



Universidade Estadual de Maringá

Pós-Graduação em Física

**Espectroscopia vibracional para avaliação *ex vivo*
da dinâmica das ações induzidas por fungos
patogênicos em tecidos biológicos**

Gutierrez Rodrigues de Moraes

Orientador: Prof. Dr. Mauro Luciano Baesso

Co-Orientadora: Prof. Dra. Luzmarina Hernandes

Maringá - PR

Março/2016



Universidade Estadual de Maringá

Pós-Graduação em Física

**Espectroscopia vibracional para avaliação *ex vivo*
da dinâmica das ações induzidas por fungos
patogênicos em tecidos biológicos**

Gutierrez Rodrigues de Moraes

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Física, área de concentração: Física da matéria condensada
Orientador: Dr. Mauro Luciano Baesso.

Maringá - PR

Março/2016

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

Morais, Gutierrez Rodrigues de Moraes

M827e Espectroscopia vibracional para avaliação ex vivo da
dinâmica das ações induzidas por fungos patogênicos em
tecidos biológicos / Gutierrez Rodrigues de Moraes.
- Maringá, 2016.
186 f.; Il. Graf.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Luciano Baesso.

Co-orientadora: Prof. Dra Luzmarina Hernandez

Tese (Doutorado em Física) - Universidade
Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas,
Departamento de Educação Física, Programa de
Pós-Graduação em Física.

1. Física da matéria condensada. 2. Fenômenos
fototérmicos. 3. Espectroscopia no infravermelho.
4. Espectroscopia fotoacústica. . I. Baesso, Mauro
Luciano, orient. II. Universidade Estadual de Maringá,
Centro de Ciências Exatas, Departamento de Física,
Programa de Pós-graduação em Física. III. Título.

535.012 21.ed.

AHS-001810
Cicilia C. Maria

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes de minha vida, pelo carinho, compreensão e estímulo, meus pais Daquimar e Jandira, minha esposa Nayana e minha filha Bárbara.

AGRADECIMENTO

Esta tese não seria possível sem a importante colaboração de algumas pessoas, agradeço em especial:

Primeiramente a Deus por mais esta bênção alcançada e pelo conforto encontrado nas orações durante os momentos difíceis.

Ao meu orientador, professor Dr. Mauro Luciano Baesso, por quem aprendi a ter imensa admiração. Sou muito grato por sua paciência, estímulo, conhecimento adquirido e principalmente pela confiança em meu trabalho.

À professora Dr^a. Luzmarina Hernandez, do Departamento de Ciências Morfológicas (UEM), à Professora Dr^a. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski, do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina (UEM), as mestre Edilaine Martins Moratto e Elaine Sciuniti Mansano, parceiras no trabalho com o *Paracoccidioides brasiliensis* e a mestre Kátia Cristina Sibin pela parceria no trabalho com o *Fusarium Oxysporum*. Agradeço por todo conhecimento adquirido durante este tempo de convívio e, sobretudo pelo crédito depositado em mim e pela afetuosa atenção.

À professora Dr^a. Francielle Sato por toda ajuda tanto nos experimentos quanto pela valiosa atenção e discussões. Jamais me esquecerei de todo esse carinho e amizade.

Aos amigos e amigas: Ana Claudia, Giselly, Gustavo, Leandro, Marcelo, Rogério, José Renato e Vitor, pela ajuda, companheirismo e apoio;

Aos Professores do Programa de Doutorado em Física por todo conhecimento e ensinamento. Obrigado pela paciência e disponibilidade para ensinar.

Aos Professores do GEFf pela colaboração, sugestões e importantes discussões.

A todos os funcionários do PFI-UEM, e em especial à Akiko e à Mônica;

À Capes, CNPq, FINEP, Fundação Araucária e UEM pelo apoio financeiro.

Muito obrigado a todos!

"Se vi mais longe foi por estar de pé sobre ombros de gigantes."

Isaac Newton

RESUMO

Neste trabalho a Espectroscopia FTIR com detecção fotoacústica (FTIR-PAS) e a Espectroscopia Raman foram utilizadas para estudar, em camundongos *Swiss*, a dinâmica das mudanças estruturais de tecidos, no pulmão e fígado, após infecção com *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), e na pele, após inoculação intradérmica de metabólitos produzidos por *Fusarium oxysporum*. O estudo histológico das amostras foi realizado para validação dos resultados. Os experimentos foram realizados *ex vivo* e foram avaliadas as alterações nas bandas de absorção óptica e de espalhamento Raman, no pulmão, no fígado e na pele, em função do tempo. O estudo foi dividido em quatro partes: 1ª) os espectros Raman de pulmões de camundongos *Swiss* infectados por Pb foram correlacionados à expressão temporal da glicoproteína gp43, à ocorrência de morte celular programada e às alterações morfológicas no órgão. As análises foram realizadas 1, 2, 4 e 8 semanas após a infecção. As bandas mostraram que a infecção foi mais intensa na 1ª e na 4ª semana, e a maior expressão de gp43 foi concomitante com a maior imunocoloração para TUNEL; 2ª) as alterações nos pulmões infectados com Pb foram avaliadas com a técnica FTIR-PAS. Os resultados mostraram que as mudanças nas bandas de absorção relacionam com alterações morfológicas, que foram dependentes do período de infecção; 3ª) a técnica FT-Raman foi utilizada para avaliação da paracoccidioidomicose no fígado de camundongos *Swiss* infectado com Pb. As alterações ocorreram nas regiões espectrais entre 1700-1530 cm^{-1} e 1370 - 1290 cm^{-1} , nos picos da fenilalanina e das moléculas CH_2 e CH_3 correlacionadas ao colágeno. A resposta dos tecidos foi caracterizada pelo desenvolvimento de granulomas organizados e infecção disseminada, com leveduras localizadas dentro dos macrófagos e hepatócitos isolados; 4ª) neste estudo as inoculações da fração F1 na pele de ratos saudáveis foram realizadas 3, 6, 12 e 24 horas após a aplicação de uma fração (F1) contendo metabólitos produzidos por *F. oxysporum*. As áreas ocupadas na derme dos colágenos tipo I e III aumentaram ao longo do período de infecção. Houve mudança na área da banda da amida I e naquela das moléculas CH_2 e CH_3 . Em conclusão, os resultados deste trabalho mostraram que as técnicas FTIR e Raman podem ser combinadas para avaliação da dinâmica das alterações nos tecidos biológicos sobre a ação de agentes patógenos, sendo promissoras para novas formas de diagnóstico de doenças.

ABSTRACT

In this work the FTIR technique with photoacoustic (FTIR-PAS) detection and the Raman method were used to study the dynamic of the structural changes in lung and liver tissues of Swiss mice submitted to inoculation of the *Paracoccidioides brasiliensis* fungus (Pb), and in the skin of rats intradermic inoculated by a fraction F1 of *Fusarium oxyporum*. Histological evaluation of the samples was performed to validate the results. The experiments were performed ex vivo and as a function of the infection period, evaluating the changes in both optical absorption bands and Raman scattering induced by these pathogens. The study was divided into four parts: 1^a) the Raman spectra of lungs of Swiss mice infected with Pb were correlated with the temporal expression of the gp43 glycoprotein, the apoptosis and the morphological changes. Analyses were performed after 1, 2, 4 and 8 of infection. The bands showed that infection was more intense in the 1st and 4th weeks, and gp43 expression was concomitant with most immunostaining for TUNEL. 2^a) changes in lungs infected with Pb were also evaluated with the FTIR-PAS technique. The results showed that changes in the absorption bands resulted from morphological changes, which were dependent on the infection period. 3^a) FT-Raman technique was used to evaluate the paracoccidioidomycosis in liver of Swiss mice infected with Pb. Changes occurred in the spectral region between 1700-1530 cm^{-1} and 1370-1290 cm^{-1} , the peaks of phenylalanine and CH_2 and CH_3 molecules of the collagen. The tissue response resulted in the development of granulomas with yeasts located within macrophages and isolated hepatocytes. 4^a) in this study F1 fraction inoculations were performed in the skin of healthy rats 3, 6, 12 and 24 hours after application of the fraction. The areas of collagens type I and III increased throughout the infection period. There were changes in the areas of the amide I and CH_2 and CH_3 bands. In conclusion, the present results show that the FTIR, FTIR-PAS and Raman techniques can be combined for evaluation of the dynamics of changes in biological tissues invaded by pathogens, being a promising new way of disease diagnosis.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivos	3
CAPÍTULO 2 - FUNDAMENTOS TEÓRICOS	5
2.1 Espectroscopia Vibracional	5
2.1.1 Espectroscopia no infravermelho	5
2.1.2 Espectroscopia Raman	9
2.2 Considerações Finais	14
CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES SOBRE AS AMOSTRAS E OS SISTEMAS ESTUDADOS.....	15
3.1 Estrutura do Pulmão.....	15
3.2 Estrutura do Fígado.....	17
3.3 Estrutura da Pele.....	19
3.4 Paracoccidioidomicose.....	20
3.5 <i>Fusarium oxysporum</i>	21
CAPÍTULO 4 - PROCEDIMENTOS E MONTAGENS EXPERIMENTAIS.....	23
4.1 Considerações iniciais.....	23
4.2 Pulmão e fígado de camundongos infectados com <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	23
4.3 Pele de rato inoculada com fração proteica de <i>Fusarium oxysporum</i>	25
4.4 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com detecção fotoacústica (FTIR-PAS)	26
4.5 Espectroscopia Raman por transformada de Fourier (FT-Raman)	28
CAPÍTULO 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1 Considerações iniciais.....	30
5.2 Espectroscopia FT-Raman de amostras de pulmão infectado com <i>Paracoccidioide brasiliensis</i> (Pb).....	32
5.3 Espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier com detecção fotoacústica de pulmão infectado com <i>Paracoccidioide brasiliensis</i> (Pb).....	41

5.4 Espectroscopia Raman de fígado de camundongos Swiss infectados por <i>Paracoccidioide brasiliensis</i> (Pb).....	49
5.5 Espectroscopia Raman de pele de rato com aplicação intradérmica da fração proteica de <i>Fusarium oxysporum</i>	57
CAPÍTULO 6 - CONCLUSÃO.....	64
CAPÍTULO 7 - REFERÊNCIAS.....	66
CAPÍTULO 8 - ANEXO.....	85

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a espectroscopia vibracional vem sendo cada vez mais empregada no estudo de tecidos biológicos, em especial porque os pesquisadores estão reconhecendo que estas técnicas têm potencial para serem ferramentas de diagnóstico de doenças com vantagens em relação aos métodos tradicionais. Os estudos têm proporcionado o desenvolvimento de diferentes técnicas espectroscópicas e de imagens voltadas para a detecção de doenças a partir da investigação das características estruturais de grupos funcionais presentes nos tecidos biológicos ^[1].

Estes métodos são promissores para diagnóstico clínico porque permitem detecção rápida de processos biológicos sem a necessidade de uso de reagentes ou preparo da amostra para a medida ^[2]. As alterações espectrais no infravermelho têm sido usadas para identificar fenômenos biológicos importantes, como a morte celular programada ^[3,4] e a identificação de células cancerígenas ^[5].

Neste trabalho foram realizados estudos utilizando as técnicas Espectroscopia Raman e Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com detecção convencional ou fotoacústica. No primeiro estudo as técnicas Raman e fotoacústica foram empregadas para avaliação de pulmão e de fígado de camundongos *Swiss* infectados com *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb). Este fungo é o principal agente da paracoccidioidomicose (PCM). É um fungo dimórfico térmico que apresenta a forma de micélio em 25°C e de levedura em 36°C ^[6]. Em forma de levedura pode se disseminar através do corpo do hospedeiro e parasitar tecidos mais profundos ^[7,8]. A ocorrência de leveduras dentro dos polimorfonucleares, monócitos e macrófagos mostra que ele pode sobreviver dentro das células ^[9]. A

paracoccidiodomicose é endêmica em regiões tropicais e subtropicais úmidas da América Latina, onde é considerada uma das micoses mais importantes. Ela representa a oitava causa de morte por doença infecciosa e tem a maior taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas [10-12].

O principal componente antigênico do Pb é uma glicoproteína de 43 kDa conhecida como gp43 [13]. Ela é sintetizada e transportada para a parede celular e então secretada para o meio [14]. Há evidências de que a gp43 participa na adesão, invasão e patogênese dos fungos [15], inibe a atividade de macrófagos, e contribui para o desenvolvimento de infecção em hospedeiros susceptíveis [16]. Além disso, a gp43 é o principal antígeno que é utilizado para o diagnóstico e prognóstico de PCM [17].

A via respiratória é a principal porta de entrada do fungo, que se estabelece inicialmente no pulmão e é disseminado por vias linfáticas ou hematogênicas, inclusive para outras regiões do organismo [18, 7,8]. No pulmão, o Pb induz a formação de granulomas [19] e fibrose [20,21], o que pode danificar sua arquitetura e conseqüentemente prejudicar a função respiratória. No caso do fígado, alguns estudos mostram que as enzimas do fígado são alteradas [22,23], indicando que a infecção pode perturbar a homeostase deste órgão. Vale lembrar que o diagnóstico de PCM natural é atualmente baseado na visualização direta do agente no tecido. Técnicas sorológicas têm sido propostas como uma alternativa [24,25].

Uma nova perspectiva para o diagnóstico de PCM tem sido considerada a partir da utilização de técnicas espectroscopias no infravermelho. Estes métodos permitem a caracterização de componentes moleculares e deformações estruturais resultantes da infecção. Estudos podem ser realizados *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo* [26]. Os métodos de espectroscopia vibracional permitem acelerar o diagnóstico de doenças e podem representar um avanço nas investigações experimentais de PCM [27,28]. Além disso, avaliar as propriedades físico-químicas dos tecidos de pulmão e de fígado infectados pode permitir a obtenção de informações sobre os mecanismos de ação que estes fungos utilizam para induzir alterações nos tecidos invadidos.

No segundo estudo a técnica Raman foi empregada para avaliação físico-química da pele de ratos saudáveis que foi tratado com uma fração de extrato bruto de *Fusarium oxysporum*. *Fusarium* é um patógeno que tem recebido atenção dos pesquisadores porque tem havido um grande número de casos de pacientes

infectados que apresentam altos níveis de morbidade e mortalidade. Um outro aspecto é sua forte resistência ao tratamento com drogas antifúngicas [29]. Pápulas eritematosas e nódulos com necrose central são frequentes na pele afetada por fungos [30].

Uma resposta significativa do tecido associada com a produção de ação tóxica tem sido observada em pacientes [31]. Foi demonstrado em estudo *in vitro* que o extrato bruto de *Fusarium oxysporum* é capaz de produzir irritação na pele e induzir resposta inflamatória. Além disso, foi recentemente demonstrado que este fungo pode provocar morte celular programada na pele e no tecido subcutâneo de ratos saudáveis [32]. No entanto, os componentes deste extrato bruto que são responsáveis por estes efeitos ainda não foram identificados. Historicamente, *Fusarium* é um gênero conhecido por sua capacidade de produzir micotoxinas que têm sido associadas à reações observadas na pele de animais [32] e de seres humanos. Portanto, é importante investigar quais os componentes extracelulares que são os causadores destas alterações nos tecidos infectados.

A infecção experimental de animais que são suscetíveis ao fungo em geral é capaz de mostrar o comportamento da doença. O uso da espectroscopia vibracional parece ser promissor neste tipo de estudo, uma vez que os espectros podem fornecer informações sobre as mudanças conformacionais de moléculas que constituem o sistema estudado. A possibilidade de estudos com os métodos de espectroscopia vibracional tanto *ex vivo* como em função do tempo de infecção, pode resultar em um método alternativo e importante para novos diagnósticos das doenças causadas por estes agentes, além de poder permitir avanços em termos do entendimento da dinâmica com que estes patógenos agem nos organismos vivos.

1.1 Objetivos

Os objetivos deste trabalho são:

- Utilizar a espectroscopia Raman e a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com detecção fotoacústica para avaliar a

dinâmica das mudanças estruturais de pulmão de camundongos *Swiss* infectado com *Paracoccidioides brasilienses*;

- Utilizar a espectroscopia Raman para análise da dinâmica das mudanças estruturais de fígado de camundongos *Swiss* infectados com *Paracoccidioides brasilienses*;
- Avaliar com a espectroscopia Raman a dinâmica das mudanças conformacionais da pele de ratos tratados com a fração do extrato bruto de *Fusarium oxysporium*.
- Correlacionar os resultados destas análises físico-químicas realizadas a partir dos dados obtidos pelas espectroscopias vibracionais com aqueles das análises histológicas.

Capítulo 2

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 Espectroscopia Vibracional

As espectroscopias de absorção e espalhamento na região do infravermelho são importantes ferramentas para o estudo de processos físico-químicos e biológicos. Elas permitem avaliação de compostos químicos, em qualquer estado físico, por meio de processos não destrutivos. Neste capítulo faremos uma breve descrição dos princípios básicos que caracterizam estas técnicas.

2.1.1 Espectroscopia no infravermelho

A região espectral do infravermelho compreende a radiação com número de onda no intervalo entre aproximadamente 12800 e 10 cm^{-1} . Por ser uma faixa espectral muito extensa, é dividida em infravermelho próximo (12800 - 4000 cm^{-1}), infravermelho médio (4000 - 200 cm^{-1}) e infravermelho longínquo (200 - 10 cm^{-1}) [33].

A região do infravermelho médio está relacionada principalmente com as transições vibracionais fundamentais, que envolvem o estado fundamental e o primeiro estado vibracional excitado. O infravermelho próximo corresponde à região onde são observadas as bandas correspondentes a modos resultantes das combinações entre as frequências fundamentais. As ligações envolvidas nesses modos de vibração são normalmente C-H, N-H e O-H.

A espectroscopia no infravermelho envolve essencialmente a interação entre fótons na região do infravermelho e os autoestados vibracionais da molécula, sendo

que a energia do fóton absorvido deve ser igual a diferença de energia entre dois autoestados com energias bem definidas: $h\nu = E_2 - E_1$.

A descrição do sistema em estudo é feita a partir do modelo de oscilador harmônico perturbado, considerando-se o meio como de natureza quântica que apresenta transições que envolvem níveis de energia vibracionais separados por $\Delta\nu = \pm 1$. Uma molécula poliatômica não linear com N átomos contém $3N-6$ graus de liberdade vibracionais. Porém, nem todos os modos normais de vibração resultam em transições vibracionais no espectro de infravermelho. As transições só ocorrem quando houver variação do momento de dipolo elétrico, ou seja, devemos ter:

$$\left(\frac{\partial\mu}{\partial Q_i}\right)_0 \neq 0 \quad (1)$$

em que Q_i é a coordenada normal associada ao i-ésimo modo normal da molécula.

Isto explica porque grupamentos moleculares tais como OH, C=O entre outros, dão origem a bandas intensas de absorção no espectro de infravermelho. Esses grupos apresentam ligações covalentes bastantes polarizadas que durante a transição vibracional, envolvendo estiramento ou deformação de ligações, dão origem a valores apreciáveis de $\partial\mu/\partial Q_i$, cujo quadrado é diretamente proporcional à intensidade da banda de absorção correspondente.

Para um modo vibracional ser ativo no infravermelho, no modo clássico, é necessário que haja variação no momento dipolar durante essa vibração. Em casos de moléculas diatômicas, a única coordenada normal do sistema condiz com a coordenada interna da ligação, Q. Então, expandindo o momento de dipolo em uma série de Taylor da coordenada Q para cada um dos componentes μ_x , μ_y e μ_z obtém-se a equação 2, expressa a seguir ^[34].

$$\mu = \mu_0 + \left(\frac{\partial\mu}{\partial Q}\right)_0 Q + \dots \quad (2)$$

Em que μ_0 é o vetor que representa o momento de dipolo permanente e a derivada é considerada na posição de equilíbrio.

Para pequenas vibrações, pode-se desprezar os termos de ordem superiores, uma vez que $\left(\frac{\partial \mu}{\partial Q}\right)_0$ terá valor desprezível. Para haver absorção no infravermelho, a condição de variação no momento de dipolo com vibração implica que o termo $\left(\frac{\partial \mu}{\partial Q}\right)_0$ seja diferente de zero para pelo menos umas das componentes μ_x , μ_y ou μ_z do momento de dipolo.

Utilizando a mecânica quântica, a transição entre dois estados caracterizados pelas funções de onda Ψ_m e Ψ_n (m para estado inicial e n para estado final), é descrita pelo momento de transição de dipolo μ_{mn} :

$$\mu_{mn} = \int \Psi_m \mu \Psi_n d\tau \quad (3)$$

Ou pelas componentes:

$$(\mu_x)_{mn} = \int \Psi_m \mu_x \Psi_n d\tau \quad (4)$$

$$(\mu_y)_{mn} = \int \Psi_m \mu_y \Psi_n d\tau \quad (5)$$

$$(\mu_z)_{mn} = \int \Psi_m \mu_z \Psi_n d\tau \quad (6)$$

O momento de transição pode ser entendido como a medida do dipolo associado com o movimento dos elétrons durante a transição entre os dois estados envolvidos. Os valores das integrais definem a intensidade da transição no infravermelho, que é proporcional a probabilidade de transição $|\mu_{mn}|^2$. Para que a transição seja permitida é necessário que pelo menos uma das integrais seja diferente de zero.

Considerando as equações 1 e 2, e reescrevendo os termos, a série de Taylor que descreve o momento de dipolo pode ser escrita como:

$$\mu_{mn} = \int \Psi_m \Psi_n d\tau + \left[\frac{\partial \mu}{\partial Q}\right]_0 \int \Psi_m Q \Psi_n d\tau \quad (7)$$

Pela ortogonalidade das funções de onda, a integral do segundo membro da equação é igual a zero e para que o segundo termo seja diferente de zero é necessário que as seguintes condições sejam satisfeitas: 1ª) $\left(\frac{\partial\mu}{\partial Q_i}\right)_0 \neq 0$ ou seja, deve haver variação do dipolo com uma pequena vibração na posição de equilíbrio; 2ª) $\int \Psi_m Q \Psi_n d\tau \neq 0$, para que esta integral seja diferente de zero o produto $\Psi_m Q \Psi_n$ deve ser uma função par. Como Q é uma função ímpar, é necessário que o produto $\Psi_m \Psi_n$ seja função ímpar, ou seja as funções devem ter diferentes paridades.

A regra de seleção para o oscilador harmônico é $\Delta v = \pm 1$, onde o sinal + vale para absorção e o sinal – para emissão e v é o número quântico vibracional.

Se consideramos apenas o modelo simples do oscilador harmônico, regra de seleção $\Delta v = \pm 1$, os espectros de absorção no infravermelho só apresentariam absorções associadas aos modos fundamentais. A observação destas outras transições pode ser explicada considerando a anarmonicidade elétrica, que no desenvolvimento da série do momento de dipolo leva em conta os termos adicionais, como pode ser observado na equação 8:

$$\mu = \mu_0 + \left(\frac{\partial\mu}{\partial Q}\right)_0 Q + \frac{1}{2}! \left(\frac{\partial^2}{\partial Q^2}\right) Q^2 + \dots \quad (8)$$

Para o aparecimento da primeira harmônica considera-se o termo quadrático da série de Taylor, para o da segunda considera-se o termo cúbico e assim por diante. Então são possíveis transições com $\Delta v = \pm 1, \pm 2, \pm 3$, etc.

A partir de 1960 ocorreu um grande avanço na tecnologia de instrumentos utilizados em espectroscopia de infravermelho com o desenvolvimento dos equipamentos interferométricos usando transformada de Fourier. Esses equipamentos apresentam alta relação sinal/ruído permitindo detecção de bandas de baixa intensidade e podem ainda permitir que medidas de absorção e de espalhamento Raman possam ser realizadas no mesmo instrumento. Além disso, permitem o registro, de uma só vez, de uma ampla região espectral.

2.1.2 Espectroscopia Raman

Um espectro Raman nos mostra, da mesma maneira que um espectro de absorção no infravermelho, um conjunto de transições vibracionais da molécula. O fato dos dois espectros, em geral, não serem idênticos, reflete a existência de diferentes regras de seleção, o que fica mais evidente no caso de moléculas com maior simetria.

No caso da espectroscopia Raman, além da regra de seleção geral $\Delta\nu = \pm 1$ válida dentro da aproximação harmônica, deve-se considerar a regra de seleção específica:

$$\left(\frac{\partial\alpha}{\partial Q_i}\right) \neq 0 \quad (9)$$

em que α representa a polarizabilidade eletrônica molecular.

Uma diferença essencial entre as espectroscopias infravermelho, eletrônica e Raman é que enquanto as duas primeiras envolvem a absorção ressonante de fótons, na última está envolvido o fenômeno de espalhamento inelástico de fótons. Portanto, as energias dos fótons incidente e fóton espalhado, individualmente, não são as diferenças de energia entre os auto-estados da molécula. Os casos que nos interessam aqui são os das transições vibracionais, rotacionais, eletrônicas, de spin, etc. Podemos então representar uma transição vibracional Raman de acordo com o esquema apresentado na figura 1.

