

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

KÁTIA CRISTINA SIBIN

Monitoramento morfológico e por espectroscopia Raman da pele de ratos após a aplicação intradérmica de uma fração de *F. oxysporum*.

Maringá
2011

KÁTIA CRISTINA SIBIN

Monitoramento morfológico e por espectroscopia Raman da pele de ratos após a aplicação intradérmica de uma fração de *F. oxysporum*.

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

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

Maringá
2011

FOLHA DE APROVAÇÃO

KÁTIA CRISTINA SIBIN

Monitoramento morfológico e por espectroscopia Raman da pele de ratos após a aplicação intradérmica de uma fração de *F. oxysporum*.

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 Dra. Luzmarina Hernandez
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof^a Dra. Eneri Vieira de Souza Leite Melo
Universidade Estadual de Maringá

Prof^o Dr. Mauro Luciano Baesso
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 19 de dezembro de 2011

Local de defesa: Anfiteatro, Bloco 126, PCS - *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais, pelo amor incondicional. Aos meus irmãos, meu marido, e amigos pelo incentivo a busca de novos conhecimentos.

AGRADECIMENTOS

À Deus por sua infinita bondade, por iluminar meu caminho dando sabedoria e me guiar nos momentos difíceis.

À minha família, pela base sólida que sempre me deu força para encarar a vida de frente. Aos meus pais, Roberto e Lúcia, e meus irmãos Danielle e Alexandre, pelo apoio, compreensão, amor, carinho e por sempre acreditarem e depositarem em mim toda confiança de que sou capaz. Sem vocês com certeza eu não teria conseguido. Ao meu marido Wellington pelo incentivo e compreensão, suas palavras nas horas mais difíceis.

A todos meus amigos que permaneceram comigo mesmo com toda a distância, provocada por este curso. O contato é pouco mais o carinho é imenso. Aos amigos que fiz ao decorrer desses dois anos agradeço o convívio, colaboração e solidariedade, sem a ajuda de vocês esse caminho teria sido bem mais difícil.

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

Aos professores e amigos do Departamento de Física por ter me proporcionado acesso ao crescimento pessoal e profissional.

A minha co-orientadora, Prof^a Terezinha obrigada pelos conhecimentos científicos, pelos ensinamentos de vida, companheirismo, amizade, dedicação e confiança, muito obrigada pelas oportunidades oferecidas a mim e por sempre acreditar na minha capacidade.

E a minha orientadora, Prof^a Luzmarina, por todo o ensinamento científico, pelo tempo e paciência dedicados a mim, cujas valiosas orientações permitiram a conclusão deste trabalho. Obrigada pelas oportunidades oferecidas a mim. Muito obrigada por fazer parte da minha vida pessoal e da minha formação profissional.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro dado a essa pesquisa.

EPÍGRAFE

“O futuro da humanidade está nas
mãos daqueles que são capazes de
transmitir às gerações do amanhã
razões de vida e de esperança.”

Papa João Paulo II

Monitoramento morfológico e por espectroscopia Raman da pele de ratos após a aplicação intradérmica de uma fração de *F. oxysporum*

RESUMO

Fusarium é um patógeno emergente com alta taxa de morbidade e mortalidade. Importante resposta tecidual é observada nos pacientes infectados e tem sido associada com a produção de metabólitos de ação tóxica. Nosso objetivo foi individualizar a fração majoritária do extrato metabólico bruto de *Fusarium oxysporum* e investigar seus efeitos na pele de ratos saudáveis. A fração F1 foi obtida por meio do cultivo de *F. oxysporum* em Czapek-Dox. Nos grupos tratados (n=4 animais/tempo de sacrifício) foi injetado, via intradérmica, fração F1 (0,5 mg / mL) e nos grupos controle (50 µl) de solução salina 0,9%. Os animais foram sacrificados 3, 6, 12 e 24 horas após a inoculação. A pele foi fixada para inclusão em parafina para obtenção de cortes histológicos e coradas com hematoxilina e eosina, avaliando resposta inflamatória; Sirius red, para a quantificação de colágeno; e TUNEL, para detectar células em apoptose. Uma amostra (n=2 animais/tempo de sacrifício) foi analisada por espectroscopia Raman com transformada de Fourier. As reações teciduais foram classificadas e comparadas ao longo do tempo e tratamento. No grupo tratado a reação inflamatória atingiu um pico em 6 horas sendo classificada como moderada, com o infiltrado formado principalmente por neutrófilos, hiperemia e fibroblastos com morfologia de células ativas. A coloração de TUNEL foi negativa. A área ocupada por colágeno tipo I e III no grupo tratado teve um ganho temporal. Houve alteração na área ocupada por amida I e nas razões das moléculas $-CH_2$ e $-CH_3$. A fração F1 de *F. oxysporum* não foi capaz de induzir os mesmos eventos biológicos daqueles estudados anteriormente. É plausível supor que a fração contenha elementos que contribuam para a invasão de *Fusarium* na pele, desestruturando a organização da matriz extracelular.

Palavras-chave: *Fusarium oxysporum*. Micotoxinas. Raman.

Monitoring morphological and Raman spectroscopy of rat skin after intradermal application of a fraction of *F. oxysporum*

ABSTRACT

Fusarium is an emerging pathogen with high morbidity and mortality. Important tissue response is observed in infected patients and has been associated with the production of metabolites of toxic action. Our goal was to individualize the major fraction of the crude extract of *Fusarium oxysporum* metabolic and investigate their effects on the skin of healthy mice. The fraction F1 was obtained by the cultivation *F. oxysporum* in Czapek-Dox. In the treated groups (n = 4 animals / time of sacrifice) was injected intradermally F1 fraction (0.5 mg / mL) and control (50 µl) of 0.9% saline solution. The animals were sacrificed 3, 6, 12 and 24 hours after inoculation. The skin was set for inclusion in paraffin to prepare histological sections and stained with hematoxylin and eosin, assessing inflammatory response, Sirius red for collagen quantification, and TUNEL to detect apoptotic cells. A sample (n = 2 animals / sacrifice time) was analyzed by Raman spectroscopy with Fourier transform. Tissue reactions were classified and compared over time and treatment. In the group treated inflammatory reaction peaked at 6 hours was classified as moderate, with the infiltrate consisting mainly of neutrophils, hyperemia and morphology of fibroblasts with active cells. TUNEL staining was negative. The area occupied by type I and III collagen in the treated group had a winning time. There were changes in the area occupied by the reasons amide I and molecules -CH₂ - CH₃. The fraction F1 of *F. oxysporum* was not able to induce the same biological events of those studied previously. It is plausible that the fraction contains elements that contribute to the invasion of *Fusarium* in the skin destabilized the organization of the extracellular matrix.

Keywords: *Fusarium oxysporum*. Mycotoxins. Raman.

Dissertação elaborada e formatada
conforme as normas das publicações
científicas: *Internacional Journal of
Dermatology* Disponível em:
[http://www.wiley.com/bw/submit.asp?re
f=0011-9059](http://www.wiley.com/bw/submit.asp?ref=0011-9059)

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	11
1. Introdução.....	11
1.1. Importância do Gênero <i>Fusarium</i> sp.....	11
1.2. Análises por meio de espectroscopia Raman com Transformada de Fourier ..	14
1.2.1. Espectroscopia Raman	14
1.2.2. Espectroscopia Raman com transformada de Fourier	15
2. Justificativa.....	16
3. Objetivos	17
3.1. Objetivos específicos.....	17
4. Referências	18
CAPÍTULO II.....	21
Extrato bruto de <i>Fusarium oxysporum</i> induz apoptose e alterações estruturais na pele de ratos sadios.....	22
CAPÍTULO III.....	39
Conclusões	39
Perspectivas futuras	40

CAPÍTULO I

1. Introdução

Fusarium sp é um fungo filamentosso não dermatófito (FFND), geofílico, saprofíto e fitopatógono, sendo a minoria patogênica para o homem ⁽¹⁾. Pertencem ao Reino *Eumycota*, Divisão *Ascomycota*, Classe *Euascomycetes*, Ordem *Hipocreales*, Família *Hypocreaceae*, Gênero *Fusarium* ⁽²⁾. *Fusarium* sp são comuns em regiões tropicais e temperadas, mas também são encontrados no deserto e áreas do Ártico ⁽³⁾.

É caracterizado pela presença de micélios abundantes de aspecto cotonoso, apresenta pigmentação de cor rosa, púrpura, cinza ou amarela; hifas hialinas septadas, conidióforos variáveis e conídios em duas formas: macroconídios septados em forma de foice e microconídios unicelulares ovóides ou oblongos, sendo comum a presença de clamidósporos ⁽⁴⁾.

O gênero é representado por mais de 50 espécies, incluindo patógenos de plantas, animais e humano. Doze espécies foram associadas à infecção humana sendo a mais frequente *Fusarium solani* seguido por *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme* e *Fusarium verticillioidis* ^(4,5).

1.1. Importância do Gênero *Fusarium* sp

A maioria das espécies de *Fusarium* é prejudicial à agricultura, uma vez que invadem sementes de cereais e outros tecidos causando doenças. As diferentes formas de acometimento das plantas e as diversas culturas afetadas representam um cenário preocupante devido aos prejuízos que a infecção e contaminação dos vegetais por *Fusarium* sp causam à agricultura ⁽⁶⁾.

