

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

ELAINE SCIUNITI BENITES MANSANO

Histologia e espectroscopia FT- Raman do fígado de camundongos *Swiss*
infectados por *Paracoccidioides brasiliensis*

Maringá

2012

ELAINE SCIUNITI BENITES MANSANO

Histologia e espectroscopia FT- Raman do fígado de camundongos *Swiss*
infectados por *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

2012

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

M286h Mansano, Elaine Sciuniti Benites
Histologia e espectroscopia FT-Raman do fígado de camundongos *Swiss* infectados por *Paracoccidioides brasiliensis* / Elaine Sciuniti Benites Mansano. -- Maringá, 2012.
74 f. : il. col., figs., tab.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Luzmarina Hernandez.
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Teresinha Ines 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, 2012.

1. *Paracoccidioides brasiliensis*. 2. Histopatologia. 3. Fígado - Morfologia. 4. Gp43. 5. Espectroscopia FT-Raman. I. Hernandez, Luzmarina, orient. II. Svidzinski, Teresinha Ines Estivalet, coorient. 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. 616.362

AMMA-00650

FOLHA DE APROVAÇÃO

ELAINE SCIUNITI BENITES MANSANO

Histologia e espectroscopia FT- Raman do fígado de camundongos *Swiss*
infectados por *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 Mauro Luciano Baesso
Universidade Estadual de Maringá

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

Prof. Dr^a Adriana Fiorini
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Eder Paulo Belato Alves
Universidade Estadual de Maringá

Hora e data: 14:00 horas do dia 10 de dezembro de 2012.

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

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, por ter me permitido mais esta graça. Aos pacientes portadores de paracoccidioidomicose, que ainda padecem com esta enfermidade devido aos mecanismos de patogenicidade que ainda são um enigma, mesmo que alguns aspectos já tenham sido elucidados. A minha família pelo amor incondicional. Ao meu marido, e às minhas filhas que me incentivaram e me apoiaram nas horas difíceis e de ausência, obrigado pela compreensão na busca de novos conhecimentos. A minha orientadora que contribuiu para esta formação, Prof^ª. Dr^ª. Luzmarina e a minha co-orientadora Prof^ª. Dr^ª. Terezinha. Vossas presenças foram essenciais para concretização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, meu maior orientador e guia neste projeto e na minha vida.

A minha maravilhosa orientadora Prof^a Luzmarina Hernandes por toda dedicação e zelo ao meu aprendizado, pela paciência que teve em todos os momentos do meu trabalho. E pela experiência adquirida na histologia, e pela sua amizade e compreensão, muito obrigada.

A minha co-orientadora, Prof^a Terezinha Ines Estivalet Svidzinski pessoa está que foi muito especial na minha vida, que me permitiu mais está conquista e que me incentivou no aprendizado e no conhecimento de fungos.

Ao CNPq pela bolsa concedida no meu último ano de mestrado, que muito me auxiliou financeiramente.

Ao Finep (edital:CT-infra 01\ 2008) pelos recursos financeiros que possibilitaram a aquisição do FT-Raman.

Ao meu marido Milton Vanderlei Mansano Júnior, que foi o meu maior incentivador nesta minha caminhada de estudos, por todo apoio, carinho e amor em todos os momentos da minha vida.

As minhas queridas filhas Amanda Benites Mansano e Giovana Benites Mansano, pois foi necessária a compreensão da importância do meu crescimento para compensar as horas de ausência, vocês foram indispensáveis para este crescimento, vocês foram à razão desse esforço.

Aos meus pais Gilberto Artuz Ortiz Benites e Eunice Sciuniti Benites, pelo amor e carinho e principalmente a minha mãe, que muito me ajudou nas horas em que estava ausente, ela estava presente como mãe tanto minha como das minhas filhas.

A toda minha família que me fazem sentir que realmente o amor existe.

A minha amiga de vida e de mestrado Eliane M. da Silva Bettega pela amizade, pelo carinho e compreensão de me ouvir nas horas difíceis da caminhada e que tem me dado força para sempre seguir em frente, e oportunidades de trabalhar com fungos e bactérias, foi uma grande experiência de vida.

Aos integrantes do grupo de fenômenos fototérmicos Gutiérrez Rodriguês de Moraes, Francielle Sato e ao professor Mauro L. Baesso, por mais esta experiência adquirida e pela oportunidade de trabalhar de maneira multidisciplinar.

As funcionárias do laboratório de histologia Maria Eurides Carlos Cancino, Maria dos Anjos Moreira Fortunato e Maria Angela Moreira da Costa, vocês estiveram sempre presentes em todas as etapas de mais esta conquista, me auxiliando e guiando em todos os detalhes, muito obrigada pela ajuda, companheirismo e amizade de vocês, aqui na histologia eu adquiri outra família, tenho um carinho muito especial por vocês.

Aos amigos que adquiri e convivi no Laboratório de histologia e micologia, meus sinceros agradecimentos.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM), na pessoa do Reitor Prof. Dr. Júlio Santiago Prates Filho.

Ao programa de Pós- graduação em Biociências Aplicadas a Farmácia, na pessoa coordenadora Prof^a Marcia Edilaine Lopes Consolaro.

Aos docentes do programa de Pós- graduação em Biociências Aplicadas a Farmácia, vocês foram essenciais para a minha formação.

A secretária da Pós-Graduação a Luciane Menchon Moura da Silva, pelo apoio e dedicação, sempre uma amiga, nos apoiando e ajudando, nos guiando e lembrando todas as etapas a serem alcançadas.

As minhas eternas amigas que mesmo longe não me saem da memória Milvia Baldissera, e Edilaine M. Moratto.

EPÍGRAFE

A imaginação é mais importante que o conhecimento. Conhecimento auxilia por fora, mas só o amor socorre por dentro. Conhecimento vem, mas a sabedoria tarda.

(ALBERT EINSTEIN)

Histologia e espectroscopia FT- Raman do fígado de camundongo *Swiss* infectados por *Paracoccidioides brasiliensis*

RESUMO

Introdução: A paracoccidioidomicose é uma doença sistêmica causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, cuja ocorrência é limitada à América Latina. A principal porta de entrada são as vias aéreas. Sua instalação ocorre primeiramente no pulmão, porém, na forma disseminada, qualquer órgão pode ser afetado. O fígado é um dos órgãos acometidos por esta enfermidade que pode desequilibrar a homeostase do órgão. O objetivo deste trabalho foi avaliar a evolução morfológica da paracoccidioidomicose hepática em camundongos *Swiss* e correlacionar à morfologia com a expressão de gp43 e com a análise físico-química do órgão infectado, via FT-Raman.

Resultados: De acordo com a contagem de unidades formadoras de colônias e de granulomas a primeira e a segunda semanas foram os períodos de maior infecção. A resposta tecidual se caracterizou pelo desenvolvimento de granulomas organizados e também uma infecção de caráter generalizado com leveduras localizadas no interior de macrófagos e hepatócitos isolados. A expressão de gp43 teve uma distribuição difusa pelo parênquima hepático e similar em todos os períodos observados. As principais alterações físico-químicas foram detectadas no intervalo espectral de 1750 – 1560 cm^{-1} onde houve deslocamento do pico relacionado com o radical $-\text{NH}_3^+$ e mudança na simetria do estiramento da molécula $-\text{CH}_3$, observada no intervalo entre 3030 - 2820 cm^{-1} .

Conclusões: Ao longo do tempo houve uma relação diretamente proporcional entre o número de unidades formadoras de colônias, o número de granulomas e as alterações físico-químicas no fígado infectado por *Paracoccidioides brasiliensis*. A expressão de gp43 foi semelhante em todos os períodos observados.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*, histopatologia, fígado, gp43, espectroscopia FT- Raman.

Histology and FT- Raman spectroscopy of the liver of *Swiss* mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*

ABSTRACT

Background: Paracoccidioidomycosis is a systemic disease caused by the fungi *Paracoccidioides brasiliensis*, whose occurrence is limited to Latin America. The main entrance door are the airways. Its installation occurs primarily in the lung, but in disseminated form, any organ can be affected. The liver is one of the organs affected by this disease that can disrupt the body's homeostasis. The objective of this study was to evaluate evolution morphological of the paracoccidioidomycosis liverwort in mice Swiss and correlate the morphology with the expression of gp43 and the physical-chemical analysis of the infected organ, via FT-Raman.

Results: According to the CFU count and the granulomas the first and second weeks were periods of larger infection. The tissue response observed was the development of organized granulomas and also a infection of widespread character an with isolated macrophages and hepatocytes, which do not constitute granulomas. The expression of gp43 had a diffuse distribution in the hepatic parenchyma and intensity was similar in all observed periods. The main physico-chemical changes were detected in the spectral range 1750 - 1560 cm^{-1} where there was displacement of the peak related to the radical- NH_3^+ and change in the symmetry of the molecule stretch- CH_3 observed in the range between 3030-2820 cm^{-1} .

Conclusions: There was relationship directly proportional a temporal between the number of colony forming units, the number of granulomas and physicochemical changes in the liver infected by *Paracoccidioides brasiliensis*. The expression of gp43 was similar in all observed periods.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*, histopathology, liver, gp43, FT - Raman spectroscopy.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
BHI	Brain heart infusion
cm	Centímetros
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
FT-Raman	Raman com Transformada de Fourier
g	Gramas
gp	Glicoproteína
H&E	Hematoxilina e Eosina
KDa	Kilodaltons
Kg	Kilograma
log	Logaritmo
mg	Miligrama
mw	Miliwatt
nm	Nanômetro
PAS	Ácido periódico de Schiff
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
Pb18	Cepa virulenta do fungo <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PBS	Tampão fosfato de sódio
PCM	Paracoccidioidomicose
pH	Potencial hidrogeniônico
PMN	Leucócito polimorfonuclear
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µm	Micrômetro

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Número de Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs/log ₁₀).....	49
Figura 2 Número de granulomas por semana de infecção por Pb no fígado.....	50
Figura 3 Fotomicrografia do fígado controle e na primeira semana de infecção com Pb	51
Figura 4 Fotomicrografia do fígado controle e na segunda semana de infecção com Pb	52
Figura 5 Fotomicrografia do fígado controle e na quarta e oitava semana de infecção com Pb	53
Figura 6 Fotomicrografia do fígado controle e infectado com Pb ao longo do período experimental corado pela técnica de picro sirius.....	54
Figura 7 Fotomicrografia do fígado imunomarcado com a expressão de gp43, fígado controle e infectado com Pb ao longo do período experimental	55
Figura 8 Espectroscopia FT-Raman do fígado de camundongos <i>Swiss</i> controle e infectados com Pb ao longo do período experimental.....	56
Figura 9 Deslocamento da posição dos picos associados ao -NH ₃ ⁺ dos animais controle em comparação aos animais infectados ao longo do período experimental.....	57
Figura 10 Razão entre os picos 2875 e 2930 cm ⁻¹ do fígado controle, e infectado em função do período de infecção	58

LISTA DE TABELA

Tabela 1 Números de onda referentes aos picos obtidos por FT Raman e os radicais químicos aos quais estão associados	59
---	----

Dissertação elaborada e formatada conforme
as normas das publicações científicas:

BMC MICROBIOLOGY

[http://www.biomedcentral.com/bmcmicrobiol/
authors/instructions/researcharticle](http://www.biomedcentral.com/bmcmicrobiol/authors/instructions/researcharticle)

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I.....	14
1.1	Revisão de Literatura	14
1.2	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	14
1.3	Paracoccidioidomicose	15
1.4	Espectroscopia Raman	18
1.5	Justificativas	20
1.6	Objetivos	20
1.6.1	Objetivo geral	20
1.6.2	Objetivos específicos.....	21
1.7	Referências Bibliográficas.....	21
2	CAPÍTULO II.....	28
2.1	Correlação entre a análise histopatológica e por espectroscopia FT- Raman em fígado de camundongos <i>Swiss</i> infectados por <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	29
3	CAPÍTULO III	47
3.1	Perspectivas Futuras	47
	APÊNDICES	48
	ANEXOS	60
	Anexo 1 Protocolo de aprovação do projeto de pesquisa emitido pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da Universidade Estadual de Maringá	61
	Anexo 2 Normas da revista BMC Microbiology	62

CAPÍTULO I

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

1.2 *PARACOCIDIROIDES BRASILIENSIS*

Paracoccidioides brasiliensis pertence ao reino Fungi e compõe o filo *Ascomycota*, ordem *Onygenales*, a família *Onygenaceae*, subfamília *Onygenaceae* *Anamórficos* [1].

Uma nova proposta na ordem *Onygenales*, foi sugerida e uma mudança então ocorreu na família que de *Onygenaceae*, passou a ser denominada *Ajellomycetae* [2].

Paracoccidioides brasiliensis (Pb), é o principal agente causador da Paracoccidioidomicose (PCM) [3]. Pb é um fungo termo dimórfico que muda sua forma de acordo com a temperatura, apresentando micélio a 25°C e forma de levedura a 36° C [4].

Acredita-se que o habitat natural do Pb na natureza seja no solo, por isso este fungo afeta principalmente produtores rurais [5] preferencialmente os agricultores, pois estão constantemente em contato com a poeira em suspensão podendo ser considerado uma doença ocupacional [6, 7].

O Pb tem preferencia por solo arenoso e argiloso, contendo alto teor de água, que é favorável para o estabelecimento e sobrevivência deste patógeno. Também é frequente nas tocas de animais silvestres onde pode crescer e produzir conídios infecciosos [8].

Condições ideais para o desenvolvimento das formas saprofíticas do Pb é em regiões com temperaturas amenas, vegetação abundante e umidade [9].

Sobrevive em condições ambientais e cultivadas in vitro, dependendo da temperatura que se encontra, tanto na forma de micélio como de levedura. Na forma de micélio são visualizados microscopicamente por hifas septadas com a presença de conídios terminais ou intercalares. A levedura apresenta a forma arredondada ou oval, que se caracteriza pela presença de uma célula mãe podendo ou não ter múltiplos brotamentos, é patogênico do Pb nesta fase quando se encontra no aspecto de roda de leme de navio [1,10].

Em culturas na fase micelial, as colônias tem aspecto cotonoso cobertas por um fino micélio aéreo e estão firmemente aderidas ao meio de cultura. As culturas na forma leveduriforme, apresentam colônias cerebriformes, de coloração bege, facilmente

destacadas do meio, e compostas por células de diferentes tamanhos variando de 5 a 30µm [11].

1.3 PARACOCCIDIOIDOMICOSE

A paracoccidiodomicose é uma micose sistêmica de grande relevância médica, pois a patogenicidade do fungo causador desta doença, de natureza grave, deixa sequelas, sendo considerado uma das micoses sistêmicas mais importantes da América Latina [12], afetando cerca de 10 milhões de pessoas [13, 14].

Considerada a oitava causa de mortalidade dentre as doenças infecciosas crônicas entre as doenças infecciosas e parasitárias e dentre as micoses sistêmicas é a que tem maior taxa de mortalidade, 1,45 casos/milhão de habitantes [15, 16].

Representa um problema de saúde pública, pois acomete as pessoas em sua fase produtiva incapacitando-as de exercer suas funções [17]. Em casos mais graves a hospitalização por longo período se faz necessário, com custos elevados, e o tratamento muitas vezes pode durar até dois anos podendo haver reincidência da doença [18].

É uma patologia endêmica em áreas úmidas tropicais e subtropicais da América Latina, abrange uma ampla região do México até a Argentina e 80% dos casos notificados foram no Brasil [19,18].

Não é uma doença de notificação compulsória e sem dados precisos sobre sua incidência no Brasil [17]. Acredita-se que sua incidência com base em serviços de referência no atendimento de pacientes com PCM, varie em zonas endêmicas de 3 a 4 novos casos/milhão até 1 a 3 novos casos por 100 mil habitantes ao ano [16].

A infecção é causada pela inalação de propágulos no ar, na fase de micélio do fungo, que vão se alojar predominantemente nos pulmões, que no hospedeiro ao atingir o alvéolo pulmonar converte-se para a forma patogênica, leveduriforme [20].

Pode ser destruído pelo organismo ou se multiplicar podendo ativamente penetrar na superfície muco-cutânea e parasitar células epiteliais, evitando assim as defesas do hospedeiro, ou alcançar os tecidos mais profundos [21] e depois ser disseminado para quase todas as partes do corpo [22].

No hospedeiro o Pb pode interagir com produtos secretados pelas células, com a superfície da célula e proteínas da matriz extracelular (colágeno tipo I e IV, fibronectina, fibrinogênio e laminina). O Pb possui um mecanismo evoluído para aderir e invadir as barreiras impostas pelo hospedeiro, as adesinas presentes no fungo

determinam a capacidade de ligação e também o tropismo por uma célula ou tecido [23,24].

