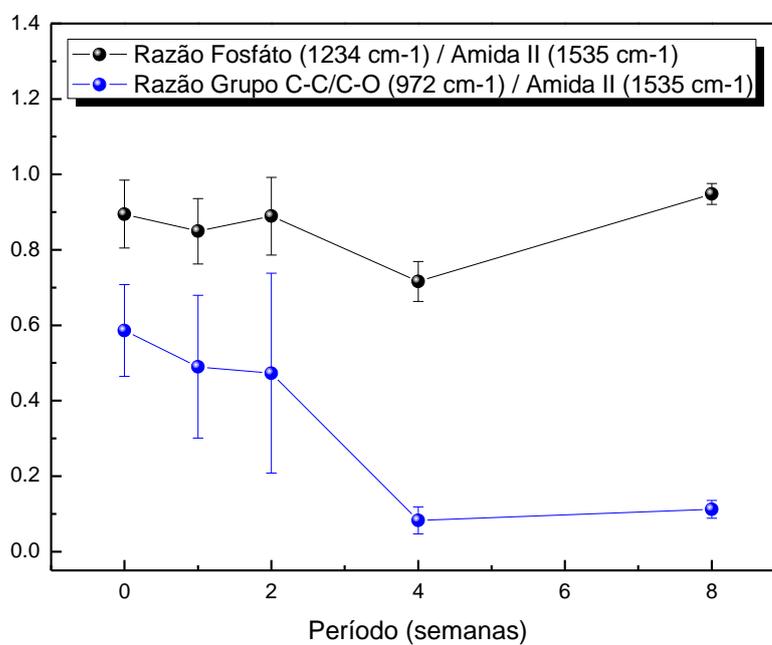


Fig. G.1 Em preto: Razão do grupo Fosfato/Amida II; G.2 Em azul: Razão do grupo C-C/C-O pela Amida II. Razão obtidas do espectro de absorção via FTIR-PAS dos pulmões de camundongos *Swiss* infectados com Pb18, após 1, 2, 4 e 8 semanas. O tempo zero representa o ponto controle da leitura feita em pulmões de camundongos *Swiss* sadios, injetados intravenosamente com PBS.

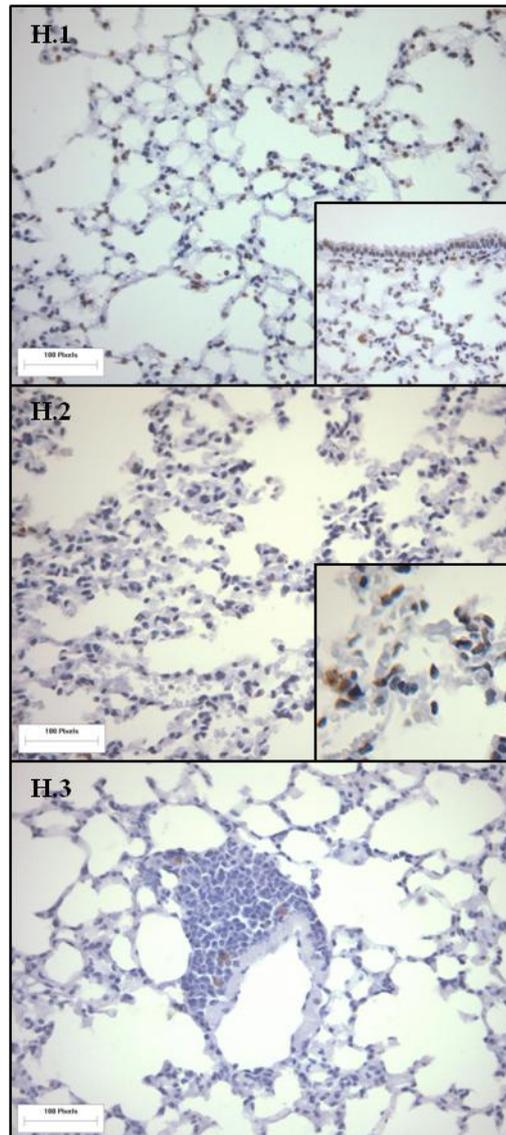


Fig. H Fotomicrografias de pulmões de camundongos *Swiss* infectados por Pb18, corados pela técnica de TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated UTP nick end labelling*). A maior frequência de células marcadas pode ser observada na primeira (H.1) e na quarta semana. A imunocoloração foi semelhante na segunda (H.2) e na oitava semana de infecção (H.3). Em H.1 notar a marcação TUNEL-positiva difusa, pelo parênquima pulmonar e no detalhe (zoom) a grande quantidade de núcleos corados no epitélio bronquiolar; Em H.2 observar que houve menor frequência de células marcadas; Somente na oitava semana (H.3) foram observados granulomas iniciais contendo células marcadas em seu interior. Contracoloração com Hematoxilina de Meyer. Aumento Original: 40x.