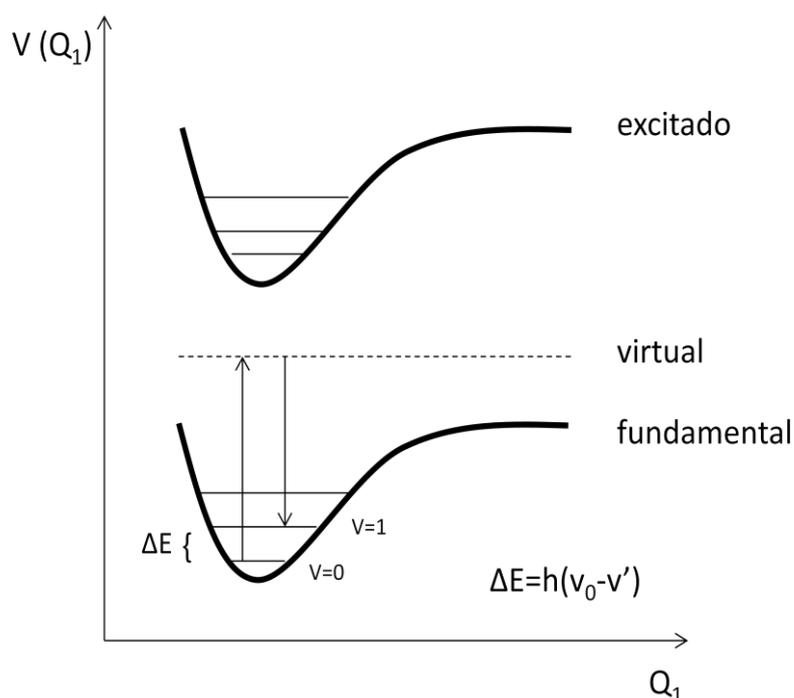


Figura 1: Transição vibracional (Raman).

É importante notar que o fóton incidente ($h\nu$) e o espalhado ($h\nu'$) não devem ser considerados separadamente, pois o espalhamento não pode ser considerado como um processo sequencial de absorção e emissão, que é o caso da fluorescência. A escala de tempo envolvida no espalhamento Raman é da ordem de femtosegundos (10^{-15} s), e isso implica que pela relação de incerteza $\Delta E \Delta t \geq \hbar$, a energia do chamado estado virtual (ou intermediário) não precisa satisfazer o princípio de conservação da energia. Esse estado recebe este nome exatamente por esta razão, ou seja, não corresponde a nenhum dos estados estacionários da molécula, na verdade o estado virtual é um auto-estado do sistema molécula + radiação. Nesse ponto é importante chamar a atenção para a importância central da polarizabilidade eletrônica do efeito Raman, que está ligada ao momento de dipolo induzido na molécula pelo campo elétrico da radiação.

No modo clássico, podemos considerar que o vetor do momento de dipolo induzido oscila com a sobreposição de frequências e pode ser escrito como sendo $\vec{P} = \alpha \vec{E}$, em que α corresponde à polarizabilidade da molécula e \vec{E} ao vetor campo elétrico. O momento de dipolo pode ser expandido em série de Taylor da coordenada interna Q , representada pela equação ^[34].

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{d\alpha}{dQ}\right)_0 Q + \dots \quad (10)$$

Considerando que a coordenada Q e o campo elétrico \vec{E} são descritos por:

$$Q = Q_0 \cos(2\pi\nu_v t) \quad (11)$$

$$\vec{E} = \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (12)$$

em que ν_v e ν_0 são, respectivamente, as frequências vibracional e da radiação incidente.

O momento de dipolo induzido pode ser reescrito então como sendo:

$$\vec{P} = \alpha_0 \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \left(\frac{d\alpha}{dQ}\right)_0 Q_0 \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \cos(2\pi\nu_v t) \quad (13)$$

Os termos de ordem superior podem ser desprezados para pequenas vibrações. Sabendo que $\cos(a)\cos(b) = 1/2[\cos(a+b) + \cos(a-b)]$, a equação anterior pode ser reescrita como:

$$\vec{P} = \alpha_0 \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \left(\frac{d\alpha}{dQ}\right)_0 Q_0 \vec{E}_0 \{ \cos[2\pi(\nu_0 + \nu_v)t] + \cos[2\pi(\nu_0 - \nu_v)t] \} \quad (14)$$

em que o primeiro termo corresponde ao espalhamento Rayleigh, o segundo ao espalhamento Raman anti-Stokes e o terceiro ao espalhamento Raman Stokes. Para que os dois últimos termos tenham contribuição é necessário que $\left(\frac{d\alpha}{dQ}\right)_0 \neq 0$, ou seja, que haja variação da polarizabilidade com a vibração.

Considerando o modelo clássico, as linhas Raman Stokes e anti-Stokes deveriam apresentar a mesma intensidade, mas observa-se na prática que as Stokes são mais intensas que as anti-Stokes. Para explicar este comportamento é necessário utilizar o modelo quântico.

Podemos introduzir uma expressão para a polarizabilidade semelhante à equação 2, utilizando a mecânica quântica, para o momento de transição de dipolo. Neste caso, o momento de transição de dipolo induzido, equação 15:

$$\alpha_{mn} = \int \Psi_m \alpha \Psi_n d\tau \quad (15)$$

A relação entre os componentes do momento de dipolo induzido e os componentes do campo elétrico são dadas por:

$$P_x = \alpha_{xx}E_x + \alpha_{xy}E_y + \alpha_{xz}E_z \quad (16)$$

$$P_y = \alpha_{yx}E_x + \alpha_{yy}E_y + \alpha_{yz}E_z \quad (17)$$

$$P_z = \alpha_{zx}E_x + \alpha_{zy}E_y + \alpha_{zz}E_z \quad (18)$$

Os componentes α_{ij} , que relacionam os dois vetores, formam um tensor simétrico no efeito Raman normal ($\alpha_{xy}=\alpha_{yx}$, $\alpha_{xz}=\alpha_{zx}$, $\alpha_{yz}=\alpha_{zy}$).

Para cada transição entre os estados vibracionais m e n são considerados os componentes $(\alpha_{ij})_{mn}$, em que i e j são x, y ou z. Para que haja atividade Raman é necessário que pelo menos um dos componentes das seis integrais $(\alpha_{ij})_{mn} = \int \Psi_m \alpha_{ij} \Psi_n d\tau$ seja diferente de zero.

Substituindo 15 em 7, tem-se:

$$\alpha_{mn} = \alpha_0 \int \Psi_m \Psi_n d\tau + \left(\frac{d\alpha}{dQ} \right)_0 \int \Psi_m Q \Psi_n d\tau \quad (19)$$

No espalhamento Raman Stokes e anti-Stokes, os estados vibracionais m e n são diferentes e a primeira integral do segundo membro é sempre igual à zero, pela ortogonalidade entre Ψ_m e Ψ_n . Para que o segundo termo seja diferente de zero é necessário que sejam satisfeitas duas condições: 1ª) $\left(\frac{d\alpha}{dQ} \right)_0 \neq 0$ ou seja, deve haver variação da polarizabilidade com a pequena vibração em torno da posição de equilíbrio; 2ª) $\int \Psi_m Q \Psi_n d\tau \neq 0$, para que esta integral seja diferente de zero o produto $\Psi_m Q \Psi_n$ deve ser uma função par. Como Q é uma função ímpar, é necessário que o produto $\Psi_m \Psi_n$ seja função ímpar, bem como, as funções devem ter diferentes paridades. A regra de seleção para o oscilador harmônico é $\Delta_v = \pm 1$, onde o sinal + vale para Stokes e o sinal – para anti-Stokes.

De acordo com a Lei de distribuição de Boltzman, a razão entre o número de moléculas no estado vibracional fundamental e no primeiro estado excitado pode ser definida pela equação 20 ^[35].

$$\frac{N_i}{N_j} = e^{\frac{-(E_i-E_j)}{kT}} \quad (20)$$

Em que i refere-se ao estado vibracional fundamental e j ao primeiro estado excitado. N corresponde à população em cada estado e E suas respectivas energias.

Lembrando que o espalhamento Stokes resulta da colisão do fóton com a molécula em seu estado vibracional fundamental. Isto significa que os valores da energia vibracional e as temperaturas normalmente utilizadas, garantem via distribuição de Boltzmann, uma alta taxa de população do estado fundamental em relação ao excitado, resultando assim em linhas Stokes mais intensas que as anti-Stokes.

A intensidade Raman depende de forma complexa da probabilidade de transição e da intensidade da fonte, podendo ser expressa por:

$$I_{mn} = \left(\frac{16\pi^2}{9c^4}\right) I_0 v^4 \sum_i \sum_j |(\alpha_{ij})_{mn}|^2 \quad (21)$$

Em que I_0 é a intensidade da fonte e v sua frequência.

Esta expressão mostra que quanto maior a energia do fóton incidente, maior será a intensidade da radiação espalhada. Portanto, o espalhamento Raman com excitação em 1064 nanômetros apresenta baixa intensidade em relação à excitação no visível. Esta dificuldade é superada pelo uso da espectroscopia por transformada de Fourier e pelo uso de detectores extremamente sensíveis no infravermelho próximo, como semicondutores de Germânio refrigerados com nitrogênio líquido.

Existem outras formas de se obter maior intensidade no espalhamento Raman, tais como os efeitos Raman ressonante e o efeito Raman intensificado por superfícies (SERS), os quais não serão descritos neste trabalho ^[36-38].

2.2 Considerações Finais

Neste capítulo apresentamos uma abordagem teórica da espectroscopia vibracional, na qual mostramos a relação das transições vibracionais das espectroscopias de absorção no infravermelho e do espalhamento Raman. Verificamos que os espectros de infravermelho e Raman são um conjunto de transições vibracionais da molécula, porém o que difere um do outro é a diferença na regra de seleção para obter os espectros. Na espectroscopia de infravermelho é necessária uma variação no momento de dipolo elétrico da molécula, possibilitando o sua conexão com o campo elétrico da radiação eletromagnética incidente. O efeito Raman envolve a interação do campo elétrico da radiação com a distribuição da nuvem eletrônica molecular, as respostas dos elétrons se manifestam por meio da polarizabilidade eletrônica.

Capítulo 3

CONSIDERAÇÕES SOBRE AS AMOSTRAS E OS SISTEMAS ESTUDADOS

As amostras estudadas nas espectroscopias infravermelho e Raman foram tecidos biológicos de pulmão, fígado e pele de animais cobaias fornecidos pelo Laboratório de Ciências Morfológicas da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

3.1 Estrutura do Pulmão

Os pulmões são órgãos responsáveis pela respiração dos mamíferos. Eles são pares de órgãos situados na cavidade torácica e estão separados um do outro pelo coração e por estruturas situadas no mediastino. Cada pulmão é dividido em lobos por uma ou mais fissuras. O pulmão esquerdo tem uma fissura oblíqua e dois lobos; o pulmão direito tem duas fissuras, oblíqua e horizontal, e três lobos (figura 2) [39].

Existem dois tipos de estruturas pulmonares, parênquima e estruturas não parenquimatosas. O parênquima pulmonar se assemelha a uma esponja, e ocupa 90% do volume pulmonar total. Estruturas não parenquimatosas consistem na árvore brônquica, vasos pulmonares, e septos interlobulares. As artérias pulmonares e brônquios correm juntos, alternados por veias pulmonares [40].

O parênquima pulmonar é composto por numerosas passagens de ar de finas estruturas distribuídas uniformemente. Essas estruturas são ductos alveolares e alvéolos. Os septos alveolares e pequenos vasos pulmonares ocupam 10% do volume total do parênquima, isto é, a densidade média do parênquima pulmonar é 0,1 g / ml [41].

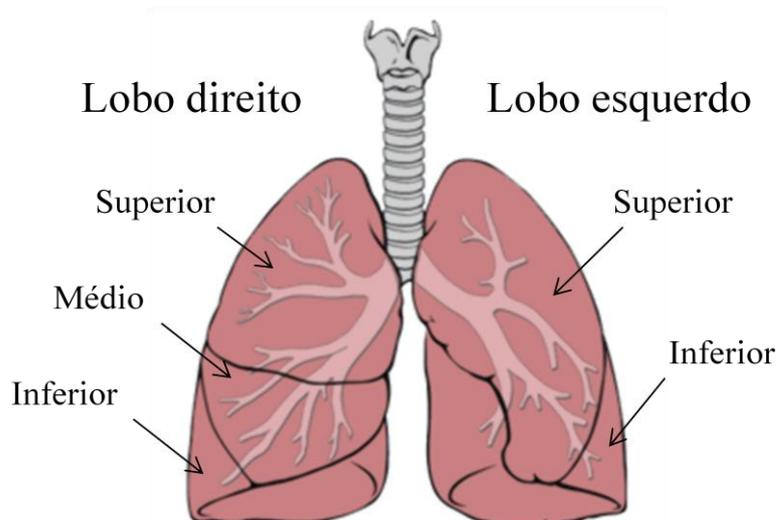


Figura 2: Esquema representativo da anatomia macroscópica do pulmão com seus lobos ^[39].

O septo interalveolar é uma membrana fina, e a forma global do alvéolo é poliédrica. Ao se observar o ducto alveolar na histologia, cada membrana do septo alveolar se parece como uma linha. A superfície interna da conduta alveolar é coberta por uma folha de alvéolos. A forma de cada entrada alveolar não é redonda, mas poligonal, como um favo de mel.

O bronquíolo respiratório é chamado de zona de transição, porque parte de sua parede é substituída por alvéolos. A distância a partir do bronquíolo respiratório para as estruturas mais próximas do septo do lóbulos secundário é sempre constante. Por exemplo, o bronquíolo respiratório é separado a partir da veia pulmonar por parênquima pulmonar. A distância entre os dois é mantida em aproximadamente 2 mm.

O componente estrutural importante do septo interalveolar é o capilar alveolar. Os leitos capilares são calculados para compreender 50% do volume do septo alveolar. O capilar alveolar é uma rede densa que consiste de um número de polígonos irregulares. De acordo com Weibel, 10% dos alvéolos entram em contato com as estruturas não parenquimatosas, tais como vasos pulmonares ^[42]. Certos alvéolos entram em contato com a veia pulmonar. Tais alvéolos não formam as folhas de duas camadas usuais de alvéolos. O septo interalveolar é uma parede alveolar de dupla face. A troca gasosa é possível em ambos os lados da parede alveolar de dupla face. Capilares alveolares são conectados a pequenos vasos pré-

capilares. Tais vasos ocupam parte do espaço intersticial limitado entre os ductos alveolares.

Há um rico suprimento sanguíneo das artérias brônquicas nos nódulos linfáticos hiliares e brônquios, bem como vasos comunicantes entre a veia pulmonar e o plexo venoso brônquico ^[43]. Veias brônquicas estão localizadas em torno de uma bainha arterial, que se comunica diretamente com a veia pulmonar adjacente. A veia pulmonar dá um pequeno ramo para as vias aéreas vizinhas. Esta rota especial pode ser responsável por espessamento peribrônquico, visto na condição anormal em que a pressão venosa pulmonar se eleva.

3.2 Estrutura do Fígado

A cor normal do fígado é castanha e a superfície exterior é lisa (figura 3a). O fígado é cerca de 2% do peso corporal. O fígado recebe seu suprimento de sangue de duas fontes: 80% são provenientes da veia porta hepática, que drena o baço e os intestinos; os 20% restantes, o sangue oxigenado, é fornecido pela artéria hepática. A veia porta é formada pela união da veia do baço e a mesentérica superior com a veia mesentérica inferior drenando a veia do baço. Na maioria dos casos, a artéria hepática comum é um ramo da artéria celíaca, juntamente com as artérias esplênicas gástricas. Ocasionalmente, a artéria hepática tem vasos acessórios que abastecem o fígado. O acessório ou artéria hepática direita é um ramo da artéria mesentérica superior proximal, enquanto o acessório ou artéria hepática esquerda é um ramo da artéria gástrica esquerda. Muitas variações anatômicas, no entanto, também podem existir na anatomia da artéria hepática ^[44].

Externamente, o fígado é dividido pelo ligamento falciforme em um lóbulo direito maior e um lóbulo esquerdo menor (figura 3a). O ligamento falciforme atribui o fígado a parede abdominal anterior. Sua base contém o ligamento redondo, que tem um remanescente da veia umbilical vestigial. Com base na classificação de Couinaud ^[45], o fígado é dividido em oito segmentos funcionais independentes (figura 2b). Cada segmento tem seu próprio pedículo portal que consiste no ramo da artéria hepática, ramo portal, e do ducto biliar com um ramo venoso hepático

separado que fornece saída. A numeração dos segmentos é no sentido horário. Segmentos II e III, que são conhecidos como os segmentos anterior e posterior do lobo esquerdo, respectivamente, também são conhecidos coletivamente como o segmento lateral esquerdo do fígado e do lobo esquerdo topográfico. Segmento IV é o segmento medial do lobo esquerdo. Segmentos II, III e IV coletivamente compõem o lóbulo funcional esquerdo do fígado. O lóbulo direito funcional do fígado é composto de segmentos V e VIII, os segmentos anterior e segmentos VI e VII, os segmentos posteriores. Segmento I, o lobo caudado, está localizado na parte posterior [46].

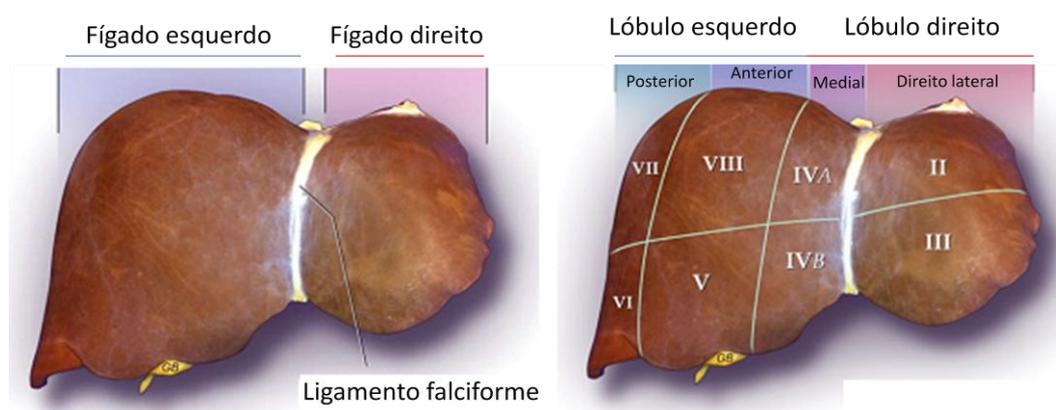


Figura 3: a) Anatomia morfológica do fígado; b) Anatomia Funcional do fígado [46].

A estrutura interna do fígado é feita de cerca de 100.000 unidades funcionais hexagonais pequenas conhecidas como lóbulos. Cada lóbulo consiste de uma veia central rodeado por 6 veias porta hepáticas e 6 artérias hepáticas. Estes vasos sanguíneos são conectados por muitos tubos capilares, chamados sinusóides, que se estendem a partir das veias e artérias do portal para atender a veia central como raios de uma roda. Cada sinusóide passa através dos tecidos do fígado contendo 2 principais tipos de células: células de Kupffer e hepatócitos. Os hepatócitos do fígado têm a tarefa de muitos dos trabalhos metabólicos importantes que suportam as células do corpo. Uma vez que todo o sangue que sai do sistema digestivo passa através da veia porta hepática, o fígado é o responsável pela metabolização de hidratos de carbono, lipídios e proteínas em materiais biologicamente úteis.

A função do fígado como um órgão do sistema imunológico ocorre por meio das células de Kupffer que revestem os sinusóides. Células de Kupffer é um tipo de macrófago fixo que forma parte do sistema de fagócitos mononucleares em conjunto

com os macrófagos baço e linfonodos. Células de Kupffer desempenham um papel importante a partir da captura e digestão de bactérias, fungos, parasitas, e os restos celulares. O grande volume de sangue que passa através do sistema portal hepático e o fígado permite que as células de Kupffer possam limpar grandes volumes de sangue muito rapidamente.

3.3 Estrutura da Pele

A pele é um órgão multifuncional muito complexo, resistente, flexível e bastante impermeável que, moldando e revestindo o corpo, o isola do meio exterior. Por sua inervação, vascularização e presença de neuromediadores, a pele é muito importante pelas inúmeras funções que desempenha, tais como: proteção, renovação e reparação, secreções sebáceas e sudoral, regulação da temperatura do corpo e absorção da radiação ultravioleta para a síntese de vitamina D ^[47].

Na composição química desse tecido o elemento mais importante é a água, com cerca de 70% da massa total. As substâncias de natureza proteica, como aminoácidos, proteínas (elastina, colágeno, melanina), azotados (ácidos graxos e uréia), representam 27,5% de seus constituintes químicos. Destacam-se ainda os lipídeos simples como o colesterol, lipídios complexos como as ceramidas e fosfolipídios e ainda os lipídios de reserva. Na pele também são encontrados sais minerais, principalmente, sódio, potássio, cálcio, magnésio, zinco, ferro, fósforo, enxofre e iodo ^[48].

Estruturalmente é constituída por duas camadas, uma externa, a epiderme, constituída por tecido epitelial e logo abaixo a derme, de natureza conjuntiva. Abaixo da derme está a hipoderme que apesar de ter a mesma origem da derme, não faz parte da pele, apenas serve de suporte e união com órgãos adjacentes, como mostra a figura 4 ^[48].

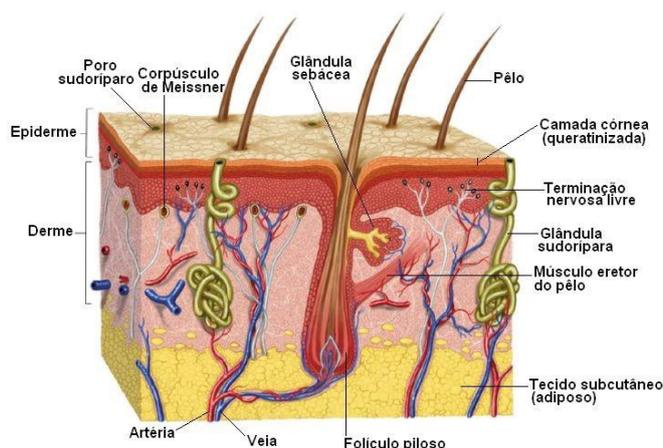


Figura 4: Representação das camadas e estrutura da pele e tecido subcutâneo ^[49].

A epiderme é constituída por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, formado por camadas sobrepostas de células sendo a mais comum os queratinócitos. Na epiderme também se encontram os melanócitos, que produzem a melanina, pigmento que confere cor a pele e absorve os raios ultravioleta (UV); as células de Langerhans, fagocitárias; e as células de Merkel, mecano-receptoras. A epiderme é um tecido avascular ^[49-51].

A derme, localizada abaixo da epiderme, é constituída por colágeno e elastina mergulhados em uma matriz extracelular vascularizada. O principal tipo celular da derme são os fibroblastos, mas também são encontrados macrófagos e outras células do sistema ^[49].

3.4 Paracoccidioidomicose

As doenças causadas por fungos são chamadas de micoses. As causadas por fungos essencialmente patogênicos são conhecidas como micose pulmonar ou sistêmica. A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica granulomatosa crônica de ocorrência endêmica no Brasil, cujo um dos agentes etiológico são os fungos *Paracoccidioides brasiliensis*. É um fungo assexuado, termodinâmico, que cresce a 37°C na forma de levedura. Na temperatura ambiente mostra-se na forma de finos filamentos septados que originam o micélio e cresce no solo como sapróbio permanente.

O homem se contamina ao perturbar micronichos do agente durante suas atividades no trabalho com a terra, ao inalar pequenos fragmentos de hifas ou conídios. Estes chegam aos alvéolos, e assim inicia-se a patogenia da doença representada, inicialmente, por área de alveolite inespecífica. Dependendo da quantidade de conídios inalados, do tempo de exposição e das condições imunológicas do indivíduo, haverá ou não a instalação da doença [52].

É considerada como a oitava causa de mortalidade por doença predominantemente crônica ou repetitiva entre as patologias infecciosas ou parasitárias, e a mais elevada taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas no Brasil. Sendo assim, a imunidade humoral vem sendo estudada em seres humanos e em animais de laboratório por sua associação com o aumento da disseminação da doença e a gravidade das manifestações clínicas [53].

A virulência pode ser estudada pela infecção experimental de animais susceptíveis ao fungo, para fins de diagnósticos, apresentando as mesmas características de cronicidade e generalização da doença observadas no homem. A influência da virulência de *Paracoccidioides ssp* na relação parasita-hospedeiro pode ser evidenciada pelas diferentes manifestações clínicas da PCM, incluindo padrão de formação do granuloma e órgãos envolvidos [54].

O pulmão é o órgão mais frequentemente acometido. A infecção causa severas modificações hemodinâmicas comprometendo anatomicamente o órgão. A doença é caracterizada por uma inflamação granulomatosa crônica e fibrose, que visam isolar o agente infectante.