Os micro-organismos desenvolvem algumas características que os permitem sobrepujar as defesas do hospedeiro. O principal componente antigênico de *P. brasiliensis* é uma glicoproteína de 43 KDa chamada gp43, [3] que participa na aderência, invasão e patogenia do fungo [19], sendo o principal antígeno de diagnóstico e prognóstico da PCM [25].

Já foram descritas diversas proteínas de adesão produzidas pelo Pb, a gp43 se liga a fibronectina, as proteínas de 19 e 32 KDa interagem com várias proteínas da matriz extracelular [26, 27].

A laminina é outro receptor para a gp43 que é responsável pela adesão do fungo durante a infecção [28, 29]. A ligação da laminina com a gp43 induz a infectividade do Pb [28].

O antígeno de Pb é a glicoproteína gp43 que é sintetizada e transportada para a parede celular e posteriormente é secretada para o meio [30]. Pb é capaz de persistir no hospedeiro, e a gp43 favorece sua invasão pois inibe a atividade fungicida de macrófagos, contribuindo para o desenvolvimento de infecção em hospedeiros susceptíveis [31].

Outros constituintes de Pb também são responsáveis por suas propriedades antigênicas da parede celular, a galactomanana é outro polissacarídeo de glicose que é encontrado na forma micelial do Pb [32]. A melanina, que se encontra distribuída por todo citoplasma e na superfície da célula é outro fator de virulência em Pb, este pigmento pode desempenhar um papel na patogênese da PCM [33, 34].

A entrada de patógenos nas células pode desestabilizar a homeostase e induzir a morte celular, [35], sugeriram que a apoptose na PCM desempenha um papel na hiporeatividade de células T antígenos específicas a gp43 reduzindo assim os mecanismos de defesa do hospedeiro [36].

As manifestações clínicas e imunológicas da PCM em humanos variam desde a forma benigna e localizada até grave e disseminada [37, 38]. A maioria das pessoas infectadas pode permanecer assintomáticas. Entretanto, os pacientes podem responder à doença de forma anérgica como ocorre no tipo juvenil considerado a forma aguda e mais grave, ou de forma hiperérgica que acomete adultos na fase crônica da doença [39].

A infecção disseminada por via hematogênica ou linfática pode envolver vários órgãos e sistemas, como os pulmões, orofaringe, pele, mucosas, linfonodos, supra renais, fígado, baço, ossos, órgãos linfóides do tubo digestório e sistema nervoso central [16,38].

Em crianças, a distribuição da doença é semelhante tanto para o gênero masculino quanto feminino. Em adultos, afeta predominantemente o sexo masculino [3]. Na mulher a ação do hormônio feminino 17 β -estradiol inibe o crescimento do fungo, evitando que ocorra a transição para a forma infecciosa de levedura [40].

A PCM é uma doença granulomatosa crônica, devido ao processo inflamatório, que estimula a produção de citocinas, porém o papel preciso na formação de granulomas ainda não está esclarecido [41].

A reação granulomatosa se desenvolve na tentativa de isolar o agente infeccioso, evitando que se multiplique e se dissemine para outras partes do corpo, o que representa uma resposta eficiente e especializada dos tecidos hospedeiros [42].

No exame histopatológico pode-se obter a relação entre a interação do parasita com o hospedeiro, pelo padrão de resposta granulomatosa. O padrão de formação desses granulomas depende da gravidade da doença, nas formas menos graves com pequena quantidade de células fúngicas, os granulomas nesse caso, são compactos e densos, já na forma grave os granulomas são frouxos, com grande quantidade de fungos [43].

Os polimorfonucleares (PMNs) nos humanos com PCM estão presentes em grande quantidade nos tecidos parasitados, nas etapas iniciais da infecção e, contribuem para uma resposta imune efetiva minimizando a capacidade de dano pelos monócitos [42].

O fungo também pode permanecer incógnito para as defesas imunes do hospedeiro, por não expor o seu antígeno na superfície celular. E pode ser encontrado intracelularmente em PMNs e em monócitos e macrófagos, quando não ativados, sugerindo que é capaz de sobreviver dentro dessas células [44].

Para aumentar a atividade fungicida das células fagocíticas, citocinas como TNF- α são estimuladas por estas células, que produzem metabólitos intermediários de oxigênio, colagenases e ativação e proliferação de moléculas de adesão que podem causar lesões no tecido, na tentativa de se proteger contra o Pb pela sua atividade fungicida e microbicida de fagócitos [42].

Estudo em animais de laboratório suscetível a doenças tem fornecido informações importantes na patogênese da doença desde estágios iniciais aos mais avançados [45].

O pulmão é o órgão mais frequentemente afetado por Pb e o desenvolvimento e a organização dos granulomas foi bem documentado neste órgão [46].

Outros órgãos vêm sendo estudados, com a infecção com Pb e observaram granulomas no baço, fígado e pâncreas em *Calomys callosus* e constataram que o Pb tem uma predisposição para crescer no pâncreas [47].

Em modelos experimentais de camundongos, no pulmão destes animais primeiramente observou-se um infiltrado de PMNs e macrófagos e posteriormente uma resposta inflamatória crônica com formação de granuloma [48].

A formação de granuloma nestes modelos experimentais e também nos seres humanos depende de vários fatores como susceptibilidade ou resistência a infecção, e a virulência da cepa do fungo [47]. Um desequilíbrio na produção de citocinas pode levar a morte celular induzida por apoptose [49].

O desenvolvimento da doença depende de fatores do fungo, como sua virulência, composição antigênica, das condições ambientais e dos fatores referentes ao hospedeiro, inerentes a sua resposta imunológica [42].

O diagnóstico é baseado no exame histopatológico, cultura através da visualização e isolamento do fungo e detecção de anticorpos em amostras clínicas [50], o principal anticorpo detectado no soro do paciente é o anti gp43 [19].

1.4 ESPECTROSCOPIA RAMAN

A espectroscopia Raman vem sendo utilizada como um método de diagnóstico precoce em nível celular, em casos de displasia e câncer porque é uma técnica não destrutiva que fornece informações sobre as estruturas moleculares dos tecidos [51, 52, 53, 54].

A técnica consiste na medida do efeito de espalhamento inelástico de luz o qual permite o estudo de rotações e vibrações moleculares [55].

Mede a troca de energia com radiação eletromagnética de um determinado comprimento de onda gerado a partir de um laser (Figura 1) com mudança mensurável no comprimento de onda da luz incidente do laser [56].

As medidas são realizadas quando a amostra é iluminada por uma luz monocromática do laser e ocorrem às interações entre os fótons incidentes e as moléculas da amostra pela dispersão da luz, transferindo energia para a molécula que estando excitada responde por meio de vibrações [57].

As informações contidas nas bandas obtidas pelo espectro Raman dependem dos níveis de energia das moléculas, da composição química e das massas dos átomos contidos nas moléculas, as bandas por Espectro Raman carregam informações detalhadas sobre a composição molecular da amostra, como banda de amida I (C=O) e amida II (N-H) resultantes de proteínas, e (C=O) de lipídios e anti-simétricas (PO₂) de ácidos nucleicos e fosfolipídios [57].

As medições são geralmente coletadas em poucos minutos, resultando na construção de uma 'impressão digital' [56].

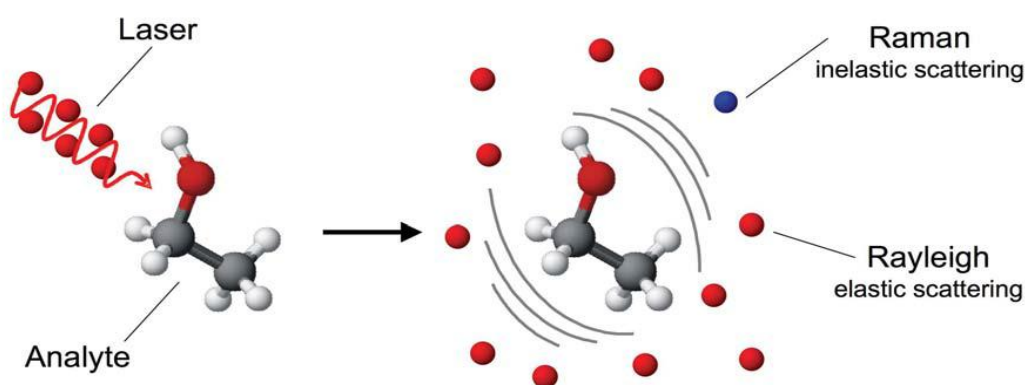


Figura 1: Espalhamento Raman [56].

A espectroscopia Raman com transformada de Fourier (FT-Raman) usa um laser Nd: YAG (NIR- 1064nm), um interferômetro e um detector de Ge, e coleta vários comprimentos de onda e em curto período de tempo. A excitação no infravermelho próximo, a 1064nm minimiza o efeito de fluorescência e a degradação fotolítica da amostra [58].

A espectroscopia Raman fornece informações das estruturas e propriedades moleculares oriundas das transições dos níveis vibracionais que resultam em deslocamentos na energia da radiação eletromagnética, que são expressos em centímetros (cm^{-1}) [59].

Tem se tornado uma técnica rápida para identificação de fungos filamentosos e leveduras em hospitais, centros de saúde, laboratórios de análise clínica, alimentos, rações, bebidas e água em indústrias [60].

A espectroscopia Raman associada à análise histopatológica pode auxiliar no diagnóstico, pois fornece informações detalhadas sobre a composição biomolecular de tecidos, podendo distinguir tecidos normais de tecidos alterados [61].

1.5 JUSTIFICATIVAS

Apesar da extensa literatura publicada sobre a PCM e do grande número de trabalhos que focalizam os diferentes métodos diagnósticos, até onde se sabe são poucas as publicações que avaliaram as alterações espectrais por FT- Raman como um método que caracteriza os componentes moleculares nos tecidos como um instrumento de diagnóstico de patologias associado à histopatologia. E pelo que se sabe por meio da literatura, não se tem relatos de estudos avaliando a PCM no fígado por esta metodologia. Bem como a expressão de gp43, pela técnica de imunohistoquímica no fígado.

Considerando que o fígado é um órgão com células em constante atividade fagocitária, e responsáveis pelo aporte nas respostas imunes, é plausível supor que a função prejudicada neste órgão poderia contribuir para a disseminação e agravo da doença, devido a um possível desequilíbrio em sua homeostasia.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo conhecer a evolução temporal da paracoccidiodomicose no fígado de camundongos Swiss por meio de um estudo da morfologia do órgão, da avaliação da expressão de gp43 e da análise físico-química, via FT-Raman do órgão infectado.

1.6.2 Objetivos específicos

- Analisar as alterações morfológicas provocadas pelo Pb, no fígado por Pb 18, nos períodos de 1, 2, 4 e 8 semanas após a infecção.
- Aplicar técnicas de imunohistoquímica, na análise da expressão de gp43.
- Identificar as alterações físico-químicas por meio da Espectroscopia Raman com Transformada de Fourier.
- Verificar se este órgão em camundongos *Swiss* pode ser considerado alvo da Paracoccidioidomicose.
- Alertar para as possíveis alterações morfológicas decorrentes da infecção, contribuindo para melhor elucidação da doença.

1.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. San-Blas G, Niño-Vega G, Iturriaga T. ***Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics.** Med Mycol 2002, **40**(3):225-242.
2. Untereiner WA, Scott JA, Naveau FA, Sigler L, Bachewich J, Angus A. **The *Ajellomycetaceae*, a new Family of vertebrate-associated *Onygenales*.** Mycologia 2004, **96**(4): 812-821.
3. Costa PF, Fernandes GF, Dos Santos PO, Amaral CC, Camargo ZP. **Characteristics of Environmental *Paracoccidioides brasiliensis* Isolates.** Mycopathologia 2010, **169**:37-46.
4. Nemecek JC, Wüthrich M, Klein BS. **Global control of dimorphism and virulence in fungi.** Science 2006, **312**:583-588.
5. Barrozo LV, Benard G, Silva MÊS, Bagagli E, Marques AS, Mendes RP. **First Description of a Cluster of Acute/Subacute Paracoccidioidomycosis Cases and Its Association with a Climatic Anomaly.** Plos neglected tropical diseases 2010, **4**(e643): 1-4.
6. Franco, M. **Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis.** J Med Vet Mycol 1987, **25**(1): 5-18.

7. Santos R da S, Lima P de S, De Paula LB, Reis AA da S, Barbosa MS. **The human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* and Paracoccidioidomycosis: a medical and molecular approach.** Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações 2011, **9**(2): 281-295.
8. Terçariole GR, Bagagli E, Reis GM, Theodoro RC, Bosco S. de MG, Macoris SA. da G, Richini-Pereira VB. **Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection.** BMC Microbiology 2007, **7**(92): 1-8.
9. Restrepo A. **The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unresolved.** J Med Vet Mycol 1985, **23**: 323-334.
10. Restrepo A, Benard G, De Castro CC, Agudelo CA, Tobón AM. **Pulmonary paracoccidioidomycosis.** Semin Respir Crit Care Med 2008, **29**(2):182-197.
11. Souto PC, Brito VN, Gameiro J, da Cruz-Höfling MA, Verinaud L. **Programmed cell death in thymus during experimental paracoccidioidomycosis.** Med Microbiol Immunol 2003, **192**(4): 225-229.
12. Pereira LA, Bão SN, Barbosa MS, Da Silva JLM, Felipe MSS, De Santana JM, Mendes-Giannini MJS, Soares C M. de A. **Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function.** Federation of European Microbiological Societies 2007, **7**: 1381-1388.
13. Restrepo A, McEwen JG, Castañeda E. **The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle?** Med Mycol 2001, **39**(3): 233-241.
14. Neto BR. da S, Da Silva J de F, Mendes-Giannini MJS, Lenzi HL, Soares CM de A, Pereira M. **The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a linked surface protein that behaves as an anchorless adhesion.** BMC Microbiology 2009, **9**(272): 1-12.
15. Coutinho ZF, Da Silva D, Lazéra M, Petri V, De Oliveira RM, Sabroza PC, Wanke B. **Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1990 – 1995).** Cad Saúde Pública, Rio de Janeiro 2002, **18**(5): 1441-1454.
16. Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho FQ, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML e grupo de consultores do consenso de paracoccidioidomicose. **Consenso em paracoccidioidomicose – Relatório Técnico.** Rev Soc Bras Med Trop 2006, **39** (3): 297-310.