CAPÍTULO III

PERSPECTIVAS FUTURAS

Frente aos resultados obtidos, para prosseguir com os estudos sobre a paracoccidiodomicose, sugerimos as próximas etapas:

1. Dosar ou identificar a expressão de fosfolipase e colectinas pulmonares em pulmões de camundongos *Swiss* infectados com Pb;
2. Imunizar camundongos *Swiss* com a glicoproteína-gp43 para averiguar se gp43 previne mudanças conformacionais nas estruturas moleculares de pulmões infectados com Pb18.
3. Fazer análise por Espectroscopia Raman para comparar com os espectros de absorção obtidos via FTIR-PAS.

ANEXOS

ANEXO 01



Universidade Estadual de Maringá
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação



Parecer emitido após reunião realizada em: 9/11/2010 Parecer nº 116/2010

Investigador: Luzmarina Hernandez	Sector: DCM	
Título:	Protocolo nº 042/2010	
Expressão temporal de gp43 em granuloma pulmonar de camundongos Swiss infectados por <i>Parascoccidoides brasiliensis</i> e sua relação com a ocorrência de morte celular programada		
Entrada: 11/8/2010	Início: 1/8/2010	Término: 28/2/2012
Situação do Projeto:	Aprovado	
Relatório Final:	Aguarda finalização do projeto	
ATENÇÃO: este parecer, quando a situação do projeto constar "aprovado", autoriza os proponentes a executarem o protocolo em questão. O certificado será emitido após apreciação e aprovação do relatório final.		
<p>Considerações e Parecer:</p> <p>Por entender que os procedimentos experimentais não ferem os princípios éticos na experimentação animal aos de parecer favorável à execução do mesmo. Ressalta-se ainda que este Comitê aguarda o Relatório Final para a emissão do certificado desde que considerado conforme.</p>		
 Dr. Fábio Augusto Presidente do CEAA/UEM		

Artigo 10 da Resolução nº 002/2006-CEP: Os projetos analisados serão enquadrados em uma das seguintes categorias:

- I - aprovado;
- II - pendente, quando o CEAA considerar o protocolo e o projeto como aceitáveis, porém com problemas no protocolo, no projeto ou em ambos, e houver recomendação de uma revisão específica, ou solicitação de modificação ou informação relevante, que deverá ser atendida em até 60 dias, após o recebimento da comunicação, pelo coordenador do projeto;
- III - arquivado, quando o protocolo permanecer pendente, transcorridos 30 dias, após o prazo previsto no inciso II do recebimento da comunicação;
- IV - não aprovado.

www.ppg.uem.br - e-mail: ceaa@uem.br

ANEXO 02

Analytica Chimica Acta

An International Journal Devoted to All Branches of Analytical Chemistry



Preparation

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

Please use line numbering and double spacing for the manuscript at the time of submission.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Materials and methods

Experimental The experimental methods should be described after the introductory material. Detailed experimental descriptions should be restricted to one section of the paper. Sufficient detail should be given to allow any experienced worker to implement the procedures described. Procedural steps should not be numbered.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

This should include key findings of the research, quantitative analytical performance figures (if appropriate) and their significance to real sample matrices.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- ***Title.*** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- ***Author names and affiliations.*** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling

and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature, abbreviations and symbols

Please use L for litres. Always leave a space between units and use superscripts rather than /. For instance: use **mg mL⁻¹** and not **mg/ml**. Do not use ppm or ppb to denote solid/liquid concentrations.

Do not use abbreviations in the title or keywords. Define abbreviations that are not standard in this field at their first occurrence in both the abstract and the main text. Ensure consistency of abbreviations throughout the remainder of the manuscript.

In all other cases, the recommendations of the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) should be followed, and attention should be given to the recommendations of the Analytical Chemistry Division in the journal *Pure and Applied Chemistry* (see also IUPAC Compendium of Analytical Nomenclature, Definitive Rules, 1987).

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

Biographies and photographs

Authors of reviews and tutorials will be required to upload a colour image and short biography of each individual author. Biographies should contain 2 to 3 sentences (max 100 words) indicating authors' present affiliation, number of publications, awards, current research interests and website if available.

References***Citation in text***

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (☞ <http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (☞ <http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, J. Sci. Commun. 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, The Elements of Style, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), Introduction to the Electronic Age, E-Publishing, Inc. New York, 2009, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: ☞ <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of title word abbreviations: ☞ <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): ☞ <http://www.cas.org/sent.html>.