Dentre as doenças destaca-se a murcha de *Fusarium*, caracterizada por clorose e lesões necróticas a partir das folhas mais velhas, com posterior murcha, desfolhamento prematuro e nanismo ⁽⁷⁾. A variedade *Fusarium oxysporum* produz doenças em tomate, batata doce, peras e foi responsável pela doença das bananas no Panamá ⁽⁸⁾.

Este microrganismo também é conhecido por produzir micotoxinas que são metabólitos secundários de grande importância na medicina veterinária por causar várias fusariotoxicoses ⁽³⁾, destacando-se: toxicose-tricotecenos, síndrome zearalenona, leucoencefalomalácia eqüina, edema pulmonar suíno e síndrome do raquitismo em aves ⁽⁹⁾. As toxinas mais importantes responsáveis pelas fusariotoxicoses são os tricotecenos

(desoxinivalenol (DON), 3-acetildesoxinivalenol, nivalenol, fusarenona-X, toxina T-2, diacetoxiscirpenol), zearalenona e fumonisinas ^(10,11).

A intoxicação pela DON se manifesta pela diminuição na ingestão de alimentos ou sua recusa, vômitos e distúrbios digestivos ⁽¹²⁾. A diminuição da ingestão de alimentos ocorre em função da inibição da síntese protéica, aumentando os níveis de aminoácidos circulantes, dentre eles o triptofano que está ligado ao controle da saciedade ⁽¹³⁾. Entre os animais, os porcos são os mais suscetíveis em relação a aves e ruminantes, e a susceptibilidade é também influenciada pelo gênero sendo machos mais suscetíveis que fêmeas ⁽¹⁴⁾.

A toxina T-2 apresenta capacidade de formar um quadro clínico de síndrome sanguinolenta, com ocorrência de dermatites, abortamentos, distúrbios do sistema nervoso central (SNC), e hemorragias gástricas e viscerais ^(15,16).

A síndrome zearalenona é caracterizada pela capacidade dessa micotoxina de interferir com a fisiologia dos estrógenos, fazendo com que a fertilidade dos animais seja diminuída devido a um quadro de hiperestrogenismo causado pela similaridade da zearalenona com os estrógenos ^(15,17). A ação desta toxina se dá pelo estímulo aos receptores estrogênicos citoplasmáticos, incrementando a síntese protéica no aparelho reprodutor ⁽¹⁸⁾. Dentre os sintomas mais evidentes encontram-se: inchaço, vulva avermelhada, prolapso retal e vaginal, hipertrofia uterina, atrofia ovariana decorrente da manutenção do corpo lúteo em quadro de pseudogestação, leitões fracos e natimortos ^(13 16,18).

As fumonisinas em eqüinos possuem tropismo especial pelo sistema nervoso central, onde produzem uma necrose liquefativa da substância branca, denominada leucoencefalomalácia. Os sinais clínicos caracterizam-se por inapetência, fraqueza generalizada, sonolência, anorexia, lentidão ao caminhar, depressão, sinais de cegueira, desorientação seguida por ataxia, tendência de permanecer com os membros anteriores cruzados, andar em círculo, batidas contra cercas e objetos, decúbito lateral e movimentos de pedalar até a morte. As áreas com necrose de liquefação se caracterizam pela formação de cavitações multifocais na substância branca, que contém material encefálico fragmentado e amolecido, formando uma massa pastosa de coloração branco-acinzentada ⁽¹⁸⁾.

Em suínos intoxicados pela mesma fumonisina pode haver a formação de edema pulmonar e hidrotórax. Os principais sinais clínicos são relacionados ao sistema cardio-respiratório, como aumento da frequência respiratória, respiração abdominal e cianose. Em aves a fumonisina causa aumento do consumo de água e ração, bem como diarreia escura e pegajosa com diminuição no ganho de peso ⁽¹⁸⁾.

Em humanos *Fusarium* é um agente de infecções de qualquer natureza, seja em indivíduos imunocomprometidos ou imunocompetentes ⁽⁵⁾. É considerado um patógeno emergente devido ao crescente número de casos graves com alta taxa de morbidade e mortalidade e também por sua ampla resistência às drogas antifúngicas ⁽¹⁹⁾.

As infecções por *Fusarium* podem ser localizadas, focalmente invasivas ou disseminadas, sendo que a última classificação se dá quando dois ou mais órgãos são envolvidos ^(20,21). Este fungo causa um amplo espectro de doenças humanas, tais como micotoxicoses, sinusite alérgica, ceratite, oculomicose, micetoma, e onicomiose. Também tem a capacidade de aderir em material protético como lentes de contato e cateteres ⁽³⁾.

Entre os indivíduos imunocompetentes, as lesões de pele geralmente são localizadas e se desenvolvem após ruptura da pele (queimaduras e trauma), as infecções cutâneas comumente apresentam lesões com necrose central, pápulas eritematosas, celulite secundária, úlceras crônicas e abscessos ^(20,22).

Onicomioses causadas por esse gênero quase sempre são diagnosticadas nas unhas dos pés afetadas por traumas, distrofias ou já apresentando infecção por dermatófitos ⁽²⁾ e são caracterizadas por lesões dolorosas, paroníquia, reação inflamatória e dor ⁽²³⁾. A onicomiose causada por *Fusarium* tem sido considerada uma das portas de entrada para infecções invasivas ⁽²⁴⁾. A ceratomicose ou infecção da córnea por fungos é provavelmente o tipo de infecção mais freqüente. A maioria dos casos de ceratite fúngica está associada a trauma da córnea por vegetais do solo, corpos estranhos ou pelo uso de lentes de contato ^(25,26).

Em indivíduos imunocomprometidos, sobretudo aqueles com malignidades hematológicas como os neutropênicos, *Fusarium* representa o fungo mais freqüentemente isolado como causa de infecções invasivas, e a evolução da lesão ocorre em um período curto de tempo. As lesões nestes pacientes são caracterizadas por eritemas múltiplos, pápulas, nódulos com necrose central e lesões dolorosas ⁽²⁷⁾.

Em infecção por *Fusarium* sp as lesões da pele são freqüentemente a única fonte de material para diagnóstico. Portanto, é importante analisar as características do histopatológico de fusariose na pele e estabelecer seu papel no diagnóstico e tratamento desta infecção ^(5,27).

A produção de metabólitos secundários de *Fusarium oxysporum* e suas ações sobre tecidos vegetais tem sido amplamente estudadas, no entanto o efeito de metabólitos em tecidos animais é pouco estudado ⁽²⁸⁾.

1.2 Análises por meio de espectroscopia Raman com Transformada de Fourier

A espectroscopia Raman é uma técnica óptica que mede o espalhamento inelástico de uma radiação monocromática. É amplamente utilizada em estudos analíticos, qualitativos e quantitativos. Através da espectroscopia Raman a estrutura molecular e a composição do material é codificada através das informações obtidas sobre os níveis vibracionais das moléculas, a partir do qual a sua composição molecular pode ser determinada ⁽²⁹⁻³¹⁾.

A espectroscopia Raman tem sido ultimamente utilizada como uma ferramenta analítica na caracterização bioquímica dos tecidos biológicos, incluindo neoplasias, devido a vantagens, como a sua sensibilidade para detectar pequenas mudanças estruturais nas moléculas, bem como, por ser um teste não- invasivo, que não requer muita preparação em coleta de dados ⁽³⁰⁻³²⁾.

1.2.2 Espectroscopia Raman

O efeito Raman é um processo em que há troca de energia entre a luz e a matéria. Quando a radiação eletromagnética proveniente de uma fonte monocromática (como o laser), atinge uma substância, ela pode ser absorvida, espalhada ou transmitida. No espalhamento inelástico toda luz espalhada tem a mesma frequência que a luz incidente ⁽³³⁾. Entretanto para algumas moléculas, esta pode ser inelástica, a qual leva a matéria para um nível de energia excitado, o que resulta numa perda de energia do fóton e este é espalhado com frequências menores que a incidente ⁽³⁴⁾.

O espalhamento Raman pode resultar tanto em um fóton de menor energia, quanto em um fóton de maior energia. As frequências Raman são conhecidas como linhas *Stokes* quando o fóton é espalhado com energia maior que a do incidente, e de *Anti-Stokes* se a molécula esta em um estado excitado e a colisão com um fóton causar uma perda de energia, fazendo a molécula sofrer uma transição para um estado de energia mais baixo (figura 1) ⁽³⁴⁾.

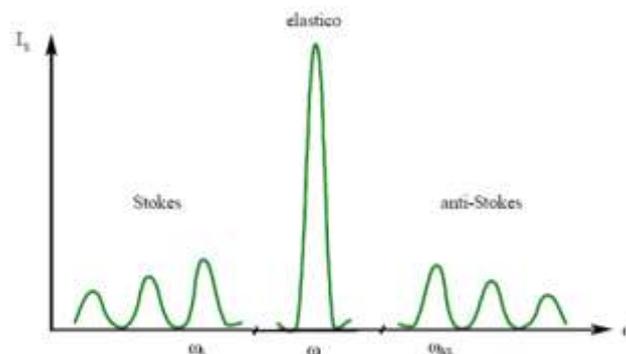


Figura 1 – Espectro Raman esquemático representando mostrando os processo Rayleigh, *Anti-Stokes* e *Stokes*

1.2.3 Espectroscopia Raman com transformada de Fourier

Amostras biológicas apresentam sinais Raman fracos e a emissão de fluorescência é a maior interferência para a medida da energia das moléculas. Dessa forma para a remoção indesejada da fluorescência no espectro Raman utiliza-se a espectroscopia Raman com transformada de Fourier (FT-Raman) ⁽³⁵⁾.

