

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO

PEDRO SATIRO CARVALHO JUNIOR

**AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE
DIFERENTES LINHAGENS DE CAMUNDONGOS À
INFECCÃO POR *Fusarium oxysporum*.**

**SÃO LUÍS
2010**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

PEDRO SATIRO CARVALHO JUNIOR

**AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE DIFERENTES LINHAGENS DE
CAMUNDONGOS À INFECÇÃO POR *Fusarium oxysporum*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof(a). Dr(a). – Flávia Raquel Fernandes do Nascimento.

**SÃO LUÍS
2010**

Carvalho Júnior, Pedro Satiro

Avaliação da susceptibilidade de diferentes linhagens de camundongos à infecção por *Fusarium oxysporum*./Pedro Satiro Carvalho Júnior. – São Luís, 2010.

59f.

Orientador: Prof^a Dr^a Flávia Raquel Fernandes do Nascimento.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Maranhão, UFMA, 2010

1. Fusarium-Fusariose-Modelo Experimental-Camundongos. I. Título.

CDU

Pedro Satiro Carvalho Junior

**AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE DIFERENTES LINHAGENS DE
CAMUNDONGOS À INFECÇÃO POR *Fusarium oxysporum*.**

A Comissão julgadora da Defesa do Trabalho Final de Mestrado em
Ciências da Saúde, em sessão pública realizada no dia / / , considerou
o(a) candidato(a)

() APROVADO

() REPROVADO

1) Examinador _____

2) Examinador _____

3) Examinador _____

4) Presidente (Orientador) _____

*Aos meus pais Pedro Satiro e Domingas
Carvalho.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de inspiração;

Aos meus pais Pedro Satiro e Domingas Carvalho pelo seguro alicerce;

À minha avó Maria, pelo carinho doado;

Ao meu irmão Emmanuel Malheiros, que me socorreu sempre quando mais precisei;

A todos os meus amigos pela amizade e confiança;

Aos companheiros de trabalho e a minha equipe da Pague Menos pelo incentivo diário;

À minha eterna orientadora, educadora, amiga Prof^ª Dr^ª Flávia Raquel por acreditar e investir em mim.

“O impossível é apenas uma força te
convidando para realizar.”

Mario Prata

RESUMO

A fusariose é uma doença causada pelo fungo do gênero *Fusarium*, um fitopatógeno que também provoca infecção local ou sistêmica em humanos, principalmente imunocomprometidos, podendo levá-los ao óbito. O objetivo deste trabalho foi estabelecer um modelo experimental da fusariose em camundongos, para melhor conhecimento sobre a doença. Para isso, camundongos das linhagens Swiss, C3H/HePAS e C57Bl/6 (2-3 meses, machos, 15/grupo) foram inoculados por via intraperitoneal com 0,2 mL de suspensão de *Fusarium oxysporum* isolado do solo e mantido em ágar com repiques semanais. Após 1 e 4 semanas pós inoculação (pi), os camundongos foram pesados, exsanguinados, para obtenção do soro e sacrificados e tiveram seus pulmões, baço e fígado removidos, pesados e triturados em 1 mL de solução salina. Uma alíquota destas suspensões foi semeada em ágar batata e o crescimento do fungo foi acompanhado por uma semana. Os 5 animais restantes foram mantidos para acompanhamento da sobrevida. Na primeira semana pi, apenas a linhagem C3H/HePAS apresentou redução no peso corporal, a linhagem C57Bl/6 apresentou aumento do peso do fígado e todas as linhagens apresentaram aumento do peso do baço. Na quarta semana apenas as linhagens C57Bl/6 e C3H/HePAS ainda mantiveram o peso do baço aumentado. Não houve diferenças significativas na avaliação do peso do pulmão em nenhuma das linhagens nos dois tempos. Houve crescimento do fungo nas culturas de todos os órgãos das três linhagens na 1ª semana pi, porém, na 4ª semana pi não houve crescimento no pulmão em nenhuma das linhagens, sendo que a linhagem C3H/HePAS se destacou pelo alto crescimento do fungo no baço. Em relação à sobrevida, a linhagem C3H/HePAS foi a mais susceptível uma vez que após 7 meses de infecção 100% dos animais foram à óbito, contra 60% dos C57Bl/6 e 40% dos Swiss. A linhagem C3H/HePAS apresentou uma maior produção de IFN- γ e uma menor produção de IL-10 quando comparada com as outras linhagens. Os dados nos permitem concluir que das 3 linhagens testadas, a C3H/HePas é a mais susceptível ao *Fusarium oxysporum*, sendo o modelo de infecção intraperitoneal bastante útil para a avaliação da disseminação fúngica e controle da infecção.