3.5 *Fusarium oxysporum*

Espécies de *Fusarium* são responsáveis por infecções contagiosas graves com altas taxas de mortalidade, envolvendo geralmente pacientes com baixa imunidade. As lesões tegumentares causadas por *Fusarium* tendem a manifestar nodulares com necrose central. Em indivíduos imunocompetentes, as lesões tendem a ser localizadas e manifestam-se como ceratite e onicomicose, enquanto se mantém um padrão clínico que sugere uma resposta inflamatória [29,30].

A susceptibilidade única de cada indivíduo é um fator determinante no estabelecimento de infecções por *Fusarium*, mas também é evidente que este fungo possui seus próprios atributos que lhe permitem invadir os tecidos saudáveis, provocando reações inflamatórias e permitindo que ele se espalhe para outras áreas. Metabólitos, tais como enzimas líticas e substâncias tóxicas, conhecidas como micotoxinas, são relevantes entre os fatores de virulência de membros deste gênero. *Fusarium* pode produzir também fitotoxinas, antibióticos e pigmentos [31,32].

A patogenicidade dos metabólitos foi estudada em plantas, mas pouco se conhece acerca de seu mecanismo de ação em tecidos animais [55,56].

Em um estudo anterior demonstrou-se que o extrato bruto do *Fusarium oxysporum* induz uma resposta inflamatória e a morte celular programada na pele de rato saudável [57]. No entanto, o efeito de esterilização térmica sobre a atividade biológica do extrato não é conhecido. Portanto, estudamos os efeitos de metabólitos produzidos pelo *Fusarium oxysporum*, isolado a partir de onicomiose humana em ratos, por meio da comparação do extrato bruto.

Capítulo 4

PROCEDIMENTOS E MONTAGENS EXPERIMENTAIS

Os estudos físico-químicos e histológicos foram desenvolvidos em parcerias entre o o programa de pós-graduação em Física com o programa de pós-graduação em Biociências e Fisiopatologia da Universidade Estadual de Maringá.

4.1 Considerações iniciais

Neste capítulo será demonstrado como as amostras foram preparadas para a realização das medidas tanto com as espectroscopias IR e Raman, quanto para os ensaios histológicos.

4.2 Pulmão e fígado de camundongos infectados com *Paracoccidioides brasiliensis*.

Este estudo foi desenvolvido em parceria com as professoras Dr^a. Luzmarina Hernandez do Departamento de Ciências Morfológicas (UEM) e Dr^a. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski do Departamento de Biociências e Fisiopatologia (UEM) e com as mestres Edilaine Martins Moratto e Elaine Sciuniti Benites Mansano. O tema também fez parte da dissertação da referida mestre Edilaine Martins Moratto e da tese de doutorado de Elaine Sciuniti Benites Mansano.

Foi obtido um isolado de *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) da coleção do Departamento de Imunologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), e

cultivado em meio de cultura Fava Neto a 35°C, no laboratório de Micologia Médica da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Foram utilizados vinte e quatro camundongos machos da linhagem *Swiss*, com um peso médio de 30 gramas. Com a idade entre quatro e cinco semanas, os animais foram transferidos do Biotério Central de Animais da UEM para o Laboratório de Experimentação em Paracoccidiodomicose do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina 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 ao alimento.

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

Animais de ambos os grupos, infectados e controles, foram mortos após uma, duas, quatro e oito semanas da inoculação. Para o sacrifício aplicou-se uma sobre dose (três vezes maior que a usual de 40 mg/ kg) de tiopental sódico (Cristal Pharma BR) na veia caudal lateral. Os pulmões e os fígados foram removidos e fixados em solução de *para-formaldeído* 4% por 24 horas e processado para inclusão em parafina. Foram feitos cortes semi-seriados de 5 µm de espessura. Os cortes foram corados com H&E para avaliação histológica, com Gomori-Grocott para identificação do fungo e pelo método imunohistoquímico de detecção *in situ* da fragmentação do DNA (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated UTP nickend labelling*, TUNEL) para avaliação da morte celular programada, utilizando o *kit* comercial *ApopTag plus* peroxidase (Chemicon, Temecula CA, EUA). Este procedimento foi utilizado tanto para os experimentos com as amostras de pulmão quanto para as de fígado utilizadas nas medidas com a espectroscopia Raman e infravermelho, porém em datas diferentes.

4.3 Pele de rato inoculada com fração proteica de *Fusarium oxysporum*.

Este estudo foi desenvolvido em parceria com as professoras Dr^a. Luzmarina Hernandez e Dr^a. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski e com a mestre Kátia Cristina Sibin. O tema também fez parte da dissertação da referida mestre.

O cultivo do *Fusarium oxysporum* foi realizado no laboratório de ensino de análises clínicas da Universidade Estadual de Maringá, incubado durante 5 dias a 25°C em meio de Czapek-Dox, formando um extrato, conhecido como extrato bruto. A partir do extrato bruto foi retirada a fração F1.

Um total de trinta e dois ratos *Wistar*, machos, pesando entre 150 e 200 g, foram utilizados. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno com quatro animais por gaiola, a uma temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 50% de umidade, e um ciclo de 12h com claro-escuro, com livre acesso a água e comida.

Para evitar reação inflamatória, dois dias antes da aplicação da injeção intradérmica com as soluções testadas, depilou-se uma área de aproximadamente $3,5 \text{ cm}^2$ no dorso, próxima à região cervical. Isto foi feito sob anestesia com tiopental (40 mg / kg).

Um total de dezesseis animais receberam uma injeção intradérmica de 50 μl de solução aquosa contendo 0,05 mg / ml da fração F1 (a concentração foi determinada a partir da análise preliminar de dose / efeito) em cada animal, a partir do grupo experimental. Cada um dos 16 animais do grupo controle recebeu uma injeção intradérmica de 0,9% de 50 μl de uma solução salina. Os animais foram sacrificados por sobredosagem anestésica em 3, 6, 12 e 24 h (n = 4 para cada grupo / hora) após a aplicação das soluções. Em seguida as amostras da pele foram levadas ao laboratório de espectroscopia Raman para as análises.

4.4 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com detecção fotoacústica (FTIR-PAS)

A base de funcionamento desta técnica é o interferômetro de Michelson (Figura 6), contendo um espelho móvel e outro fixo. À medida que o espelho móvel se desloca, o divisor de feixe direciona o feixe para os dois espelhos, gerando uma diferença de caminho óptico para os feixes refletidos em ambos os espelhos, que ao atingirem o detector estarão em diferença de fase, originando assim um interferograma.

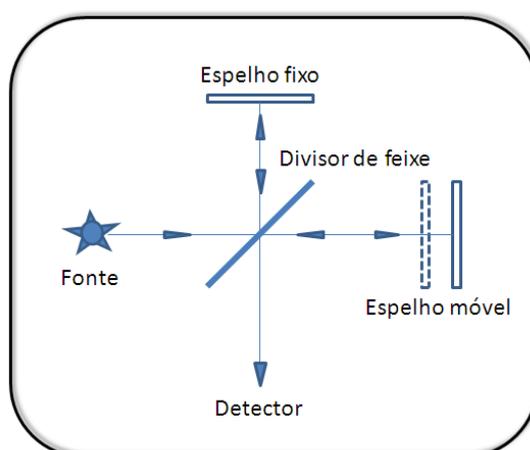


Figura 5: Modelo representativo do interferômetro de Michelson.

Nos espectrômetros de Transformada de Fourier, o espelho móvel do interferômetro oscila em relação a sua posição. No modo step scan, a velocidade do espelho é interrompida com determinada frequência de modulação e de amplitude. Desta forma, a modulação de fase do sinal fotoacústico é fornecida.

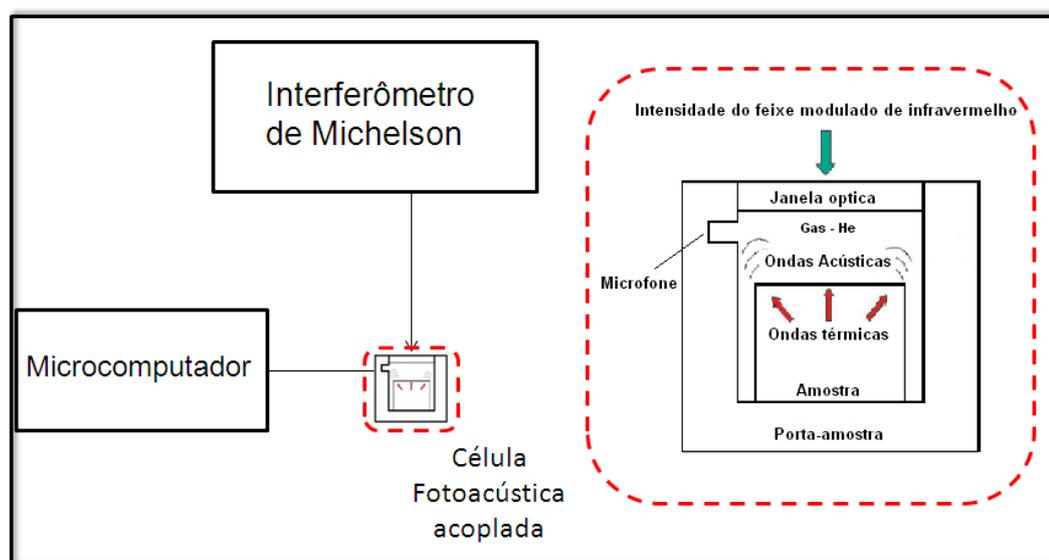


Figura 6: Representação esquemática da FTIR-PAS.

Uma transformada de Fourier converte o sinal obtido no domínio do tempo para o domínio de frequências. Como não se usam monocromadores em instrumentos FTIR, toda faixa de radiação chega simultaneamente na amostra com grande ganho de tempo, permitindo resoluções extremamente altas. O resultado de várias varreduras é combinado para melhorar a relação sinal/ruído. Desta forma, espectros com excelente resolução podem ser obtidos utilizando-se pequena quantidade de amostra ^[58].

A modulação do sinal fotoacústico é assegurada pelo processador de aquisição, que realiza uma transformada de Fourier, via software, originando um espectro (Figura 7) ^[59]. Quando as ligações químicas dos componentes da amostra oscilam nas mesmas frequências da radiação IR incidente, uma banda de absorção pode ser detectada ^[59-61]. O fato de que a técnica fornece uma modulação uniforme de frequência para todos os números de onda e, conseqüentemente, uma inspeção uniforme de profundidade, representa a vantagem mais importante deste método. Ele permite realizar perfil de profundidade na amostra.

4.5 Espectroscopia Raman por transformada de Fourier (FT-Raman)

Os espectrômetros FT-Raman utilizam um acessório que serve como uma unidade de recolhimento do espalhamento Raman. O feixe recolhido é então introduzido no interferômetro Michelson, como descrito na secção anterior. A vantagem desta abordagem é que ele permite que o mesmo instrumento sirva para múltiplas necessidades de ambas as medições de infravermelho e Raman (figura 7) [62].

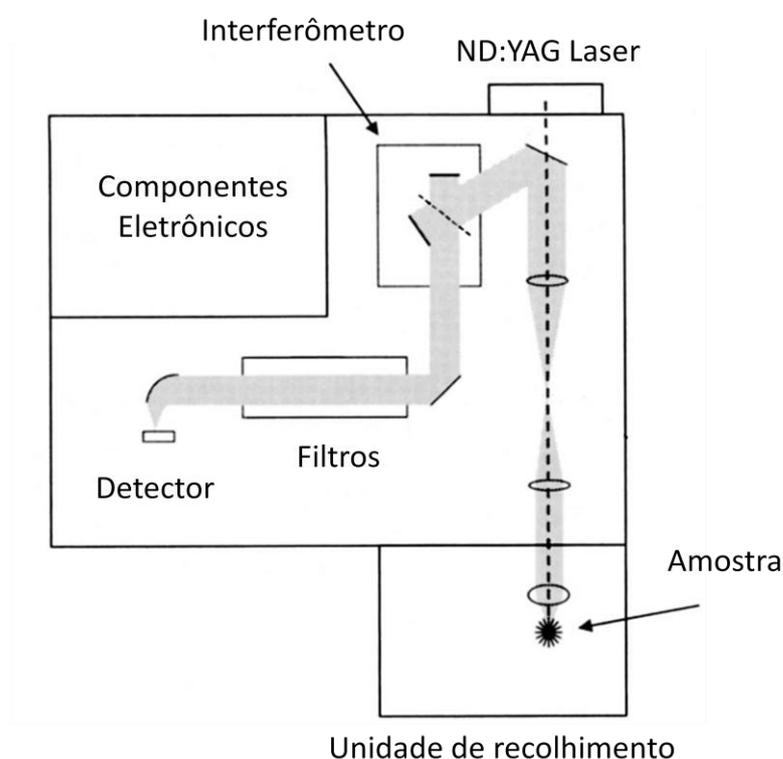


Figura 7: Diagrama de um sistema óptico de FT-Raman [62].

A configuração comum de um FT-Raman emprega uma onda contínua de um laser que normalmente é de Nd:YAG com emissão em 1064 nanômetros, com um coletor de espalhamento de 180° formado por lentes e espelhos. Vários filtros devem ser usados para rejeitar o espalhamento elástico da radiação e permitir a separação do espalhamento Raman da radiação incidente.

Os lasers que operam em 1064 nanômetros são os mais escolhidos para FT-Raman. Um Nd:YAG operando em 1064 nanômetros, por exemplo, fornece a minimização da fluorescência para a maioria dos sistemas, mantendo ao mesmo tempo a capacidade de funcionar com os detectores mais sensíveis, como InGaAs e germânio.

Depois de modulado pelo interferômetro, a luz difusa Raman é selecionada e detectada por meio de um detector GaAs de alta sensibilidade resfriado aproximadamente em 77 K. A maioria dos estudos espectroscópicos na área biológica concentraram-se na análise da região do espectro entre 3600 e 400 cm^{-1} .

Capítulo 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Considerações iniciais

Nos resultados a serem apresentados as espectroscopias FTIR com detecção fotoacústica e a Raman foram utilizadas para estudos da dinâmica das mudanças conformacionais de amostras de pulmão e de fígado de camundongos *Swiss* submetidos à inoculação do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) e ainda de amostras de pele de rato inoculadas via intradérmica por uma fração proteica do fungo *Fusarium oxyporum*. Os resultados espectroscópicos foram correlacionados com estudos histológicos para validação.

Este capítulo está dividido em quatro partes:

1ª) As alterações nos espectros Raman de pulmões de camundongos *Swiss* infectados por Pb foram correlacionadas com a expressão temporal da glicoproteína gp43, com a morte celular programada e com as alterações morfológicas. As análises foram realizadas nos períodos de uma, duas, quatro e oito semanas após a infecção. As alterações nos espectros Raman foram observadas nas regiões espectrais nas quais as bandas Raman podem ser associadas à fenilalanina, ao triptofano e ao grupo funcional Amida I. Foi realizado estudo imunohistoquímico para se detectar a gp43 e a possível presença de células em apoptose, o que foi feito com o teste TUNEL. Observou-se que a infecção foi mais intensa na 1ª e na 4ª semana, e a maior expressão de gp43 foi concomitante com a maior imunocoloração para TUNEL. A expressão da gp43 variou ao longo do período experimental e estas oscilações coincidiram com aquelas observadas na infecção e na ocorrência de apoptose. Os espectros Raman demonstraram as deformações ocorridas na

estrutura de algumas moléculas como consequência das alterações histopatológicas provocadas pelo fungo.

2ª) As alterações físico-químicas e morfológicas nos pulmões de camundongos *Swiss* infectados com Pb foram avaliadas com a técnica FTIR-PAS. As análises também foram realizadas após 1, 2, 4 e 8 semanas de inoculação do fungo. Os cortes histológicos foram novamente realizados para identificação da imunocoloração do fungo e para a detecção da possível ocorrência de morte celular programada. Os resultados mostraram que os pulmões infectados por Pb apresentaram mudanças estruturais que variavam de acordo com o período de tempo analisado, e que as mudanças nas bandas de absorção de diferentes grupos funcionais correlacionam com as alterações morfológicas. Os resultados sugerem ainda que a combinação de espectroscopia FTIR-PAS com a avaliação morfológica é um procedimento eficaz para o estudo da paracoccidiodomicose.

3ª) A técnica FT-Raman foi utilizada para avaliação da paracoccidiodomicose no fígado de camundongos *Swiss* infectados com Pb. As principais alterações físico-químicas do fígado infectado ocorreram nas regiões espectrais entre $1700-1530\text{ cm}^{-1}$ e $1370 - 1290\text{ cm}^{-1}$, por meio de um deslocamento do centro do pico atribuído à fenilalanina e pelas variações das áreas das ligações das moléculas CH_2 e CH_3 do grupo funcional colágeno. A resposta dos tecidos foi caracterizada pelo desenvolvimento de granulomas organizados e infecção disseminada, com leveduras localizadas dentro dos macrófagos e hepatócitos isolados. A molécula gp43 foi distribuída por todo o parênquima hepático e apresentou comportamento semelhante em todos os períodos observados.

4ª) Neste último estudo foram avaliadas as alterações nos espectros de Raman da derme de animais inoculados por uma fração proteica do fungo *Fusarium oxysporum*. As inoculações da fração F1 em ratos saudáveis via intradérmica foram realizadas nos períodos de 3, 6, 12 e 24 horas, após a aplicação da primeira fração. Esta fração F1 foi obtida a partir do cultivo de *Fusarium oxysporum* em Czapek-Dox. As áreas ocupadas por colágenos tipos I e III aumentaram ao longo do período de tempo após os animais terem sido submetidos à aplicação da fração proteica obtida

a partir do crescimento (F1). Houve mudança na área ocupada pela amida I e ainda nas ligações moleculares de CH_2 e CH_3 .

5.2 Espectroscopia FT-Raman de amostras de pulmão infectado com *Paracoccidioide brasiliensis* (Pb)

A figura 8 mostra o espectro FT-Raman de pulmão de camundongo *Swiss* sem a inoculação do Pb. Os máximos das bandas de espalhamento Raman e os respectivos grupos funcionais associados estão mostrados na tabela 1.

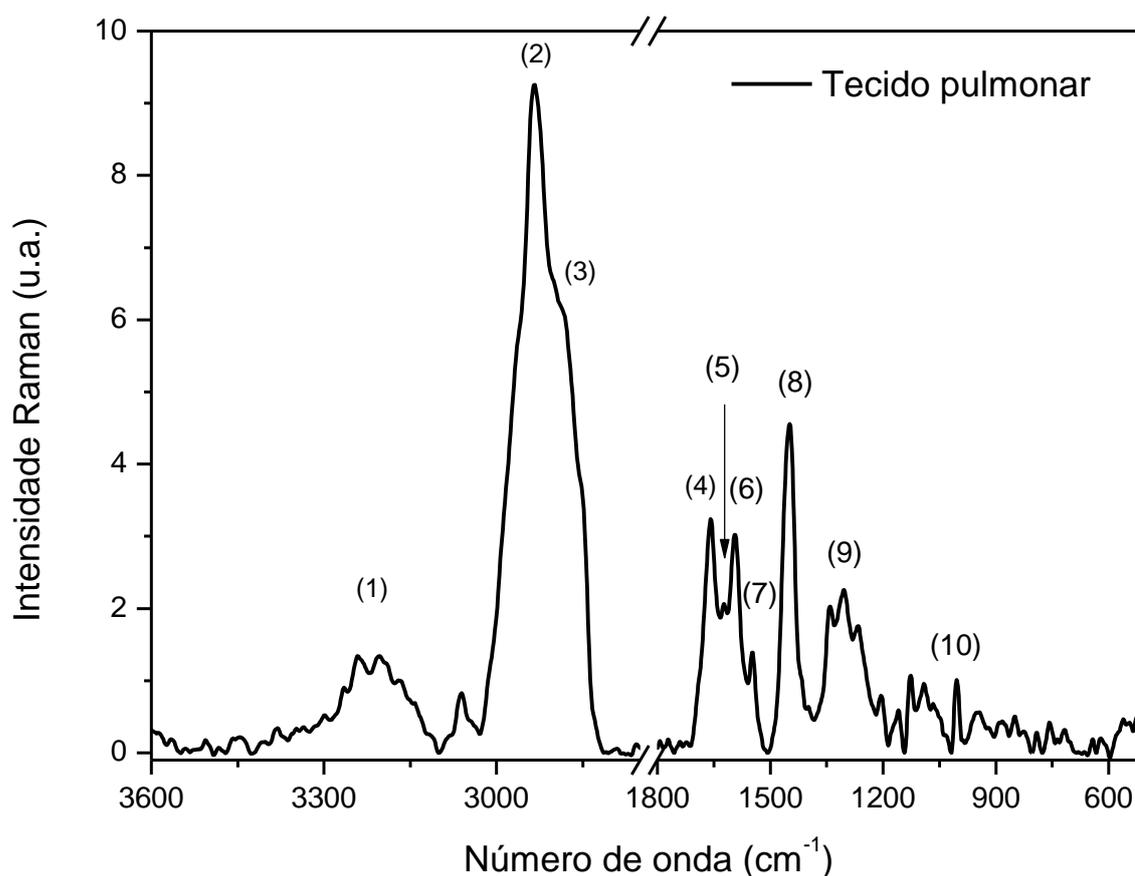


Figura 8: Espectro de FT-Raman do pulmão de camundongo *Swiss* controle.

O pico em 3200 cm^{-1} corresponde à amina e N-H livres, enquanto que os picos em 2935 e 2880 cm^{-1} podem ser associados à vibração de alongamento das ligações de CH_2 antissimétrico e CH_3 simétrico, respectivamente. Em 1660 cm^{-1} tem-

se a banda relacionada ao grupo funcional Amida I, e em 1620, 1590 e 1550 cm^{-1} aquelas atribuídas às vibrações de alongamento dos aminoácidos tirosina, fenilalanina e triptofano, respectivamente. A fenilalanina pode também contribuir para a formação do pico em 1004 cm^{-1} . Em 1450 e 1300 cm^{-1} tem-se contribuição da vibração de flexão da ligação de CH_2 simétrico, além de vibração de deformação do mesmo, respectivamente.

A figura 9 mostra os espectros de amostras do pulmão controle e após 1^a, 2^a, 4^a e 8^a semanas de infecção com Pb. Os espectros são uma média de três medidas de cada grupo de amostras em cada semana e foram normalizados em relação ao pico em 1300 cm^{-1} , que é associado à vibração de deformação de CH_2 .

As análises foram feitas considerando-se as alterações do pico em 1660 cm^{-1} , associado ao grupo funcional amida I, dos picos associados aos aminoácidos em 1620 cm^{-1} , da tirosina em 1590 cm^{-1} e da Fenilalanina e do triptofano em 1550 cm^{-1} .

Tabela 1: Energias dos picos máximos das bandas FT-Raman e os possíveis grupos funcionais associados.

Número do Pico	Posição do pico (cm^{-1})	Atribuição
1	3200	Amina, N-H; Proteínas ^[63] .
2	2935	CH_2 (antissimétrico); Proteínas e Lipídios ^[63] .
3	2880	CH_3 (simétrico); Proteínas e Lipídios ^[63] .
4	1660	Amida I; Proteínas ^[64,65] .
5	1620	Tirosina; Aminoácidos ^[64,65] .
6	1590	Fenilalanina; Aminoácidos ^[64,65] .
7	1550	Triptofano, Aminoácidos ^[64,65] .
8	1450	CH_2 , Proteínas e Lipídios ^[63] .
9	1300	CH_2 , Lipídios ^[63] .
10	1004	Fenilalanina; Aminoácidos ^[63] .

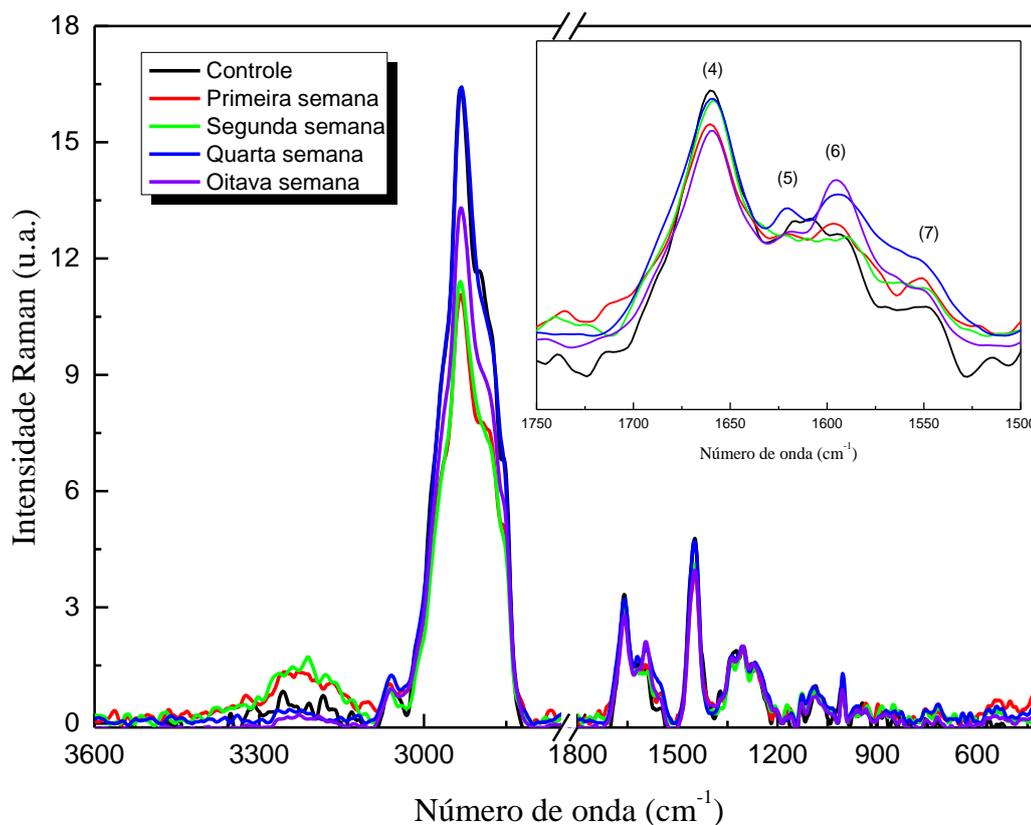


Figura 9: Espectros FT-Raman do pulmão de camundongo Swiss infectado com Pb após 1, 2, 4 e 8 semanas.