Na espectroscopia Raman com Transformada de Fourier utiliza-se como fonte de excitação um laser de Nd:YAG com comprimento de onda de 1064 nm, que mantém a maioria das bandas de absorção dos fluoróforos fora do espectro; um interferômetro de Michelson, onde são agrupadas as frequências do espalhamento Raman em um único sinal; e um detector de Ge que coleta vários comprimentos de onda em um curto período de tempo, sendo este refrigerado por nitrogênio líquido (Figura 2) ⁽³⁶⁾.

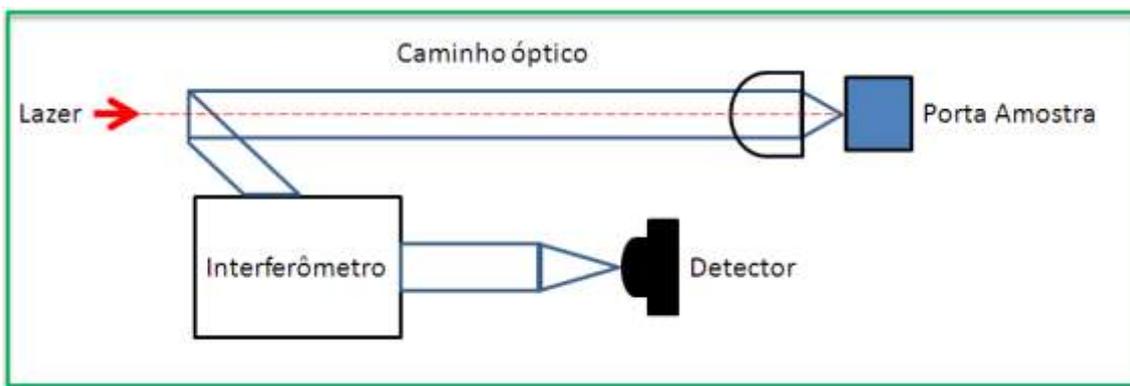


Figura 2 – Esquema do FT-Raman, adaptado de Manoharan (1996).

2 - Justificativa

Fusarium oxysporum tem sido abundantemente estudado na agricultura por seu potencial em causar doenças nos tecidos vegetais, nos quais são observados frequentemente, necrose e morte celular. Também é considerado patógeno emergente em humanos, responsável por causar infecções que variam sua intensidade de acordo com estado imunológico do paciente.

Pacientes, tanto imunocomprometidos, quanto imunocompetentes, com infecção causada por *Fusarium* apresentam comprometimento do sistema tegumentar, cuja característica clínica é a presença de lesões necróticas e/ou inflamatórias.

Entre os indivíduos atendidos no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas- LEPAC/UEM, as infecções por *F. oxysporum* se restringem a onicomicoses, todas elas com destaque para uma ampla resistência às drogas antifúngicas.

É possível que a resposta tecidual observada nas infecções por *Fusarium* na clínica médica esteja associada aos metabólitos que têm ação tóxica. Como resultado desta hipótese, o presente estudo investiga o efeito da aplicação de uma fração F1 obtida de um extrato metabólico de *Fusarium oxysporum* na pele de ratos saudáveis.

3 - Objetivos

Determinar, a natureza físico-química e efeito sobre a pele de ratos sadios, de uma fração (F1) de extrato metabólico de *Fusarium oxysporum* obtido de onicomicose.

3.1 Objetivos específicos

- Extrair uma fração F1 a partir do extrato bruto obtido de *Fusarium oxysporum* isolado de onicomicose;
- Estudar as alterações morfológicas decorrentes da aplicação intradérmica da fração F1 na pele intacta de ratos;
- Avaliar a distribuição de colágeno tipo I e III após a aplicação intradérmica da fração F1 na pele intacta de ratos;
- Avaliar a ocorrência de morte celular programada;
- Análise físico-química da pele através de Espectroscopia Raman com Transformada de Fourier.

4. Referências

1. Baran R, Tosti A, Piraccini BM. Uncommon clinical patterns of *Fusarium* nail infection: report of three cases. *British Journal of Dermatology*, 1997, 136: 424-427.
2. De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ - Atlas of Clinical Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira Virgili, Reus, Spain, 2000.
3. Nelson PE, Dignani MC, Anaissie EJ. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7: 479–504.
4. Lacaz CS, Porto E, Heins-Vaccari EM, Melo NT. Guia para Identificação: Fungos, Actinomicetos, Algas de Interesse Médico. São Paulo: Sarvier, 1998.
5. Nucci M, Anaissie E. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clin. Microbiol. Rev.* 2007; 20(4):695-704.
6. Comeau A. Emerging issues. Proceedings of the Canadian Workshop on *Fusarium* head blight, Nov. 28-30, Winnipeg, Canada, 1999; 26-27.
7. Cavalcanti LS, Coelho RSB, Perez JO. Utilização de dois métodos de inoculação na avaliação da resistência de cultivares e linhagens de feijoeiro a *Fusarium oxysporum* F.SP.phaeoli. *Cienc. Rural.* 2002; 32:1-5.
8. Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M. *Introductory Mycology*, New York: John Wiley & Sons Inc., 4ed. 1996.
9. Conková E, Lacioková A, Kovág G, Seidel H. Fusarial toxins and their role in animal diseases. *Vet. J.*, 2003; 165: 214-220.
10. Josephs RD, Derbyshire M, Stroka J, Emons H, Anklam E. Trichothecenes: reference materials and method validation. *Toxicol. Lett.* 2004 10;153(1):123-132.
11. Cavret S, Lecoer S. Fusariotoxin transfer in animal. *Food and Chemical Toxicology.* 2006; 44(3):444-453.
12. Ellend N. Mykotoxine in Österreich - Vorkommen, Effekte, Analytik, Gegenmaßnahmen. In: Proceedings of a Conference Mycotoxins in food and feed 15–17 June. Bydgoszcz, Poland pp. 95–100.
13. Smith T K, Seddon IR. Synergism demonstrated between *Fusarium* mycotoxins. *Feedstuffs.* 1998; 12:16.
14. Rotter, B. A., Prelusky, D. B. & Pestka, J. J. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *Journal of Toxicology and Environmental. Health*, 1996; 48:1–31.

15. Murphy PA, Hendrich S, Landgren C, Bryant CM. Food Mycotoxins: An Update. *Journal of Food Science*. 2006 1; 71(5): R51–65.
16. Dilkin N. Micotoxicose suína: aspectos preventivos, clínicos e patológicos. *Biológico*, 2002, 64 (2): 187-191.
17. Malekinejad H, Maas-Bakker R, Fink-Gremmels J. Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. *The Veterinary Journal*. 2006; 172(1):96–102.
18. Dilkin P, Mallmann C A. Sinais clínicos e lesões causadas por micotoxinas. *In: XI Encontro Nacional de Micotoxinas, Piracicaba. Anais... Piracicaba: USP- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004, 32-35.*
19. Pincelli TPH, Brandt HRC, Motta AL, Maciel FVR, Criado PR. Fusariose em paciente imunocomprometido: sucesso terapêutico com voriconazol. *An. Bras. Dermatol*. 2008; 83(4):331–4.
20. Dignani MC, Anaissie E. Human fusariosis. *Clinical Microbiology and Infection*. 2004 mar 1;10:67–75.
21. Stanzani M, Vianelli N, Bandini G, Paolini S, Arpinati M, Bonifazi F, et al. Successful treatment of disseminated Fusariosis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with the combination of voriconazole and liposomal amphotericin B. *Journal of Infection*. 2006; 53(6):e243–6.
22. Cocuroccia B, Gaido J, Gubinelli E, Annessi G, Girolomoni G. Localized Cutaneous Hyalohyphomycosis Caused by a *Fusarium* Species Infection in a Renal Transplant Patient. *J Clin Microbiol*. 2003;41(2):905–7.
23. Guilhermetti E, Takahachi G, Shinobu CS, Svidzinski TIE. *Fusarium* spp. as agents of onychomycosis in immunocompetent hosts. *International Journal of Dermatology*. 2007; 1;46(8):822–6.
24. Calado NB, Sousa F Jr, Gomes NO, Cardoso FR, Zaror LC, Milan EP. *Fusarium* nail and skin infection: a report of eight cases from Natal, Brazil. *Mycopathologia*. 2006;161(1):27–31.
25. Wihelmus KR - Review of clinical experience with microbiological keratitis associated with contact lenses. *Contact Lens Association of Ophthalmologists Journal*, 1987;13:211.
26. Strelow SA, Kent HD, Eagle RC, Colsen EJ - A case of contact lens related *Fusarium solani* keratitis. *Contact Lens Association of Ophthalmologists Journal*, 1992; 1:125-127.