17. Wanke B, Aidê MA. **Chapter 6 – Paracoccidioidomycosis.** Continuing Education Course – Mycoses. J Bras Pneumol 2009, **35**(12):1245-1249.
18. Travassos LR, Taborda CP. **New advances in the development of vaccine against paracoccidioidomycosis.** Frontiers in Microbiology 2012, **3**(212): 1-6.
19. Vargas J, Vargas R. **Actualizaciones Paracoccidioidomycosis.** Rev. de Enfermedades Infecciosas y Tropicales, Enero 2009, **1**(1): 49-56.
20. De Camargo ZP, De Franco MF. **Current Knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis.** Rev Iberoam Micol 2000, **17**: 41-48.
21. 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): 4040-4050.
22. Pereira M, Bailão AM, Parente JA, 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, Rio de Janeiro 2009, **104**(3): 486-491.
23. McMahon JP, Whea TJ, Sobel ME, Pasula R, Downing JF, Martin WJ. **Murine Laminin binds to Histoplasma capsulatum. A possible mechanism of dissemination.** J Clin Inv 1995, **96**(2): 1010-1017.
24. Lenzi, HL, Calich VLG, Mendes-Giannini MJS, Xidieh CF, Miyaji M, Mota EM, Machado MP, Restrepo A. **Two Patterns of Extracellular Matrix Expression in Experimental Paracoccidioidomycosis.** Med Mycol 2000, **38**: 115-119.
25. Rocha AA, Morais FV, Puccia R. **Polymorphism in the flanking regions of the PbGp43 gene from the human pathogen Paracoccidioides brasiliensis: search for protein binding sequences and poly (A) cleavage sites.** BMC Microbiology 2009, **9**:277.
26. González A, Gómez BL, Diez S, Hernández O, Restrepo A, Hamilton AJ, Cano EL. **Purification and parcial characterization of a Paracoccidioides brasiliensis protein with to bind to extracelular matrix proteins.** Infection and Immunity 2005, **73**(4): 2486-2495.
27. Mendes-Giannini MJS, Andreotti PF, Vincenzi LR, Da Silva JLM, Lenzi HL, Benard G, Zancopé-Oliveira R, Guedes HL de M, Soares CP. **Binding of**

- extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*.** *Microbes and Infection* 2006, **8**:1550-1559.
28. Vicentini AP, Gesztesi JL, Franco MF, De Souza W, De Moraes JZ, Travassos LR, Lopes JD. **Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp 43 leads to enhancement of fungal pathogenesis.** *Infection and Immunity* 1994, **62**(4): 1465-1469.
29. Hanna SA, Silva JLM, Mendes-Giannini MJS. **Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in vero cells.** *Microbes and Infection* 2000, **2**: 887-884.
30. Nimrichter L, Rodrigues ML, Rodrigues EG, Travassos LR. **The multitude of targets for the immune system and drug therapy in the fungal cell wall.** *Microbes and Infection* 2005, **7**: 789- 798.
31. Popi A. F.; Lopes J. D.; Mariano M. **GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus.** *Cellular Immunology* 2002, **218**:87-94.
32. Kanetsuna F, Carboneli LM, Azuma I, Yamakura Y. **Biochemical Studies on the Thermal Dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*.** *Journal of Bacteriology* 1972, **110**(1): 208 – 218.
33. Taborda C, Da Silva MB, Nosanchuk JD, Travassos LR. **Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview.** *Mycopathologia*, 2008, **165**(4-5): 331–339.
34. Gómez BL, Nosanchuk JD, Diez S, Youngchim S, Aisen P, Cano LE, Restrepo A, Casadevall A, Hamilton AJ. **Detection of Melanin-Like Pigments in the Dimorphic Fungal Pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* In Vitro and during Infection.** *Infection and Immunity* 2001, **69** (9): 5760- 5767.
35. 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.** *Clin Immunol* 2002, **105**:215-222.
36. Vechio AD, Da Silva J de F, Da Silva JLM, Andreotti PF, Soares CP, Benard G, Mendes-Giannini MJS. **Induction of apoptosis in A549 pulmonary cells by two *Paracoccidioides brasiliensis* samples.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2009, **104**(5): 749- 754.
37. Ferreira MC, De Oliveira RTD, Da Silva RM, Blotta MHSL, Mamoni RL. **Involvement of regulatory T cells in the immunosuppression characteristic**

- of patients with paracoccidioidomycosis.** Infection and Immunity 2010, **78**(10): 4392-4401.
38. Bertini S, Colombo AL, Takahashi HK, Straus AH. **Expression of antibodies directed to *Paracoccidioides brasiliensis* glycosphingolipids during the course of Paracoccidioidomycosis treatment.** Clinical and Vaccine Immunology 2007, **14**(2): 150- 156.
 39. Berbet ALCV, Faria GG, Gennari-Cardoso ML, Silva MMMD, Mineo JR, Loyola AM. **Histological and serological evidence of experimental in *Calomys callosus* (Rodentia: Cricetidae).** International journal of experimental pathology 2007, **88**: 55-62.
 40. Pinzan CF, Ruas LP, Casabona-Fortunato AS, Carvalho FC, Roque-Barreira MC. **Immunological basis for the gender differences in murine *Paracoccidioides brasiliensis* infection.** Plos ONE 2010, **5**(5): e10757: 1-10.
 41. Parise-Fortes MR, Marques AS, Soares AMVC, Kurokawa CS, Marques MEA, Peracoli MTS. **Citokines released from blood monocytes and expressed in mucocutaneous lesions of patients with paracoccidioidomycosis evaluated before and during trimetropim-sulfamethoxazole treatment.** British Journal of Dermatology 2006, **154**:643-650.
 42. Fortes MRP, Kurokawa CS, Marques AS, Miot HA, Marques MEA. **Immunology of paracoccidioidomycosis.** An Bras Dermatol 2011, **86**(3): 516-525.
 43. Borges-Walmsley MI, Chen D, Shu X, Walmsley A. **The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*.** Trends in Microbiology 2002, **10**(2): 80-87.
 44. Acorci MJ, Dias-Melicio LA, Golim MA, Bordon-Graciani AP, Peracoli MTS, Soares AMVC. **Inhibition of human neutrophil apoptosis by *Paracoccidioides brasiliensis*: Role of interleukin-8.** Scandinavian Journal of Immunology 2008, **69**:73 -79.
 45. 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**: 336-350.
 46. Da Silva FC, Svidzinski TIE, Patussi EV, Cardoso CP, Dalalio MM de O, Hernandez L. **Morphologic organization of pulmonar granulomas im mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*.** Am J Trop Med Hyg 2009, **80**(5): 798-804.

47. Fortes RM, Kipnis A, Junqueira-Kipnis AP. ***Paracoccidioides brasiliensis* pancreatic destruction in *Calomys callosus* experimentally infected.** BMC Microbiology 2009, **9**:84.
48. González A, Lenzi HL, Motta EM, Caputo L, Restrepo A, Cano LE. **Expression and arrangement of extracellular matrix proteins in the lungs of mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia.** Int J Exp Path 2008, **89**: 106-116.
49. Lozano VF, Lins TC, Teixeira MM, Vieira RG, Blotta MHSL, Goes AM, Silva ICR, Pereira RW, Bocca AL, Felipe MSS. **Polymorphism analysis of the CTLA-4 gene in paracoccidioidomycosis patients.** Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2011, **106**(2): 220-226.
50. Tatibana BT, Sano A, Uno J, Kamei K, Igarashi T, Mikami Y, Miyage M, Nishimura K, Itano EN. **Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* gp43 gene in sputa by loop-mediated isothermal amplification method.** Journal of Clinical Laboratory Analysis 2009, **23**: 139-143.
51. Hawi SR, Campbell WB, Kajdacsy-Balla A, Murphy R, Adar F, Nithipatikom K. **Characterization of normal and malignant human hepatocytes by Raman microspectroscopy.** Cancer Lett 1996, **110**(1-2): 35-40.
52. Malini R, Venkatakrishna K, Kurien J, Pai KM, Rao L, Kartha VB, Krishna CM. **Discrimination of normal, inflammatory, premalignant, and malignant oral tissue: A Raman spectroscopy study.** Biopolymers 2006, **81**(3): 179- 193.
53. De Oliveira AF, Santos ID de AO, Cartaxo SB, Bitar RA, Simões MM, Enokibara S, Martinho H da S, Martin AA, Ferreira LM. **Differential diagnosis in primary and metastatic cutaneous melanoma by FT-Raman spectroscopy** 2010, Acta Cirúrgica Brasileira **25**(5):434-439.
54. Oshima Y, Shinzawa H, Takenaka T, Furihata C, Sato H. **Discrimination analysis of human lung cancer cells associated with histological type and malignancy using Raman spectroscopy.** Journal of Biomedical Optics 2010, **15**(1): 017009.
55. Moreira LM, Silveira Jr L, Santos FV, Lyon JP, Rocha R, Zângaro RA, Villaverde AB, Pacheco MTT. **Raman spectroscopy: A powerful technique for biochemical analysis and diagnosis.** Spectroscopy 2008; 22: 1-19.
56. Goodacre R, Jarvis M. **Applications in bioprocesses and biotechnology.** European Pharmaceutical Review 2005, **4**: 72- 77.

57. Faolain EO, Hunter M, Byrne J, Kelehan P, Byrne HJ. **The potential of vibrational spectroscopy in the early detection of cervical cancer: an exciting emerging field.** Proceedings of optoIreland SPIE 2005, **5826**(25).
58. Hanlon EB, Manoharan R, Koo TW, Shafer KE, Motz JT, Fitzmaurice M, Kramer JR, Itzkan I, Dasari RR, Feld MS. **Prospects for *in vivo* Raman spectroscopy.** Phys Med Biol 2000, **45**(2): 51-59.
59. Lewis IR, Edwards GM. **Handbook of Raman Spectroscopy: from the Research Laboratory to the Process Line.** New York: Marcel Dekker, 2001: 1-2.
60. Santos C, Fraga ME, Kozakiewicz Z, Lima N. **Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts.** Res Microbiol 2010, **16**(2): 168-175.
61. Lorincz AL, Haddad D, Naik R, Fung A, Cao A, Manda P, Pandya A, Auner G, Rabah R, Langenburg SE, Klein MD. **Raman spectroscopy for neoplastic tissue differentiation: A pilot study.** Journal of Pediatric Surgery 2004, **39**(6): 953-956.

CAPÍTULO II

**Artigo: Correlação entre a análise histopatológica e por espectroscopia
FT- Raman em fígado de camundongos *Swiss* infectados por
*Paracoccidioides brasiliensis***

Correlação entre a análise histopatológica e por espectroscopia FT- Raman em fígado de camundongos *Swiss* infectados por *Paracoccidioides brasiliensis*

Elaine Sciuniti Benites Mansano^a, Terezinha Inez Estivalet Svidzinski^c, Francielle Sato^b, Gutierrez Rodriguês de Moraes^b, Edilaine Martins Moratto^a, Luzmarina Hernandez^a

^a Departamento de Ciências Morfológicas, Laboratório de Histologia e Histotécnica Animal. Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.

^b Departamento de Física, Laboratório de Estudo de Fenômenos Fototérmicos. Centro de Ciências Exatas. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.

^c Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Laboratório de Micologia Médica. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.

Email: Elaine Sciuniti Benites Mansano- elaineamgi@gmail.com;
Terezinha Inez Estivalet Svidzinski - terezinha.svidzinski@gmail.com;
Francielle Sato - fransatou@gmail.com;
Gutierrez Rodriguês de Moraes - gutierrez_morais@hotmail.com;
Edilaine Martins Moratto - edilainemm@gmail.com;
Luzmarina Hernandez - luzhernandes@gmail.com

Autor para correspondência:

Dra Luzmarina Hernandez: luzhernandes@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá

Departamento de Ciências Morfológicas

Bloco H79 - Sala 108

Avenida Colombo 5790 - CEP: 87020-900

Maringá – Paraná – Brasil

RESUMO

Introdução: A paracoccidioidomicose é uma doença sistêmica causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, cuja ocorrência é limitada à América Latina. A principal porta de entrada são as vias aéreas. Sua instalação ocorre primeiramente no pulmão, porém, na forma disseminada, qualquer órgão pode ser afetado. O fígado é um dos órgãos acometidos por esta enfermidade que pode desequilibrar a homeostase do órgão. O objetivo deste trabalho foi avaliar a evolução morfológica da paracoccidioidomicose hepática em camundongos *Swiss* e correlacionar a morfologia com a expressão de gp43 e com a análise físico-química via FT-Raman do órgão infectado.

Resultados: De acordo com a contagem de unidades formadoras de colônias e de granulomas a primeira e segunda semanas foram os períodos de maior infecção. A resposta tecidual se caracterizou pelo desenvolvimento de granulomas organizados e também uma infecção de caráter generalizado com leveduras localizadas no interior de macrófagos e hepatócitos isolados. A expressão de gp43 teve uma distribuição difusa pelo parênquima hepático e similar em todos os períodos observados. As principais alterações físico-químicas foram detectadas no intervalo espectral de 1750 – 1560 cm^{-1} onde houve deslocamento do pico relacionado com ao radical $-\text{NH}_3$ e mudança na simetria do estiramento da molécula de $-\text{CH}_3$, observada no intervalo entre 3030 - 2820 cm^{-1} .

Conclusões: Ao longo do tempo houve uma relação diretamente proporcional entre o número de unidades formadoras de colônias, o número de granulomas e as alterações físico-químicas no fígado infectado por *Paracoccidioides brasiliensis*. A expressão de gp43 foi semelhante em todos os períodos observados.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*, histopatologia, fígado, gp43, espectroscopia FT- Raman.

INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM), causada por *Paracoccidioides spp.* é uma doença endêmica em áreas úmidas, tropicais e subtropicais da América Latina onde é considerada uma das micoses mais importantes, representando a oitava causa de mortalidade por doença infecciosa crônica entre as doenças infecciosas e parasitárias e sendo, dentre as micoses sistêmicas, aquela que apresenta maior taxa de mortalidade [1, 2]. Apresenta caráter granulomatoso e progressão insidiosa, de grande relevância médica, pois acomete as pessoas em sua fase produtiva, incapacitando-as e deixando sequelas [3, 4].

O *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), é o principal agente da PCM. É um fungo termodimórfico que muda sua forma de acordo com a temperatura: apresenta-se como micélio a 25° e como levedura a 36°C [5]. A infecção é causada pela inalação de propágulos do micélio, que podem penetrar ativamente na superfície muco-cutânea e parasitar células epiteliais onde se convertem para a forma leveduriforme [6]. Nesta forma podem se disseminar pelo corpo do hospedeiro e parasitar os tecidos mais profundos [7, 6]. A ocorrência de leveduras no interior de polimorfonucleares (PMNs), monócitos e de macrófagos, mostra que este microrganismo é capaz de sobreviver dentro dessas células [8].

O principal componente antigênico do Pb é uma glicoproteína de 43 KDa chamada gp43 [9], que é sintetizada e transportada para a sua parede celular e posteriormente é secretada no meio [10]. A gp43 participa na aderência, invasão e patogenia do fungo [11] inibindo a atividade fungicida de macrófagos, e contribuindo para o desenvolvimento da infecção em hospedeiros susceptíveis [12]. A gp43 é o principal antígeno de diagnóstico e prognóstico da PCM [13].

Uma nova perspectiva de diagnóstico da PCM pode ser vislumbrada pela Espectroscopia Raman com Transformada de Fourier (FT-Raman). Esta técnica permite caracterizar alguns componentes moleculares e detectar, por meio da intensidade das bandas de espalhamento Raman, as deformações estruturais decorrentes das infecções [14]. Este método pode agilizar o diagnóstico da doença e representar um avanço nas investigações da PCM experimental.

O principal órgão afetado pela PCM é o pulmão, entretanto também há comprometimento de outros órgãos como o tecido ósseo, pele, mucosa e órgãos linfóides [2, 15]. O fígado também pode ser acometido por esta enfermidade e, alguns estudos mostram que as enzimas hepáticas apresentam-se alteradas na PCM [16, 17] indicando que a infecção pode desequilibrar a homeostase do órgão propiciando a instalação do fungo. Não há estudos por espectroscopia FT-Raman do fígado infectado com Pb.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a evolução morfológica da paracoccidiodomicose hepática em camundongos *Swiss*, correlacionar com a expressão de gp43 e com a análise físico-química via FT-Raman do órgão infectado.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolado Fúngico

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

Experimentação Animal

Todos os procedimentos envolvendo o uso de animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM) sob parecer 116/2010.

Foram utilizados 32 camundongos machos da linhagem *Swiss* e com peso médio de 30 gramas. Com a idade entre 4 e 5 semanas os animais foram transferidos do Biotério Central de Animais da UEM para o Laboratório de Experimentação em Paracoccidiodomicose do Departamento de Ciências Básicas da Saúde da UEM. Os animais foram mantidos em condições ambientais controladas, com uma temperatura de 23 a 24°C e um ciclo claro/escuro de 12 horas, com livre acesso à água e alimento.

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

Os camundongos foram distribuídos em quatro grupos de oito animais, dos quais seis foram infectados e dois foram usados como controle. Os animais foram anestesiados pela administração intramuscular de uma solução contendo 100mg/Kg de cloridrato de cetamina (Park, Davis & Company, Berlim, Alemanha) e 10mg/Kg de xilazina (Bayer, Brasil) [18]. Após a anestesia, os animais foram infectados, por meio da veia caudal lateral, com 0,1 mL de suspensão fúngica, contendo 2×10^6 células leveduriformes de Pb18 por mililitro UFC/ml. Os animais controle receberam 0,1 ml de tampão fosfato de sódio (PBS- *phosphate buffer sodium*), pH 7,4, pela mesma via.

Morte dos animais

Os animais, infectados e controles, foram mortos 1, 2, 4 e 8 semanas após a inoculação, com uma sobredose (3 vezes maior que a dose usual de 40 mg/ Kg) de tiopental sódico (Cristal Pharma, Minas Gerais, Brasil) na veia caudal lateral. Após a remoção do fígado, o lobo direito foi isolado e fixado em solução de paraformoldeído 4% por 24 horas e processado para inclusão em parafina. Foram feitos cortes semi-seriados de 5 μ m de espessura. Alguns fragmentos do lobo esquerdo do fígado foram pesados, colocados em tubos de ensaio de estéril, com 1 ml de PBS, e macerados com auxílio de pistilo até a obtenção de uma suspensão homogênea. Essa suspensão foi utilizada para a contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFCs). O restante do lobo esquerdo foi empregado para estudo espectroscópico por FT-Raman.