O comportamento pós inoculação do Pb no pulmão foi avaliado por um período de oito semanas. A presença do fungo, sua localização no parênquima pulmonar e a resposta do tecido à infecção foram determinadas por meio de técnicas histológicas e físico-químicas.

A região do espectro em 1660 cm^{-1} , que corresponde ao grupo funcional amida I, foi marcada por uma mudança em relação ao controle observada na 1ª e na 4ª semana, com pequena tendência de normalização na 2ª e na 8ª semana, conforme mostrado na figura 10. A área do pico em 1660 cm^{-1} mostra o comportamento do grupo funcional relacionado às proteínas presentes no pulmão. Nota-se uma diminuição da 1ª para a 2ª semana, um aumento na 4ª semana e uma nova diminuição na oitava semana. Este comportamento pode estar associado ao número de unidades formadoras de colônia do fungo no parênquima pulmonar. As análises histológicas também mostraram variações com esta mesma tendência observada nos espectros Raman. Ou seja, estes resultados coincidiram com o

número de unidades formadoras de colônia (UFCs) e com a coloração de Grocott, métodos utilizados para se determinar a maior ou menor presença do fungo no parênquima pulmonar, conforme mostrado na figura 11.

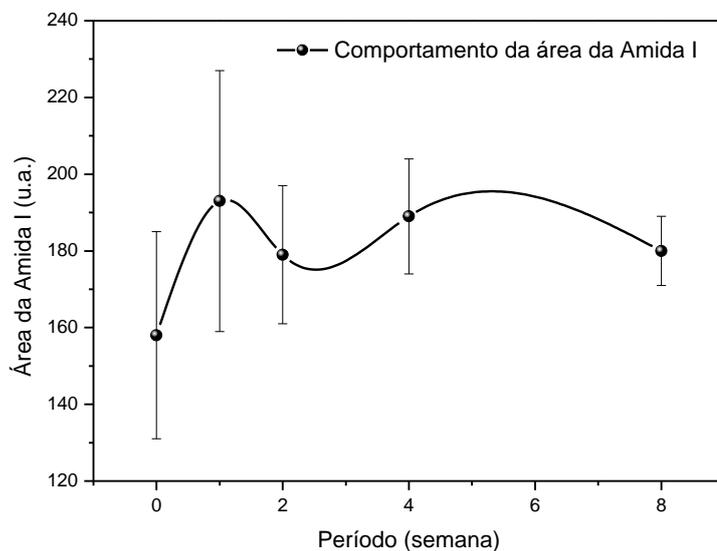


Figura 10: Comportamento da área do grupo funcional Amida I.

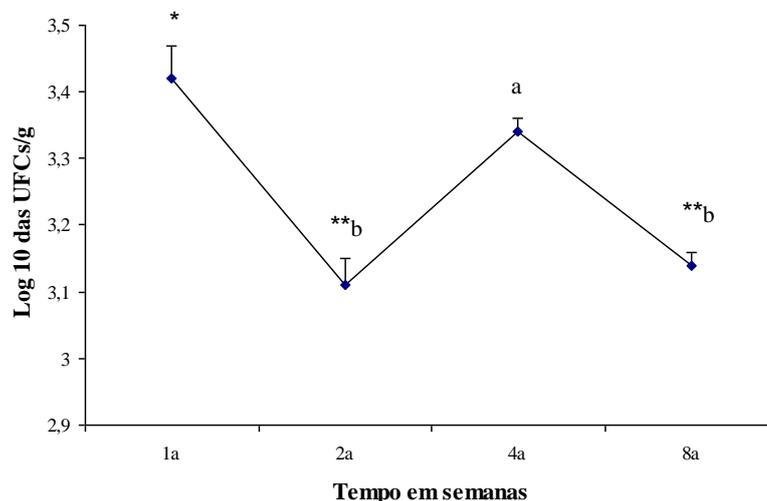


Figura 11: Número de unidades formadoras de colônia (UFCs)/g no pulmão infectado com Pb. Resultados expressos como Log 10; n=4 na 1ª e 2ª semanas e n=5 na 4ª e na 8ª semanas (lado esquerdo). Observar o fungo na fase leveduriforme com e sem brotamentos; Resultados expressos como a média \pm EPM. P<0,001 quando * comparado com ** e P<0,01 quando comparado com b. ANOVA, pós-teste de Tukey (lado direito). Esses resultados foram obtidos pela mestra Edilaine M. Moratto [dados não publicados].

A avaliação das células UFCs e as análises histopatológicas revelaram a evolução do processo infeccioso que envolveu a presença de infiltrado inflamatório e a formação de granulomas no parênquima pulmonar. Este comportamento já havia sido descrito por outros autores [66]. O menor número de UFCs ocorreu na 2ª e 8ª semanas de infecção, quando também foi observado o menor número de fungos corados por Gomori-Grocott e menor número de polimorfos nucleares no parênquima pulmonar. Estes achados sugerem que nestes períodos houve uma resposta defensiva por parte do animal, assim também relacionamos que na 2ª e 8ª semanas a diminuição da banda da amida I nos espectros de FT-Raman indica uma redução na quantidade de proteínas, indicando que a quantidade de fungos está relacionada com a quantidade de proteínas no pulmão.

Por outro lado, na 1ª e na 4ª semana foram observados também maiores índices de infecção, caracterizados por intensificação da resposta inflamatória e uma maior presença do fungo. A presença de maior número de UFCs nestes períodos está em acordo com os achados histológicos. Outros trabalhos também demonstraram que a infecção por Pb pode apresentar evolução em função do tempo. Experimentos realizados com camundongos Balb/c, inoculados com conídios pela via intratraqueal, resultaram em uma diminuição no número de UFCs após a primeira semana de infecção, seguida por um aumento progressivo até a décima sexta semana [67]. Enquanto que experimentos realizados com camundongos Swiss demonstram uma redução de UFCs na 8ª semana de infecção [66].

A região do espectro que corresponde aos aminoácidos, em 1620 cm^{-1} (5) da tirosina e em 1550 cm^{-1} do triptofano (7), apresentou mudanças significativas. A área da banda em 1620 cm^{-1} diminuiu com o período de inoculação do Pb. Nota-se na figura 12 que a área na primeira semana é maior em relação às outras semanas e diminui significativamente na 4ª e na 8ª semana. Este comportamento pode estar relacionado com o número de granulomas formados no pulmão pelo Pb. Os resultados histológicos mostram que houve um aumento no número de granulomas com o período de inoculação do fungo, mostrado na tabela 2.

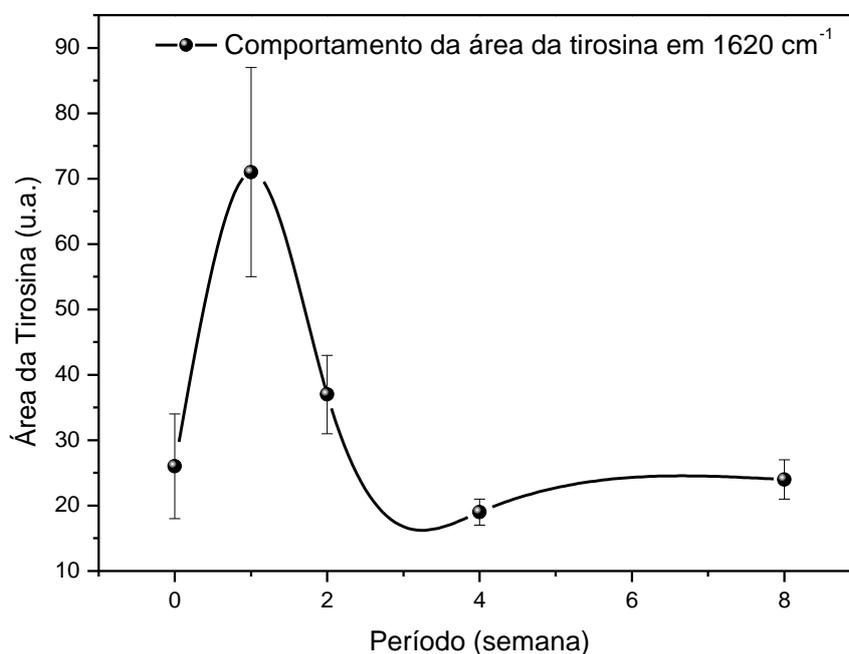


Figura 12: Comportamento da área da tirosina em 1620 cm⁻¹.

Os resultados histológicos, que permitem estimar o número de granulomas no pulmão, mostraram que a quase totalidade das estruturas coradas pela prata eram na forma de fragmentos de Pb. Fungos íntegros eram raros e nenhum brotamento foi detectado. Foi possível observar que a maioria dos fragmentos estava no interior de macrófagos cujo número, ao contrário dos polimorfonucleares, aumentou progressivamente ao longo do período experimental. Os macrófagos são as principais células envolvidas na resposta imunológica contra a infecção por Pb, sendo um dos principais componentes dos granulomas^[68-70]. Assim, a diminuição da quantidade de aminoácidos mostrada na figura 12 pode ter ocorrido como consequência do aumento dos granulomas.

Tabela 2: Número de granulomas/animal de pulmão de camundongos Swiss após 1,2, 4 e 8 semanas de infecção com *Paracoccidioides brasiliensis*.

Tempo de infecção (semanas)	Número de granulomas/ animal (média±EPM)
1 (n=4)	5.81±2.42 ^{*a}
2 (n=4)	6.15±2.66 ^{*a}
4 (n=5)	11.75±2.01 ^{**}
8 (n=5)	10.17±2.32 ^b

Resultados expressos como a média \pm EPM. $P < 0,01$ quando * comparado com ** e $P < 0,05$ quando a comparado com b. ANOVA, pós-teste de Tukey. Estes resultados foram obtidos pela mestra Edilaine M. Moratto [dados não publicados].

O desenvolvimento de granulomas no órgão infectado representa a capacidade controle da infecção por parte do organismo hospedeiro. A formação dos granulomas foi observada a partir da 1ª semana de infecção. Os plasmócitos, macrófagos e linfócitos eram os principais constituintes dos granulomas. Estas estruturas apresentaram-se mais organizadas e numerosas a partir da 4ª semana. Os granulomas tornam-se cada vez mais compactos com o passar do tempo, comprometendo a morfologia do órgão e conseqüentemente a qualidade de vida do hospedeiro. Na figura 13 observamos que a área da banda atribuída ao triptofano apresenta uma redução na 4ª e na 8ª semana, períodos que coincidem com aqueles nos quais os granulomas estão mais presentes nas amostras de pulmão que tiveram inoculação de Pb.

Em alguns animais utilizados neste estudo não houve a formação de granulomas e a resposta foi mais difusa. Estudos anteriores já demonstraram que indivíduos imunocompetentes são capazes de provocar a formação de granulomas para conter a disseminação fúngica, enquanto que indivíduos com insuficiência na resposta imune apresentam lesões granulomatosas indefinidas ^[71]. Isto pode explicar porque alguns dos espectros obtidos têm mudanças mais significativas que outros.

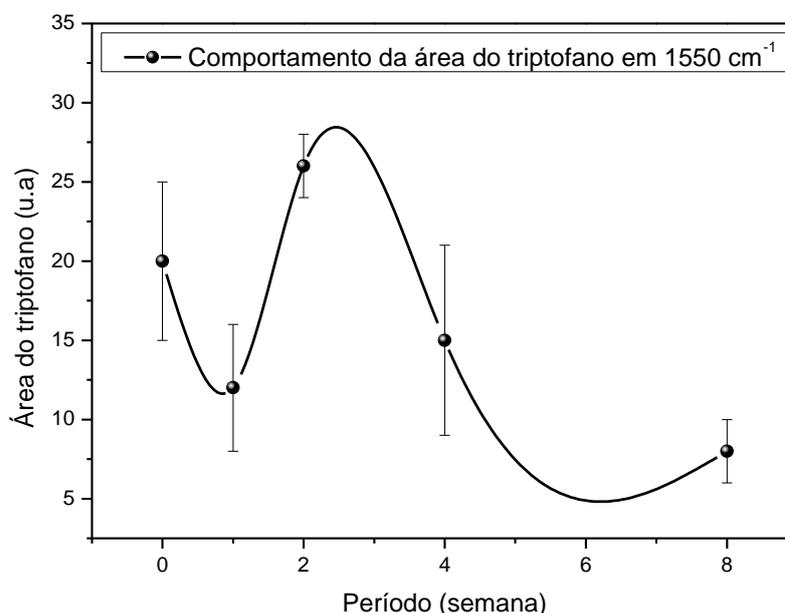


Figura 13: Comportamento da área do triptofano em 1550 cm⁻¹.

Camundongos *Swiss* têm sido utilizados por vários pesquisadores para o estudo da PCM experimental [72-74], por apresentarem suscetibilidade [75], mas ao mesmo tempo possuem certo grau de resistência à infecção [72]. Isto pode explicar a resistência à infecção detectada em alguns animais testados.

Microorganismos patogênicos utilizam uma variedade de estratégias moleculares para subverter os mecanismos das células hospedeiras e invadi-las [76-78]. Embora não seja considerado tradicionalmente um típico patógeno intracelular, a capacidade do Pb de se aderir e invadir fagócitos tem sido reconhecida [15,16]. Foi mostrado em estudos realizados *in vitro* [79,80] e *in vivo* [81,82] que Pb pode internalizar nas células epiteliais. A adesão de propágulos infecciosos às células hospedeiras é um passo crucial para a invasão, colonização e crescimento do Pb. Ele pode ainda desenvolver vários fenótipos dependendo da cepa, do hospedeiro e de outros fatores [77,82]. A apoptose é uma das estratégias utilizadas pelo Pb para subverter a célula hospedeira [73] e é considerada um importante fator de virulência [83].

O processo de apoptose tem um importante papel na hiporesponsividade antígeno-específico de células T para o principal antígeno de Pb. A glicoproteína de 43 kDa, a gp43, que age como um receptor da molécula de laminina, que é

marcadora de gp43 e responsável pela adesão das leveduras à membrana basal das células do hospedeiro [83-84].

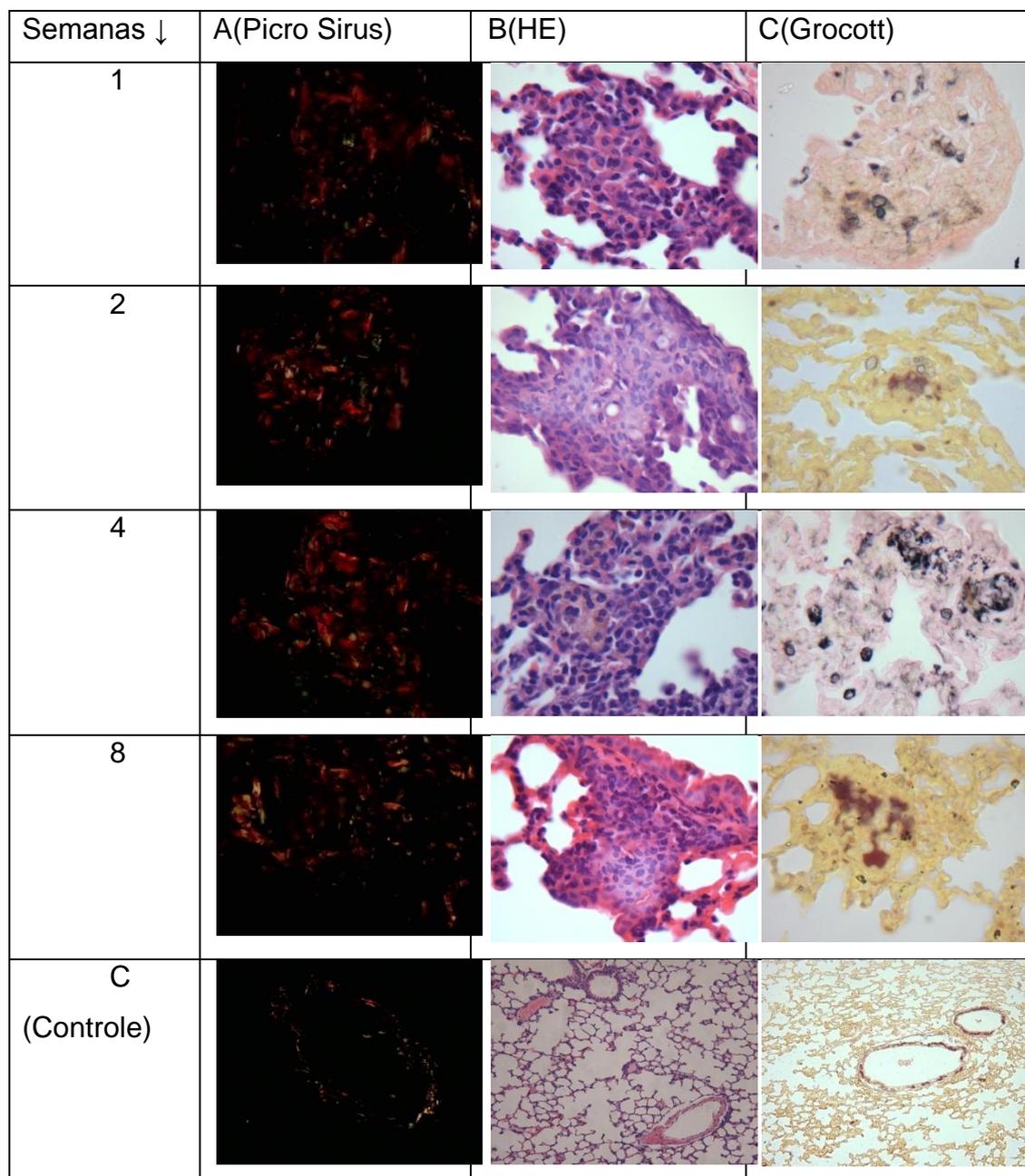


Figura 14: Fotomicrografia de pulmões infectados com Pb: Objetiva de: 40x(Picro-Sirus e Gp43);100x(HE, Gomori-Grocott e Tunel); 20x(Controles). Resultados obtidos pela mestre Edilaine M. Moratto [dados não publicados].

Além disso, a gp43 inibe a capacidade fungicida dos macrófagos e a resposta inflamatória [85], o que pode ser considerado um dos mecanismos de virulência para a instalação da infecção primária em hospedeiros susceptíveis [86]. Esta glicoproteína

também auxilia na aderência do fungo na matriz extracelular e induz a apoptose, que é um mecanismo de disseminação do fungo [87].

A relação entre a expressão de gp43 e a ocorrência de morte celular ao longo do processo infeccioso não havia sido estudada antes. Nesse sentido, demonstramos que nos períodos em que houve a maior expressão de gp43, na 1ª e 4ª semanas, houve maior número de células TUNEL positivas e aumento da banda da Amida I (figura 10) atribuída às proteínas. Esses eventos coincidem ainda com o período de maior carga fúngica demonstrado por meio do crescimento de UFCs e da coloração por Gomori-Grocott (figura 14). Até onde se sabe esta é a primeira vez, em estudos da paracoccidiodomicose experimental, que se relaciona a expressão de gp43 e as alterações histopatológicas do órgão infectado com as mudanças detectadas nos espectros Raman.

Concluimos, portanto, que a expressão de gp43 variou ao longo do período experimental e foi concomitante com a ocorrência de apoptose e com os maiores picos de infecção do parênquima pulmonar por Pb. Os espectros Raman demonstraram as deformações ocorridas na estrutura de algumas moléculas como consequência das alterações histopatológicas provocadas pelo fungo. Isto sugere estas técnicas como uma nova ferramenta para a investigação e diagnóstico de paracoccidiodomicose.

5.3 Espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier com detecção fotoacústica de pulmão infectado com *Paracoccidioide brasiliensis* (Pb)

Repetimos o experimento de infecção com Pb em camundongos *Swiss* para avaliação das amostras com a técnica FTIR-PAS, com o objetivo de comparar os resultados com aqueles obtidos com a técnica FT-Raman. Com a FTIR-PAS foi possível verificar mudanças nas bandas de absorção que ocorreram em outras regiões do espectro em relação ao que foi observado com a técnica FT-Raman. Desta forma, ao comparar as alterações nas bandas de absorção com as de espalhamento Raman pode também ser uma alternativa para uma melhor

interpretação da dinâmica dos processos envolvidos durante a infecção pelos fungos.

A Figura 15 mostra o espectro de absorção óptica do tecido do pulmão do camundongo Swiss sem infecção. A atribuição de cada banda de absorção óptica está indicada na tabela 3.

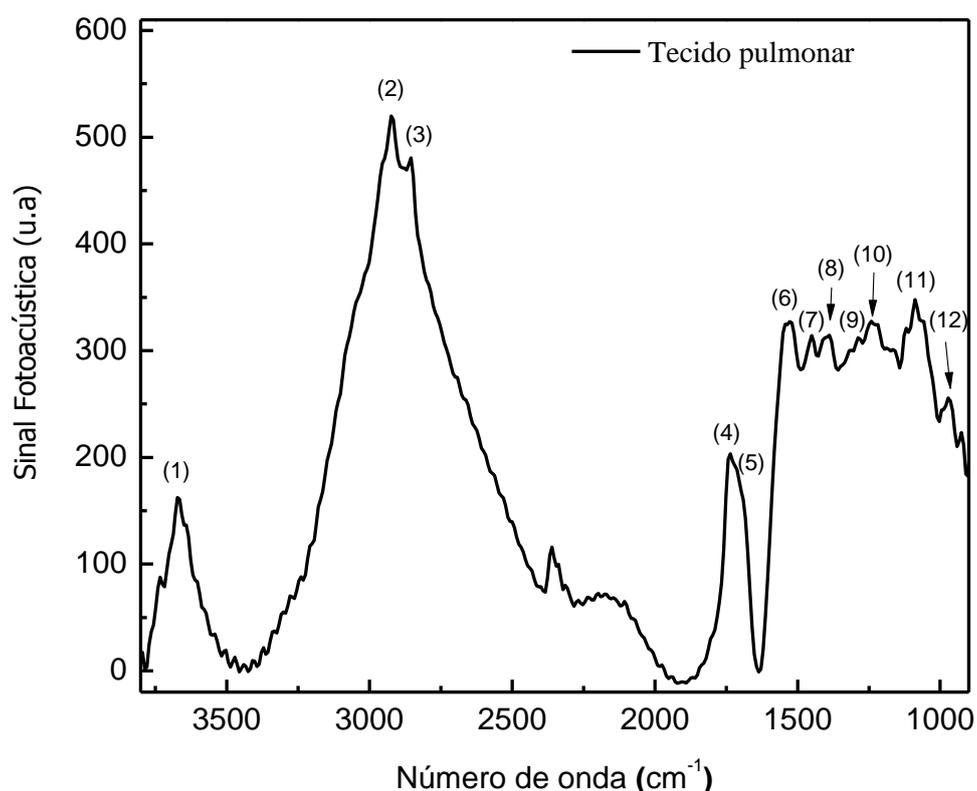


Figura 15: Espectro FTIR-PAS de pulmão de camundongo Swiss controle

As bandas identificadas nos números de onda 1087 cm^{-1} e 1242 cm^{-1} são originadas, respectivamente, de ligações simétricas e assimétricas do estiramento das vibrações dos grupos fosfato, que fazem parte do DNA. Para a amida I foi em 1681 cm^{-1} e para a amida II em 1540 cm^{-1} . No caso do grupo CH_3 ocorrem em 1455 , 2854 e 2924 cm^{-1} , e para o C-C/C-O em 972 cm^{-1} , que corresponde ao grupo funcional da desoxirribose-ribose [88-90].

A Figura 16 mostra o espectro do pulmão após uma, duas, quatro e oito semanas de infecção com Pb em relação ao grupo controle. As diferenças nas

intensidades do sinal fotoacústico dos espectros não foram consideradas porque podem ser produzidas por fatores como tamanho e umidade da amostra. Para minimizar estes fatores optou-se por realizar o cálculo das razões entre os picos de intensidade em cada respectivo espectro.