27. Nucci M, Anaissie E. Cutaneous infection by *Fusarium* species in healthy and immunocompromised hosts: implications for diagnosis and management. *Clin. Infect. Dis.* 2002;35(8):909–20.
28. McLean M. The phytotoxicity of *Fusarium* metabolites: An update since 1989. *Mycopathologia.* 1996;133:163-179.
29. Bitar RA, Martinho HS, Tierra-Crioulo CJ, Ramalho NZ, Netto MM, Martin AA. Biochemical analysis of human breast tissues using Fouriertransform Raman spectroscopy. *J Biomed Opt.* 2006;11:1-8.
30. 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):R1-59.
31. Lindon JC, Tranter JE, Holmes JL. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry.* Amsterdã; Elsevier 2000. p 1993.
32. Stone N, Kendall C, Shepherd N, Crow P, Barr, H. Near-infrared Raman spectroscopy for the classification of epithelial pre-cancers and cancers. *J Raman Spectrosc.* 2002;33:564-73.
33. Ball, DW. Rayleigh and Raman scattering. *Spectroscopy.* 2001;16(2):28-31.
34. Silveira Jr, L. Correlação entre a técnica de espectroscopia Raman e a análise histopatológica das placas ateromatosas em artérias coronárias humanas. 2001, 109f. Tese (doutorado) – Departamento de Fisiopatologia experimental – Faculdade de Medicina da Universidade Estadual de São Paulo. São Paulo.
35. Alcântara, P. Espectroscopia Molecular. Curso Física Moderna II. Centro de Ciências Exatas e Naturais, Departamento de Física, Universidade Federal do Pará. 2002;1-5.
36. Hanlon EB, Manoharan R, Koo T-W, Shafer KE, Motz JT, Fitzmaurice M, et al. Prospects for *in vivo* Raman spectroscopy. *Physics in Medicine and Biology.* 2000;45:R1-R59.

CAPÍTULO II

Monitoramento morfológico e por espectroscopia Raman da pele de ratos após a aplicação intradérmica de uma fração de *F. oxysporum*.

Palavras-chaves: *Fusarium oxysporum*, pele, histopatologia, Raman.

Kátia Cristina Sabin¹, Terezinha Inez Estivalet Svidzinski², Mariana Cristina Vicente Umada Zapater¹, Thiago Honório Dutra da Silva¹, Luzmarina Hernandez¹.

¹ Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Ciências Morfológicas. Maringá, Paraná, Brasil

² Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Maringá, Paraná, Brasil

* Autor para correspondência: lhernandes@uem.br
Universidade Estadual de Maringá
Avenida Colombo 5790, Bloco H79, sala 108
Maringá, Paraná, Brasil. CEP: 87020-900
Telefone: (55) 44 30114706 Fax (55) 44 30114340

Resumo

Fusarium é um patógeno emergente com alta taxa de morbidade e mortalidade. Importante resposta tecidual é observada nos pacientes infectados e tem sido associada com a produção de metabólitos de ação tóxica. Nosso objetivo foi individualizar a fração majoritária do extrato metabólico bruto de *Fusarium oxysporum* e investigar seus efeitos na pele de ratos saudáveis. A fração F1 foi obtida por meio do cultivo de *F. oxysporum* em Czapek-Dox. Nos grupos tratados foi injetado, via intradérmica, fração F1 (0,5 mg / mL) e nos grupos controle (50 µl) de solução salina 0,9%. Os animais foram sacrificados 3, 6, 12 e 24 horas após a inoculação. A pele foi fixada para inclusão em parafina para obtenção de cortes histológicos e coradas com hematoxilina e eosina, avaliando resposta inflamatória; Sirius red, para a quantificação de colágeno; e TUNEL, para detectar células em apoptose. Amostra dos animais tratados foi analisada por espectroscopia Raman com transformada de Fourier. As reações teciduais foram classificadas e comparadas ao longo do tempo e tratamento. No grupo tratado a reação inflamatória atingiu um pico em 6 horas sendo classificada como moderada, com o infiltrado formado principalmente por neutrófilos. A coloração de TUNEL foi negativa. A área ocupada por colágeno tipo I e III no grupo tratado teve um ganho temporal. Houve alteração na área ocupada por amida I e nas razões das moléculas $-CH_2$ e $-CH_3$. É plausível supor que a fração F1 contenha elementos que contribuam para a invasão de *Fusarium* na pele, desestruturando a organização da matriz extracelular.

Abstract

Fusarium is an emerging pathogen with high morbidity and mortality. Important tissue response is observed in infected patients and has been associated with the production of metabolites of toxic action. Our goal was to individualize the major fraction of the crude extract of *Fusarium oxysporum* metabolic and investigate their effects on the skin of healthy mice. The F1 fraction was obtained by cultivation *F. oxysporum* in Czapek-Dox. In the treated groups was injected intradermally fraction F1 (0.5 mg / mL) and control (50 µl) of 0.9% saline solution. The animals were sacrificed 3, 6, 12 and 24 hours after inoculation. The skin was set for inclusion in paraffin to prepare histological sections and stained with hematoxylin and eosin, assessing inflammatory response, Sirius red for collagen quantification, and TUNEL to detect apoptotic cells. Sample of treated animals was analyzed by Raman spectroscopy with Fourier transform. Tissue reactions were classified and compared over time and treatment. In the group treated inflammatory reaction peaked at 6 hours was classified as moderate, with the infiltrate consisting mainly of neutrophils. TUNEL staining was negative. The area occupied by type I and III collagen in the treated group had a winning time. There were changes in the area occupied by the reasons amide I and molecules -CH₂ -CH₃. It is plausible that the fraction F1 contains elements that contribute to the invasion of *Fusarium* in the skin destabilized the organization of the extracellular matrix.

1. Introdução

Fusarium é um patógeno emergente devido ao crescente número de casos graves de pacientes infectados, com alta taxa de morbidade e mortalidade e também por sua ampla resistência às drogas antifúngicas¹. Pápulas eritematosas e nódulos com necrose central são frequentes na pele infectada por esse gênero². Importante resposta tecidual é observada nos pacientes, o que tem sido associado com a produção de metabólitos de ação tóxica³. Recentemente foi demonstrado o potencial efeito irritante de um extrato metabólico bruto de *Fusarium oxysporum* produzido *in vitro*, capaz de induzir reação inflamatória, resposta tecidual e morte celular programada na pele e tecido subcutâneo de ratos saudáveis⁴.

Entretanto ainda não é conhecido quais componentes desse extrato bruto seriam responsáveis pela resposta inflamatória e lesões necróticas encontradas neste estudo *in vitro*.

Historicamente o gênero *Fusarium* spp é conhecido pela importante capacidade de produzir micotoxinas: tricotecenos (desoxinivalenol, 3- acetildesoxinivalenol nivalenol, fusarenona-X, toxina T-2, diacetoxiscirpenol), zearalenona e fumonisinas^{5,6}. É possível que estes componentes sejam os responsáveis pelas reações observadas na pele de animais⁴ e de humanos³. Onicomicoses causadas por esse gênero mesmo em pacientes imunocompetentes são caracterizadas por lesões dolorosas, paroníquia, reação inflamatória e dor⁷. Adicionalmente, a onicomicose causada por *Fusarium* spp tem sido considerada uma das portas de entrada para infecções invasivas⁸, principalmente em pacientes imunocomprometidos como neutropênicos e transplantados³. Assim é oportuno investigar quais componentes extracelulares estão relacionados a essa resposta tecidual.

O presente estudo individualiza a fração majoritária do extrato metabólico bruto de *Fusarium oxysporum*, investiga os efeitos de sua administração na pele de ratos saudáveis e realiza a análise físico-química através de espectroscopia Raman com transformada de Fourier.

2. Material e Métodos

2.1. Isolado fúngico condições de cultivo

A amostra previamente selecionada de *F. oxysporum* foi isolada de um paciente portador de onicomicose, atendido no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil.

A amostra foi repicada em placa de Petri contendo ágar batata dextrose (Difco, Detroit, MI, EUA) e incubado durante 7 dias a 25 °C, três discos de 5mm dessa cultura foram colocados em frascos contendo 200 ml de meio Czapek-Dox⁹, com pH ajustado a 5.5 e, esterilizado a 120 °C por 20 minutos. Os frascos foram mantidos em estufa a 25 °C com agitação orbital a 70 rotações por minuto, por 15 dias.

Após este período, as culturas foram filtradas em papel de Whatman N.º 1, usando uma bomba de vácuo, para a remoção do micélio. A seguir o líquido bruto obtido do filtrado de cultura foi esterilizado a 120 °C por 20 minutos. O produto dessa filtração foi concentrado 10-20 vezes, por evaporação à vácuo em rotaevaporador R-210 (BUCHI Labortechnik AG, Flawil, Switzerland), a 40 °C, e dializado contra água destilada durante 48 horas em membranas de 14 KDa. Este extrato, denominado extrato bruto, foi mantido a 4 °C até o momento do uso. Paralelamente 100 ml de meio Czapek-Dox foi submetido às mesmas condições que o extrato bruto para ser utilizado como solução controle dos experimentos.

2.2. Obtenção da fração F1

O extrato bruto foi submetido à eletroforese de proteínas – SDS-PAGE em cuba de eletroforese BIO RAD Mini-PROTEAN Tetra System (Bio-Rad Laboratories Inc, California, USA) em gel de poliacrilamida a 12%, em eletroforese vertical, para separação das frações de acordo com peso molecular. Em seguida, o gel foi revelado com nitrato de prata para identificação das bandas e, a banda majoritária, denominada de fração F1, foi eluída em tampão de transferência (25 mM Tris, 192mM Glicina, 20% metanol, em pH 8.3) e usada com adjuvante completo para imunização de coelhos para a produção de anticorpos.