Determinação de UFCs/g do tecido hepático

Um volume de 300 μ l da suspensão de fígado infectado com Pb foi colocados em placas de Petri contendo *brain heart infusion (BHI) agar médium* (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) suplementado com soro fetal bovino 5% e fator de crescimento [19]. As placas foram incubadas a 35°C por 15 dias. As contagens de UFCs/g foram realizadas no sétimo e décimo quinto dias de incubação, e o \log_{10} das UFCs/g foram calculados.

Estudo histológico e imunohistoquímico do fígado dos camundongos

As lâminas foram coradas com (a) hematoxilina e eosina (H&E) e (b) ácido periódico de *Schiff* (PAS) para avaliação histopatológica e com (c) *sirius red* pela técnica de picrosirius para avaliar a ocorrência ou não de fibrose; (d) foram

impregnadas pela prata segundo Gomori-Grocott e contra-coradas com verde luz ou H&E, para localizar as leveduras no parênquima hepático e (e) imunocoradas com anticorpo anti-gp43 para detectar a expressão da glicoproteína gp43.

A expressão de gp43 no fígado foi detectada pelo método de coloração imunohistoquímico avidina biotina peroxidase, utilizando o anticorpo primário policlonal, anti-gp43 na concentração de 1:50, extraído dos coelhos e um *kit* comercial de imunohistoquímica (Histostain®-Plus Kits, Invitrogen® 2nd Generation, LAB-AS Detection System, Camarilo CA). O anticorpo primário anti gp43 foi obtido pelo laboratório de Micologia Médica do Departamento de Análises Clínicas da UEM.

As lâminas foram observadas e fotografadas em fotomicroscópio trinocular Nikon Eclipse 80i, com câmera Nikon (DSFi1C), acoplado a um computador, utilizando o software Nis-Element (Tóquio, Japão).

Contagem de granulomas

A contagem de granulomas foi realizada em cortes histológicos corados com H&E. Foram contados os granulomas presentes em 4 cortes histológicos/animal (24 cortes/semana de infecção). As contagens foram feitas em microscópio óptico, Nikon Eclipse 80i, com câmera Nikon (DSFi1C), utilizando objetiva de 20X. Para determinar a área aproximada na qual as contagens foram realizadas, um corte histológico do fígado de cada animal foi digitalizado e sua área determinada usando um programa de análise de imagem (Image Pro Plus, versão 4.5, Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Foi calculada a área média de $15,25\text{mm}^2 \pm 0,85$ e usada como um padrão para a área na qual os granulomas foram contados. O número de granulomas foi, portanto, expressos em número de granulomas/ $15,25\text{mm}^2$.

Espectroscopia Raman por transformada de Fourier (FT-Raman)

A análise foi realizada em um espectrômetro FT-IR acoplado ao módulo RAM II marca Bruker® (Alemanha), modelo Vertex 70V, equipado com uma fonte de excitação laser de Nd:YAG em 1064 nm e um detector de Germânio refrigerado à nitrogênio líquido. A potência utilizada foi de 70 mW. Foram analisadas amostras de fígado com aproximadamente 1cm^2 de área superficial. Os espectros obtidos para cada amostra correspondem a média de 400 varreduras, com resolução espectral de 4cm^{-1} .

Análise estatística

Foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) para avaliar o número de UFCs/g e de granulomas em *software* GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA). O pós-teste de Tukey foi utilizado com um nível de 95 % de confiança.

RESULTADOS

1. Contagem das Unidades Formadoras de Colônia- UFCs

Os resultados das contagens das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs), no fígado são demonstrados na Figura 1.

2. Contagem de granulomas

Os resultados da contagem de granulomas estão representados na Figura 2. As lesões granulomatosas foram diminuindo ao longo do período experimental.

3. Estudo histopatológico

Nas primeiras semanas de observação, a formação de granulomas foi uma das alterações mais evidentes do parênquima hepático dos camundongos infectados.

Na primeira semana (Figura 3) as lesões granulomatosas ocorreram predominantemente na periferia do órgão. Aparecem como estruturas bem definidas constituídas por agregados de histiócitos, macrófagos, plasmócitos, linfócitos e neutrófilos. Neste período as leveduras foram evidentes com sua morfologia característica, no interior dos granulomas, sendo visualizadas apenas com a coloração de Gomori-Grocott. Macrófagos isolados e hepatócitos eventualmente apresentaram impregnação pela prata. Outras alterações histopatológicas como a presença de mitoses e eosinofilia citoplasmática dos hepatócitos foram observadas na primeira semana de infecção, período em que ocorreu o maior número de UFCs ($2,05 \text{ UFCs} \log_{10}$) (Figura 1).

Na 2ª semana (Figura 4) a infecção hepática apresentou dois padrões: (1) áreas com aspecto normal, exceto pela presença de granulomas maiores e mais organizados, contendo leveduras, e (2) outras áreas com infecção difusa, sem limites nítidos onde o

parênquima hepático apresentava áreas em necrose, com acidofilia citoplasmática, picnose e cromatólise nuclear. Nessas regiões as leveduras apareciam isoladas, íntegras ou fragmentadas no interior de hepatócitos. Fragmentos impregnados pela prata foram identificados no interior de macrófagos. Em 100% das amostras analisadas foram identificadas leveduras com ou sem brotamentos.

A quarta e oitava semanas (Figura 5) apresentaram características semelhantes às descritas para as semanas anteriores, entretanto houve uma redução na frequência de granulomas e na extensão de lesões no parênquima. Na quarta semana as lesões granulomatosas foram observadas em apenas 77% dos animais e na oitava em 50% dos animais. A oitava semana foi representada pela menor contagem de UFCs.

Com a técnica de picro sirius notou-se um aumento ao longo do tempo na quantidade de fibras colágenas presentes próximas aos capilares sinusóides, entre os cordões de hepatócitos (Figura 6).

A gp43 apresentou expressão nuclear e citoplasmática nos hepatócitos, com extensas áreas marcadas por todo o parênquima hepático; raramente foram vistas leveduras marcadas. A marcação foi similar em todos os períodos observados (Figura 7).

4. Análise físico-química por Espectroscopia Raman com Transformada de Fourier

Nossos resultados demonstram que existem diferenças espectrais no fígado de camundongos infectados por *Paracoccidioides brasiliensis* comparados com fígado de camundongos normais (Figura 8). O intervalo espectral entre 1750 e 1500 cm^{-1} apresentou diferenças entre as amostras de fígado controle em relação com as infectadas. Houve deslocamento nos picos centrados em 1606 e 1560 cm^{-1} , em função do tempo nos fígados infectados (Figura 9).

A tabela 1 apresenta os números de onda obtidos por FT-Raman e os radicais químicos aos quais estão associados.

Comparado com o fígado controle, sem a presença do fungo, observa-se um deslocamento nos picos centrados em 1606 e 1560 cm^{-1} , (Figura 9) em direção a menores frequências, conforme o aumento do período de infecção. Estes picos estão correlacionados ao grupo $-\text{NH}_3^+$ [20].

Outro fato relevante é a mudança de simetria do estiramento C-H na região de 3030-2820 cm^{-1} . Nos picos centrados em 2875 cm^{-1} , $-\text{CH}_3$ simétrico, e em 2930, $-\text{CH}_3$

assimétrico, há uma troca de simetria em função do tempo de infecção, se comparados ao fígado sem a presença do fungo (Figura 10). Para esta análise foram feitas razões entre os picos 2875/2930 cm^{-1} . Este resultado está em concordância com aquele observado na contagem das UFCs. Os demais picos foram analisados da mesma maneira e apresentaram comportamento constante.

DISCUSSÃO

Neste trabalho as técnicas de FT-Raman e as colorações histológicas foram empregadas para demonstrar o comportamento morfológico e físico-químico do fígado frente à infecção por *Paracoccidioides brasiliensis*. A expressão temporal do principal antígeno produzido por Pb, a gp43, foi avaliada.

O fígado não é o órgão preferencial da paracoccidioidomicose, mas a partir do foco pulmonar, o fungo se dissemina por via linfática e hematogênica para outras regiões do organismo como pele, mucosas, linfonodos, fígado, baço, ossos, suprarrenais, intestino e sistema nervoso central [21, 22, 23, 2, 24]. Em comparação com os estudos em pulmão, há poucos trabalhos clínicos ou experimentais relatando a paracoccidioidomicose hepática. A hepatoesplenomegalia, icterícia e fibrose são algumas das alterações patológicas descritas em pacientes infectados com Pb [25, 26, 27].

Neste estudo a via de infecção endovenosa e o inóculo preparado a partir da cepa de Pb18, uma das formas mais virulentas de Pb parecem ter favorecido a disseminação e a instalação do fungo no fígado. A infecção foi constatada pela análise das UFCs, onde o crescimento fúngico foi avaliado.

O estudo histopatológico utilizando cortes sequenciais corados com técnicas distintas permitiu vislumbrar, por diferentes perspectivas, a relação parasita-hospedeiro e a morfologia do órgão infectado. Com as técnicas de hematoxilina e eosina e PAS foram identificados os granulomas contendo formas leveduriformes de Pb com halo claro e região central acidófila. Com a impregnação pela prata (técnica de Gomori-Grocott) o infiltrado inflamatório do granuloma não pode ser visto, mas a localização das leveduras em seu interior [28] e no parênquima hepático foram identificados.

No fígado corado com Gomori-Grocott, as estruturas impregnadas pela prata se localizaram internalizadas em células localizadas predominantemente na periferia do

órgão, próximo ao peritônio visceral. Estas células foram identificadas como macrófagos, em virtude de sua forma irregular e posição variável, sugerindo que ou essas células fagocitaram leveduras para matá-las ou eram leveduras residentes nestes macrófagos. Muitos hepatócitos também apresentaram estruturas intracitoplasmáticas pequenas impregnadas pela prata sugestivas de micro leveduras internalizadas.

O modo como o Pb pode se disseminar para os órgãos, ainda não é bem conhecida. Uma das formas seria pela migração de macrófagos infectados ou de células dendríticas, através do sistema linfático [29,30]. As leveduras já foram encontradas intracelularmente em polimorfonucleares (PMNs) e em monócitos e macrófagos, sugerindo que o fungo é capaz de sobreviver dentro dessas células [8, 31], podendo assim, permanecer incógnito às defesas imunes do hospedeiro, por não expor o seu antígeno na superfície celular, escapando dos fagócitos profissionais e facilitando assim sua disseminação [32].

Em nosso estudo o número dos fungos nas lesões foram diminuindo nos períodos tardios da infecção, e os granulomas formados nas primeiras semanas representaram um mecanismo de defesa inicial contra o Pb, comprometendo a multiplicação e disseminação das leveduras. É possível que a arquitetura mais compactada do fígado, com menos espaços livres, possa ter dificultado o estabelecimento e a disseminação do fungo pelo parênquima, em comparação com o pulmão, que possui amplos espaços [28].

Por outro lado, é possível que os camundongos tenham desenvolvido a forma hiperérgica da doença, com resposta imune do tipo celular, e formando granulomas com poucos fungos, sugerindo que estes animais tem grande resistência imunológica. Outros autores demonstraram que os camundongos *Swiss* são bastante resistentes a infecção por Pb [33,34,35].

A formação de granuloma em modelos experimentais e também nos seres humanos depende de vários fatores como susceptibilidade ou resistência á infecção [36]. O desenvolvimento da doença depende de fatores relacionados ao fungo, como sua virulência, composição antigênica, das condições ambientais e dos fatores referentes ao hospedeiro, inerentes à sua resposta imunológica [37].

Em estudo anterior, utilizando a mesma espécie murina, avaliamos a evolução morfológica dos granulomas [28] ao longo de 1, 2, 4 e 8 semanas de infecção em pulmão infectado por Pb18. Ao longo do tempo, os granulomas tornaram-se mais numerosos, maiores, mais organizados e com quantidades crescentes de fibras colágenas e

reticulares [28]. Ao contrário, no fígado, o número de granulomas foi maior nas duas primeiras semanas de infecção, declinando significativamente na oitava. Os granulomas se tornaram menores ao longo do tempo e por meio da coloração com *Sirius red* constatou-se que não houve desenvolvimento de fibrose importante.

Pela primeira vez, a expressão de gp43 foi avaliada por imunohistoquímica no fígado infectado por *Pb*. A glicoproteína gp43 é o principal componente antigênico de diagnóstico do *Paracoccidioides brasiliensis* [9]. A imunocoloração de gp43 no fígado foi predominantemente difusa, com expressão nuclear e citoplasmática e em algumas formas leveduriformes intactas e fragmentadas. Não foi observada diferença de marcação ao longo do período experimental, sendo a marcação similar em todas as semanas de infecção.

A gp43 pode ser sintetizada e armazenada dentro de vesículas densas que parecem migrar para a borda externa da parede celular do fungo sendo excretadas extracelularmente. São observadas no citoplasma de macrófagos e em toda a parede das células fúngicas e das células do hospedeiro, e de forma dispersa [38, 32].

Outra forma de diagnóstico empregada neste estudo foi a avaliação físico-química por FT-Raman. A espectroscopia Raman é um método que, associado à análise histopatológica pode auxiliar em diagnósticos, e tem sido mais comumente empregada em casos de células e tecidos tumorais [39, 40, 41, 42]. Fornece informações detalhadas sobre a composição biomolecular de tecidos, permitindo distinguir tecidos normais de tecidos doentes [14]. Não há na literatura relatos de análises espectrais em fígado de camundongos *Swiss* infectados por *Pb*.

As análises de FT-Raman mostram uma possível mudança estrutural no fígado devido à presença dos fungos. Neste trabalho detectamos o deslocamento nos picos centrados em 1606 e 1560 cm^{-1} (Figura 9) em direção a menores frequências, nos fígados infectados, conforme o aumento do período de infecção. O deslocamento em uma banda num espectro de infravermelho pode representar a mudança da massa efetiva da ligação entre dois átomos que vibram numa determinada frequência. De forma simplificada, isso quer dizer que em condições normais dois átomos (X e Y) ligados apresentam uma determinada frequência de vibração. Quando um terceiro átomo ou radical (Z) se liga a um dos dois primeiros, ocorre uma mudança na configuração da molécula modificando o modo de vibração, e assim podendo causar um deslocamento no espectro. Assim a frequência de vibração dessa nova configuração estará nas

proximidades da frequência característica dos dois átomos X e Y ligados. Nos órgãos não infectados não foram detectados deslocamentos.

Os picos que sofreram deslocamento estão correlacionados ao grupo $-\text{NH}_3^+$ [20], grupo característico dos aminoácidos. Mudanças estruturais em 1585 e 1610 cm^{-1} foram correlacionadas com os aminoácidos fenilalanina e arginina, em análise do fígado [43].

Os resultados obtidos com a espectroscopia FT-Raman nos sugerem que as principais moléculas afetadas pela infecção por Pb são de natureza protéica.

Na PCM diversas alterações implicam um envolvimento com componentes protéicos, uma vez que o Pb produz diversas proteínas e enzimas que favorecem a sua adesão [44, 45, 46, 3,47, 6] e por outro lado, o hospedeiro produz proteínas relacionadas com o processo infeccioso [48].

Outro fato relevante é a mudança de simetria do estiramento C-H na região de $3030\text{-}2820\text{ cm}^{-1}$. Para as amostras de fígado infectadas nos picos centrados em 2875 cm^{-1} , $-\text{CH}_3$ simétrico, e em 2930 , $-\text{CH}_3$ assimétrico, houve uma troca de simetria em função do tempo de infecção (Figura 10).

Para esta análise foram feitas razões entre os picos $2875/2930\text{ cm}^{-1}$ que resultaram em uma curva que pode ser comparada àquela obtida pelas análises das UFCs. Na oitava semana houve a menor contagem de UFCs e a razão entre os picos $2875/2930\text{ cm}^{-1}$ foi semelhante ao grupo controle. Na 1^a, 2^a e 4^a semanas as razões decresceram, em comparação com o controle, demonstrando que estes foram os períodos em que houve maior alteração entre as moléculas orgânicas no fígado. Os demais picos foram analisados da mesma maneira e apresentaram comportamento constante.

Concluimos que houve uma relação diretamente proporcional entre o número de UFCs, o número de granulomas e as alterações físico-químicas no fígado infectado por *Paracoccidioides brasiliensis*, ou seja: (a) os períodos de maior infecção hepática foram as duas primeiras semanas, quando houve também o maior número de granulomas e de UFCs; (b) os períodos de maiores alterações moleculares e histopatológicas também corresponderam aos períodos de maior infecção;

A paracoccidioidomicose provocou necrose hepática em algumas áreas infectadas;

Não foi possível correlacionar a expressão de gp43 com as alterações físico-químicas e morfológicas uma vez que a expressão foi semelhante em todos os períodos estudados.