Palavras-chave: *Fusarium*; fusariose; modelo experimental; camundongos.

ABSTRACT

The fusariosis is a disease caused by a fungus from *Fusarium* genus, a phytopathogen that can also induce local and systemic infection in the human beings, causing death, mainly in the immunosuppressed ones. The aim of this work was establish an experimental model of *Fusarium* infection in immunocompetent mice, to better understand the disease. Swiss, C3H/HePAS and C57Bl/6 mice (2-3 months old, male, 15/group) were inoculated by intraperitoneal route with 0,2 mL *Fusarium oxysporum* suspension. This fungus was isolated from the solo and maintained in agar by weekly replications. After 1 and 4 weeks post infection (pi), the mice of all strains (5/week) were weighed and the blood, spleen, liver and lungs were collected. The organs were weighed and triturated in saline solution (1mL). An aliquot of the cells suspension was added to potatoes agar and the fungal burden was followed by one week. The rest of mice (5/strain) were followed to evaluate the survival. At the first week pi. only the C3H/HePAS strain presented a reduction in the body weight, only the C57Bl/6 strain presented an increase in the liver weight, but all the strains presented increase in the spleen. At the fourth week there were no alterations in body weight and only C57Bl/6 and C3H/HePAS strains still presented the spleen weight increased. The fungal burden was observed in all organs in the first week, but at the fourth week there was no fungal burden in the lungs anymore. The C3H/HePAS presented high fungal burden in the spleen at first and fourth week, and it was the first strain to die, since all mice were death after seven months pi. At this time 40% of C57Bl/6 mice and 60% of Swiss mice were still alive. The C3H/HePAS strain presented bigger IFN- γ production but smaller IL-10 production than the other mice strains. In conclusion, C3H/HePas mice are the most susceptible to *Fusarium oxysporum* infection what can be related with the Th1 pattern of immunological response presented by this strain.

Key-words: *Fusarium*, fusariosis, experimental model

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Efeito da inoculação da suspensão de <i>Fusarium oxysporum</i> . sobre o peso corpóreo dos animais.	17
FIGURA 2	Efeito da inoculação da suspensão de <i>Fusarium oxysporum</i> . sobre o peso do fígado.	18
FIGURA 3	Efeito da inoculação da suspensão de <i>Fusarium oxysporum</i> . sobre o peso dos pulmões.	19
FIGURA 4	Efeito da inoculação da suspensão de <i>Fusarium oxysporum</i> . sobre o peso do baço.	20
FIGURA 5	Efeito da inoculação da suspensão de <i>Fusarium oxysporum</i> . sobre o número de células do baço.....	21
FIGURA 6	Dosagem de IL-10 e IFN γ no soro de camundongos inoculados com <i>Fusarium oxysporum</i>	23
FIGURA 7	Efeito da inoculação da suspensão de <i>Fusarium oxysporum</i> . no tempo de sobrevivência de camundongos de diferentes linhagens.....	25