2.3 Obtenção do soro hiperimune contra a fração F1

Todos os experimentos envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá, sob protocolo número 005/2010, e parecer 080/2010.

Os anticorpos foram produzidos em coelhos da linhagem Nova Zelândia, obtidos na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI) da Universidade Estadual de Maringá. Dois coelhos com 4 meses, foram imunizados na região dorsal por via subcutânea com 100 µg de eluato contendo a Fração F1.

Após 15 dias, foi aplicado uma dose de reforço de 100 µl de eluato contendo a Fração F1 e ao final de 30 dias o sangue foi coletado por punção cardíaca. O experimento prosseguiu

por 3 meses, sendo injetadas alternadamente uma dose de reforço e uma coleta (20 ml de sangue). Ao término do experimento os coelhos foram eutanasiados com administração de uma associação de anestésicos: acepromazina (0,1 mg/kg), quetamina (0,15 ml/kg), midazolam (0,3 mg/kg) e fentanil (5 microgramas/kg). Após a perda dos reflexos, foi administrada uma dose de cetamina até parada cardio-respiratória. O soro dos animais foi aliquoteado e mantido a 4 °C.

2.4. *Obtenção dos anticorpos anti-fração F1*

Aproximadamente 20 ml de soro hiperimune dos coelhos foram precipitados com sulfato de amônio, a 33%, em banho de gelo, *overnight* a 4 °C. Em seguida, foi centrifugado, a 3000 g por 30 minutos e o sobrenadante desprezado. O precipitado foi suspenso lentamente, com 500 ml de tampão de acoplamento (tampão bicarbonato de sódio 0.1M pH8.3 acrescido de NaCl 0.5M) para montagem da coluna de afinidade. A concentração de imunoglobulinas foi estimada em espectrofotômetro UV-1650PC de 280nm (Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Germany).

2.5. *Purificação e isolamento da fração F1 por coluna de afinidade*

Foi resuspendida 0,28 g de resina Sefarose CNBr ativada em 10 ml de tampão de HCl 1mM, pH 3.0, colocada em um funil de placa porosa acoplado a uma bomba de vácuo e lavada com 200 ml deste tampão e em seguida lavado com 50 ml de tampão de acoplamento (bicarbonato de sódio 0.1M pH8.3 acrescido de NaCl 0.5M). O anticorpo previamente precipitado foi colocado nessa solução na proporção de 2 mg/ml de tampão de acoplamento e deixado agitando em *shaker* (Nova Ética, Curitiba, Brazil) *overnight* à 4 °C. Posteriormente, a resina juntamente com o anticorpo foram centrifugados e o sobrenadante desprezado. Em seguida foram lavados com tampão de acoplamento para a remoção dos ligantes inespecíficos. Os sítios remanescentes foram bloqueados com etanolamina 1M, pH 8.0 por 4 horas, sob agitação lenta à temperatura ambiente. A coluna foi lavada com 3 ciclos alternados de 5 ml de tampão ácido acético/acetato de sódio, 0.1 M, pH 4.0 contendo 0.5 M NaCl e 5 ml de tampão Tris-HCl, 0.1 M, pH 8 contendo 0.5 M NaCl. A coluna foi montada e armazenada em geladeira com PBS - azida.

O extrato bruto foi aplicado sobre a coluna de afinidade em circuito fechado com auxílio de uma bomba peristáltica por 4 horas. A seguir foi lavada com 30 ml PBS pH 7.2. A Fração F1 foi liberada por meio de um choque de pH com tampão glicina 50 mM com NaCl 150 mM pH 2.8, posteriormente balanceado com tampão Tris-HCl 1M pH 8. O eluato foi

coletado em várias frações de 1 ml e dosados com reativo de *bradford* para verificar em quais tubos estavam presentes a Fração F1. Posteriormente, as eluições foram monitoradas em gel de SDS-PAGE e coradas pela prata.

2.6. *Procedimento experimental*

Foram utilizados 32 ratos da linhagem Wistar, machos, pesando entre 150-200g. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno em número de 4 animais/caixa em ambiente com temperatura controlada de 22 ± 2 °C, 50% de umidade e ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à água e alimento.

Sob anestesia com tiopental (40 mg/kg), uma área de aproximadamente 1,5 cm² no dorso, próxima à região cervical de cada animal foi epilada dois dias antes da aplicação intradérmica das soluções testadas para evitar que a leve reação inflamatória decorrente da epilação interferisse com os resultados. Dezesesseis animais receberam uma injeção intradérmica de 50 µl de uma solução aquosa da Fração F1 contendo 0,5 mg/ml (concentração determinada a partir de avaliação preliminar dose/efeito), em cada animal do grupo experimental. Outros 16 animais receberam uma injeção intradérmica de 50 µl de solução salina 0,9% em cada animal do grupo controle. Os animais foram sacrificados por uma dose de anestésico em 3, 6, 12 e 24 horas (n= 4 para cada grupo/tempo) após a aplicação das soluções.

2.7. *Procedimento histológico e análise microscópica*

Amostras de pele foram coletadas e fixadas em solução de paraformaldeído 4% por 24 h e processadas para inclusão em parafina. Cortes semi-seriados, de 7 µm de espessura, foram processados para diferentes técnicas de coloração e analisados em microscópio óptico Olympus BX41 (Tokio, Japão) para os seguintes parâmetros.

2.7.1. *Reação inflamatória (hematoxilina-eosina)*

A avaliação do infiltrado inflamatório foi realizada na derme e tecido subcutâneo, verificando a morfologia celular. Reações teciduais foram classificadas como ausente, leve, moderada ou grave, e comparados estatisticamente ao longo do tempo. Os critérios de pontuação utilizados foram os seguintes: 0, ausência de inflamação; 1, inflamação leve (poucas células inflamatórias, principalmente polimorfonucleares); 2, inflamação moderada (aumento da reação inflamatória e presença de linfócitos); 3, inflamação grave (intensa reação inflamatória, presença de macrófagos e células plasmáticas).

2.7.2. Caracterização e análise morfométrica de fibras de colágeno (Sirius red staining.)

A análise do colágeno dermal foi realizada sob microscopia de luz usando polarização óptica¹⁰. As fibras de colágeno foram classificadas em tipo I ou III de acordo com sua birrefringência. Para a análise morfométrica da área ocupada por colágeno, imagens padronizadas de 40 campos de 0,2 mm² por animal foram capturadas com objetiva de 20X e digitalizadas pelo *software* de análise de imagem (*Image Pro Plus*, versão 4.5, *Media Cybernetics*, EUA). As imagens foram obtidas no mesmo dia para evitar qualquer variabilidade associada com a fonte de luz. As áreas marcadas foram identificadas e quantificadas automaticamente, e os resultados foram expressos como média (μm^2) \pm desvio padrão.

2.7.3. Detecção *in situ* de DNA fragmentado (TUNEL)

A fragmentação do DNA foi examinada usando um *kit* comercial para a detecção de apoptose (*ApopTag Peroxidase*, *Chemicon*, *Temecula*, CA, EUA). Após desparafinização e hidratação, os cortes foram submetidos à digestão enzimática com 20 μg / mL de proteinase K por 5 min, tratados com peróxido de hidrogênio 5% (30 volume) por 20 minutos para bloqueio da peroxidase endógena e lavado com tampão fosfato (PBS), 0,1 M, pH 7,4. Os cortes foram, então, imersos em um tampão de equilíbrio por 10 minutos e incubados com uma solução estoque de enzima deoxinucleotidil transferase terminal (TdT) a 37 ° C por 1 h. Os cortes foram lavados com PBS e incubadas com conjugado antidigoxigenina peroxidase e substrato da peroxidase e para detecção de células em apoptose, com coloração marrom. A contracoloração foi realizada com hematoxilina de Harris. A imunomarcação na epiderme e na derme foi classificada como ausente (-), fraca (+), moderada (++) ou forte (+++) com base na frequência de células marcadas.

2.7.4. Análise estatística

O *software* GraphPad Prism 3.0 (*GraphPad Software, Inc.*, La Jolla, CA, EUA) foi utilizado para análise estatística. Dados sobre a quantificação de colágeno foram analisados por testes não paramétricos com análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey, $p < 0,05$ para a comparação das médias e teste t para análise da proporção de colágeno III:I com $p < 0,05$.

2.8. *Análise físico-química da pele através de Espectroscopia Raman com Transformada de Fourier*

Para a análise físico-química da pele foi realizada a aplicação intradérmica da Fração F1 em 2 animais/tempo de sacrifício. Como controle foi utilizada a pele sem qualquer aplicação. Os animais foram mortos com sobredose de anestésico. A pele foi removida e encaminhada imediatamente para análise *ex vivo* em espectrômetro Raman, modelo *Vertex 70 FT-IR spectrometer coupled to a Ram II FT-Raman module* (©Bruker Optics, Ettlingen, Germany), no modulo FT-Raman. O experimento foi realizado com o laser em 200 mW e resolução espectral de 4 cm^{-1} , em um total de 300 *scans* por medida.