REFERÊNCIAS

1. Coutinho ZF, Da Silva D, Lazéra M, Petri V, De Oliveira RM, Sabroza PC, Wanke B. **Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1990 – 1995)**. Cad Saúde Pública, Rio de Janeiro 2002, **18**(5): 1441-1454.
2. Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho FQ, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML e grupo de consultores do consenso de paracoccidioidomicose. **Consenso em paracoccidioidomicose – Relatório Técnico**. Rev Soc Bras Med Trop 2006, **39** (3): 297-310.
3. Pereira LA, Bão SN, Barbosa MS, Da Silva JLM, Felipe MSS, De Santana JM, Mendes-Giannini MJS, Soares C M. de A. **Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function**. Federation of European Microbiological Societies 2007, **7**: 1381-1388.
4. Wanke B, Aidê MA. **Chapter 6 – Paracoccidioidomycosis**. Continuing Education Course – Mycoses. J Bras Pneumol 2009, **35**(12):1245-1249.
5. Nemecek JC, Wüthrich M, Klein BS. **Global control of dimorphism and virulence in fungi**. Science 2006, **312**:583-588.
6. 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): 4040-4050.
7. Pereira M, Bailão AM, Parente JA, 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, Rio de Janeiro 2009, **104**(3): 486-491.
8. Acorci MJ, Dias-Melicio LA, Golim MA, Bordon-Graciani AP, Peraçoli MTS, Soares ÂMVC. **Inhibition of human neutrophil apoptosis by**

- Paracoccidioides brasiliensis*: Role of interleukin-8.** Scandinavian Journal of Immunology 2008, **69**:73 -79.
9. Costa PF, Fernandes GF, Dos Santos PO, Amaral CC, Camargo ZP. **Characteristics of Environmental *Paracoccidioides brasiliensis* Isolates.** Mycopathologia 2010, **169**:37-46.
 10. Nimrichter L, Rodrigues ML, Rodrigues EG, Travassos LR. **The multitude of targets for the immune system and drug therapy in the fungal cell wall.** Microbes and Infection 2005, **7**: 789- 798.
 11. Vargas J, Vargas R. **Actualizaciones Paracoccidioidomicosis.** Rev. de Enfermedades Infecciosas y Tropicales, Enero 2009, **1**(1): 49-56.
 12. Popi A. F.; Lopes J. D.; Mariano M. **GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus.** Cellular Immunology 2002, **218**:87-94.
 13. Rocha AA, Morais FV, Puccia R. **Polymorphism in the flanking regions of the PbGp43 gene from the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: search for protein binding sequences and poly (A) cleavage sites.** BMC Microbiology 2009, **9**:277.
 14. Lorincz AL, Haddad D, Naik R, Fung A, Cao A, Manda P, Pandya A, Auner G, Rabah R, Langenburg SE, Klein MD. **Raman spectroscopy for neoplastic tissue differentiation: A piloto study.** Journal of Pediatric Surgery 2004, **39**(6): 953-956.
 15. Matos WB, Dos Santos GMC, Silva VEB, Gonçalves EGR, Silva AR. **Paracoccidioidomycosis in the State of Maranhão, Brazil: geographical and clinical aspects.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2012, **45**(3): 385-389.
 16. Nogueira MGS, Andrade GMQ, Tonelli E, Diniz SN, Goes AM, Cisalpino OS. **Laboratory evolutive aspects of children under paracoccidioidomycosis treatment.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2006, **39**(5): 478-483.
 17. Takahachi G, Maluf MLF, Svidzinski TIE, Akimoto-Günther LS, Hübler MRNO, Bersani-Amado CA, Cuman RKN. **Biochemical responses in mice experimentally infected with *Paracoccidioides brasiliensis* and treated with Canova.** Brazilian Archives of Biology and Technology 2006, **49**(6): 897-903.

18. Green CJ, Knight J, Precious S, Simpkin S. **Ketamine alone and combined with diazepam or xylazine in laboratory animals: a 10 year experience.** *Laboratory Animals* 1981, **5**: 163–170.
19. Restrepo, A, Jiménez B. **Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium.** *Journal of Clinical Microbiology* 1980, **12** (2): 279- 81.
20. Socrates G, Willey J, Sons LTD. **Infrared and Raman characteristic group frequencies - Tables and Charts.** Third edition, Chichester, 2001:329-332.
21. Singer-Vermes LM, Burger E, Calich VLG, Modesto-Xavier LH, Sakamoto TN, Sugizaki MF, Meira DA, Mendes RP. **Pathogenicity of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in the human disease and in an experimental murine model.** *Clin Exp Immunol* 1994, **97**:113-119.
22. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. **Paracoccidioidomycosis: an Update.** *Clinical Microbiology Reviews* 1993, **6**(2): 89-117.
23. Borges-Walmsley MI, Chen D, Shu X, Walmsley A. **The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*.** *Trends in Microbiology* 2002, **10**(2): 80-87.
24. Bertini S, Colombo AL, Takahashi HK, Straus AH. **Expression of antibodies directed to *Paracoccidioides brasiliensis* glycosphingolipids during the course of Paracoccidioidomycosis treatment.** *Clinical and Vaccine Immunology* 2007, **14**(2): 150- 156.
25. Barbosa W, Daher R, Oliveira AR. **Forma linfático-abdominal da *Blastomicose Sul-Americana*.** *Rev Inst Med trop São Paulo* 1968, **10**(1): 16-27.
26. Brito T, Castro RM, Shiroma M. **Biopsia hepática na Blastomicose Sul-Americana.** *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1968, **10**(3): 188-191.
27. Berni ADM, Júnior EE, Filho AA, Paniago AMM. **Protein-losing enteropathy in paracoccidioidomycosis identified by scintigraphy: report of three cases.** *Braz J Infect Dis* 2010, **14**(5): 540-543.
28. Da Silva FC, Svidzinski TIE, Patussi EV, Cardoso CP, Dalalio MM de O, Hernandez L. **Morphologic organization of pulmonary granulomas in mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*.** *Am J Trop Med Hyg* 2009, **80**(5): 798-804.
29. Restrepo A, Tobon A. ***Paracoccidioides brasiliensis*. In: Principles and Practice of Infectious Diseases.** 5(eds GL Mandell, JE Bennert, R Dolin), London: Churchill Livingstone. 5th edn, 2005 pp.3062-3068.

30. González A, Lenzi HL, Motta EM, Caputo L, Restrepo A, Cano LE. **Expression and arrangement of extracellular matrix proteins in the lungs of mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia.** Int J Exp Path 2008, **89**: 106-116.
31. Mendes-Giannini MJS, Taylor ML, Bouchara JB, Burger E, Calich VLG, 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- 123.
32. Hanna SA, Silva JLM, Mendes-Giannini MJS. **Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in vero cells.** Microbes and Infection 2000, **2**: 887-884.
33. Defaveri J, Rezkallah-Iwasso MT, Franco MF. **Experimental pulmonar paracoccidioidomycosis in mice: Morphology and correlation of lesion with humoral and cellular immune response.** Mycopathologia 1982, **77**:3-11.
34. Defaveri J, Martin LC, Franco M. **Histological and ultrastructural study of the inflammation evoked by *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in previously immunized mice.** Mycopathologia 1989, **105**: 53-58.
35. Defaveri J, Rezkallah-Iwasso MT, Franco M. **Pulmonary paracoccidioidomycosis in immunized mice.** Mycopathologia 1992, **119**: 1-9.
36. Fortes RM, Kipnis A, Junqueira-Kipnis AP. ***Paracoccidioides brasiliensis* pancreatic destruction in *Calomys callosus* experimentally infected.** BMC Microbiology 2009, **9**:84.
37. Fortes MRP, Kurokawa CS, Marques AS, Miot HA, Marques MEA. **Immunology of paracoccidioidomycosis.** An Bras Dermatol 2011, **86**(3): 516-525.
38. Sandoval Marina Penteado. **Distribuição de antígenos em biópsias de pele e mucosa na paracoccidioidomicose humana.** Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 1996, **38** (4): 311-311.
39. Hawi SR, Campbell WB, Kajdacsy-Balla A, Murphy R, Adar F, Nithipatikom K. **Characterization of normal and malignant human hepatocytes by Raman microspectroscopy.** Cancer Lett 1996, **110**(1-2): 35-40.

40. Malini R, Venkatakrishna K, Kurien J, Pai KM, Rao L, Kartha VB, Krishna CM. **Discrimination of normal, inflammatory, premalignant, and malignant oral tissue: A Raman spectroscopy study.** Biopolymers 2006, **81**(3): 179- 193.
41. De Oliveira AF, Santos ID de AO, Cartaxo SB, Bitar RA, Simões MM, Enokibara S, Martinho H da S, Martin AA, Ferreira LM. **Differential diagnosis in primary and metastatic cutaneous melanoma by FT-Raman spectroscopy** 2010, Acta Cirúrgica Brasileira **25**(5):434-439.
42. Oshima Y, Shinzawa H, Takenaka T, Furihata C, Sato H. **Discrimination analysis of human lung cancer cells associated with histological type and malignancy using Raman spectroscopy.** Journal of Biomedical Optics 2010, **15**(1): 017009.
43. Yue KT, Yang JP, Martin CL, Sloan DL, Callender RH. **Raman spectroscopy of liver alcohol dehydrogenase.** Biochemical and biophysical research communication 1984, **122**(1): 225- 229.
44. Andreotti PF, Silva JLM, Bailão AM, Soares CMA, Benard G, Soares CP, Mendes-Giannini MJS. **Isolation and characterization of a 30 KDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*.** Microbes and Infection 2005, **7**:875-881.
45. González A, Gómez BL, Diez S, Hernández O, Restrepo A, Hamilton AJ, Cano EL. **Purification and parcial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* protein with to bind to extracelular matrix proteins.** Infection and Immunity 2005, **73**(4): 2486-2495.
46. Barbosa MS, Bão SN, Andreotti PF, De Faria FP, Felipe MSS, Feitosa LS, Mendes - Giannini MJS, Soares CMA. **Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells.** Infection and Immunity 2006; **74**(1): 382- 389.
47. Neto BR. da S, Da Silva J de F, Mendes-Giannini MJS, Lenzi HL, Soares CM de A, Pereira M. **The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a linked surface protein that behaves as an anchorless adhesion.** BMC Microbiology 2009; **9**(272): 1-12.
48. Popi AF, Godoy LC, Xander P, Lopes JD, Mariano M. **B-1 cells facilitate *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice via IL-10 secretion.** Microbes Infect 2008; **10**: 817-824.

49. Notingher I, Verrier S, Haque S, Polak JM, Hench LL. **Spectroscopic study of human lung epithelial cells (A549) in culture: Living cells versus dead cells.** *Biopolymers (Biospectroscopy)* 2003, **72**: 230–240.

CAPÍTULO III

PERSPECTIVAS FUTURAS

Diante dos nossos resultados a fim de melhor elucidar a interação do *Paracoccidioides brasiliensis* em tecidos do hospedeiro, sugere-se seguir o estudo com o mesmo padrão experimental, com a cepa Pb18 ao longo do tempo de 1, 2, 4 e 8 semanas, com o intuito de se definir a localização celular do Pb no pulmão, fígado, baço e timo e correlacionar as possíveis alterações histológicas com alterações ultra estruturais por microscopia eletrônica de transmissão e de varredura.

E outras propostas podem ser avaliadas bem como;

- 1 - Utilizar um modelo de infecção nas fases iniciais e analisar as alterações histopatológicas por um período de dias (1, 3 e 6 dias).
- 2 – Utilizar marcadores imunohistoquímicos para inflamação, morte celular e marcadores de enzimas envolvidas na adesão do Pb como a enolase.
- 3 – Identificar as características da cepa de Pb18 por espectroscopia FT-Raman.
- 4 – Comparar o pulmão, fígado e baço infectados por Pb, pela espectroscopia FT-Raman

APÊNDICES

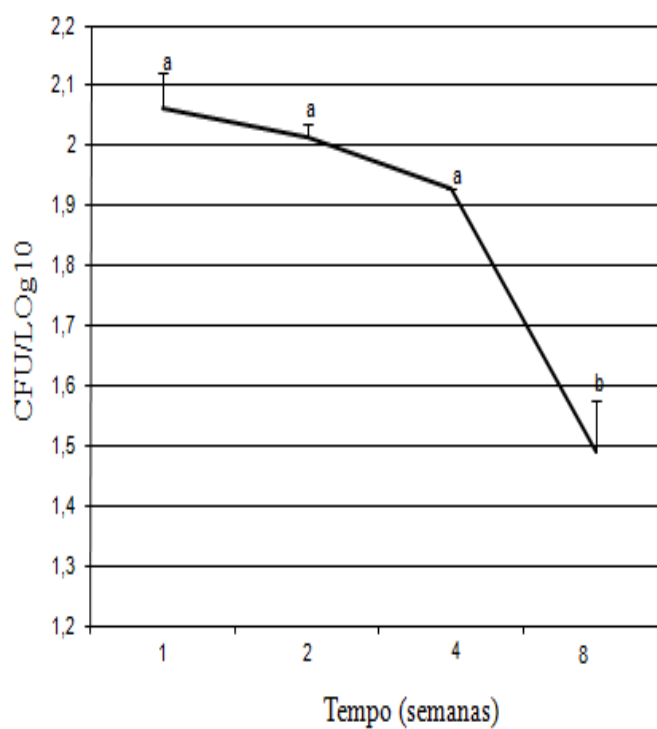


Figura 1: Número de Unidades Formadoras de Colônia (UFCs)/g no fígado infectado com *Paracoccidioides brasiliensis*. Resultados expressos como Log₁₀; n=6 Resultados expressos como a média ± EPM. Letras diferentes representam P<0, 001. ANOVA, pós-teste de Tukey.

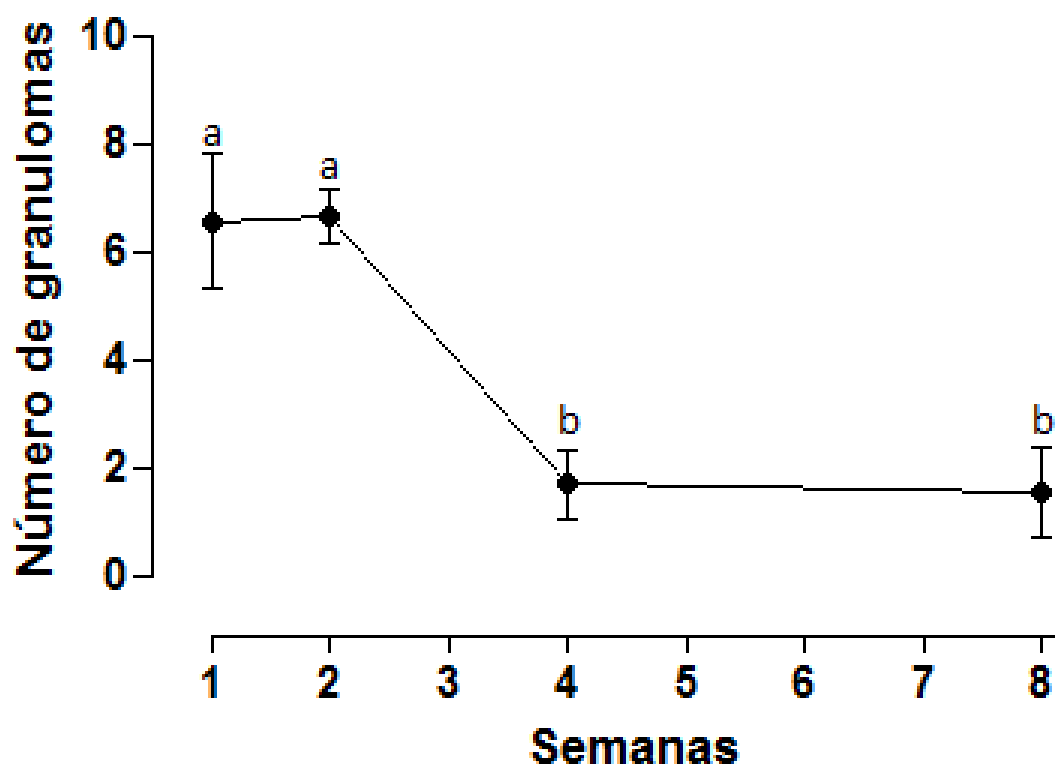


Figura 2: Número de granulomas por semana de infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* no fígado. Resultados expressos durante o período experimental. Resultados expressos como a média \pm EPM. Letras diferentes representam $P < 0,05$. ANOVA, pós-teste de Tukey.