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	x
<i>1 INTRODUÇÃO.....</i>	<i>1</i>
<i>2 OBJETIVOS.....</i>	<i>6</i>
<i>3 CAPÍTULO I - AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE DIFERENTES LINHAGENS DE CAMUNDONGOS A INFECÇÃO POR <i>Fusarium oxysporum</i></i>	<i>7</i>
<i>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</i>	<i>36</i>
<i>REFERÊNCIAS.....</i>	<i>37</i>
<i>ANEXO A – Normas para publicação Brazilian Journal of medical and biological research.....</i>	<i>41</i>

INTRODUÇÃO

As doenças fúngicas constituem, atualmente, diferentes problemas de Saúde Pública, embora as micoses não sejam doenças de notificação obrigatória para a Organização Mundial de Saúde. No Brasil, têm-se referido inúmeras micoses superficiais, profundas e oportunistas. No Maranhão, há uma subnotificação dos casos o que é decorrente da insuficiência de profissionais e laboratórios estruturados nos hospitais locais (NASCIMENTO et al., 2003).

Em nosso planeta, existem aproximadamente 200 mil espécies de fungos, sendo a grande maioria incapaz de causar infecções em humanos por falta de adaptação ao organismo dos mamíferos. Entretanto, cerca de 200 espécies fúngicas conseguiram adaptar-se e sobreviver ao ambiente hostil de nosso organismo (TELLES, 2004).

Os fungos são microrganismos cosmopolitas. O clima tropical, entretanto, favorece o crescimento de várias espécies, que a partir do seu habitat natural, espalham-se na natureza, utilizando-se de várias vias de dispersão, como o ar atmosférico, água, insetos, homem e animais. Os fungos que habitam o solo ou vegetais são dispersos principalmente pelo ar atmosférico, embora possam utilizar outras vias, sendo denominados fungos contaminantes. Dentre os fungos mais freqüentes no ar podemos destacar *Aspergillus* sp, *Fusarium* sp e *Cladosporium* sp (DARINI et al, 2003).

Desde a última década, fungos filamentosos têm sido implicados em um aumento do número de infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos, em especial a fusariose (GUARO; GENÉ, 1995; NUCCI; ANAISSIE, 2002; NIR-PAZ et al, 2004, PINCELLI et al, 2008).

A fusariose ou gomose é uma doença comum em vegetais, causada por diversas espécies do gênero *Fusarium*. O fungo causador dessa patologia é classificado como um fungo imperfeito, caracterizado por um micélio hialino, ramificado e septado, com esporóforos em forma de fiálides e conídios de forma e tamanho variável, apresentando macroconídeas fusiformes, com vários septos (LACAZ et al., 1991). Este fungo encontra-se amplamente disseminado por solos ricos em resíduos vegetais, sendo considerado um fitopatógeno, tendo distribuição geográfica universal (GUARRO; GENÉ, 1992).

Nos vegetais o fungo do gênero *Fusarium* é bastante nocivo, podendo levar à morte ou má-formação de frutos. O controle desta fitoendemia é bastante difícil, sendo que nenhuma prática tem sido adequada para reduzir o impacto da doença. Além disso, safras chuvosas e semeadura direta favorecem a incidência da doença nos vegetais (SNYDER; HANSEN, 2004).

O contato da pele lesionada com vegetais ou solo infectado com os fungos do gênero *Fusarium* podem levar ao aparecimento de lesões locais ou sistêmicas nos seres humanos. As lesões ocorrem principalmente em decorrência de lesões traumáticas ou infecções secundárias às queimaduras. As manifestações mais frequentes são ceratites, úlceras de pele, micetomas e osteoartrites (RIPPON et al., 1990; WARNOCK et al., 1991; THOMAS, 1992; NASCIMENTO et al, 2002). A doença manifesta-se com febre e grandes lesões cutâneas ulcerativas que evoluem para necrose, o que dificulta o diagnóstico diferencial para *Aspergillus*, porém ao contrário deste, é freqüente a hemocultura positiva em casos de fusariose disseminada (ZAITZ, 1998).