3. Resultados

3.1 *Estudo histológico*

3.1.1. *Avaliação histopatologia*

O exame microscópico revelou que os animais que receberam uma injeção intradérmica com a fração F1 de *F. oxysporum* apresentaram reação inflamatória que variou de leve a moderada observada principalmente na região do tecido subcutâneo (Figura 1). Na derme dos animais tratados observou-se a ocorrência de hiperemia e edema às 3 e 6 horas. A derme papilar e a derme reticular apresentaram fibroblastos com morfologia de células ativas às 6 horas.

A reação inflamatória às 3 horas foi leve, com predomínio de neutrófilos. Às 6 horas, as amostras apresentaram inflamação classificada como leve à moderada, com o infiltrado formado principalmente por neutrófilos e um pequeno número de linfócitos e mastócitos. Às 12 horas a reação inflamatória apresentou um grau leve e às 24 horas a pele e o tecido subcutâneo voltaram à normalidade (Figura 1). No grupo controle nem a pele nem o tecido subcutâneo apresentaram reação inflamatória. O escore de inflamação está representado na tabela 1.

3.1.2. *Análise da área ocupada por colágeno na derme*

Os resultados da análise histomorfométrica do colágeno dermal estão representados nas figuras 3a , b e c.

A área total ocupada por colágeno foi menor às 3 horas ($p < 0,05$) nos animais tratados com a fração F1 em comparação com o grupo controle (Figura 2a). Na análise da área

ocupada por colágeno tipo I e III, de modo geral, houve um ganho temporal na área dos colágenos I e III, após a aplicação da fração F1. Entre os animais do grupo controle as áreas não variaram.

Quando comparados ratos tratados com controles o colágeno tipo III apresentou uma área significativamente menor naqueles que receberam a fração F1. O colágeno tipo I apresentou área significativamente menor nos animais tratados com F1, somente no período de 3 horas (Figura 2b).

A Figura 2c mostra que a proporção de colágeno III:I diminuiu significativamente em todos os tempos nos animais tratados com a fração F1.

3.1.3. Detecção in situ do DNA fragmentado (TUNEL)

Não houve marcação para TUNEL.

3.2 Análise físico-química da pele através de Espectroscopia Raman com Transformada de Fourier

A Figura 4 mostra os espectros Raman na pele normal e após a aplicação intradérmica da fração F1 obtida de *F. oxysporum*.

4. Discussão

Fusarium oxysporum é a espécie do gênero mais frequentemente isolada de onicomicoses, assim como de infecções cutâneas e subcutâneas, endoftalmite, otite, sinusite, artrite, osteomielite e abscesso cerebral^{11, 12}. A fração F1 de *F. oxysporum* obtida neste estudo é uma mistura complexa, produzida como resultado do crescimento do fungo, envolvendo produtos do metabolismo, como os metabólitos secundários. Uma única aplicação intradérmica da fração F1 na pele de ratos provocou resposta biológica e alterações físico-químicas na derme e tecido subcutâneo, indicando que a fração F1 continha componentes capazes de se difundirem para os tecidos adjacentes provocando injúrias.

Após a administração da fração, observou-se uma resposta inflamatória que teve o seu maior pico de intensidade classificado como moderado, no tempo de 6 horas, sendo os neutrófilos o tipo celular predominante. Em estudo anterior demonstramos, nas mesmas condições experimentais deste trabalho, que uma única aplicação intradérmica do extrato bruto de *F. oxysporum*⁴ provocou uma resposta inflamatória mais exacerbada, com pico em 12 horas, o que sugere que durante o processo de obtenção da fração F1, os principais elementos responsáveis pela indução da inflamação tenham sido eliminados pois o processo

de diálise eliminou moléculas com *cut-off* abaixo de 12KDa a 16KDa, e além disso alguns elementos foram removidos quando o extrato foi submetido à separação de proteínas por eletroforese.

A análise prévia do extrato bruto de *F. oxysporum* em gel de eletroforese marcou uma banda com peso molecular de aproximadamente 50KDa, que corresponde à banda da fração F1. Esta informação indica que as moléculas presentes na fração tem peso inferior ou igual a 50KDa. Entretanto, deve-se considerar que durante a diálise para a obtenção do extrato bruto, aquelas moléculas com peso abaixo de 12KDa, como por exemplo os tricotecenos (250 a 500Da¹³), que reconhecidamente provocam reação tecidual, seja na forma de inflamação ou indução de morte celular programada^{14, 15}, também foram eliminadas, desta forma as moléculas presentes na fração F1 devem apresentar peso que varia de 16 a 50KDa e cuja efeito biológico, de acordo com os resultados deste trabalho, parece não incluir a indução da resposta inflamatória.

Os resultados da coloração por TUNEL reforçam esta hipótese já que não houve marcação TUNEL-positiva na pele injetada com a fração. Por outro lado a pele tratada topicamente (dado não publicado) ou injetada intradermicamente com o extrato bruto apresentou marcação na epiderme, derme e até no tecido subcutâneo⁴.

Várias toxinas produzidas por *Fusarium* agem de forma diferente quando elas ocorrem sozinhas ou em diferentes combinações. As toxinas butenolide (Bd), fusarenon X (FX) e a diacetoxiscirpenol (DAS), quando administradas topicamente e isoladamente, provocam degeneração tegumentar e infiltrado celular de grau leve, entretanto quando DAS é administrada em associação com FX ou com Bd a mesma resposta tecidual é intensificada, sugerindo um sinergismo entre estas substâncias¹⁶.

Fusarium é um fungo que produz toxinas com potencial para causar necrose cutânea. Embora neste estudo a fração F1 não tenha provocado uma resposta celular, houve alterações no componente colágeno da matriz extracelular da derme. Quando comparado com a pele tratada com salina, área ocupada por fibras do tipo I reduziu-se às 3 horas e aquelas do tipo III, em todos os tempos avaliados. Acreditamos que a menor área inicial das fibras colágenas possa ser decorrente da ação tóxica da própria fração que pode conter elementos produzidos para facilitar a invasão e permanência deste patógeno na pele.

Com a evolução temporal houve a recuperação (em relação à pele controle) das fibras tipo I, mas não das fibras do tipo III. Apesar disso, a área ocupada pelas fibras tipo III aumenta ao longo do tempo, indicando que está havendo síntese de colágeno. Esta hipótese é reforçada pela presença dos fibroblastos hipertóxicos às 6 horas e pelo aumento progressivo da

área total ocupada por colágeno (Figura 2a), sempre levando em consideração que a fração foi aplicada uma única vez.

A espectroscopia Raman é uma técnica óptica que fornece informações sobre os níveis vibracionais das moléculas, sendo amplamente utilizada em estudos analíticos, qualitativos e quantitativos. A partir desta técnica a estrutura molecular e a composição do material é codificada pelas alterações das frequências observadas através da mudanças do espalhamento da luz. Assim os espectros Raman também podem refletir as mudanças no entorno das moléculas, portanto, útil no estudo intra e intermolecular¹⁷⁻¹⁹.

As análises via espectroscopia Raman, mostram o surgimento de picos que indicam que a pele tratada com a fração F1 apresentou mudanças físico-químicas, diferentes do padrão observado na pele normal, isenta de qualquer produto. As bandas associadas à área ocupada por amida I evidenciaram mudanças estruturais em todos os períodos analisados após a aplicação da fração F1, detectadas no número de onda de 1640 - 1700cm⁻¹, que correspondem principalmente a vibração das ligações C=O^{20, 21}.

Na pele dos ratos tratados com a fração F1 a razão das moléculas -CH₂ e -CH₃ sofreu uma diminuição em relação à pele dos animais controle, porém, sofreu uma evolução ao longo do tempo. Fazendo um paralelo entre os resultados biológicos e físico-químicos deste estudo nota-se que a evolução das moléculas -CH₂ e -CH₃ se assemelha àquela observada na área total das fibras colágenas que são complexos poliméricos ricos em grupamentos metil.

Os fungos estão entre os organismos que ao longo do processo evolutivo conseguiram se manter na natureza graças ao seu potencial para aderir, invadir e se reproduzir no hospedeiro. Este sucesso é garantido por uma gama de moléculas produzidas pelas espécies com as mais diversas ações. Demonstramos neste estudo que a fração F1, o componente majoritário obtido a partir do extrato bruto de *F. oxysporum*, não foi capaz de induzir os mesmos eventos biológicos ou na mesma intensidade daqueles já estudados por nós anteriormente, ou seja, intensa resposta inflamatória e apoptose, entretanto é plausível supor que a fração F1 contenha elementos que contribuam para a invasão de *F. oxysporum* na pele, desestruturando a organização da matriz extracelular, pois parece ter sido capaz de agir sobre o colágeno e interferir na estrutura físico-química de moléculas orgânicas presentes na derme.