Tabela 3: Atribuições dos picos de absorção para as amostras de pulmão estudadas.

Nº do Pico	Posição do Pico (cm ⁻¹)	Atribuição
(1)	3672	Amina, N-H, OH Livre; Proteínas [63,88].
(2)	2924	CH ₂ antissimétrico; Proteínas e Lipídios [63,88].
(3)	2854	CH ₃ simétrico; Proteínas e Lipídios [63,88].
(4)	1743	C=O Vibração em estiramento [89].
(5)	1681	Amida I; Proteínas [89,90]. (C=O, C - N, C-C e N-H) [89,90].
(6)	1540	Amida II ; Proteínas [89,90].
(7)	1455	CH ₃ antissimétrico; Fosfolipídios [63,88].
(8)	1400	Grupo COO ⁻ ; Proteínas [63,88].
(9)	1303	Amida III, Proteínas [63,88].
(10)	1234	PO ₂ ⁻ antissimétrico (grupo do fosfato) [90]; Ácidos Nucléicos [89,90].
(11)	1087	PO ₂ ⁻ simétrico; Ácidos Nucléicos [90].
(12)	972	C-C/C-O; Desoxirribose-ribose [90].

As análises espectrais por meio da FTIR-PAS foram realizadas visando obter alterações no espectro de absorção óptica e comparar com resultados histológicos e com aqueles obtidos com a espectroscopia FT-Raman. Foram selecionadas algumas regiões do espectro para se mostrar as possíveis mudanças estruturais causados pelo fungo. As bandas escolhidas foram: Amida I (1681 cm⁻¹), Fosfato assimétrico (1234 cm⁻¹) e grupo C-C/C-O (972 cm⁻¹).

A Figura 16 mostra os espectros normalizados em relação à banda em 2930 cm⁻¹. Esta banda corresponde, principalmente, à flexão no plano do grupo funcional CH₂ antissimétrico, que está presente nas proteínas e nos lipídios [88]. Esta banda foi

adotada como referência porque apresentou menor variação ao longo dos períodos de tempo após a infecção.

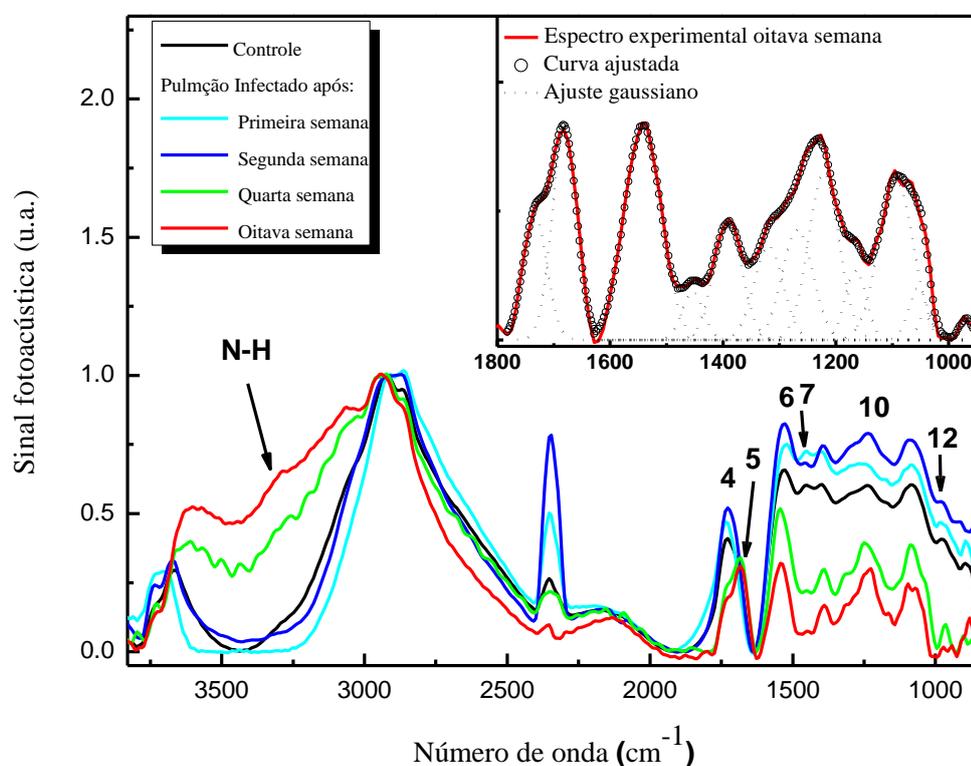


Figura 16: Espectros FTIR-PAS do pulmão de camundongo Swiss infectado com Pb, após 1, 2, 4 e 8 semanas.

A razão amida I/amida II mostra as alterações ocorridas na amida I em função da amida II no decorrer do período experimental, caracterizadas por um aumento progressivo até a 8ª semana (figura 17). O aumento da razão amida I/amida II poderia estar relacionado com a maior quantidade de colectinas, que são proteínas do surfactante pulmonar que têm a capacidade de fazer ligação com moléculas de superfície expressas por microorganismos. As colectinas podem também modular várias funções do sistema mononuclear fagocitário, incluindo a internalização e morte dos microorganismos. Neste trabalho as colectinas não foram quantificadas, mas a resposta inflamatória foi monitorada e apresentou uma evolução temporal, na qual, a resposta imune foi levemente mais acentuada na 2ª semana, em relação à 1ª (figura 18- E.1). Nos dois períodos avaliados, a maior parte das leveduras se localizou no parênquima e uma menor quantidade de fungos fragmentados ocupava

o interior de macrófagos (figura 18- E.2). A resposta inflamatória se intensificou ao longo da 4ª e 8ª semanas, com o aumento da celularidade no parênquima pulmonar. Na 8ª semana foi observado um grande número de macrófagos com fragmentos de Pb fagocitados (figura 18 - E.3 e E.4).

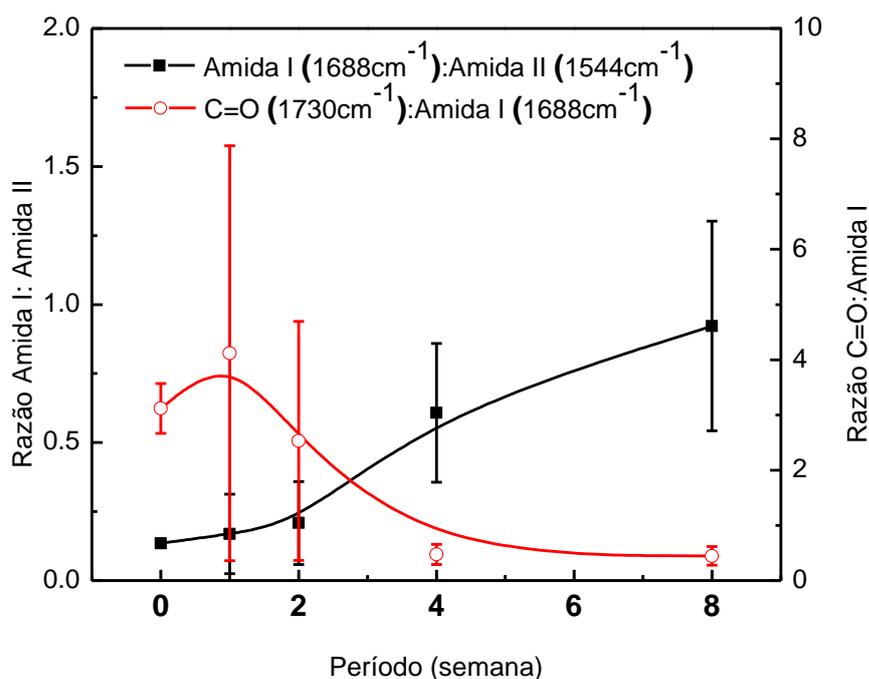


Figura 17: Razão das bandas Amida I / II e C = O / amida I do tecido pulmonar de ratos em função do tempo depois de 1, 2, 4 e 8 semanas de infecção do Pb. O pulmão controle é representado pelo período 0.

Dessa forma, considerando que os macrófagos são as células mais envolvidas na defesa contra Pb ^[92], pode-se inferir que a evolução da razão amida I/amida II, que tem sido relacionada com o aumento do teor de proteínas ^[93] acompanhou aquela do processo inflamatório, observado por meio das técnicas histológicas.

A razão fosfato assimétrico (1234 cm^{-1}) em função da amida II (1535 cm^{-1}) está ilustrada na figura 19. A diminuição do fosfato assimétrico foi relacionada anteriormente com o aumento de morte celular programada ^[94]. Nota-se que nos períodos da 4ª e da 8ª semanas foram observadas as menores razões fosfato/amida II.

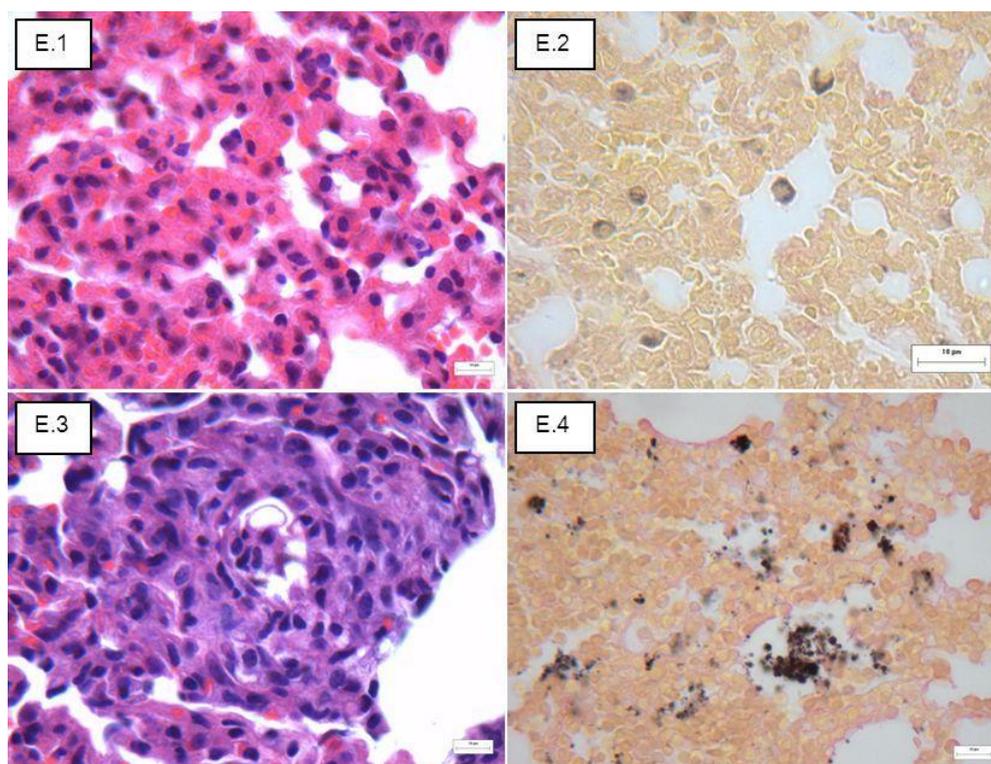


Figura 18: Fotomicrografia de pulmões de camundongos Swiss infectados com Pb. E.1 e E.2 após 2 semanas. E.3 e E.4 após 8 semanas. E.1 e E.3 corados por H&E, E.2 e E.4 corados por Gomori-grocott. Aumento Original: 100x. Estas medidas foram realizadas pela mestre Edilaine Martins Moratto ^[91].

A intensidade de absorção nas vibrações de fosfato assimétrica permite avaliar mudanças qualitativas e quantitativas nos fosfolipídeos e ácidos nucleicos ^[95]. Em estudo *in situ* de células cancerosas, por espectroscopia de reflectância total atenuada (FTIR-ATR), foi demonstrado que no processo de apoptose ocorre um decréscimo na razão fosfato/proteína ^[93]. Além disso, a apoptose tem sido identificada por meio de observação da redução da quantidade de fosfato em fibroblastos malignos. Isto foi feito utilizando-se a razão da média das bandas de absorvância dos grupos fosfato assimétrico ($1151-1350\text{ cm}^{-1}$) em relação à da amida II ^[94].

A diminuição dos grupamentos C-C/C-O (970 cm^{-1}) (figura 19) tem sido relacionada com a mudança na absorvância de DNA e ao aumento de morte celular programada ^[95], da mesma forma, a diminuição na absorção de ribose (C-O) foi relacionada com o aumento na frequência de apoptoses ^[96].

As oscilações na frequência de células TUNEL-positivas medidas em nossas amostras podem estar relacionadas com variações na intensidade de infecção, de

acordo com a resposta imunológica do hospedeiro. Observamos picos de infecção mais intensos com maior frequência de células em apoptose, na 1ª e na 4ª semana. Na 2ª e 8ª semanas, haviam menos células marcadas (figura 20).

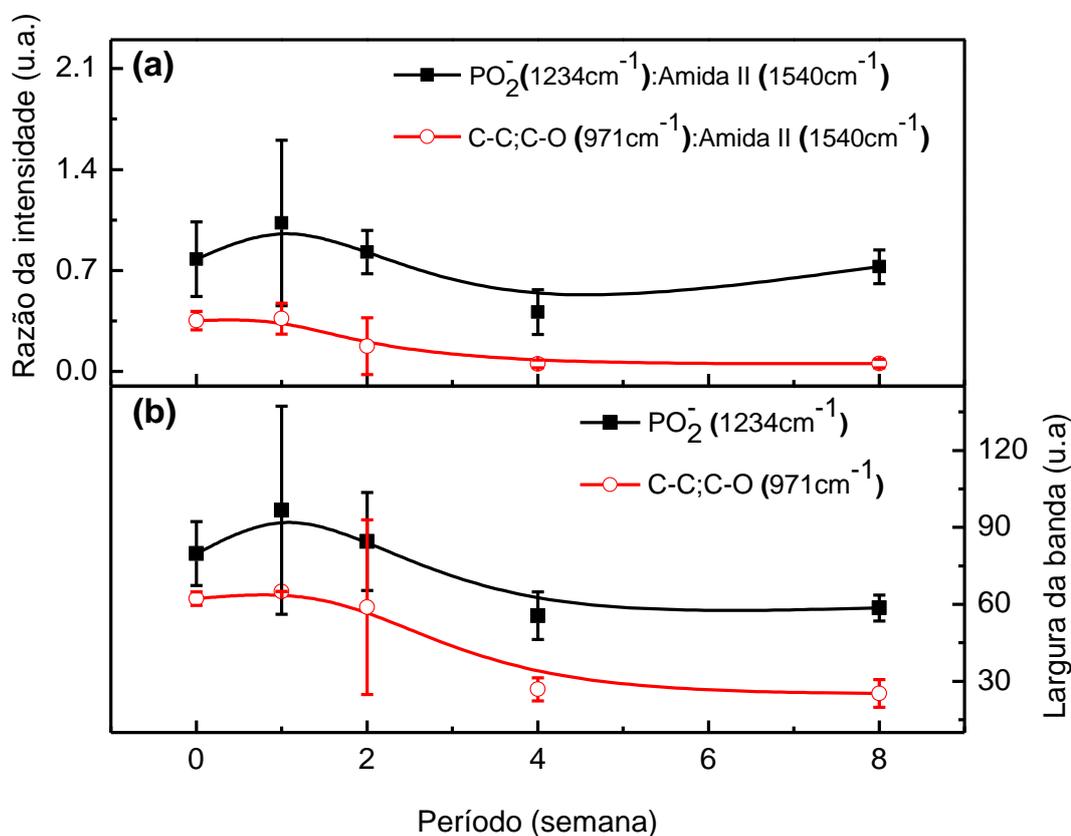


Figura 19: Em preto: razão do grupo fosfato pela Amida II; em vermelho: razão do grupo C-C/C-O pela Amida II.

As tendências dos resultados das regiões espectrais das medidas com a técnica Raman referentes ao aminoácido da Tirosina e do Triptofano tiveram comportamento semelhante ao que ocorreu com as bandas de fosfato e do grupo de C-C/C-O medidos com a técnica FTIR-PAS, ambas mostraram decréscimo de intensidade na 4ª e na 8ª semana do período de infecção do fungo, coincidindo com os estudos histológicos que mostraram aumento de granulomas, aumento da resposta inflamatória e com a ocorrência de apoptose. No entanto, foi verificado que os dados obtidos com a espectroscopia Raman referentes à região do espectro com bandas atribuídas à Amida I tiveram comportamento diferente em relação ao que se obteve com a técnica FTIR-PAS. Isto pode ter ocorrido em razão de resposta diferente em termos de infecção do fungo de um grupo para outro de animais.

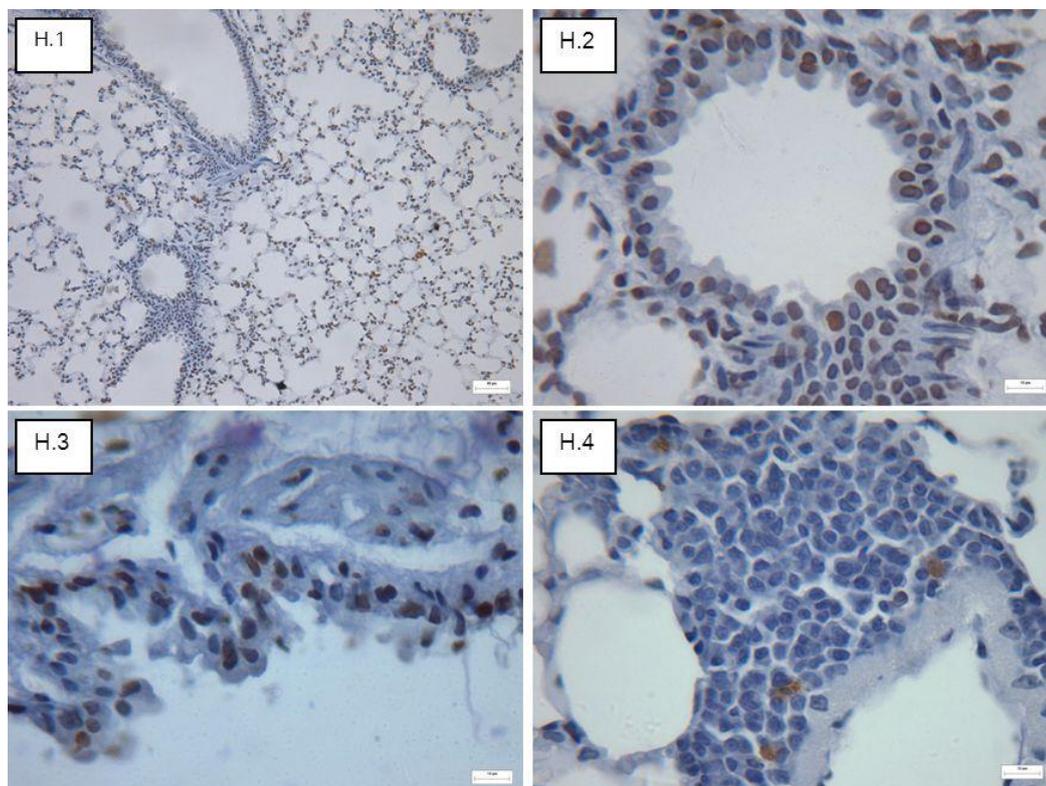


Figura 20: Fotomicrografia de cortes histológicos do pulmão de camundongos *Swiss* infectados por Pb corados por TUNEL e contra-corados por Hematoxilina de Meyer evidenciando células em apoptose. H.1(20x) e H.2(100x) na primeira semana e H.3(100x) e H.4(100x) na quarta e na oitava semana, respectivamente. Estas medidas foram realizadas pela mestra Edilaine Martins Moratto ^[91].

Dessa forma, conclui-se que o pulmão infectado por Pb apresentou alterações estruturais que variaram de acordo com o período de tempo analisado e que as mudanças nas bandas de absorção óptica e de espalhamento Raman de vários grupamentos químicos foram uma consequência dessas alterações morfológicas. Até onde se sabe essa é a primeira vez que a técnica FTIR-PAS foi utilizada como método de estudo da paracoccidiodomicose experimental. Nossos resultados sugerem que este método pode se tornar uma técnica promissora para o estudo desta patologia.

5.4 Espectroscopia Raman de fígado de camundongos Swiss infectados por *Paracoccidioide brasiliensis* (Pb)

Neste estudo a Espectroscopia Raman foi empregada para avaliação das alterações físico-químicas de tecidos de fígado de camundongos *Swiss* infectados com Pb. Análises histopatológicas também foram realizadas para validação dos resultados. Como descrito anteriormente, a espectroscopia FT-Raman pode fornecer informações sobre a composição biomolecular de tecidos, permitindo que tecidos normais possam ser distinguidos dos doentes [97,98].

Não existem estudos na literatura sobre a análise espectral dos fígados de camundongos *Swiss* infectados com Pb. De fato, o fígado não é o órgão alvo do Pb e esta talvez seja a razão por haver poucos estudos relacionando a infecção desses microorganismos aos eventuais danos hepáticos.

Assim como nas medidas anteriores, a expressão gp43, principal antígeno produzido por Pb, foi avaliada ao longo do período de tempo de inoculação. O fígado não é o órgão de preferência da paracoccidioidomicose (PCM), mas é afetado a partir do foco pulmonar após o fungo se espalhar através das rotas linfáticas e vias hematogênicas [99-101]. Em comparação com os estudos de pulmões, há poucos estudos clínicos e experimentais que descrevem o envolvimento do fígado no processo. A fibrose no fígado é uma das alterações patológicas descritas em pacientes infectados com Pb [101-103]. A infecção já foi confirmada por análise de UFCs, onde o crescimento do fungo estudado foi avaliado. Os estudos histopatológicos realizados por meio de diferentes técnicas mostraram mudanças na morfologia do fígado e identificaram granulomas no parênquima do fígado que apresentaram formas de levedura de Pb [104].

Os espectros FT-Raman realizados nesse trabalho mostraram diferenças nas amostras de fígado de camundongos infectados com Pb em comparação com os camundongos sem inoculação de Pb. Os grupos funcionais associados a cada pico numerado na figura 21 estão mostrados na Tabela 4.

Todos os espectros foram submetidos à correção da linha de base e normalizados pelo pico da amida I (1660 cm^{-1}).

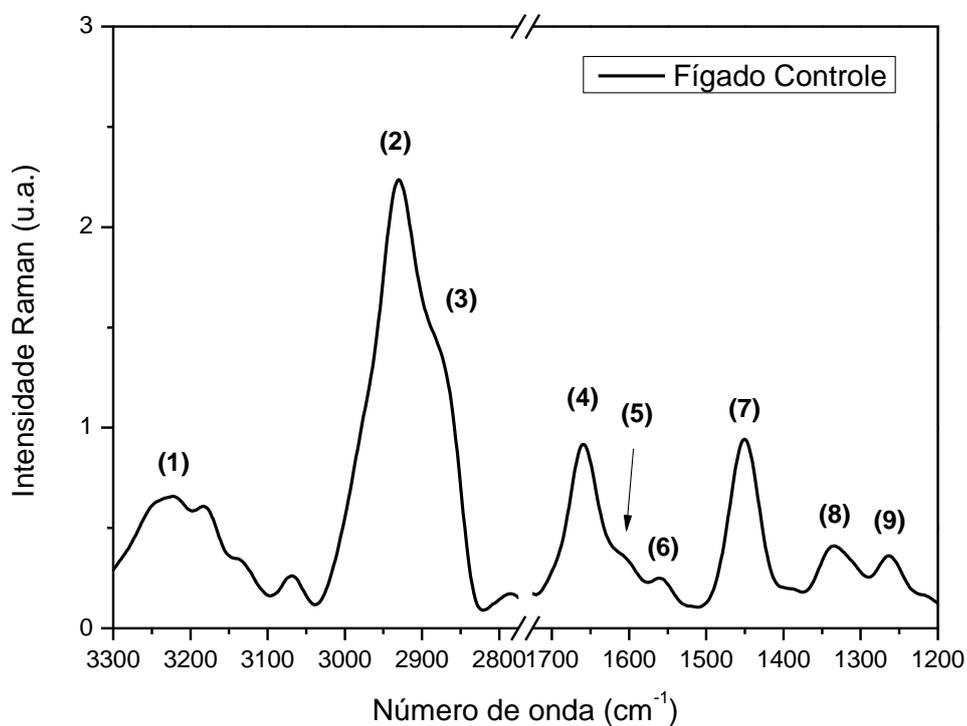


Figura 21: Espectro Raman da amostra de fígado controle.

A Figura 22 mostra os espectros entre 1400-1200 cm⁻¹, cujas bandas são associadas com a deformação de CH₂ e CH₃. Nota-se uma variação na área com o aumento do tempo de infecção. Os grupos funcionais CH₂ e CH₃ nesta região espectral são geralmente correlacionados com a presença de fibras de colágeno nos tecidos biológicos do fígado. Essa variação foi investigada neste trabalho a partir da razão entre a área da banda do colágeno e a da amida III (1260 cm⁻¹), que permanece constante ao longo o período de infecção.