O fungo do gênero *Fusarium* destaca-se não só pela sua agressividade, mas também por levar ao óbito a maioria dos pacientes com infecção disseminada, mesmo em uso de altas doses de anfotericina B, considerada o antifúngico mais eficaz (GUARRO; GENÉ, 1992).

Segundo LACAZ (1991) as espécies mais frequentemente isoladas de casos humanos têm sido *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. roseum*. E de acordo com Guarro e Gené (1995), 27 casos de 83 estudados por eles foram causados por *F. solani*, sendo essa espécie resistente aos antifúngicos testados *in vitro*, em especial anfotericina B, o que resulta em alta mortalidade associada a essa fungo. Enquanto *Fusarium oxysporum* foi responsável por 20 % dos casos publicados entre 2001 e 2005, de acordo com o levantamento de Nucci e Anaissie em 2007.

Dentre os casos de onicomicoses causados pelas espécies de *Fusarium*, a grande maioria foi associada ao *Fusarium oxysporum* (GODOY et al., 2004; BRILHANTE et al., 2005; NINET et al., 2005).

Espécies de *Fusarium* possuem vários fatores de virulência, incluindo a capacidade de produzir micotoxinas, inclusive tricotecenos, que suprimem a imunidade humoral e celular e também pode causar a ruptura do tecido (NELSON et al., 1994).

O desenvolvimento da fusariose depende de certo grau de imunocomprometimento nos indivíduos. Como qualquer outro patógeno, o fungo quando em contato com o organismo, desencadeia uma resposta imune, onde há a participação de algumas linhagens celulares como, por exemplo, os macrófagos. Essas células são fundamentais no desenvolvimento da resposta imunológica, uma vez que atuam tanto na resposta imune inata, quanto na adquirida. Eles são responsáveis pela eliminação de resíduos orgânicos através da fagocitose, bem como pela apresentação de antígenos para reconhecimento dos linfócitos T, sendo uma das populações celulares que mais atua na liberação de sinais ativadores ou co-estimulatórios para outras células como: linfócitos T e B e para os próprios macrófagos (ADEREM; UNDERHILL, 1999).

Macrófagos obtidos de sítios inflamatórios ou infecciosos apresentam alterações morfo-funcionais típicas de um estado de ativação, que envolvem: o aumento nas funções microbicida e citotóxica ou tumoricida, relacionado com o aumento na secreção de altas concentrações de reativos intermediários do oxigênio (ROI), nitrogênio (RNI) e citocinas (VAN FURTH, 1992). A participação destas células e de seus metabólitos, como por exemplo, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico tem sido relatada em várias infecções, tais como as infecções causadas por *Cryptococcus neoformans*, *Schistosoma mansoni*, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Micobacterium* sp., *Plasmodium* sp., *Leishmania* sp., dentre outros (GREEN et al., 1992; MacMICKING et al., 1997).

Além disso, a ativação ou inativação destas células direcionada pelas citocinas liberadas por linfócitos do padrão Th1 ou Th2, respectivamente, está diretamente relacionada com o padrão de susceptibilidade dos hospedeiros aos agentes infecciosos, incluindo fungos causadores de infecções sistêmicas. Dentre essas citocinas, podemos citar o interferon- γ (IFN- γ) que é importante no processo de ativação de macrófagos, induzindo não só o aumento da expressão de moléculas de classe II do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) responsáveis pela apresentação de antígenos exógenos (STEEG et al, 1982), mas também a produção de outras citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF), por exemplo, além da secreção de uma série de metabólitos como os ROI (NATHAN et al, 1983) e RNI (DING et al, 1988).