5. Referências

- 1 - Pincelli TPH, Brandt HRC, Motta AL, Maciel FVR, Criado PR. Fusariose em paciente imunocomprometido: sucesso terapêutico com voriconazol. *An. Bras. Dermatol.* 2008;83(4):331-334.
- 2- Cocuroccia B, Gaido J, Gubinelli E, Annessi G, Girolomoni G. Localized Cutaneous Hyalohyphomycosis Caused by a *Fusarium* Species Infection in a Renal Transplant Patient. *J Clin Microbiol.* 2003;41(2):905-907.
- 3 - Nucci M, Anaissie E. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clin. Microbiol. Rev.* 2007;20(4):695-704.
- 4 - Marangon AV, Svidzinski TIE, Salci TP, Meurer R, da Cruz Fernandes M, Hernandez L. Metabolic extract of *Fusarium oxysporum* induces histopathologic alterations and apoptosis in the skin of Wistar rats. *Int. J. Dermatol.* 2009;48(7):697-703.
- 5 - Josephs RD, Derbyshire M, Stroka J, Emons H, Anklam E. Trichothecenes: reference materials and method validation. *Toxicol. Lett.* 2004;153(1):123-132.
- 6 - Cavret S, Lecoer S. Fusariotoxin transfer in animal. *Food and Chemical Toxicology.* 2006; 44(3):444-453.
- 7 - Guilhermetti E, Takahachi G, Shinobu CS, Svidzinski TIE. *Fusarium* spp. as agents of onychomycosis in immunocompetent hosts. *Int. J. Dermatol.* 2007 1;46(8):822-826.
- 8 - Calado NB, Sousa F Jr, Gomes NO, Cardoso FR, Zaror LC, Milan EP. *Fusarium* nail and skin infection: a report of eight cases from Natal, Brazil. *Mycopathologia.* 2006;161(1):27-31.
- 9 - Silva GH, Oliveira DF, Campos VP. Purificação de metabólitos fúngicos com efeitos tóxicos sobre *Meloidogyne incognita*. *Fitopatol. bras.* 2002;27(6):594-598.
- 10 - Cuttle L, Nataatmadja M, Fraser JF, Kempf M, Kimble RM, Hayes MT. Collagen in the scarless fetal skin wound: Detection with Picosirius-polarization. *Wound Repair and Regen.* 2005 1;13(2):198-204.
- 11 - Ninet B, Jan I, Bontems O, Léchenne B, Jousson O, Lew D, et al. Molecular Identification of *Fusarium* Species in Onychomycoses. *Dermatology.* 2005;210:21-5.
- 12 - Romano C, Caposciutti P, Ghilardi A, Miracco C, Fimiani M. A case of primary localized cutaneous infection due to *Fusarium oxysporum*. *Mycopathologia.* 2010;170(1):39-46.
- 13 - Bigalke H, Rummel A. Medical aspects of toxin weapons. *Toxicology.* 2005;214(3):210-20.

- 14 - Nguansangiam S, Angsubhakorn S, Bhamarapavati S, Suksamrarn A. Effects of elephant garlic volatile oil (*Allium ampeloprasum*) and T-2 toxin on murine skin. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*. 2003;34(4):899–905.
- 15 - Nelson PE, Dignani MC, Anaissie EJ. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin. Microbiol. Rev.* 1994;7:479-504.
- 16 - T. N. Bhavanishankar, H. P. Ramesh, T. Shantha. Dermal toxicity of *Fusarium* toxins in combinations. *Arch Toxicol*. 1988;61:241-244
- 17 - Bitar RA, Martinho HS, Tierra-Crioulo CJ, Ramalho NZ, Netto MM, Martin AA. Biochemical analysis of human breast tissues using Fouriertransform Raman spectroscopy. *J Biomed Opt.* 2006;11:1-8.
- 18 - 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):R1-59.
- 19 - Zhu G, Zhu X, Fan Q, Wan X. Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2011;78(3):1187–95.
- 20 - Gniadecka M, Wulf HC, Mortensen NN, Nielsen OF, Christensen DH. Diagnosis of basal cell carcinoma by Raman spectroscopy. *J Raman Spectrosc*. 1997;28:125-9.
- 21 - Williams AC, Barry BW, Edwards HG, Farwell DW. A critical comparison of some Raman spectroscopic techniques for studies of human stratum corneum. *Pharm Res*. 1993;10:1642-7.

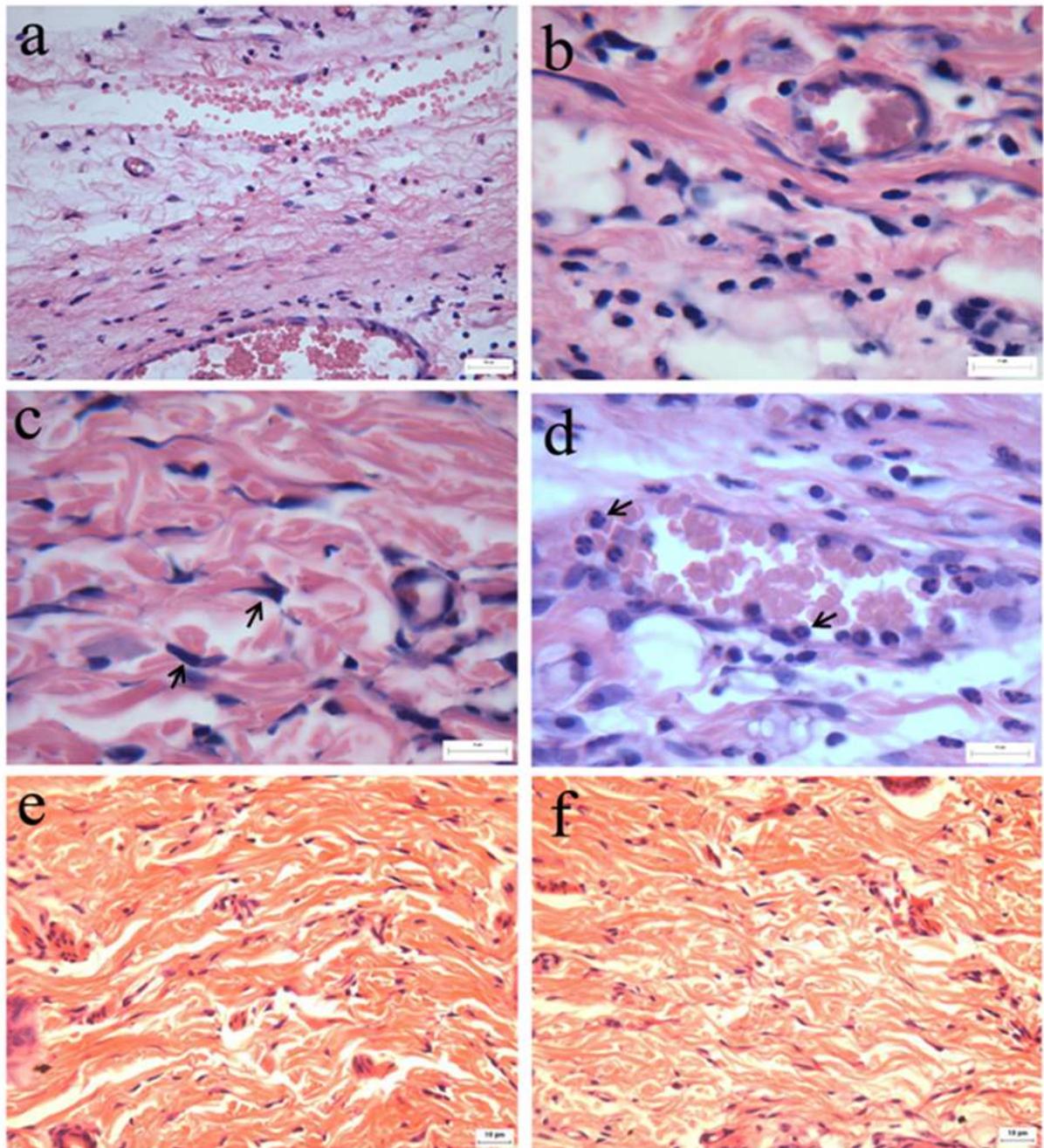
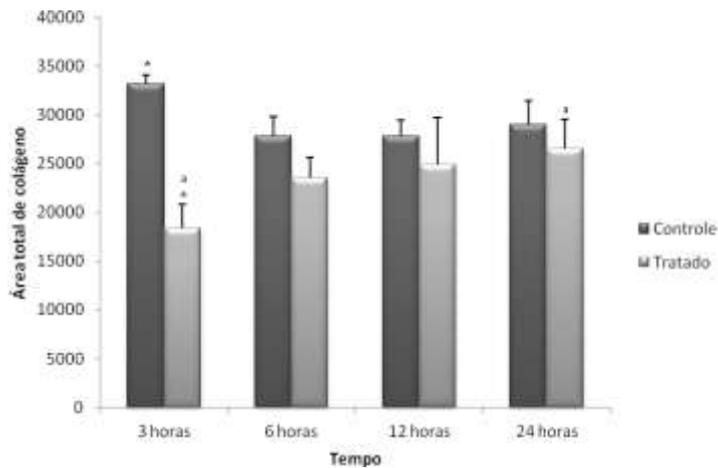


Figura1. Fotomicrografias da pele de ratos inoculados com fração F1 obtida de extrato metabólico de *Fusarium oxysporum* (0,5 mg / mL) às 3, 6, 12 e 24 horas. (a) Observe o infiltrado inflamatório leve em 3 horas; no período de 6 horas observar (b) infiltrado inflamatório moderado; (c) grande número de fibroblastos (seta) e (d) vasos hiperêmicos com uma grande quantidade de polimorfonucleares (seta); (e) às 12 horas observar a ocorrência de infiltrado inflamatório leve; e (f) às 24 horas a pele apresentou aspecto semelhante aos animais controle. Coloração de hematoxilina e eosina. Aumento original: objetiva de 20x (a); objetiva de 40x (e e f); objetiva de 100x (b, c e d).