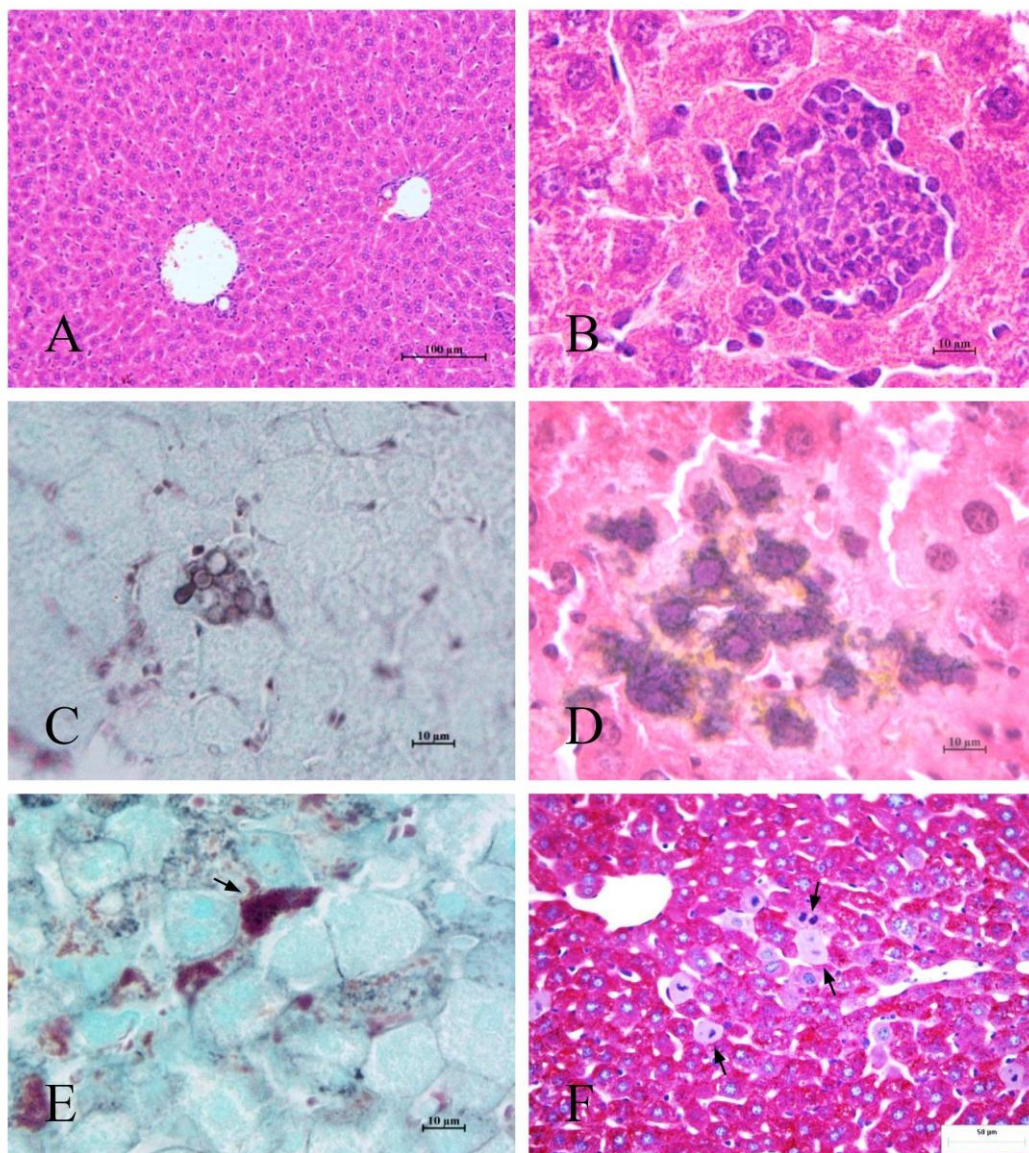


Figura 3: Fotomicrografia do fígado controle (A) e com uma semana de infecção com *Paracoccidioides brasiliensis* (B-F). Na primeira semana as leveduras não foram visualizadas no interior dos granulomas corados com H&E (B) mas foram identificadas, com brotamentos e formas variadas, em cortes corados com Gomori-Grocott (C); em (D) observar presença de fragmentos fúngicos impregnados pela prata no interior de hepatócitos e de (E) macrófagos (seta); (F) neste período um grande número de mitoses (seta) foram observadas no parênquima hepático. Coloração com hematoxilina e eosina (A e B); Gomori-Grocott contracorado com verde luz (C e E) ou H&E (D); ácido periódico de Schiff (PAS) (F).

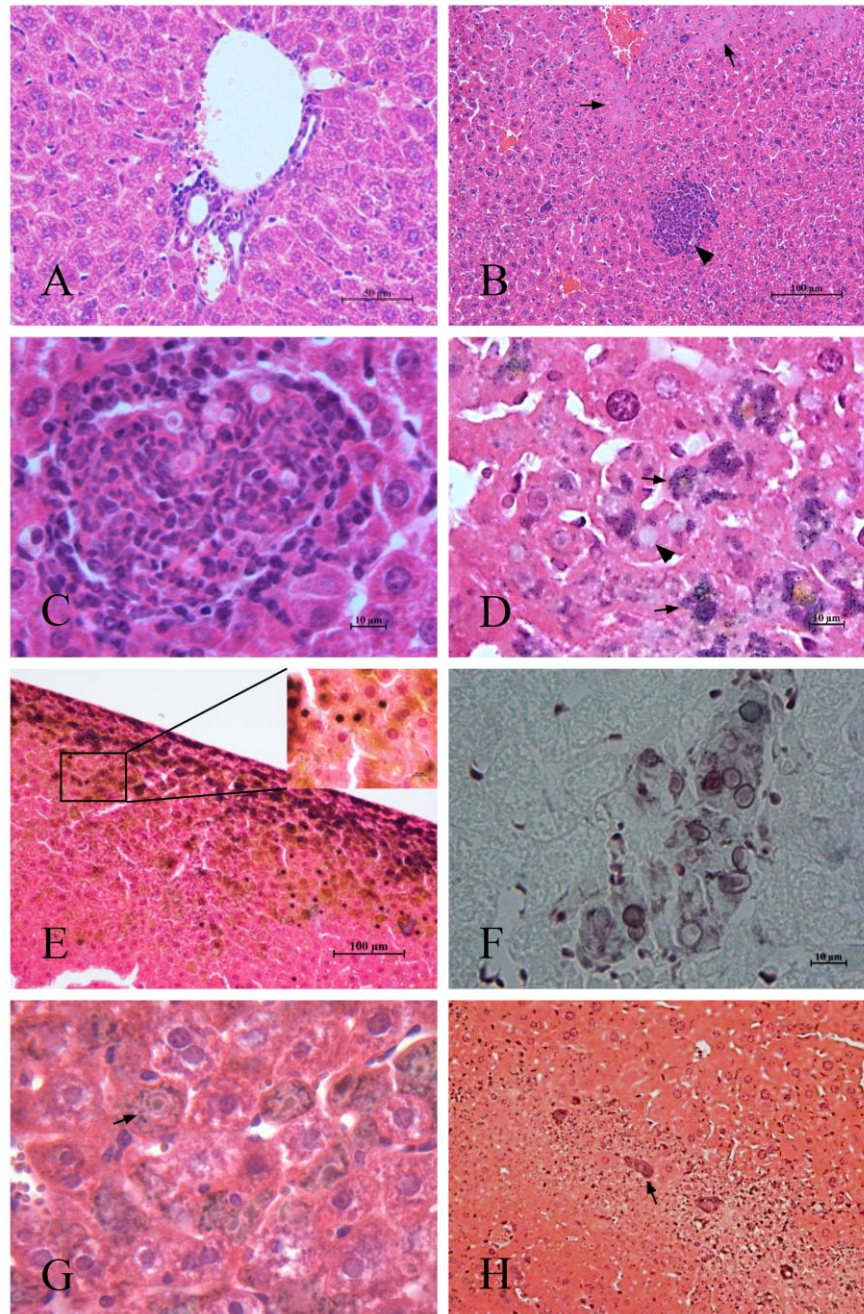


Figura 4: Fotomicrografia do fígado controle (A) e com duas semanas de infecção com *Paracoccidioides brasiliensis* (B-H). Na segunda semana o parênquima hepático apresentou (B e C) granulomas mais desenvolvidos e (B) áreas eosinofílicas (seta); as leveduras foram visualizadas no interior dos granulomas (cabeça de seta) (B) corados com H&E; o parênquima hepático apresentou (D) fragmentos fúngicos intracitoplasmáticos (seta) e cariólise (cabeça de seta); a infecção foi mais evidente na (E) periferia do órgão onde muitos núcleos picnóticos foram identificados (detalhe em E); os granulomas apresentaram (F) grande número de leveduras; em (G) observar a levedura íntegra com aspecto de roda de leme (seta); neste período foram observadas (H) grandes áreas necróticas, com a presença de grandes macrófagos (seta) impregnados pela prata. Coloração com H&E (A, B e C); Gomori-Grocott contracorado com H&E (D, E, G e H) ou verde luz (F).

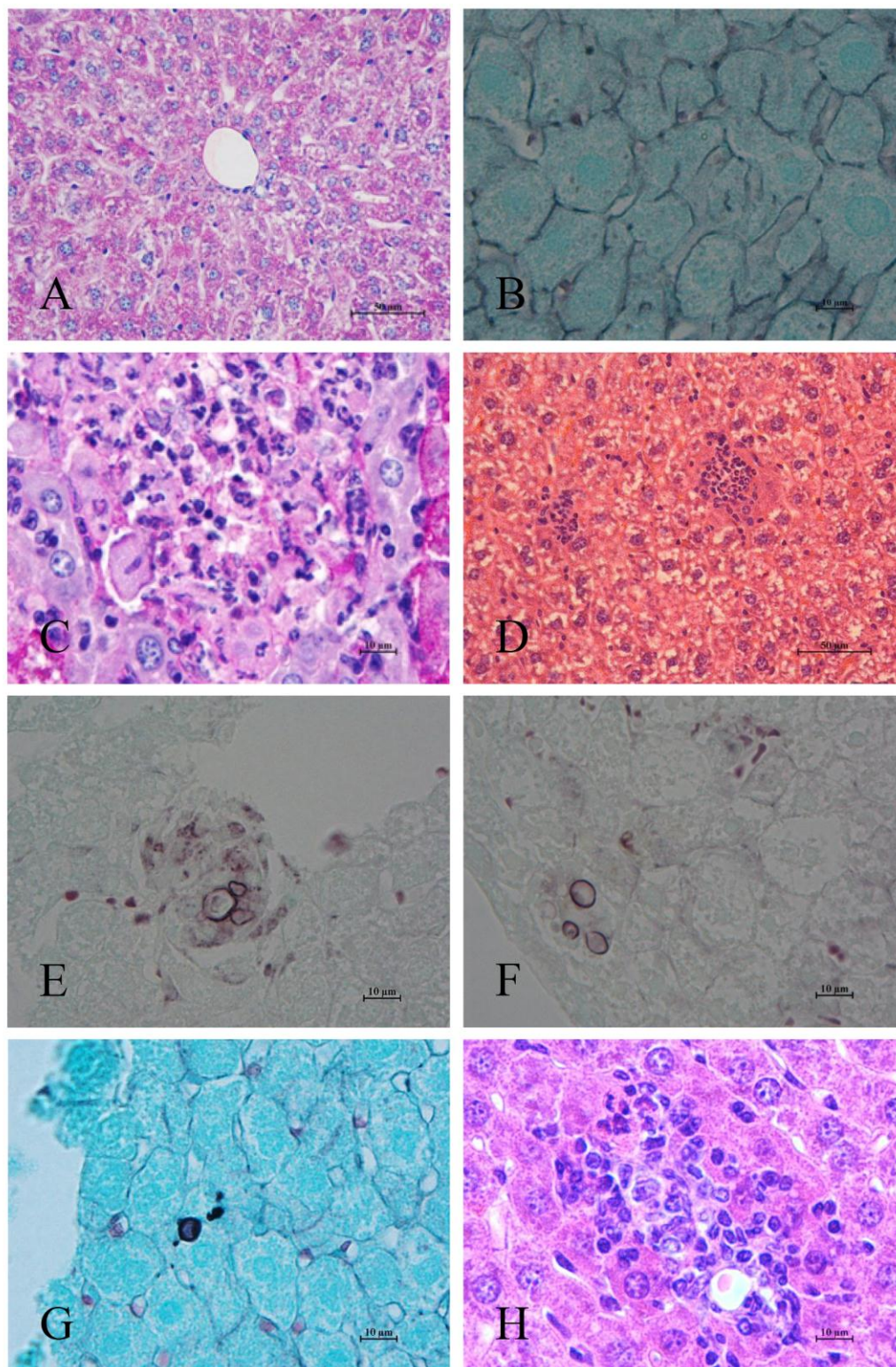


Figura 5: Fotomicrografia do fígado controle (A e B) e na quarta semana de infecção observa-se os granulomas organizados (C), e com poucas ou nenhuma levedura (C, D E e F); e na oitava semana (G e H), algumas leveduras ainda são observadas. Coloração com PAS (A e C); Gomori-Grocott contracorado com verde luz (B, E, F e G); ou H&E (D e H).

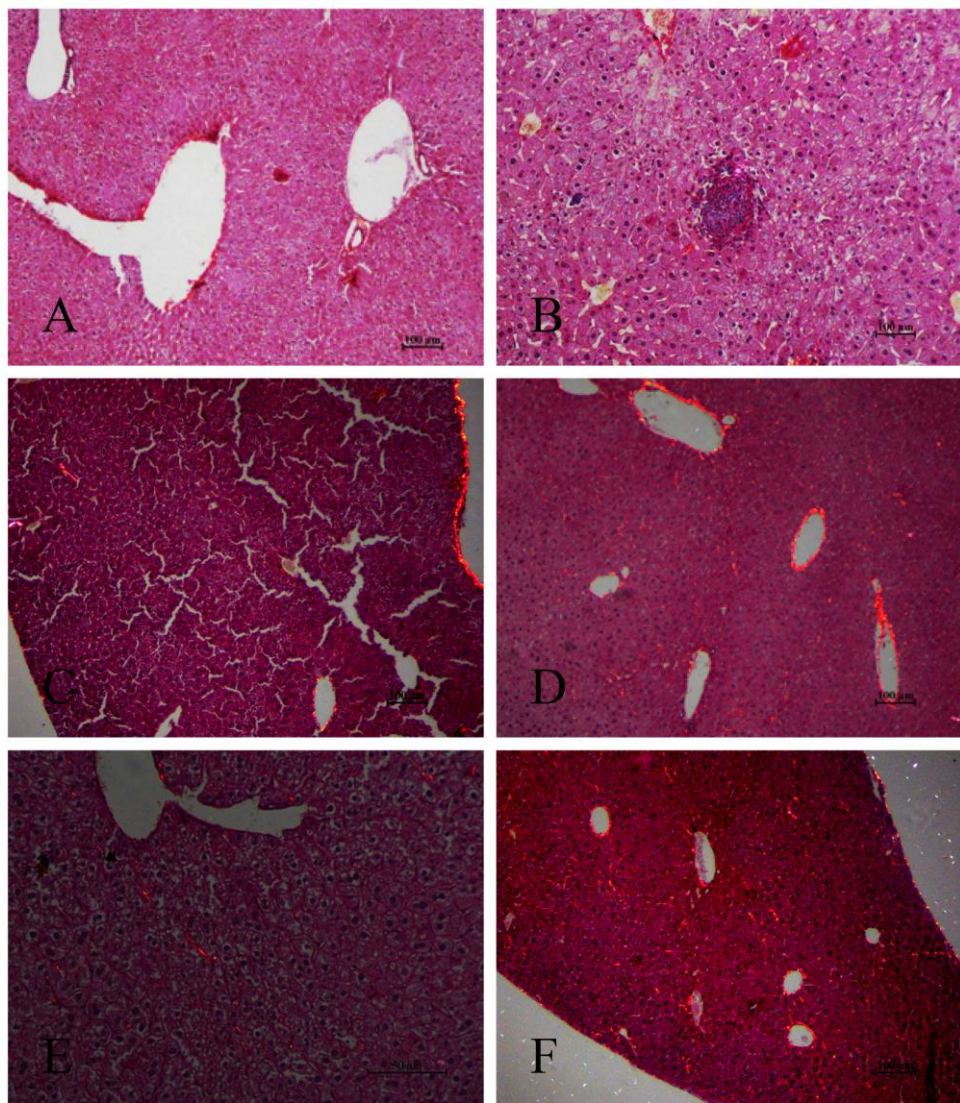


Figura 6: Fotomicrografia do fígado corado com a técnica de picro sirius. (A) animal controle. Na primeira semana de infecção (B) e nas demais semanas não foram visualizadas fibras colágenas em volta dos granulomas; Nota-se um aumento ao longo do tempo na quantidade de fibras colágenas presentes próximas aos capilares sinusóides, entre os cordões de hepatócitos (C) primeira semana, (D) segunda semana, (E) quarta semana, (F) oitava semana.