Tabela 4: Atribuições dos picos do espectro Raman das amostras de fígado estudadas

Nº do pico	Posição do Pico (cm ⁻¹)	Atribuição
1	3220	N-H; Proteínas ^[63, 88,105] .
2	2927	CH ₂ (antissimétrico); Proteínas e Lipídios ^[63,88] .
3	2874	CH ₃ (simétrico); Proteínas e Lipídios ^[63,88] .
4	1660	Amida I; Proteínas ^[63, 88,105] .
5	1615	Tirosina; Aminoácido ^[63,88] .
6	1557	NH ₃ ⁺ ; Proteínas ^[63,88] .
7	1450	CH ₂ ; Proteínas e Lipídios ^[63, 88,105] .
8	1340	CH ₂ e CH ₃ ; Colágenos ^[105] .
9	1260	Amida III; Proteínas ^[63,88] .

Nota-se uma redução na área do colágeno nas primeiras duas semanas, seguida por um aumento após a 4ª semana de infecção. A diminuição do colágeno, após a 1ª semana de infecção, poderia estar relacionada com a capacidade do Pb de degradar a matriz extracelular, para aderir e invadir os tecidos do hospedeiro. Este processo envolve a interação do fungo com proteínas da matriz extracelular, tais como enolase e adesinas. Adesinas são proteínas de adesão do Pb, as quais determinam a capacidade de ligação deste microorganismo a componentes da matriz tais como colágeno de tipo I e IV, fibronectina, fibrinogênio e laminina. Podem também determinar o tropismo por uma célula ou tecido ^[106-108]. Por sua vez, a enolase atua como um receptor de plasminogênio com capacidade proteolítica, que contribui para a degradação da matriz extracelular e o estabelecimento do fungo no corpo hospedeiro ^[7].

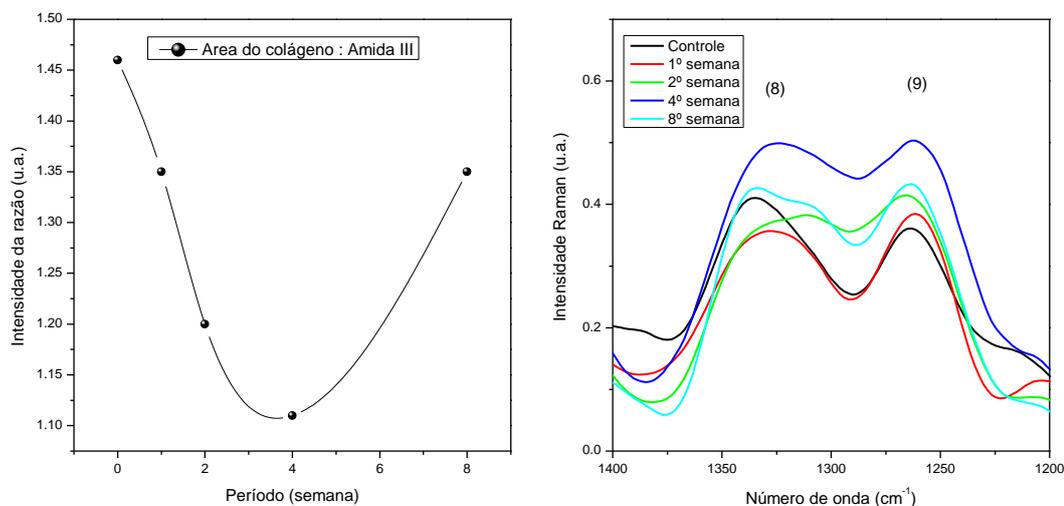


Figura 22: Área da banda do colágeno entre 1400 a 1200 cm⁻¹.

Por outro lado, o aumento da proporção de colágeno a partir da 4^a e da 8^a semana pode ser relacionado com a cronicidade da infecção. No pulmão, órgão alvo do Pb, o PCM evoluiu para fibrose, que é caracterizada pela deposição de matriz e acumulação de colágeno. No fígado, houve o desenvolvimento de um caso típico de fibrose com a progressão da infecção e aumento de fibras de colágeno, observada pela técnica de fotomicrografia, como mostrado na figura 23.

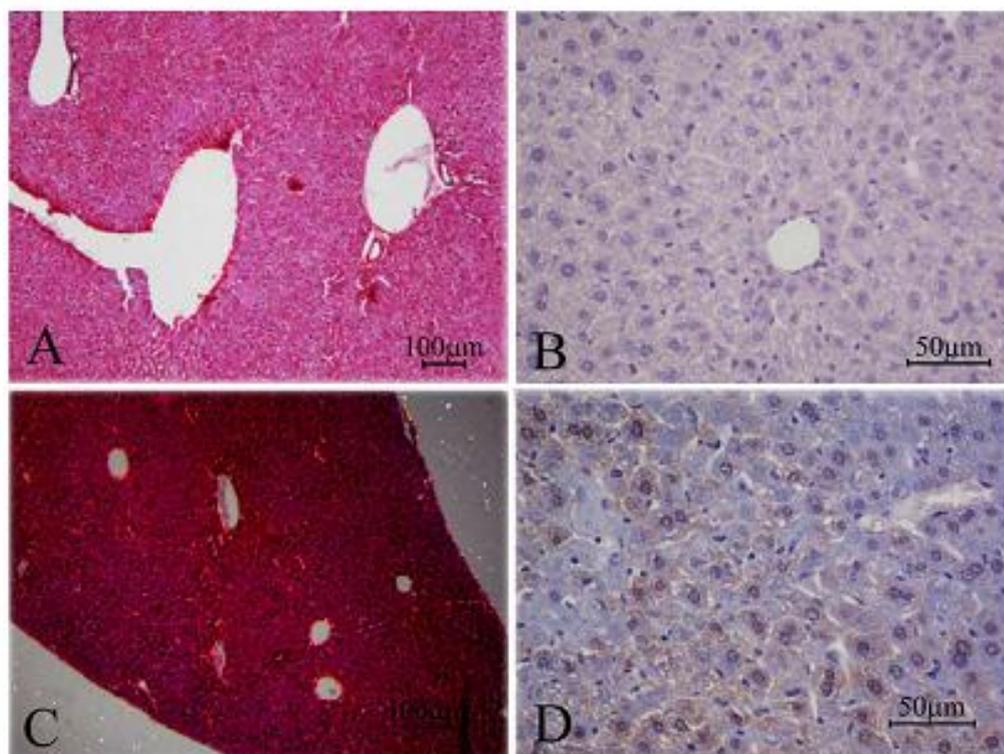


Figura 23: Fotomicrografia de: (A e B) do fígado controle, não infectados. (C e D) após oito semanas de infecção por Pb. Nota-se um aumento no número de fibras de colágeno birrefringentes (C). A imunohistoquímica com o anticorpo anti-gp43 mostrou citoplasmática difusa e coloração nuclear no parênquima do fígado (D). Estes resultados foram obtidos pela mestre Elaine S. B. Mansano^[109].

A fibrose é um mecanismo intrínseco para interromper a evolução do micro-organismo, o que permite o estabelecimento de um aparente equilíbrio entre o hospedeiro e o parasita. Como o fungo pode não ser erradicado, os tratamentos só diminuem a quantidade de fungos no corpo, tendo o risco de uma reativação mais tarde^[110,111]. De um ponto de vista funcional, a infecção parece ter influenciado o metabolismo de aminoácidos. Nota-se que nos animais controle não foram observadas alterações na banda característica do aminoácido tirosina, identificado por meio da banda em 1615 cm^{-1} .

A Figura 24 (B) mostra o deslocamento do pico de 1615 cm^{-1} em função do tempo de infecção, atingindo um valor de 1595 cm^{-1} na 8ª semana. Esta banda pode estar relacionada com os aminoácidos do próprio fígado ou presentes no sangue. O pico em 1615 cm^{-1} é atribuído à tirosina e em 1585 cm^{-1} à fenilalanina. A figura 24 (C) mostra o comportamento da área total relativa a estes aminoácidos ($1710\text{-}1510\text{ cm}^{-1}$) em função do tempo de infecção. Há uma diminuição no conteúdo de

aminoácidos na 1ª semana de infecção se comparado ao tecido controle e uma tendência de aumento até a 8ª semana. A partir da 2ª semana, há uma tendência de aumento da área total dos aminoácidos. No entanto, deve ser considerado que a maior contribuição para o espectro no fígado controle é proveniente da presença de tirosina, e para o tecido infectado da fenilalanina.

No caso específico da conversão de fenilalanina em tirosina, por fenilalanina hidroxilase, há a incorporação de radicais -OH ao anel aromático da fenilalanina, causando um rearranjo de cargas no anel, e, conseqüentemente, um deslocamento de pico. A figura 24 (C) mostra a área total da banda de aminoácidos analisados, incluindo a tirosina e a fenilalanina (1710-1510 cm^{-1}). A variação da área pode estar relacionada com a virulência do Pb. A diminuição do teor de aminoácidos na 1ª semana, em comparação com o tecido do controle, pode estar relacionada com o uso de tirosina pelo Pb para sintetizar melanina, um mecanismo que aumenta a sua resistência a atividades antifúngicas de macrófagos ^[54-56], tornando-se mais resistentes ao sistema imunológico do hospedeiro.

O aumento na área após a 2ª semana de infecção sugere a ocorrência de uma reação do organismo contra o Pb. No entanto, observou-se que este aumento é acompanhado por um deslocamento do pico na região de 1595 cm^{-1} , indicando ter havido uma redução no processo de hidroxilação da fenilalanina. A conversão de fenilalanina em tirosina pode ter sido pela redução da atividade de enzima fenilalanina hidroxilase, um evento que explicaria tal deslocamento detectado até a 8ª semana de observação, quando ainda tinha desenvolvimento de um pequeno número de UFCs.

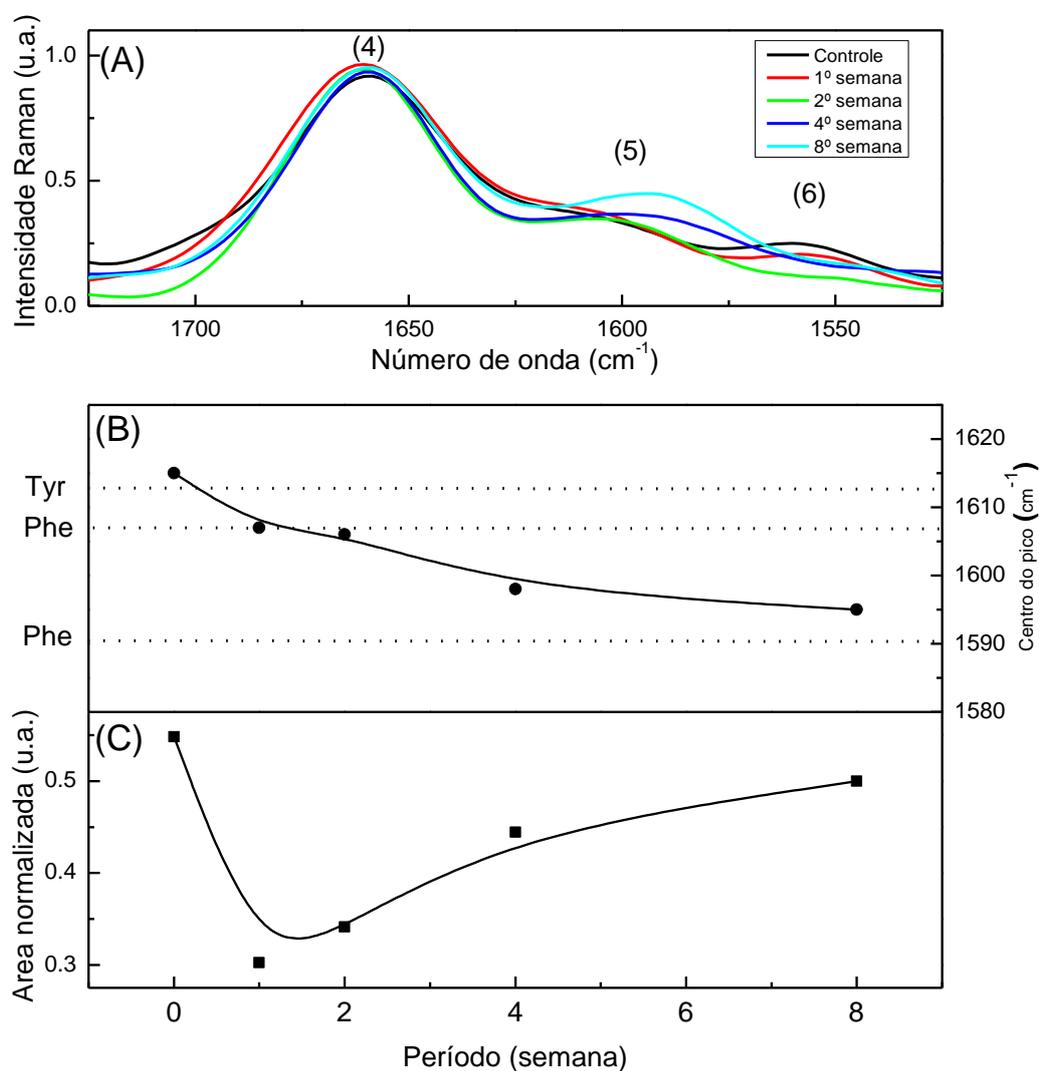


Figura 24: (A) região espectral correspondendo aos aminoácidos tirosina e fenilalanina, (B) deslocamento do centro do pico de 1620 cm⁻¹ para 1595 cm⁻¹ e (C) área total das bandas dos aminoácidos em função do tempo de infecção do Pb.

O método pelo qual Pb pode disseminar para os órgãos não é totalmente compreendido. Uma maneira pode ser por migração de macrófagos infectados ou de células dendríticas através do sistema linfático [112-117]. As leveduras foram encontradas intracelularmente em células polimorfonucleares e monócitos e macrófagos, sugerindo que o fungo seja capaz de sobreviver dentro destas células [117,77], e, por conseguinte, pode permanecer oculto nas defesas imunológicas do hospedeiro. Assim não expõe seus antígenos na superfície celular, fugindo de fagócitos, o que facilitaria a sua difusão [78].

No presente estudo, o número de fungos nas lesões diminuiu nos últimos períodos avaliados, o que sugere que os granulomas formados nas primeiras semanas representam um mecanismo inicial de defesa contra o Pb, o que afeta a multiplicação e difusão de levedura. É possível que a estrutura mais compacta do fígado, com poucos espaços abertos, pode ter impedido a criação e propagação do fungo ao longo do parênquima, em comparação com o do pulmão, que tem um amplo espaço. Além disso, é possível que os camundongos desenvolvam uma forma hiperérgica da doença com resposta imune tipo celular formando granulomas bem organizados com alguns fungos, o que sugere que estes animais têm alta resistência imunológica. Outros autores demonstraram que camundongos Swiss são relativamente resistentes à infecção de Pb [118-120].

A formação de granulomas em modelos experimentais e em seres humanos depende de fatores tais como a susceptibilidade ou resistência à infecção [121]. Por outro lado, o desenvolvimento da doença depende da virulência do fungo e composição antigênica, das condições ambientais e a resposta imunológica do hospedeiro [122]. Num estudo anterior, utilizando os mesmos tipos de espécies murinas, foi avaliada morfológicamente a evolução de granulomas nos pulmões [104] em 1, 2, 4 e 8 semanas após a infecção por Pb. Com o tempo, os granulomas pulmonares tornaram-se mais numerosos, maiores e mais organizados, com quantidades crescentes de fibras de colágeno e reticular [104]. Em contraste, no fígado, o número de granulomas foi maior nas primeiras duas semanas de infecção e diminuiu significativamente na oitava semana. Além disso, granulomas tornaram-se menores ao longo do tempo e não desenvolveram fibrose significativa.

Concluiu-se que havia uma relação diretamente proporcional entre o número de UFCs, o número de granulomas e as alterações físico-químicas no fígado infectado com Pb, isto é: (a) períodos de aumento da infecção do fígado foram as primeiras duas semanas, quando havia também o maior número de granulomas e UFCs; (b) períodos de alterações moleculares e histopatológicas mais altas também correspondiam a períodos de aumento da infecção. Não foi possível correlacionar a expressão da gp43 com as alterações físico-químicas e morfológicas, uma vez que a expressão era semelhante em todos os períodos.

5.5 Espectroscopia Raman de pele de rato com aplicação intradérmica da fração proteica de *Fusarium oxysporum*

A Figura 25 mostra o espectro FT-Raman da derme de rato controle. Estas medidas foram realizadas fazendo-se a incidência da radiação na superfície da amostra do lado da derme. Os grupos funcionais referentes à posição dos picos estão mostrados na tabela 5.

O pico em 3010 cm^{-1} corresponde à banda da molécula $=\text{CH}$ e os em 2930 e 2885 cm^{-1} são relacionados às bandas associadas às ligações CH_2 antissimétricas e simétricas, respectivamente. Em 2854 cm^{-1} corresponde à ligação C-H, e em 1745 cm^{-1} ao grupo Ester por meio da ligação C=O. O grupo amida I é identificado em 1656 cm^{-1} e a banda em 1440 cm^{-1} corresponde à ligação CH_2 . O pico em 1302 cm^{-1} é relacionado ao modo de vibração das ligações CH_3/CH_2 e o em 1263 cm^{-1} à amida III. Os fosfolipídios são responsáveis pelo pico em 1080 cm^{-1} .

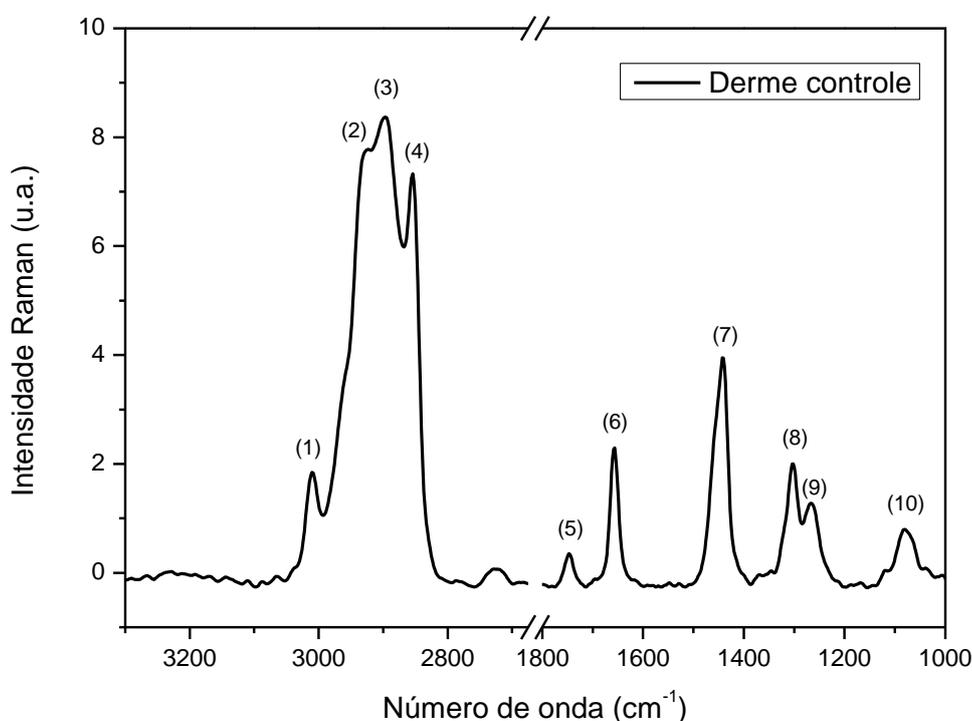


Figura 25: Espectro FT-Raman da derme controle.

Tabela 5: Atribuições dos picos do espectro FT-Raman para as amostras de pele.

Nº do Pico	Posição do Pico (cm ⁻¹)	Atribuição
(1)	3010	=CH ^[88] .
(2)	2930	CH ₂ ; Lipídios e proteínas ^[63,88] .
(3)	2885	CH ₃ ; Lipídios e proteínas ^[63,88] .
(4)	2854	C-H, Lipídios e proteínas ^[88] .
(5)	1745	C=O; grupo Ester ^[63] .
(6)	1656	Amida I; proteínas ^[63,88] .
(7)	1440	CH ₂ ; vibração de flexão ^[63,88] .
(8)	1302	CH ₃ /CH ₂ ; lipídios ^[63,88] .
(9)	1263	Amida III; proteínas ^[63,88] .
(10)	1080	PO ₄ ³⁻ ; Fosfolipídios ^[63,88] .

Os espectros Raman mostraram picos que indicam que a aplicação intradérmica da fração F1 do *Fusarium oxysporum* induz alterações físico-químicas na pele de rato. A fração F1 do *Fusarium oxysporum* usada no presente estudo é uma mistura complexa, produzida como resultado do crescimento do fungo e que envolve os produtos do metabolismo, como metabólitos secundários. *Fusarium oxysporum* é uma espécie do gênero *Fusarium* que pode causar além de onicomicose, infecções na pele e subcutânea, sinusite, artrite e osteomielite ^[123,124].

A Figura 26 mostra o espectro Raman da pele normal e daquelas que receberam aplicação intradérmica da fração F1. Mostra também o espectro da fração F1. A Figura 27 mostra a evolução da razão com o tempo dos picos CH₂/amida III e CH₃/amida III.

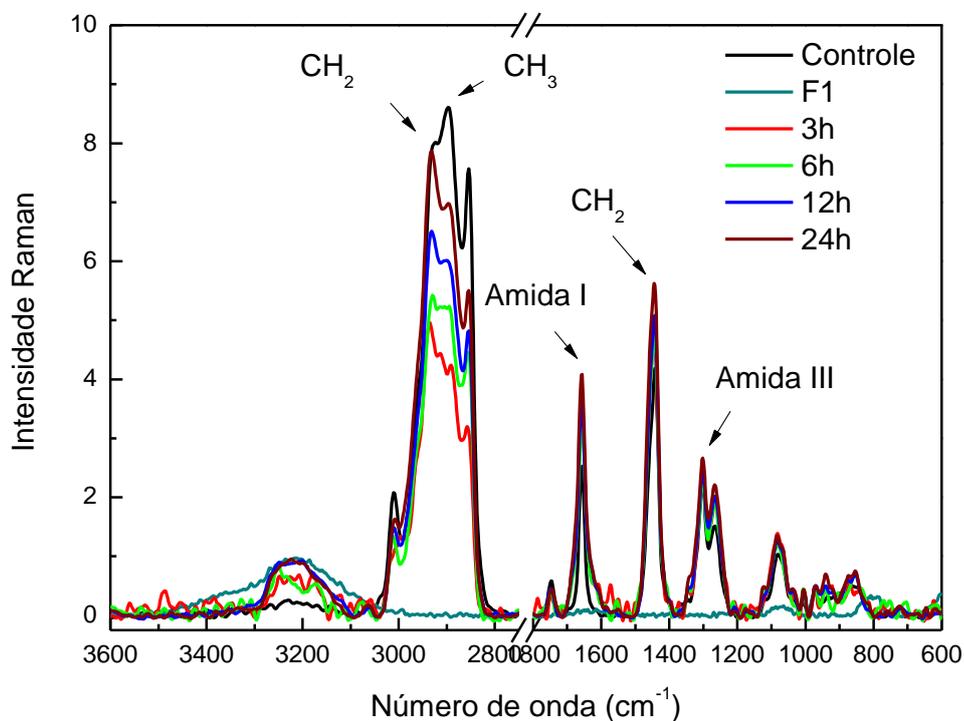


Figura 26: Espectro Raman da fração F1 e das dermes controle, 3, 6, 12 e 24h após a aplicação da fração F1.

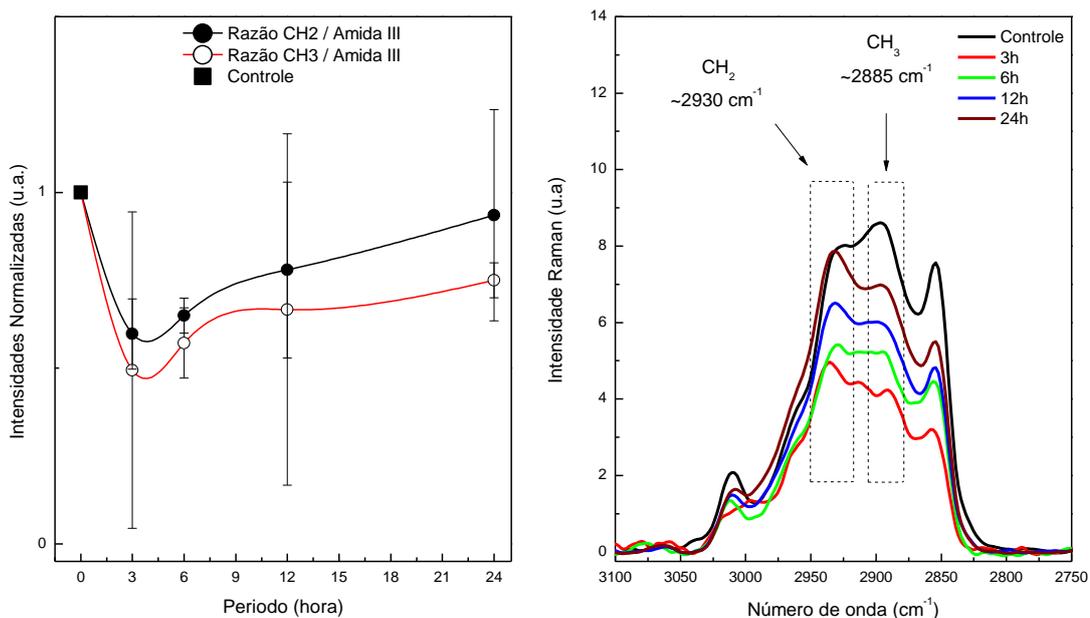


Figura 27: Razão das intensidades das bandas CH₂/amida III e CH₃/amida III.