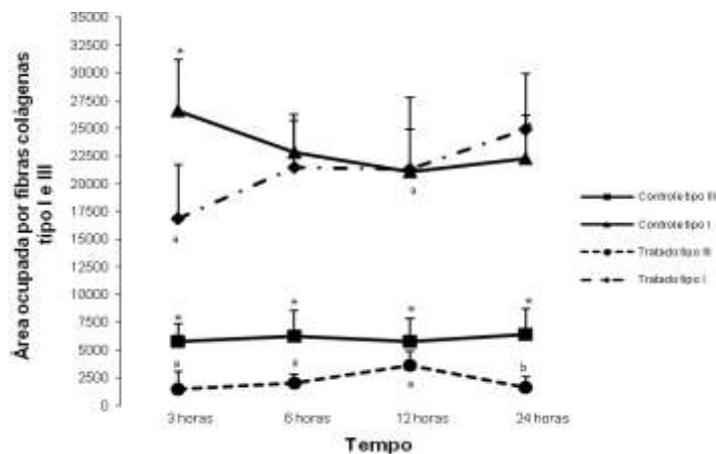
Tabela 1: Escore representando a frequência de células inflamatórias na pele 3, 6, 12 e 24 horas após a aplicação intradérmica da fração F1 obtida de *Fusarium oxysporum* ou de solução salina 0,9%.

	03 HORAS	06 HORAS	12 HORAS	24 HORAS
Solução salina	-	-	-	-
Fração F1	+	++	+	-

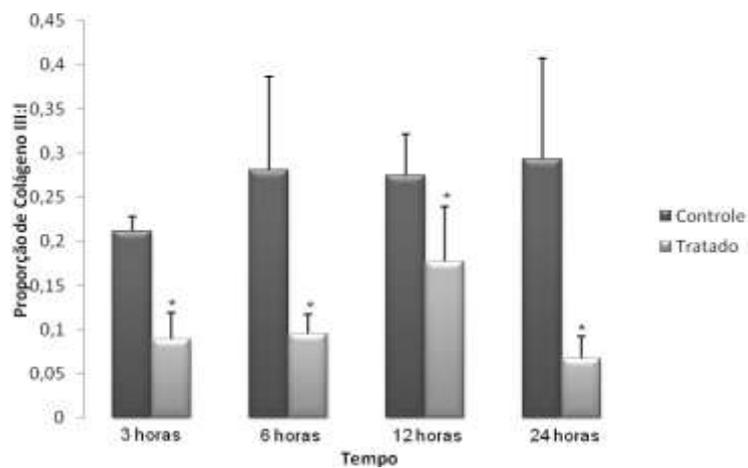
(-) ausência, (+) fraca, (++) moderada, (+++) intensa



(a)



(b)



(c)

Figura 2. Área (μm^2) ocupada colágeno total (a), por fibras colágenas do tipo I e tipo III (b) e proporção de colágeno III:I (c) na derme de ratos, 3, 6, 12 e 24 horas após a aplicação intradérmica de uma fração F1 obtida de *Fusarium oxysporum* ou de solução salina 0,9%. a e b representam diferenças estatísticas quando realizada a comparação entre os tempos do mesmo tratamento e * representa diferenças estatísticas entre grupo tratado e controle para cada tempo analisado. $P < 0,05$, $n = 4$ animais/tempo.

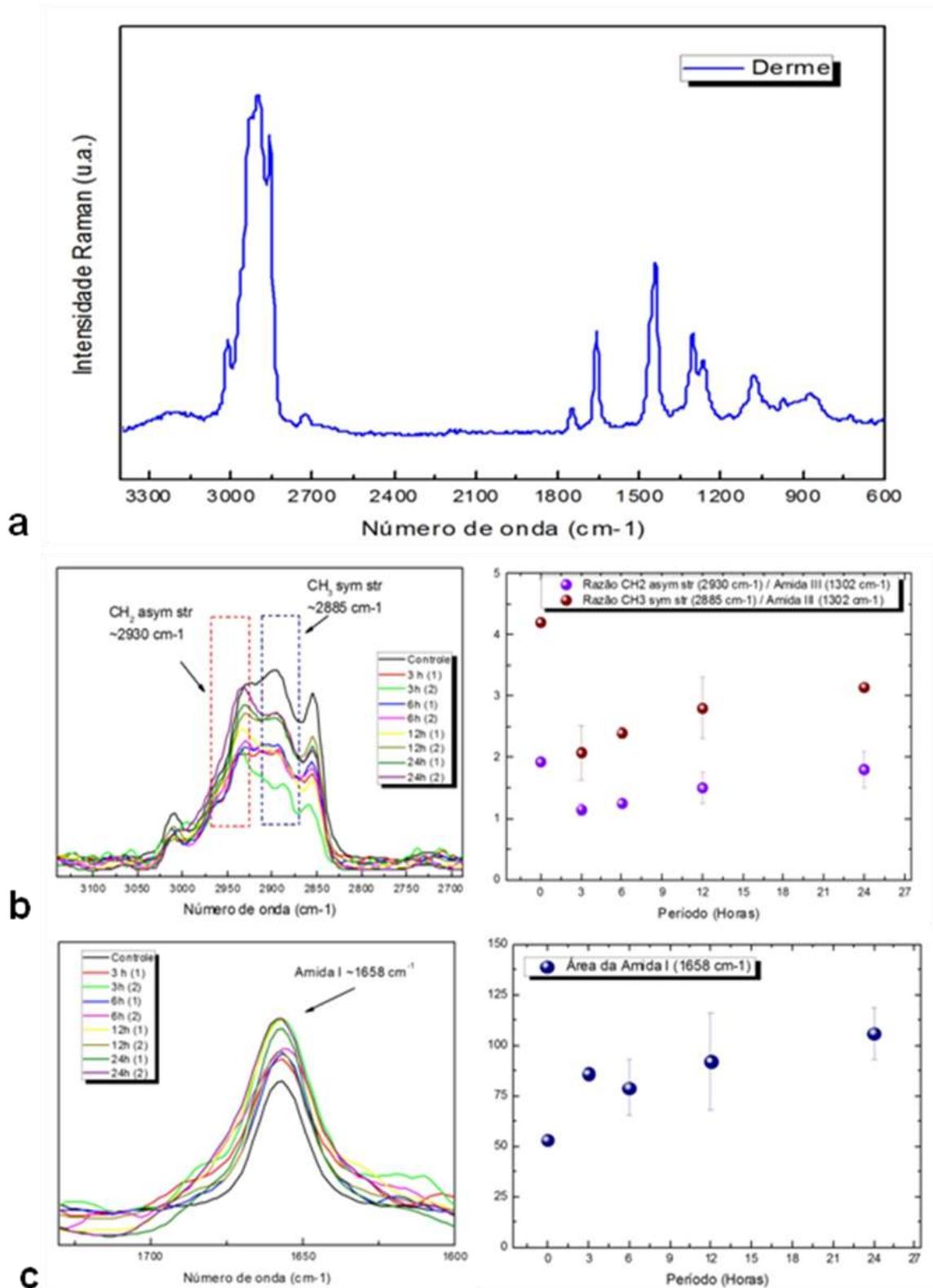


Figura 3. Espectro Raman obtido da face dermal (a) da pele de ratos Wistar; (b) da razão da molécula CH_2 (2930cm^{-1}) / amida III (1302cm^{-1}) e da razão de CH_3 (2885cm^{-1}) / amida III (1302cm^{-1}); (c) e da área ocupada pela molécula de amida I (1658cm^{-1}) às 3, 6, 12 e 24 horas após a aplicação intradérmica da fração F1 obtida de *F. oxysporum*.

CAPÍTULO III

Conclusões

O estudo realizado com a fração F1 obtida do extrato bruto de *Fusarium oxysporum* mostrou que esta fração majoritária, não foi capaz de induzir os mesmos eventos biológicos estudados por nós anteriormente, ou a mesma intensidade quando presente.

É plausível supor que a fração F1 contenha elementos que contribuam para a invasão de *Fusarium* na pele, desestruturando a organização da matriz extracelular e interferindo na estrutura físico-química de moléculas orgânicas presentes na derme.

Perspectivas Futuras

Para prosseguir com os estudos sobre o efeito biológico das micotoxinas de *Fusarium* na pele de ratos saudáveis, sugerimos as seguintes propostas:

1. Analisar a fração F1 em gel bidimensional;
2. Avaliar a composição físico-química do colágeno pela técnica de espectroscopia Raman com transformada de Fourier;
3. Analisar a pele de ratos saudáveis, após aplicação da fração F1, pela técnica de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR-*Fourier Transform Infrared*) para avaliar a composição físico-química comparando com a espectroscopia Raman com transformada de Fourier;
4. Utilizar marcadores imunohistoquímicos para inflamação;
5. Utilizar marcadores específicos para fibroblastos, a fim de, avaliar a atividade de síntese ou degradação do colágeno na pele de ratos após a aplicação intradérmica e tópica da fração F1.