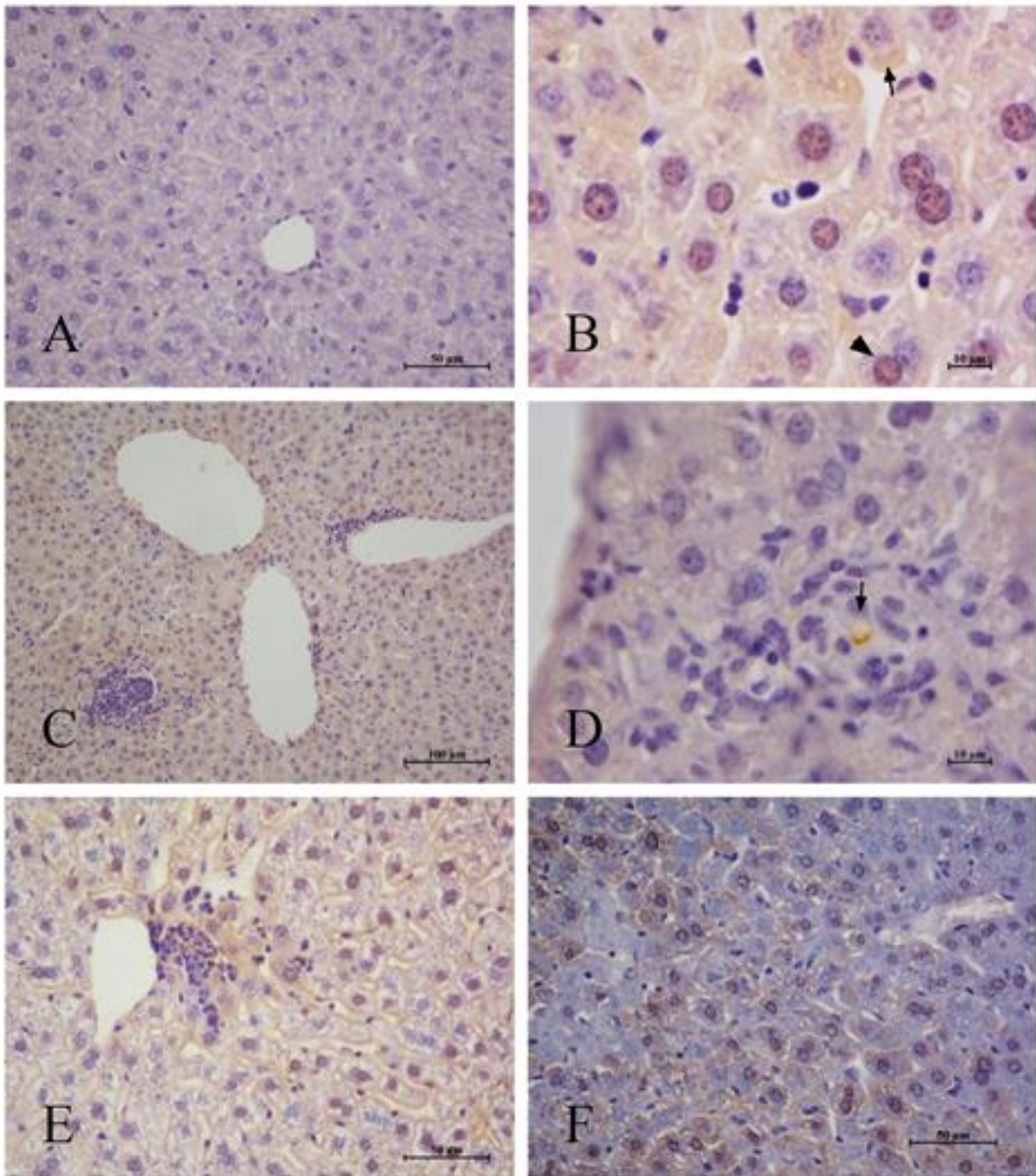


Figura 7: Fotomicrografia do fígado imunomarcado para visualizar a expressão de gp43 ao longo do período experimental; (A) animal controle. Na primeira semana (B) e em todo o período experimental, observa-se a expressão citoplásmica (seta) e nuclear (cabeça de seta) e áreas marcadas por todo o parênquima hepático (C) na segunda semana, algumas leveduras foram observadas (seta), (D) quarta semana e (E) oitava semana

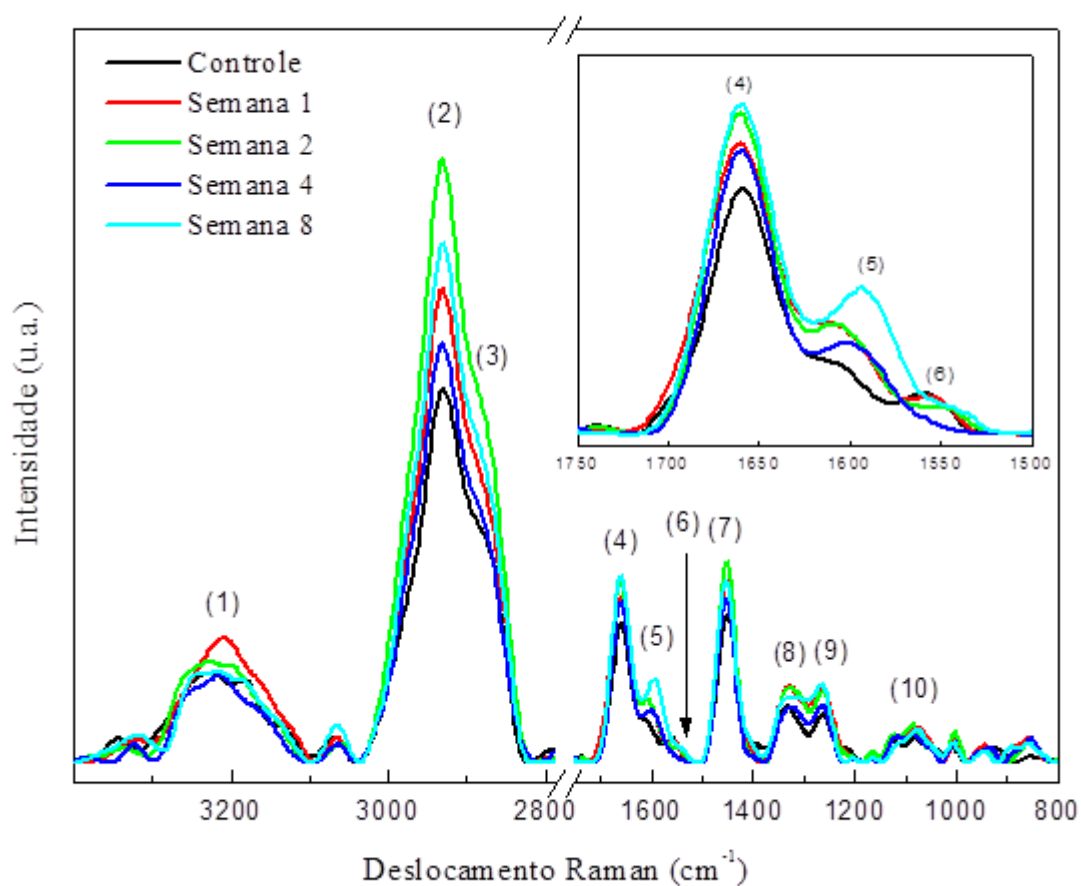


Figura 8: Espectro Raman do fígado de camundongos *Swiss*. Animais controle, sem infecção e infectados com Pb18, após 1, 2, 4 e 8 semanas. O *inset* indica a região dos deslocamentos dos picos com relação ao controle.

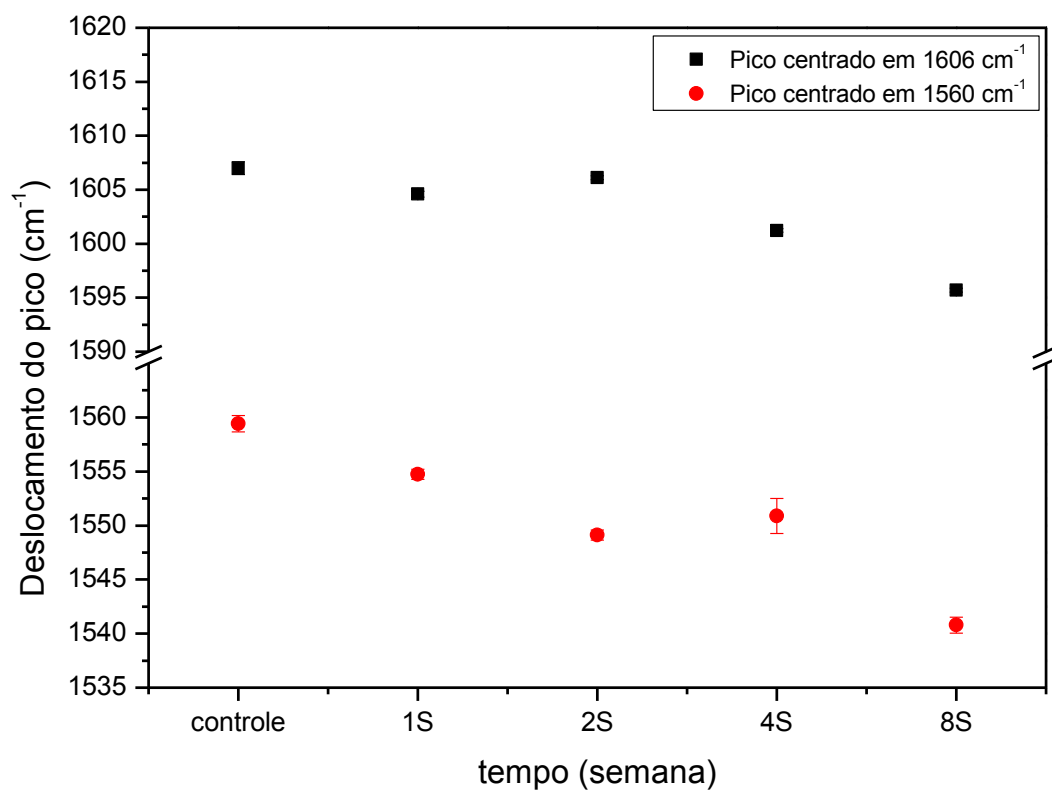


Figura 9: Deslocamento da posição dos picos associados ao -NH_3^+ dos animais controle em comparação aos animais infectados ao longo do período experimental.

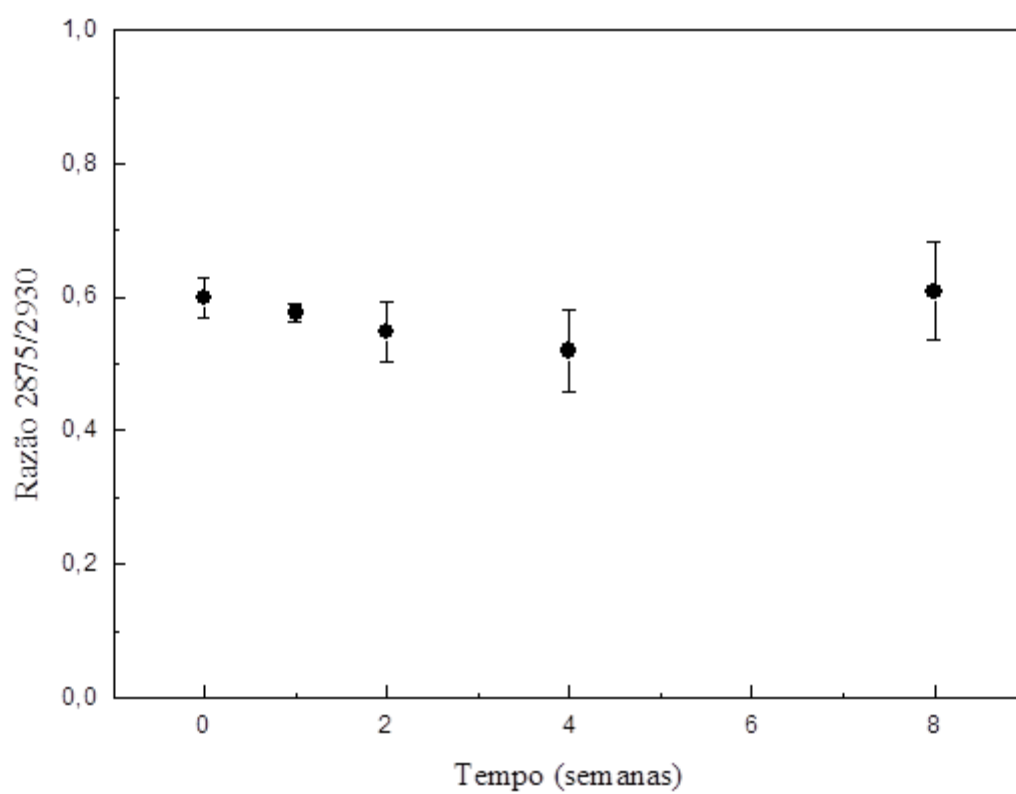


Figura 10: Razão entre os picos 2875 e 2930 cm^{-1} para amostras de fígado controle, tempo zero, e para as infectadas em função do período de infecção.

Número do pico	Números de Onda(cm^{-1})	Grupo funcional
1	3200	Estiramentos N-H e O-H ⁽²⁰⁾
2	2930	Estiramento C-H assimétrico ⁽²⁰⁾
3	2875	Estiramento C-H simétrico ⁽²⁰⁾
4	1660	Deformação -NH_3^+ ⁽²⁰⁾
5	1607	-NH_3^- ⁽²⁰⁾
6	1560	Deformação -NH_3^+ ⁽²⁰⁾
7	1450	Deformação C-H assimétrica ⁽²⁰⁾
8	1330	Deformação C-H simétrica ⁽²⁰⁾
9	1260	Amida III ⁽⁴⁹⁾
10	1080	C-N ⁽⁴⁹⁾

Tabela 1: Números de onda obtidos por FT-Raman e os radicais químicos aos quais estão associados.


ANEXOS



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

Pesquisador: Luzmarina Hernandes	Setor: DCM
Título:	Protocolo nº 042/2010
Expressão temporal de gp43 em granuloma pulmonar de camundongos Swiss infectados por Paracoccidioides brasiliensis e sua relação com a ocorrência de morte celular programada	
Entrada: 11/8/2010	Início: 1/9/2010
	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 sou 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. Valdo Araújo Presidente do CEAE/UEM	

Artigo 10 da Resolução nº 032/2006-CEP: Os projetos analisados serão enquadrados em uma das seguintes categorias:
 I - aprovado;
 II - pendente, quando o CEAE 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

ANEXO 2



Instructions for authors

Research articles

Criteria

Research articles should report on original primary research, but may report on meta-analyses of published research provided they adhere to the appropriate reporting guidelines which are detailed in '[About this journal](#)'.

Preparing main manuscript text

General guidelines of the journal's style and language are given [below](#).

Overview of manuscript sections for Research articles

Manuscripts for Research articles submitted to *BMC Microbiology* should be divided into the following sections (in this order):

- [Title page](#)
- [Abstract](#)
- [Keywords](#)
- [Background](#)
- [Results and discussion](#)
- [Conclusions](#)
- [Methods](#) (can also be placed after Background)
- [Availability of supporting data](#)
- [List of abbreviations used](#) (if any)
- [Competing interests](#)
- [Authors' contributions](#)
- [Authors' information](#)
- [Acknowledgements](#)
- [Endnotes](#)
- [References](#)
- [Illustrations and figures](#) (if any)
- [Tables and captions](#)

- Preparing additional files

Title page

The title page should:

- provide the title of the article
- list the full names, institutional addresses and email addresses for all authors
- indicate the corresponding author

Please note: abbreviations within the title should be avoided

Abstract

The Abstract of the manuscript should not exceed 350 words and must be structured into separate sections: **Background**, the context and purpose of the study; **Results**, the main findings; **Conclusions**, brief summary and potential implications. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract.