A evolução das razões com o tempo dos picos de CH₂ (2930 cm⁻¹) ou CH₃ (2885 cm⁻¹) em relação à amida III foi realizada em relação aos animais controles. Ao longo do tempo, estes picos apresentaram um comportamento de recuperação dos valores iniciais até o final do período de investigação, que concluíram em 24h. Comparando-se com os resultados histológicos, foi possível observar que a evolução dos picos de CH₂ e de CH₃ apresentou-se semelhante ao que se observou com a área total das fibras de colágeno, que são polímeros complexos ricos em grupos metilo.

No presente estudo, a fração F1 não provocou uma resposta celular com alterações histopatológicas evidentes, mas houve mudanças no componente de colágeno da matriz extracelular da derme. Quando comparada com a pele tratada com solução salina, a área ocupada pelas fibras do tipo I foi reduzida ao valor daquela obtida para o período de tempo de 3h. A do tipo III foi reduzida para os valores dos outros intervalos de tempo avaliados. É provável que a área menor das fibras de colágeno pode ser um resultado da ação tóxica da própria fração F1, a qual pode conter elementos que facilitam a invasão e a permanência do agente patogênico na pele. Houve ainda uma recuperação ao longo do tempo (em relação ao controle) da quantidade de fibras do tipo I, mas não das fibras do tipo III. Apesar disso, a área ocupada pelas fibras do tipo III aumentou ao longo do tempo, indicando a ocorrência da síntese de colágeno. Esta hipótese da possível síntese de colágeno ficou ainda mais evidente em razão da presença de fibroblastos hipertróficos no período de 6h e pelo aumento da área total ocupada pelo colágeno, como observado na figura 28. Deve ser lembrado que a fração foi aplicada apenas uma vez na pele.

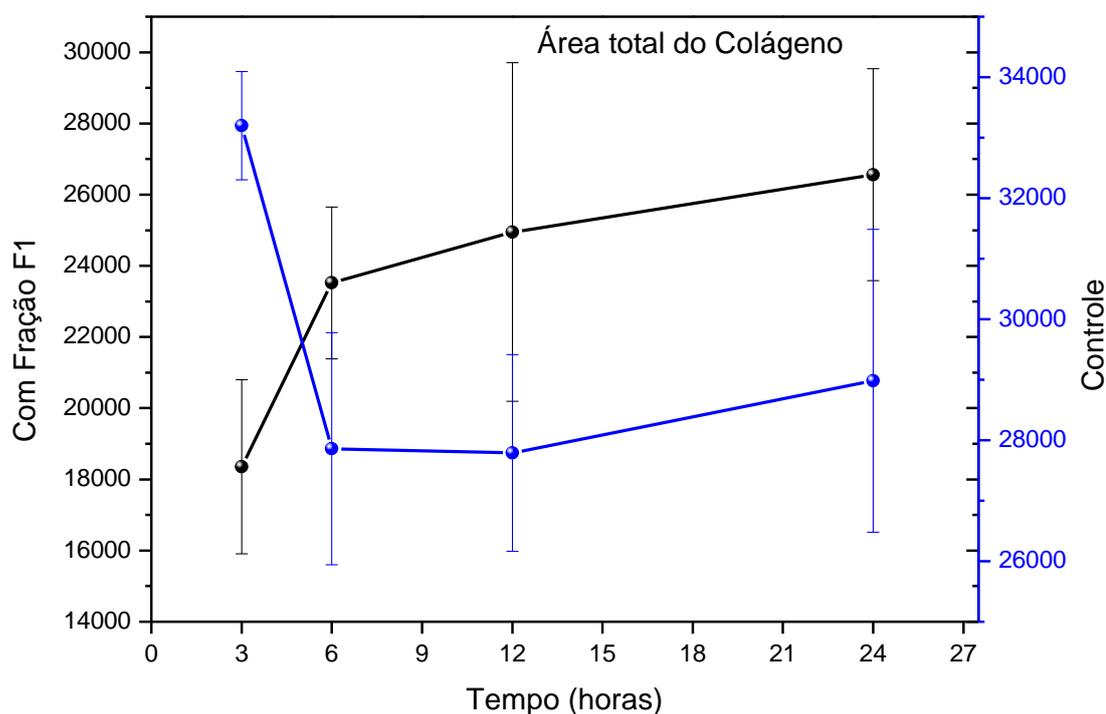


Figura 28: Área total da banda do colágeno. Resultados obtidos pela mestra Kátia Sibin^[125].

A aplicação intradérmica da fração proteica na pele de ratos provocou uma resposta biológica e alterações físico-químicas na derme e subcutâneo, indicando que a fração proteica contém componentes que são capazes de se difundirem para o tecido vizinho e causar ferimentos. As bandas associadas com a área ocupada pela amida I mostraram alterações estruturais na região espectral entre 1700-1625 cm^{-1} . Isto ocorreu em todos os intervalos de tempo analisados após a aplicação da fração F1^[126-129].

Após a administração da fração proteica, foi observada uma resposta inflamatória, com intensidade de pico médio no grupo de 6h, e com neutrófilos sendo o tipo de célula predominante. Num estudo anterior, os autores com as mesmas condições experimentais adotadas neste trabalho, demonstraram que uma única aplicação intradérmica de extrato bruto de *Fusarium oxysporum*^[130] resultou numa resposta inflamatória mais acentuada, com um pico após 12h de infecção. Isto sugere que durante o processo de obtenção da fração proteica, os principais elementos responsáveis pela inflamação foram eliminados, tal como o processo de diálise que elimina moléculas com um ponto de corte abaixo de 12-16 kDa. Além

disso, alguns elementos foram removidos quando o extrato foi submetido à separação de proteínas por eletroforese.

A Figura 29 mostra um aumento da banda da amida I que representa o grupo funcional das proteínas. Este aumento permite propor uma hipótese de que os subprodutos liberados pelo fungo, que são varias, podem alterar esta região do espectro. Análise anterior de extrato bruto de *Fusarium oxysporum* em gel de eletroforese identificou uma banda eletroforética com um peso molecular de aproximadamente 50 kDa, o que corresponde à banda da fração proteica. Esta fração pode ser relacionada com a enzima tomatinase, que é um monômero de 50 kDa, e possui pelo menos cinco isoformas e pontos isoelétricos que variam entre 4,8 e 5,8 ^[131]. Como na diálise do extrato bruto fica com moléculas de peso molecular abaixo de 12-16 kDa, os tricotecenos (250-500 Da) ^[132] que são conhecidos por provocar reações no tecido sob a forma de inflamação ou na indução de morte celular programada ^[133,134], podem ter sido eliminados. Além disso, algumas moléculas podem ter sido danificadas quando da obtenção da fração, quando o extrato bruto foi aquecido até aproximadamente 40°C ^[135]. Os resultados da coloração TUNEL reforçam esta hipótese, pois não houve coloração TUNEL-positivo na pele injetada com a fração, ao contrário a pele tratada topicamente ^[136] ou injetada com o extrato bruto, apresentou resposta de apoptose na epiderme, derme e até mesmo no tecido subcutâneo ^[130].

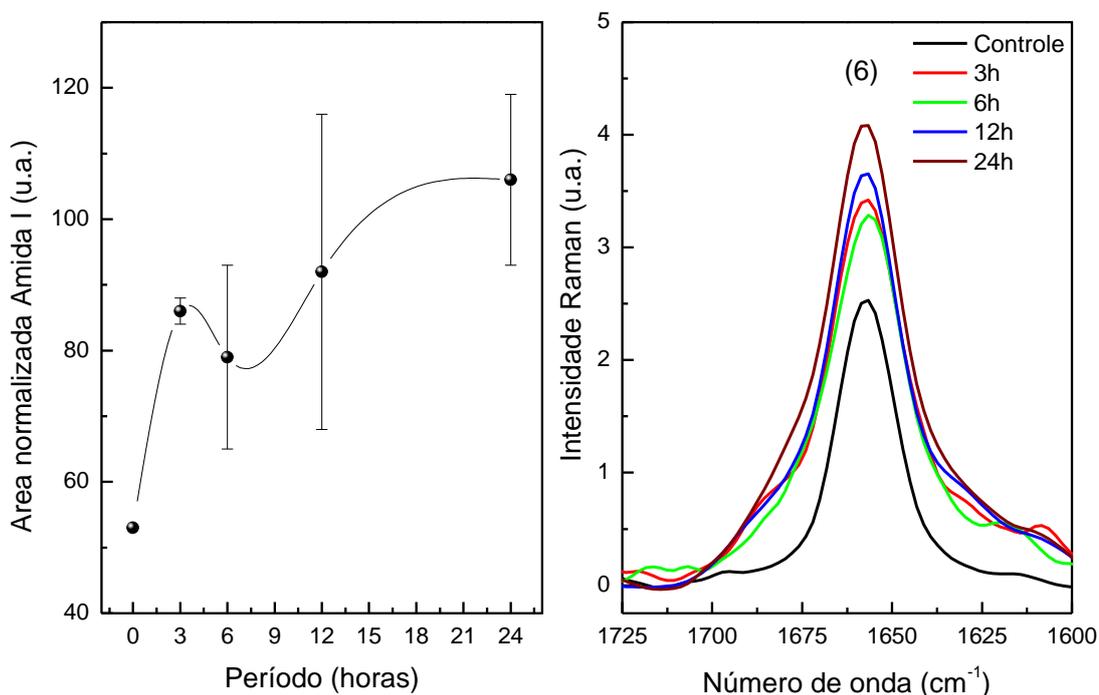


Figura 29: Área da banda da amida I na região espectral em 1660 cm^{-1} .

Os fungos estão entre os organismos em todo o processo evolutivo que foi capaz de permanecer na natureza devido ao seu potencial para aderir, invadir e replicar no hospedeiro. Isto é realizado por uma variedade de moléculas produzidas pelas espécies, que têm uma grande variedade de ações. A fração proteica, o principal componente retirado de extrato bruto do *Fusarium oxysporum*, não foi capaz de induzir os mesmos eventos biológicos registrados em estudo anterior que apresentou resposta inflamatória intensa e apoptose. O que se observou a partir dos espectros realizados foi que os componentes da fração proteica difundiram através da pele, perturbando a organização da matriz extracelular e parecem ter sido capazes de modificar o colágeno, e interferir nas propriedades físico-químicas das moléculas orgânicas presentes na derme.

Capítulo 6

CONCLUSÃO

Neste trabalho a Espectroscopia FTIR com detecção fotoacústica (FTIR-PAS) e a técnica Raman foram utilizadas para estudar *ex vivo* a dinâmica das mudanças estruturais de tecidos do pulmão e do fígado de camundongos *Swiss* submetidos à inoculação do fungo *Paracoccidioide brasilienses* (Pb) e ainda de amostras de pele de ratos inoculadas via intradérmica por uma fração proteica do fungo *Fusarium oxysporum*. A avaliação histológica das amostras permitiu a validação dos resultados.

Os espectros Raman de pulmões de camundongos *Swiss* infectados por Pb mostraram uma correlação da morte celular programada, alterações morfológicas e da expressão temporal da glicoproteína gp43. As bandas mostraram que a infecção foi mais intensa na 1ª e na 4ª semana, e a maior expressão de gp43 foi concomitante com a maior imunocoloração para TUNEL. A técnica FTIR-PAS mostrou alterações físico-químicas nos pulmões infectados com Pb, que foram dependentes do período de infecção.

A técnica FT-Raman permitiu avaliar o fígado na paracoccidiodomicose de camundongos *Swiss* infectado com Pb. As alterações ocorreram nas regiões espectrais entre $1700-1530\text{ cm}^{-1}$ e $1370 - 1290\text{ cm}^{-1}$, nos picos da fenilalanina e das moléculas CH_2 e CH_3 correlacionadas ao colágeno. A resposta dos tecidos foi caracterizada pelo desenvolvimento de granulomas organizados e infecção disseminada, com leveduras localizadas dentro dos macrófagos e hepatócitos isolados.

Inoculações de uma fração proteica de extrato de *Fusarium oxysporum* em pele de ratos saudáveis resultaram em aumento das áreas ocupadas na derme dos colágenos tipos I e III em função do período de infecção. Houve mudança na área da banda da amida I e nas das moléculas de CH_2 e CH_3 .

Finalmente, os resultados deste trabalho mostraram que as técnicas FTIR com detecção fotoacústica e a Raman podem ser combinadas para avaliação da dinâmica das alterações nos tecidos biológicos sobre a ação de agentes patógenos, sendo promissoras para novas formas de diagnóstico de doenças.

REFERÊNCIAS

- [1] REHMAN, I., MOVASAGHI, Z., REHMAN, S. *Vibrational Spectroscopy for Tissue Analysis*. Taylor & Francis Group. 2013.
- [2] LIU, K. Z., XU, D. A., SCOTT, B. R. Biomolecular characterization of leucocytes by infrared spectroscopy. *Br. J. Haematol.* 136, 713–722, 2007.
- [3] ZELIG, U., KAPELUSHNIK, R., MOREH, S., MORDECHAI A. D., NATHAN I. Diagnosis of cell death by means of infrared spectroscopy. *Biophys. J.* 97, 2107–2114, 2009.
- [4] DI GIAMBATTISTA, L., POZZI D., GRIMALDI, P., GAUDENZI, S., MORRONE, S., CASTELLANO, A. C. New marker of tumor cell death revealed by ATR-FTIR spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* 399, 2771–2778, 2011.
- [5] YANG, W., XIAO, X., TAN, J., CAI, Q. In situ evaluation of breast cancer cell growth with 3D ATR-FTIR spectroscopy. *Vib. Spectrosc.* 49, 64–67, 2009.
- [6] NEMECEK, J. C., THRICH, W. U. M., KLEIN, B. S. Global control of dimorphism and virulence in fungi. *Science* 312, 583–588, 2006.
- [7] NOGUEIRA, S. V., FONSECA, F. L., RODRIGUES, M. L., MUNDODI, V., ABICHACRA, E. A., et al. *Paracoccidioides brasiliensis* enolase is a surface protein that binds plasminogen and mediates interaction of yeast forms with host cells. *Infect Immun* 78, 9, 4040–4050, 2010.
- [8] PEREIRA, M., BAILÃO, A. M., PARENTE, J. A., BORGES, C. L., SALEM-IZACC, S. M., et al. Preferential transcription of *Paracoccidioides brasiliensis* genes: host niche and time-dependent expression. *Mem Inst Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro* 104, 3, 486–491, 2009.

- [9] ACORCI, M. J., DIAS-MELICIO, L. A., GOLIM, M. A., BORDON-GRACIANI, A. P., PERACOLI, M. T. S., et al. Inhibition of human neutrophil apoptosis by *Paracoccidioides brasiliensis*: Role of interleukin-8. *Scand J Immunol* 69, 73–79, 2008.
- [10] COUTINHO, Z. F., DA SILVA, D., LAZERA, M., PETRI, V., DE OLIVEIRA, R. M., et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1990–1995). *Cad Saúde Pública*. 18, 5, 1441–1454, 2002.
- [11] VILLALOBOS-DUNO, H., SAN-BLAS, G., PAULINKEVICIUS, M., SANCHEZ-MARTIN, Y., NINO- VEGA, G. Biochemical characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* a- 1,3-glucanase Agn1p, and its functionality by heterologous expression in *Schzosaccharomyces pombe*. *PLoS ONE* 8, 6, 1–12, 2013.
- [12] SHIKANAI-YASUDA, M. A., TELLES FILHO, F. Q., MENDES, R. P., COLOMBO, A. L., MORETTI, M. L., et al. Consenso em paracoccidioidomicose – Relatório Técnico. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 39, 3, 297–310, 2006.
- [13] Costa, P. F., FERNANDES, G. F., DOS SANTOS, P. O., AMARAL, C. C., CAMARGO, Z. P. Characteristics of environmental *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *Mycopathologia* 169, 37–46, 2010.
- [14] NIMRICHTER, L., RODRIGUES, M. L., RODRIGUES, E. G., TRAVASSOS, L. R. The multitude of targets for the immune system and drug therapy in the fungal cell wall. *Microbes Infect.* 7, 789–798, 2005.
- [15] VARGAS, J., VARGAS, R. Actualizaciones Paracoccidioidomicosis. *Rev enferm. Infecc. trop.* 1, 1, 49–56, 2009.
- [16] POPI, A. F., LOPES, J. D., MARIANO, M. Gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. *Cell Immunol.* 218, 87–94, 2002.

- [17] ROCHA, A. A., MORAIS, F. V., 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 Microbiol.* 9, 277, 2009.
- [18] McEWEN, J. G., BEDOYA, V., PATINO, M. M., SALAZAR, M. E. RESTREPO, A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *J. Med. Vet. Mycol.* 25, 165–175, 1987.
- [19] da SILVA, F. C., SVIDZINSKI, T. I. E., PATUSSI, E. V., CARDOSO, C. P., DALALIO, M. M. O., HERNANDES L. Morphologic organization of pulmonary granulomas in mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80, 798–804, 2009.
- [20] FRANCO, L., NAJVAR, L., GOMEZ, B. L., RESTREPO, S., GRAYBILL, J. R. RESTREPO, A. Experimental pulmonary fibrosis induced by *P. brasiliensis* conidia: measurement of local host responses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58, 424–430, 1998.
- [21] COCK, A. M., CANO, L. E., ELEZ, D. V, ARISTIZABAL, B. H., TRUJILLO, J., RESTREPO, A. Fibrotic sequelae in pulmonary paracoccidioidomycosis: histopathological aspects in BALB/c mice infected with viable and non-viable *Paracoccidioides brasiliensis* propagules. *Rev. Inst. Med. Trop.* 42, 59–66, 2000.
- [22] NOGUEIRA, M. G. S., ANDRADE, G. M. Q., TONELLI, E., DINIZ, S. N., GOES, A. M., et al. Laboratory evolutive aspects of children under paracoccidioidomycosis treatment. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 39, 5, 478–483, 2006.
- [23] TAKAHACHI, G., MALUF, M. L. F., SVIDZINSKI, T. I. E., AKIMOTO-GUNTHER, L. S., HUBLER, M. R. N. O., et al. Biochemical responses in mice experimentally infected with *Paracoccidioides brasiliensis* and treated with Canova. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 49, 6, 897–903, 2006.

- [24] BERTONI, T. A., PERENHA-VIANA, M. C. Z., PATUSSI, E. V., CARDOSO, R. F., SVIDZINSKI, T. I. E. Western blot is an efficient tool in differential diagnosis between paracoccidioidomycosis and pulmonary tuberculosis. *ClinVaccine Immunol* 19, 1–13, 2012.
- [25] PERENHA-VIANA, M. C. Z., GONZALES, I. A. A., BROCKELT, S. R., MACHADO, L. N. C., SVIDZINSKI, T. I. E. Serological diagnosis of Paracoccidioidomycosis through a Western Blot technique. *Clin. Vaccine Immunol.* 19, 4, 616–619, 2012.
- [26] LORINCZ, A. L., HADDAD, D., NAIK, R., FUNG, A., CAO, A., et al. (2004) Raman spectroscopy for neoplastic tissue differentiation: A piloto study. *J Pediatr Surg* 39, 6, 953–956, 2004.
- [27] De PAULO, L. F., COELHO, A. C., SVIDZINSKI, T. I. E., SATO, F., ROHLING, J. H., et al. Crude extract of *Fusarium oxysporum* induces apoptosis and structural alterations in the skin of healthy rats. *J. Biomed Optics.* 18, 9, 0950041–9, 2013
- [28] MORATTO, E. M., MORAIS, G. R., SATO, F., MEDINA, A. N., SVIDZINSKI, T. I. E., et al. Morphological and structural changes in lung tissue infected by *Paracoccidioides brasiliensis*: FTIR Photoacoustic Spectroscopy and Histological Analysis. *Photochem. Photobiol. Sci.* 89, 1170–1175, 2013.
- [29] PINCELLI T. P. H., BRANDT H. R. C., MOTTA A. L., MACIEL F. V. R., CRIADO P. R. Fusariose em paciente imunocomprometido: sucesso terapêutico com voriconazol. *An. Bras. Dermatol.* 83, 331-334, 2008.
- [30] 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.* 41, 2, 905-907, 2003.
- [31] NUCCI, M., ANAISSIE, E. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 4, 695-704, 2007.

-
- [32] MARANGON, A. V., SVIDZINSKI, T. I. E., SALCI, T. P., MEURER, R., DA CRUZ FERNANDES M., HERNANDES, L. Metabolic extract of *Fusarium oxysporum* induces histopathologic alterations and apoptosis in the skin of Wistar rats Int. J. Dermatol. 48, 7, 697-703, 2009.
- [33] SKOOG, D. A., Holler, F. S., Nieman, T. A., Princípios de Análise Intrumental. Bookman. Porto Alegre. 2002.
- [34] SALA, O. Fundamentos da espectroscopia Raman e no Infravermelho. Editora Unesp. São Paulo. 1996.
- [35] ATKINS, P. W. Física-Química. 6ª edição. LTC, Rio de Janeiro, 1999.
- [36] CLARK, R. J. H., DINES, T. J. Angew Chem. 25, 131, 1986.
- [37] TITAN, Z. Q. J. Raman Spectrosc. 36, 466, 1986.
- [38] MOSKOVITS, M. J. Raman Spectroscop. 36, 2005.
- [39] Disponível em <http://anatomiaonline.blogspot.com.br/2015/08/pulmoes.html>. Acesso em 01 de Fevereiro de 2016.
- [40] ITOH, H. NISHINO, M., HATABU, H. Architecture of the lung: Morphology and Function. J. Thorac Imaging. 19, 4, 221-227, 2004.
- [41] SCHNEIDER, W., BORTFELD, T., SCHLEGEL, W. Correlation between CT numbers and tissue parameters needed for Monte Carlo simulations of clinical dose distributions. Phys. Med. Biol. 45,459–478, 2000.

[42] WEIBEL, E. R. Looking into the lung: what can it tell us? *Am. J. Roentgenol.* 133,1021–1031, 1979.

[43] MURATA, K., ITOH, H., TODO, G., et al. Bronchial venous plexus and its communication with pulmonary circulation. *Invest Radiol.* 21, 24–30, 1986.

[44] HIATT, J. R., GABBAY, J., BUSUTTIL, R. W. Surgical anatomy of the hepatic arteries in 1000 cases. *Ann Surg.* 220, 50–52, 1994.

[45] COUINAUD, C. *Le foie: études anatomiques et chirurgicales.* Paris: Masson; 1957.

[46] LENA SIBULESKY, M. D. Normal liver anatomy. *Clinical Liver Disease.* 2,S1-S3, 2013.

[47] CUNHA, A. P.; SILVA, A. P.; ROQUE, O. R.; CUNHA, E. Plantas e produtos vegetais em cosmética e dermatologia. Editora Fundação Calouste Gulbenkian, 79, 25-29, 2004.

[48] JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica.* Editora Guanabara Koogan S.A., 301-307, 1995.

[49] PRAÇA, F. S. G. *Liberção e permeação in vitro, de produtos transdérmicos: um estudo metodológico e aparatos e condições experimentais.* Tese de Doutorado, Ribeirão Preto, 2010.

[50] SINGER, A. J.; CLARK, R. A. F. Cutaneous wound healing. *The New England Journal of Medicine*, v.341, p.738-746, 1999 apud BALBINO, C.A.;

PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.41, p.27-51, 2005.

[51] BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 41, 27-51, 2005.

[52] WANKE, B., AIDÉ, M. A. Curso de atualização. Micoses Paracoccidioidomicose. *J. Bras. Pneumol.*, 35, 9, 1245-9, 2009.

[53] PALMEIRO, M. CHERUBINI, K. YURGEL, L. S. Paracoccidioidomicose – Revisão da literatura. *Scientia Medica*. 15, 4, 274-278, 2005.

[54] TATIBANA, B. T., SANO, A., UNO, J. et AL. Resposta imune humoral na paracoccidioidomicose experimental em camundongos ddY. *Semina: Ciências Agrárias*. 28, 2, 287-294, 2007.

[55] JOSEPHS, R. D., DERBYSHIRE, M., STROKA, J., EMONS, H., ANKLAM, E. Trichothecenes: reference materials and method validation. *Toxicol. Lett.* 153, 1, 123-132, 2004.

[56] CAVRET, S., LECOEUR, S., Fusariotoxin transfer in animal. *Food Chem. Toxicol.* 44, 3, 444-453, 2006.