Keywords

Three to ten keywords representing the main content of the article.

Background

The Background section should be written in a way that is accessible to researchers without specialist knowledge in that area and must clearly state - and, if helpful, illustrate - the background to the research and its aims. The section should end with a brief statement of what is being reported in the article.

Results and discussion

The Results and discussion may be combined into a single section or presented separately. The Results and discussion sections may also be broken into subsections with short, informative headings.

Conclusions

This should state clearly the main conclusions of the research and give a clear explanation of their importance and relevance. Summary illustrations may be included.

Methods

The methods section should include the design of the study, the type of materials involved, a clear description of all comparisons, and the type of analysis used, to enable replication.

For studies involving human participants a statement detailing ethical approval and consent should be included in the methods section. For further details of the journal's editorial policies and ethical guidelines see '[About this journal](#)'.

For further details of the journal's data-release policy, see the policy section in '[About this journal](#)'.

Availability of supporting data

BMC Microbiology encourages authors to deposit the data set(s) supporting the results reported in submitted manuscripts in a publicly-accessible data repository, when it is not possible to publish them as additional files. This section should only be included when supporting data are available and must include the name of the repository and the permanent identifier or accession number and persistent hyperlink(s) for the data set(s).

The following format is required:

"The data set(s) supporting the results of this article is(are) available in the [repository name] repository, [unique persistent identifier and hyperlink to dataset(s) in http://format]."

Where all supporting data are included in the article or additional files the following format is required:

"The data set(s) supporting the results of this article is (are) included within the article (and its additional file(s))"

We also recommend that the data set(s) be cited, where appropriate in the manuscript, and included in the reference list.

A list of available scientific research data repositories can be found [here](#). A list of all BioMed Central journals that require or encourage this section to be included in research articles can be found [here](#).

List of abbreviations

If abbreviations are used in the text they should be defined in the text at first use, and a list of abbreviations can be provided, which should precede the competing interests and authors' contributions.

Competing interests

A competing interest exists when your interpretation of data or presentation of information may be influenced by your personal or financial relationship with other people or organizations. Authors must disclose any financial competing interests; they should also reveal any non-financial competing interests that may cause them embarrassment were they to become public after the publication of the manuscript.

Authors are required to complete a declaration of competing interests. All competing interests that are declared will be listed at the end of published articles. Where an author

gives no competing interests, the listing will read 'The author(s) declare that they have no competing interests'.

When completing your declaration, please consider the following questions:

Financial competing interests

- In the past five years have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? Is such an organization financing this manuscript (including the article-processing charge)? If so, please specify.
- Do you hold any stocks or shares in an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? If so, please specify.
- Do you hold or are you currently applying for any patents relating to the content of the manuscript? Have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that holds or has applied for patents relating to the content of the manuscript? If so, please specify.
- Do you have any other financial competing interests? If so, please specify.

Non-financial competing interests

Are there any non-financial competing interests (political, personal, religious, ideological, academic, intellectual, commercial or any other) to declare in relation to this manuscript? If so, please specify.

If you are unsure as to whether you, or one your co-authors, has a competing interest please discuss it with the editorial office.

Authors' contributions

In order to give appropriate credit to each author of a paper, the individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section.

An 'author' is generally considered to be someone who has made substantive intellectual contributions to a published study. To qualify as an author one should 1) have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) have been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content; and 3) have given final approval of the version to be published. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research group, alone, does not justify authorship.

We suggest the following kind of format (please use initials to refer to each author's contribution): AB carried out the molecular genetic studies, participated in the sequence alignment and drafted the manuscript. JY carried out the immunoassays. MT participated in the sequence alignment. ES participated in the design of the study and performed the statistical analysis. FG conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support.

Authors' information

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

Acknowledgements

Please acknowledge anyone who contributed towards the article by making substantial contributions to conception, design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data, or who was involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content, but who does not meet the criteria for authorship. Please also include the source(s) of funding for each author, and for the manuscript preparation. Authors must describe the role of the funding body, if any, in design, in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. Please also acknowledge anyone who contributed materials essential for the study. If a language editor has made significant revision of the manuscript, we recommend that you acknowledge the editor by name, where possible.

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements section.

Endnotes

Endnotes should be designated within the text using a superscript lowercase letter and all notes (along with their corresponding letter) should be included in the Endnotes section. Please format this section in a paragraph rather than a list.

References

All references, including URLs, must be numbered consecutively, in square brackets, in the order in which they are cited in the text, followed by any in tables or legends. Each reference must have an individual reference number. Please avoid excessive referencing. If automatic numbering systems are used, the reference numbers must be finalized and the bibliography must be fully formatted before submission.

Only articles, datasets and abstracts that have been published or are in press, or are available through public e-print/preprint servers, may be cited; unpublished abstracts, unpublished data and personal communications should not be included in the reference list, but may be included in the text and referred to as "unpublished observations" or "personal communications" giving the names of the involved researchers. Obtaining permission to quote personal communications and unpublished data from the cited colleagues is the responsibility of the author. Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted. Journal abbreviations follow Index Medicus/MEDLINE. Citations in the reference list should include all named authors, up to the first 30 before adding '*et al.*'.

Any *in press* articles cited within the references and necessary for the reviewers' assessment of the manuscript should be made available if requested by the editorial office.

Style files are available for use with popular bibliographic management software:

- [BibTeX](#)
- [EndNote style file](#)
- [Reference Manager](#)
- [Zotero](#)

Examples of the *BMC Microbiology* reference style are shown [below](#). Please ensure that the reference style is followed precisely; if the references are not in the correct style they may have to be retyped and carefully proofread.

All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, in the following format: **The Mouse Tumor Biology Database** [<http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>]. If an author or group of

authors can clearly be associated with a web link, such as for weblogs, then they should be included in the reference.

Examples of the *BMC Microbiology* reference style

Article within a journal

Koonin EV, Altschul SF, Bork P: **BRCA1 protein products: functional motifs.** *Nat Genet* 1996,**13**: 266-267.

Article within a journal supplement

Orengo CA, Bray JE, Hubbard T, LoConte L, Sillitoe I: **Analysis and assessment of ab initio three-dimensional prediction, secondary structure, and contacts prediction.** *Proteins* 1999,**43**(Suppl 3):149-170.

In press article

Kharitonov SA, Barnes PJ: **Clinical aspects of exhaled nitric oxide.** *Eur Respir J*, in press.

Published abstract

Zvaifler NJ, Burger JA, Marinova-Mutafchieva L, Taylor P, Maini RN: **Mesenchymal cells, stromal derived factor-1 and rheumatoid arthritis [abstract].** *Arthritis Rheum* 1999, **42**:s250.

Article within conference proceedings

Jones X: **Zeolites and synthetic mechanisms.** In *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore*. Edited by Smith Y. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996:16-27.

Book chapter, or article within a book

Schnepf E: **From prey via endosymbiont to plastids: comparative studies in dinoflagellates.** In *Origins of Plastids. Volume 2*. 2nd edition. Edited by Lewin RA. New York: Chapman and Hall; 1993:53-76.

Whole issue of journal

Ponder B, Johnston S, Chodosh L (Eds): **Innovative oncology.** In *Breast Cancer Res* 1998, **10**:1-72.

Whole conference proceedings

Smith Y (Ed): *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore*. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996.

Complete book

Margulis L: *Origin of Eukaryotic Cells*. New Haven: Yale University Press; 1970.

Monograph or book in a series

Hunninghake GW, Gadek JE: **The alveolar macrophage**. In *Cultured Human Cells and Tissues*. Edited by Harris TJR. New York: Academic Press; 1995:54-56. [Stoner G (Series Editor): *Methods and Perspectives in Cell Biology*, vol 1.]

Book with institutional author

Advisory Committee on Genetic Modification: *Annual Report*. London; 1999.

PhD thesis

Kohavi R: **Wrappers for performance enhancement and oblivious decision graphs**. *PhD thesis*. Stanford University, Computer Science Department; 1995.

*Link / URL***The Mouse Tumor Biology**

Database [<http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>]

Link / URL with author(s)

Neylon C: Open Research Computation: an ordinary journal with extraordinary aims. [http://blogs.openaccesscentral.com/blogs/bmcblog/entry/open_research_computation_a_n_ordinary]

Dataset with persistent identifier

Zheng, L-Y; Guo, X-S; He, B; Sun, L-J; Peng, Y; Dong, S-S; Liu, T-F; Jiang, S; Ramachandran, S; Liu, C-M; Jing, H-C (2011): Genome data from sweet and grain sorghum (*Sorghum bicolor*). *GigaScience*. <http://dx.doi.org/10.5524/100012>.

Preparing illustrations and figures

Illustrations should be provided as separate files, not embedded in the text file. Each figure should include a single illustration and should fit on a single page in portrait format. If a figure consists of separate parts, it is important that a single composite illustration file be submitted which contains all parts of the figure. There is no charge for the use of color figures.

Please read our [figure preparation guidelines](#) for detailed instructions on maximising the quality of your [figures](#).

Formats

The following file formats can be accepted:

- PDF (preferred format for diagrams)
- DOCX/DOC (single page only)

- PPTX/PPT (single slide only)
- EPS
- PNG (preferred format for photos or images)
- TIFF
- JPEG
- BMP

Figure legends

The legends should be included in the main manuscript text file at the end of the document, rather than being a part of the figure file. For each figure, the following information should be provided: Figure number (in sequence, using Arabic numerals - i.e. Figure 1, 2, 3 etc); short title of figure (maximum 15 words); detailed legend, up to 300 words.

Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures or tables that have previously been published elsewhere.

Preparing a personal cover page

If you wish to do so, you may submit an image which, in the event of publication, will be used to create a cover page for the PDF version of your article. The cover page will also display the journal logo, article title and citation details. The image may either be a figure from your manuscript or another relevant image. You must have permission from the copyright to reproduce the image. Images that do not meet our requirements will not be used.

Images must be 300dpi and 155mm square (1831 x 1831 pixels for a raster image).

Allowable formats - EPS, PDF (for line drawings), PNG, TIFF (for photographs and screen dumps), JPEG, BMP, DOC, PPT, CDX, TGF (ISIS/Draw).

Preparing tables

Each table should be numbered and cited in sequence using Arabic numerals (i.e. Table 1, 2, 3 etc.). Tables should also have a title (above the table) that summarizes the whole table; it should be no longer than 15 words. Detailed legends may then follow, but they should be concise. Tables should always be cited in text in consecutive numerical order. Smaller tables considered to be integral to the manuscript can be pasted into the end of the document text file, in A4 portrait or landscape format. These will be typeset and

displayed in the final published form of the article. Such tables should be formatted using the 'Table object' in a word processing program to ensure that columns of data are kept aligned when the file is sent electronically for review; this will not always be the case if columns are generated by simply using tabs to separate text. Columns and rows of data should be made visibly distinct by ensuring that the borders of each cell display as black lines. Commas should not be used to indicate numerical values. Color and shading may not be used; parts of the table can be highlighted using symbols or bold text, the meaning of which should be explained in a table legend. Tables should not be embedded as figures or spreadsheet files.

Larger datasets or tables too wide for a portrait page can be uploaded separately as additional files. Additional files will not be displayed in the final, laid-out PDF of the article, but a link will be provided to the files as supplied by the author.

Tabular data provided as additional files can be uploaded as an Excel spreadsheet (.xls) or comma separated values (.csv). As with all files, please use the standard file extensions.

Preparing additional files

Although *BMC Microbiology* does not restrict the length and quantity of data included in an article, we encourage authors to provide datasets, tables, movies, or other information as additional files.

Please note: All Additional files **will be published** along with the article. Do not include files such as patient consent forms, certificates of language editing, or revised versions of the main manuscript document with tracked changes. Such files should be sent by email to editorial@biomedcentral.com, quoting the Manuscript ID number.

Results that would otherwise be indicated as "data not shown" can and should be included as additional files. Since many weblinks and URLs rapidly become broken, *BMC Microbiology* requires that supporting data are included as additional files, or deposited in a recognized repository. Please do not link to data on a personal/departmental website. The maximum file size for additional files is 20 MB each, and files will be virus-scanned on submission.

Additional files can be in any format, and will be downloadable from the final published article as supplied by the author. We encourage authors to use formats which facilitate reuse. *e.g.* We recommend CSV rather than PDF for tabular data.

Certain supported files formats are recognized and can be displayed to the user in the browser. These include most movie formats (for users with the Quicktime plugin), mini-websites prepared according to our guidelines, chemical structure files (MOL, PDB), geographic data files (KML).

If additional material is provided, please list the following information in a separate section of the manuscript text:

- File name (e.g. Additional file 1)
- File format including the correct file extension for example .pdf, .xls, .txt, .pptx (including name and a URL of an appropriate viewer if format is unusual)
- Title of data
- Description of data

Additional files should be named "Additional file 1" and so on and should be referenced explicitly by file name within the body of the article, e.g. 'An additional movie file shows this in more detail [see Additional file 1]'.

Additional file formats

Ideally, file formats for additional files should not be platform-specific, and should be viewable using free or widely available tools. The following are examples of suitable formats.

- Additional documentation
 - PDF (Adode Acrobat)
- Animations
 - SWF (Shockwave Flash)
- Movies
 - MP4 (MPEG 4)
 - MOV (Quicktime)
- Tabular data
 - XLS, XLSX (Excel Spreadsheet)
 - CSV (Comma separated values)

As with figure files, files should be given the standard file extensions.

Mini-websites

Small self-contained websites can be submitted as additional files, in such a way that they will be browsable from within the full text HTML version of the article. In order to do this, please follow these instructions:

1. Create a folder containing a starting file called index.html (or index.htm) in the root.

2. Put all files necessary for viewing the mini-website within the folder, or sub-folders.
3. Ensure that all links are relative (ie "images/picture.jpg" rather than "/images/picture.jpg" or "http://yourdomain.net/images/picture.jpg" or "C:\Documents and Settings\username\My Documents\mini-website\images\picture.jpg") and no link is longer than 255 characters.
4. Access the index.html file and browse around the mini-website, to ensure that the most commonly used browsers (Internet Explorer and Firefox) are able to view all parts of the mini-website without problems, it is ideal to check this on a different machine.
5. Compress the folder into a ZIP, check the file size is under 20 MB, ensure that index.html is in the root of the ZIP, and that the file has .zip extension, then submit as an additional file with your article.

Style and language

General

Currently, *BMC Microbiology* can only accept manuscripts written in English. Spelling should be US English or British English, but not a mixture.

There is no explicit limit on the length of articles submitted, but authors are encouraged to be concise. There is also no restriction on the number of figures, tables or additional files that can be included with each article online. Figures and tables should be numbered in the order in which they are referred to in the text. Authors should include all relevant supporting data with each article.

BMC Microbiology will not edit submitted manuscripts for style or language; reviewers may advise rejection of a manuscript if it is compromised by grammatical errors. Authors are advised to write clearly and simply, and to have their article checked by colleagues before submission. In-house copyediting will be minimal. Non-native speakers of English may choose to make use of a copyediting service.

Language editing

For authors who wish to have the language in their manuscript edited by a native-English speaker with scientific expertise, BioMed Central recommends [Edanz](#). BioMed Central has arranged a 10% discount to the fee charged to BioMed Central authors by Edanz. Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication. Please contact [Edanz](#) directly to make arrangements for editing, and for pricing and payment details.

Help and advice on scientific writing

The abstract is one of the most important parts of a manuscript. For guidance, please visit our page on [Writing titles and abstracts for scientific articles](#).

Tim Albert has produced for BioMed Central a [list of tips](#) for writing a scientific manuscript. [American Scientist](#) also provides a list of resources for science writing. For more detailed guidance on preparing a manuscript and writing in English, please visit the [BioMed Central author academy](#).

Abbreviations

Abbreviations should be used as sparingly as possible. They should be defined when first used and a list of abbreviations can be provided following the main manuscript text.

Typography

- Please use double line spacing.
- Type the text unjustified, without hyphenating words at line breaks.
- Use hard returns only to end headings and paragraphs, not to rearrange lines.
- Capitalize only the first word, and proper nouns, in the title.
- All pages should be numbered.
- Use the *BMC Microbiology* [reference format](#).
- Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted.
- Please do not format the text in multiple columns.
- Greek and other special characters may be included. If you are unable to reproduce a particular special character, please type out the name of the symbol in full. **Please ensure that all special characters used are embedded in the text, otherwise they will be lost during conversion to PDF.**
- Genes, mutations, genotypes, and alleles should be indicated in italics, and authors are required to use approved gene symbols, names, and formatting. Protein products should be in plain type.

Units

SI units should be used throughout (liter and molar are permitted, however).