[57] GUILHERMETTI, E., TAKAHACHI, G., SHINOBU, C. S., SVIDZINSK, T. I. E. *Fusarium* spp. as agents of onychomycosis in immunocompetent hosts *Int. J. Dermatol.* 46, 822-826, 2007.

[58] SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos, 5. Ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1994

[59] BAKEEV. Process Analytical Technology, *Blackwell PublishingLtd*, 2005.

[60] SIESLER, H.; OZAKI, W.; KAWATA, Y.; HEISE, S. H. M. Near-Infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Applications. *Wiley-VCH*, 2002.

[61] PASQUINI, C. Near Infrared Spectroscopy Fundamentals, Practical Aspects and Analytical Applications. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 2002.

[62] Hirschfeld, T., Chase D. B. FT-Raman Spectroscopy: Development and Justification. *Appl. Spectrosc.* 40, 2, 133-137, 1986.

[63] SOCRATES, G. Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and Charts. Third edition, Chichester, 347, 2001.

[64] NOTINGHER, I. Raman spectroscopy cell-based biosensors. *Sensors.* 7, 1343-1358, 2007.

[65] NOTINGHER, I., VERRIER, S., HAQUE, S., POLAK, J. M., HENCH, L. L. Spectroscopic study of human living epithelial cells (A549) in culture: living cells versus dead cells. *Biopolymers.* 72, 230-240, 2003.

[66] SHIKANAI-YASUDA, M. A., PEREIRA, P. M., YAMASHIRO-KANASHIRO, E., DUARTE, M. I., ASSIS, C. M., et al. Lung tissue mechanics in the early stages of induced paracoccidioidomycosis in rats. *J. Med. Biol.* 30, 1175–1179. 1997.

[67] FRANCO, L., NAJVAR, L., GOMEZ, B. L., RESTREPO, S., GRAYBILL, J. R. Experimental pulmonary fibrosis induced by *Paracoccidioides brasiliensis*

conidia: measurement of local host responses. *J. Trop. Med. Hyg.* 58, 424–430, 1998.

[68] CANO, L. E., S. S. KASHINO, C. ARRUDA, D. ANDRE, C. F. XIDIEH, et al. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect. Immun.* 66, 800–806, 1998.

[69] SOUTO, J. T., FIGUEIREDO, F., FURLANETTO, A., PFEFFER, K., ROSSI, M. A., et al. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *J. Pathol.* 156, 1811–1820. 2000.

[70] ARRUDA, C., FRANCO, M. F., KASHINO, S. S., NASCIMENTO, F. R., FAZIOLI, R. dos A., et al. 2002.. Interleukin-12 protects mice against disseminated infection caused by *Paracoccidioides brasiliensis* but enhances pulmonary inflammation. *Clin. Immunol.* 103, 185–195, 2002.

[71] MOSCARDI-BACCHI, M., SOARES, A., MENDES, R., MARQUES, S., FRANCO, M. In situ localization of T lymphocyte subsets in human paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet. Mycol.* 27, 149–158, 1989.

[72] ITANO, E. N., SASAKI, A. A., RIBEIRO, A. B., FUJII, S., ONO, E. Y. S., et al. 2008. Effect of *Fusarium verticillioides* extract on specific antibody production against *Paracoccidioides brasiliensis*. *World Mycotoxin J.* 1, 375–380, 2008.

[73] SILVA-VERGARA, M. L., MARTINEZ, R., MALTA, M. E. B., RAMIREZ, L. E., FRANCO F. A. The marsupial *Didelphis albiventris* is an improbable host of *Paracoccidioides brasiliensis* in an endemic area of paracoccidioidomycosis in Minas Gerais, Brazil. *Mem. Ins. Oswaldo Cruz.* 96, 771–772, 2001.

[74] VILANI-MORENO, F., FECCHIO, D., DE MATTOS, M. C., MOSCARDI-BACCHI, M., DEFAVERI, J., et al. Study of pulmonary experimental paracoccidioidomycosis by analysis of bronchoalveolar lavage cells: resistant vs. susceptible mice. *Mycopathologia*. 141, 79- 91, 1998.

[75] CLERC, P., P. J. SANSONETTI. Entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells: evidence for directed phagocytosis involving actin polymerization and myosin accumulation. *Infect. Immun.* 55, 2681-2688, 1987.

[76] FINLAY, B. B., S. FALKOW. 1997. Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 136–169, 1997.

[77] MENDES-GIANNINI, M. J., TAYLOR, M. L., BOUCHARA, J. B., BURGER, E., CALICH, V. L., et al. Pathogenesis II: fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. *Med. Mycol.* 38, 113–123, 2000.

[78] HANNA, S. A., SILVA, J. L. M. DA, MENDES-GIANNINI, M. J. S. Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. *Microbes Infect.* 2, 877–884, 2000.

[79] MENDES-GIANNINI, M. J. S., RICCI, L. C., UEMURA, M., TOSCANO, E., ARNS, C. W. 1994. Infection and apparent invasion of Vero cells by *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Med. Vet. Mycol.* 32, 189–195, 1994.

[80] BRITO, T., FURTADO, J. S., CASTRO, R. M., MANINI, M. Intraepithelial parasitism as an infection mechanism in human paracoccidioidomycosis, *Vir. Arch. Pathol. Anat.* 361, 129-138, 1973.

-
- [81] TUDER, R. M., EL IBRAHIM, R., GODOY, C. E., DE BRITO, T. Pathology of the human pulmonary paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*, 92, 179 -188, 1985.
- [82] BORGES-WALMSLEY, M. I., CHEN, D., SHU, X., WALMSLEY, A. R. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends Microbiol.* 10, 80-87, 2002.
- [83] CACERE, C. R., ROMANO, C. C., MENDES-GIANNINI, M. J. S., DUARTE, A. J. S., BENARD, G. The role of apoptosis in the antigen-specific T cell hyporesponsiveness of paracoccidioidomycosis patients. *Clin. Immunol.* 105, 215-222, 2002.
- [84] VICENTINI, A. P., GESZTESI, J. L., FRANCO, M. F., SOUZA, W., MORAES, J. Z., et al. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect. Immun.* 62, 1465-1469. 1994.
- [85] KONNO, A.Y.C., J. T. MARICATO, F. T. C. KONNO, M. MARIANO, LOPES, J. D. 2009. Peptides from *Paracoccidioides brasiliensis* GP43 inhibit macrophage functions and inflammatory response. *Microbes Infect.* 11, 92-99. 2009.
- [86] POPI, A. F., LOPES J. D., MARIANO M.. GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. *Cell. Immunol.* 218, 87-94, 2002.
- [87] MENDES-GIANNINI, M. J. S., HANNA, S. A., DA SILVA, J. L. M., ANDREOTTI, P. F., VINCENZI, L. R., et al. Invasion of epithelial mammalian cells by *Paracoccidioides brasiliensis* leads to cytoskeletal rearrangement and apoptosis of the host cell. *Microbes Infect.* 6, 882–891, 2004.

[88] NAUMANN, D.; MEYERS, R. A. Encyclopedia of Analytical Chemistry, John Wiley and Sons, Chichester, 102–131, 2000.

[89] KRAFFT, C.; CODRICH, D.; PELIZZO, G.; SERGO, V. Raman and FTIR microscopic imaging of colon tissue: a comparative study. J. Biophotonics, 1, 154-169, 2008.

[90] CHIRIBOGA, L.; XIE, P.; YEE, H.; VIGORITA, V.; ZAROU, D.; ZAKIM, D.; DIEM, M.; Infrared spectroscopy of human tissue. I. Differentiation and maturation of epithelial cells in the human cervix. Biospectroscopy, 4, 47–53, 1998.

[91] MORATTO, E. M. *Espectroscopia fotoacústica como método de estudo da paracoccidiodomicose*. Dissertação de mestrado. Programa de pós graduação em Ciência Farmacêuticas. Universidade Estadual de Maringá-PR. 2011.

[92] MOSCARDI-BACCHI, M.; SOARES, A.; MENDES, R.; MARQUES, S.; FRANCO, M. In situ localization of T lymphocyte subsets in human paracoccidiodomycosis. J. Med. Vet. Mycol. 27, 149-158, 1989.

[93] YANG, W.; XIAO X.; TAN, J.; CAI, Q. In situ evaluation of breast cancer cell growth with 3D ATR-FTIR spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 49, 64–67, 2009.

[94] ZHOU, J.; WANG, Z.; SUN, S.; LIU, M.; ZHANG, H. A rapid method for detecting conformational changes during differentiation and apoptosis of HL60 cells by Fourier-transform infrared spectroscopy. Biotechnol. Appl. Biochem., 33, 127-132, 2001.

[95] RAMESH, J.; KAPELUSHNIK, J.; MORDEHAIL, J.; MOSER, A.; HULEIHEL, M.; ERUKHIMOVITCH, V.; LEVI, C.; MORDECHAI, S. Novel methodology for the follow-up of acute lymphoblastic leukemia using FTIR microspectroscopy. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 51, 251-261, 2002.

[96] SALMAN, A. et al., FTIR microspectroscopy of malignant fibroblasts transformed by mouse sarcoma virus, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 55, 141–153, 2003.

[97] MALINI, R., VENKATAKRISHNA, K., KURIEN, J., PAI, K. M., RAO, L., et al. Discrimination of normal, inflammatory, premalignant, and malignant oral tissue: A Raman spectroscopy study. *Biopolymers* 81, 3, 179-193, 2006.

[98] LORINCZ, A. L., HADDAD, D., NAIK, R., FUNG, A., CAO, A., et al. Raman spectroscopy for neoplastic tissue differentiation: A piloto study. *J Pediatr. Surg.* 39, 6, 953–956, 2004.

[99] SINGER-VERMES, L. M., BURGER, E., CALICH, V. L. G., MODESTO-XAVIER, L. H., SAKAMOTO T. N., et al. Pathogenicity of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in the human disease and in an experimental murine model. *Clin. Exp. Immunol.* 97, 113–119, 1994.

[100] BORGES-WALMSLEY, M. I., CHEN, D., SHU, X., WALMSLEY, A. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Curr. Trends. Microbiol.* 10, 2. 80-87. 2002.

[101] BARBOSA, W., DAHER, R., OLIVEIRA, A. R. Forma linfático-abdominal da Blasto micose Sul-Americana. *Revista Inst. Med. Trop. São Paulo.* 10,1,16–27. 1968.

- [102] BRITO, T., CASTRO, R. M., SHIROMA, M. Biopsia hepática na blastomicrose sul-americana. *Revista Inst. Med. Trop. São Paulo* 10, 3, 188–191, 1968.
- [103] BERTINI, S., COLOMBO, A. L., TAKAHASHI, H. K., STRAUS, A. H. Expression of antibodies directed to *Paracoccidioides brasiliensis* glycosphingolipids during the course of Paracoccidioidomycosis treatment. *Clin. Vaccine Immunol.* 14, 2, 150–156, 2007.
- [104] Da SILVA, F. C., SVIDZINSKI, T. I. E., PATUSSI E. V., CARDOSO, C. P., DALALIO, M. M. O., et al. Morphologic organization of pulmonar granulomas in mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80, 5, 798–804, 2009.
- [105] LIEN-VIEN, D., COLTHUP, N. B., FATELEY, W.G., GRASSELLI, J.G. The handbook of IR and Raman characteristic frequencies of organic molecules (Compounds containing –NH₂, –NHR and NR₂). Academic Press California LTD. 155–175, 1991.
- [106] ANDREOTTI, P. F., MONTEIRO, S., BILAO, A. M., SOARES, C. M., BENARD, G., et al. (2005) Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect.* 7, 875–881, 2005.
- [107] Mc MAHON J. P., WHEAT, J., SOBEL, M. E., PASULA, R., DOWNING. J. F., et al. Murine laminin binds to *Histoplasma capsulatum*. A possible mechanism of dissemination. *J. Clin. Infect. Dis.* 96, 1010–1017. 1995.
- [108] LENZI, H. L., CALICH V. L. G., MENDES-GIANINNI M. J. S., XIDIEH, C. F., MIYAJI M., et al. Two patterns of extracellular matrix expression in experimental paracoccidioidomycosis. *Med. Mycol. J.* 38, 115–119, 2000.

[109] MANSANO, E. S. B., MORAIS, G. R., MORATTO, E. M., SATO, F., NETO, M. A., SVIDZINSKI, T. I. E., BAESSO, M. L. Correlation between histopathological and FT-Raman spectroscopy analysis of the liver of Swiss mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. Plos one. 9, 9, e106256, 2014.

[110] VILLALOBOS-DUNO, H., SAN-BLAS, G., PAULINKEVICIUS, M., SANCHEZ-MARTIN, Y., NINOVEGA, G. Biochemical characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* α -1,3-glucanase Agn1p, and its functionality by heterologous expression in *Schizosaccharomyces pombe*. PloS ONE 8, 6, 1–12. 2013.

[111] SHIKANAI-YASUDA, M. A., TELLES FILHO, F. Q., MENDES, R. P., COLOMBO, A. L., MORETTI M. L., et al. (2006) Consenso em paracoccidioidomicose – Relatório Técnico. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 39, 3, 297-310, 2006.

[112] Da SILVA, J. F., OLIVEIRA, H. C., MARCOS, C. M., Da SILVA, R. A. M., Da COSTA, T. A., et al. (2013) *Paracoccidioides brasiliensis* 30 kDa Adhesin: Identification as a 14-3-3 protein, cloning and subcellular localization in infection models. PloS ONE 8, 4, 1–10, 2013.

[113] MALINI, R., VENKATAKRISHNA, K., KURIEN, J., PAI, K. M., RAO, L., et al. (2006) Discrimination of normal, inflammatory, premalignant, and malignant oral tissue: A Raman spectroscopy study. Biopolymers 81, 3, 179–193, 2006.

[114] De OLIVEIRA, A. F., SANTOS, I. D. DE A. O., CARTAXO, S. B., BITAR, R. A., SIMÕES, M. M., et al. Differential diagnosis in primary and metastatic cutaneous melanoma by FT-Raman spectroscopy. Acta Cir. Bras. 25, 5, 434–439, 2010.

-
- [115] 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. *J. Biomed. Opt.* 15, 1, 017009, 2010.
- [116] GONZÁLEZ, A., LENZI, H. L., MOTTA, E. M., CAPUTO, L., RESTREPO, A., et al. Expression and arrangement of extracellular matrix proteins in the lungs of mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 89, 106–116, 2008.
- [117] ACORCI, M. J., DIAS-MELICIO, L. A., GOLIM, M. A., BORDON-GRACIANI, A. P., PERACOLI, M. T. S., et al. Inhibition of human neutrophil apoptosis by *Paracoccidioides brasiliensis*: Role of interleukin-8. *Scand. J. Immunol.* 69: 73–79, 2008.
- [118] DEFAVERI, J., REZKALLAH-IWASSO, M. T., FRANCO, M. F. Experimental pulmonar paracoccidioidomycosis in mice: Morphology and correlation of lesion with humoral and cellular immune response. *Mycopathologia* 77, 3–11, 1982.
- [119] DEFAVERI, J., MARTIN, L. C., FRANCO, M. Histological and ultrastructural study of the inflammation evoked by *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in previously immunized mice. *Mycopathologia* 105, 53–58, 1989.
- [120] DEFAVERI, J., REZKALLAH-IWASSO, M. T., FRANCO, M. Pulmonary paracoccidioidomycosis in immunized mice. *Mycopathologia* 119, 1–9, 1992.
- [121] FORTES, R. M., KIPNIS, A., JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P. *Paracoccidioides brasiliensis* pancreatic destruction in *Calomys callosus* experimentally infected. *BMC Microbiol* 9: 84, 2009.

[122] FORTES, M. R. P., KUROKAWA, C. S., MARQUES, A. S., MIOT, H. A., MARQUES, M. E. A. Immunology of paracoccidioidomycosis. *An. Bras. Dermatol.* 86, 3, 516–525, 2011.

[123] NINET, B., JAN, I., BONTEMS, O., LÉCHENNE, B., JOUSSON, O., LEW, D., SCHRENZEL, J., PANIZZON, R. G., MONOD, M. Molecular identification of *Fusarium* species in onychomycoses. *Dermatology.* 210, 1, 21-25, 2005.

[124] ROMANO, C., CAPOSCIUTTI, P., GHILARDI, A., MIRACCO, C., FIMIANI, M. A case of primary localized cutaneous infection due to *Fusarium oxysporum*. *Mycopathologia.* 170, 1, 39-46, 2010.

[125] MELO, K. C. S., SVIDZINSKI, T. I. E., ZAPATER, M. C. V. U., Da Silva, T. H. D., MORAIS, G. R., SATO, F., BAESSO, M. L., HERNANDES, L. Are metabolites of *Fusarium oxysporum* responsible for fungal skin invasion? A morphological and Raman spectroscopy monitoring. *J. Raman Spectroscopy.* 45, 473-878, 2014.

[126] GNIADOCKA, M., WULF, H. C., MORTENSEN, N. N., NIELSEN, O. F., CHRISTENSEN, D. H. Diagnosis of basal cells carcinoma by Raman spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.* 28, 125-129, 1997.

[127] WILLIAMS, A. C., BARRY, B. W., EDWARDS, H. G., FARWELL, D. W. A critical comparison of some Raman spectroscopic techniques for studies of human stratum corneum. *Pharm. Res.* 10, 11, 1642-1647, 1993.

[128] KNUDSEN L., JOHANSSON C. K., PHILIPSEN P. A., GNIADOCKA M., WULF H. C. Natural variations and reproducibility of *in vivo* near-infrared Fourier

transform Raman spectroscopy of normal human skin. *J. Raman Spectrosc.* 33, 7, 574-579, 2002.

[129] NGUYEN, T. T., HAPPILLON, T., FERU, J., BRASSART-PASSCO, S., ANGIBOUST, J. F., MANFAIT, M., PIOT, O. *J. Raman Spectrosc.* 44, 1230, 2013.

[130] MARANGON, A. V., SVIDZINSKI, T. I., SALCI, E. T. P., MEURER, R., FERNANDES M. C., HERNANDES, L. Metabolic extract of *Fusarium oxysporum* induces histopathologic alterations and apoptosis in the skin of Wistar rats *Int. J. Dermatol.* 48, 7, 697-703, 2009.

[131] LAIRINI, K., PEREZ-ESPINOSA, A., PINEDA, M., RUIZ-RUBIO, M. Purification and characterization of tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 5, 1604-1609, 1996.

[132] BIGALKE, H., RUMMEL, A. Medical aspects of toxin weapons. *Toxicology.* 214, 3, 210-220, 2005.

[133] NGUANSANGIAM, S., ANGSUBHAKORN, S., BHAMARAPRAVATI, 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.* 34, 4, 899-905, 2003.

[134] NELSON, P. E., DIGNANI, M. C., ANAISSIE, E. J. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin. Microbiol. Rev.* 7, 4, 479-504, 1994.

[135] HERNANDES, L., MARANGON, A. V., SALCI, T., SVIDZINSKI, T. I. E. Toxic thermoresistant metabolites of *Fusarium oxysporum* are capable of

inducing histopathological alterations in Wistar rats. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.18, 2, 144-149, 2012.

[136] De PAULO, L. F., COELHO, A. C., SVIDZINSKI, T. I. E., SATO, F., ROHLING, J. H., NATALI, M. R. M., BAESSO, M. L., HERNANDES, L.. Crude extract of *Fusarium oxysporum* induces apoptosis and structural alterations in the skin of healthy rats J. Biomed. Opt. 18, 095004, 2013.

Trabalhos publicados a partir dos resultados desta tese:

1. MANSANO, ELAINE SCIUNITI BENITES; **MORAIS, GUTIERREZ RODRIGUES DE**; MORATTO, EDILAINE MARTINS; SATO, FRANCIELLE; MEDINA NETO, ANTONIO; SVIDZINSKI, TEREZINHA INES ESTIVALET; BAESSO, MAURO LUCIANO; HERNANDES, LUZMARINA. Correlation between Histopathological and FT-Raman Spectroscopy Analysis of the Liver of Swiss Mice Infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. Plos One, v. 9, p. e106256, 2014.

2. SIBIN MELO, KÁTIA CRISTINA; SVIDZINSKI, TEREZINHA INEZ ESTIVALET; ZAPATER, MARIANA CRISTINA VICENTE UMADA; DA SILVA, THIAGO HONÓRIO DUTRA; **DE MORAIS, GUTIERREZ RODRIGUES**; SATO, FRANCIELLE; BAESSO, MAURO LUCIANO; HERNANDES, LUZMARINA. Are metabolites of *Fusarium oxysporum* responsible for fungal skin invasion? A morphological and Raman spectroscopy monitoring. Journal of Raman Spectroscopy, v. 45, p. n/a-n/a, 2014.

3. MORATO, EDILAINE M.; **MORAIS, GUTIERREZ R.**; SATO, FRANCIELLE; MEDINA, ANTONIO N.; SVIDZINSKI, TEREZINHA I. E.; BAESSO, MAURO L.; HERNANDES, LUZMARINA . Morphological and Structural Changes in Lung Tissue Infected by *Paracoccidioides brasiliensis*: FTIR Photoacoustic Spectroscopy and Histological Analysis. Photochemistry and Photobiology, v. 89, p. n/a-n/a, 2013.

Trabalhos publicados que não foram incluídos na tese:

1. MARTINEZ, CAMILA O.; RUIZ, SUELEN P.; FENELON, VANDERSON C.; **DE MORAIS, GUTIERREZ R.**; BAESSO, MAURO L.; MATIOLI, GRACIETTE . Characterization of curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 cells immobilized in a loofa sponge matrix, and application of this biopolymer in the development of functional yogurt. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. xxxx, p. n/a-n/a, 2015.

2. MOTA, THATIANE RODRIGUES; KATO, CAMILA GABRIEL; PERALTA, ROSELY APARECIDA; BRACHT, ADELAR; **DE MORAIS, GUTIERREZ RODRIGUEZ**; BAESSO, MAURO LUCIANO; DE SOUZA, CRISTINA GIATTI MARQUES; PERALTA, ROSANE MARINA. Decolourization of Congo Red by *Ganoderma lucidum* Laccase: Evaluation of Degradation Products and Toxicity. *Water, Air and Soil Pollution (Print)*, v. 226, p. 351, 2015.

3. PINTO, SANDRA; BUENO, FERNANDA; PANIZZON, GEAN; **MORAIS, GUTIERREZ**; DOS SANTOS, PAULO; BAESSO, MAURO; LEITE-MELLO, ENERI; DE MELLO, JOÃO. *Stryphnodendron adstringens*: Clarifying Wound Healing in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Planta Medica*, v. 81, p. 1090-1096, 2015.

4. DA SILVA, SIMONE MARIANO; KOEHNLEIN, ELOÁ ANGÉLICA; BRACHT, ADELAR; CASTOLDI, RAFAEL; **DE MORAIS, GUTIERREZ RODRIGUES**; BAESSO, MAURO LUCIANO; PERALTA, ROSELY APARECIDA; DE SOUZA, CRISTINA GIATTI MARQUES; DE SÁ-NAKANISHI, ANACHARIS BABETO; PERALTA, ROSANE MARINA . Inhibition of salivary and pancreatic α -amylases by a pinhão coat (*Araucaria angustifolia*) extract rich in condensed tannin. *Food Research International*, v. 56, p. 1-8, 2014.

5. CASTOLDI, RAFAEL; BRACHT, ADELAR; **DE MORAIS, GUTIERREZ RODRIGUEZ**; BAESSO, MAURO LUCIANO; CORREA, RUBIA CARVALHO GOMES; PERALTA, ROSELY APARECIDA; MOREIRA, REGINA DE FÁTIMA PERALTA MUNIZ ; POLIZELI, MARIA DE LOURDES TEIXEIRA DE MORAES; DE SOUZA, CRISTINA GIATTI MARQUES ; PERALTA, ROSANE MARINA . Biological pretreatment of *Eucalyptus grandis* sawdust with white-rot fungi: Study of degradation patterns and saccharification kinetics. *Chemical Engineering Journal (1996)*, v. 258, p. 240-246, 2014.

6. LIMA, M. K.; FERNANDES, DANIELA MARTINS; SILVA, MARCELA FERNANDES; BAESSO, MAURO LUCIANO; NETO, ANTONIO MEDINA; **MORAIS, G. R.**; NAKAMURA, CELSO VATARU; OLIVEIRA CALEARE, ANGELO; HECHENLEITNER, ANA ADELINA WINKLER ; PINEDA, EDGARDO ALFONSO

GÓMEZ . Co-doped ZnO nanoparticles synthesized by an adapted sol-gel method: effects on the structural, optical, photocatalytic and antibacterial properties. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, v. 72, p. 301-309, 2014.

7. MORIWAKI, CRISTIANE; MANGOLIM, CAMILA SAMPAIO; RUIZ, GRAZIELE BRESCANSIN; **MORAIS, GUTIERREZ RODRIGUES DE**; BAESSO, MAURO LUCIANO; MATIOLI, GRACIETTE. Biosynthesis of CGTase by immobilised alkalophilic bacilli and crystallisation of beta-cyclodextrin: Effective techniques to investigate cell immobilisation and the production of cyclodextrins. *Biochemical Engineering Journal*, v. 83, p. 22, 2013.