Muitas micoses sistêmicas profundas são provenientes de infecções com fungos presentes no solo ou em vegetais, como por exemplo, a paracoccidioidomicose, que é bastante comum em diversas regiões do Brasil. Muito do que se conhece sobre os mecanismos imunológicos envolvidos nessa micose foi decorrente de estudos com modelos experimentais murinos. Os modelos experimentais são, portanto, instrumentos muito úteis para obtenção de

certas informações que ajudam a esclarecer os diferentes mecanismos envolvidos no estabelecimento, desenvolvimento e/ou controle de diferentes doenças humanas. Estes modelos permitem procedimentos e abordagens que podem ser difíceis, ou não éticos, no hospedeiro humano (CANO et al., 1995). Diversos modelos têm sido desenvolvidos com o propósito de estudar experimentalmente a relação parasito/hospedeiro durante a infecção por diversos microorganismos, porém, ainda existem poucos trabalhos explorando diversos aspectos nos modelos de infecção experimental pelo fungo do gênero *Fusarium*.

O primeiro trabalho a estabelecer um modelo de infecção por fungos do gênero *Fusarium* foi o de Legrand et al (1991). Nesse trabalho, além de estabelecer um modelo, ele demonstrou que a espécie mais patogênica em animais imunocompetentes foi *Fusarium solani*. Um pouco mais tarde, Anaissie et al (1992) demonstraram que a anfotericina B não apresentava efeito nas infecções murinas sistêmicas induzidas por fungos do gênero *Fusarium*. E mais tarde ainda, Mayayo et al (1999) confirmaram que *Fusarium solani* é a espécie mais virulenta, mesmo em animais imunocompetentes, e que o pulmão, fígado e baço estão entre os órgãos mais afetados.

A fusariose é uma doença emergente no Maranhão (NASCIMENTO et al., 2001) e poucos são os trabalhos realizados tanto no contexto clínico quanto no experimental. Neste trabalho buscamos, portanto, estudar o efeito da infecção por fungo do gênero *Fusarium* utilizando diferentes linhagens de camundongos imunocompetentes avaliando a relação entre a carga fúngica nos animais, a produção de citocinas, a celularidade dos órgãos linfóides, a sobrevivência dos animais e um possível perfil imunológico de susceptibilidade e/ou resistência à infecção. Os dados obtidos foram organizados em forma de artigo a ser submetido no Brazilian Journal of Medical and Biological Research (Anexo 1).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar os padrões de susceptibilidade e resistência de diferentes linhagens de camundongos frente à infecção por *Fusarium oxysporum*.

2.2 Específicos

Investigar se há disseminação do fungo quando o inóculo é por via intraperitoneal;

Quantificar as células dos baços de diferentes linhagens de camundongos infectados;

Avaliar alterações em órgãos vitais como fígado, baço e pulmão em camundongos infectados;

Quantificar citocinas (IFN- γ e IL-10) no soro de camundongos infectados;

Avaliar o grau de susceptibilidade de camundongos de diferentes linhagens frente à infecção.

3 CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE DIFERENTES LINHAGENS DE CAMUNDONGOS A INFECCÃO POR *Fusarium* *oxysporum*

*Carvalho Jr, PS^{ab}; Sousa, SM^a; Costa, GC^a; Silva, LA^a; Maciel, MCG^a; Nascimento, MDSB^b;
Bezerra, GFB^b; Nascimento, FRF^{a*}.*

^aLaboratório de Imunofisiologia and ^bNúcleo Imunologia Básica e Aplicada, Depto de Patologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses, s/n, Campus do Bacanga, São Luís, MA, Brazil.

***Autor para correspondência:** Flávia Nascimento

Endereço: *Av dos Portugueses s/n Campus do Bacanga*

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS)

Laboratório de Imunofisiologia, Prédio do Integrado, Bloco 1

São Luís, MA, Brazil

CEP: 65085-580

Phone: 55 98 32178548 / Fax: 55 98 32316844

E-mail: nascimentofrf@yahoo.com.br

RESUMO

A fusariose é uma doença causada pelo fungo do gênero *Fusarium*, um fitopatógeno que também provoca infecção local ou sistêmica em humanos, principalmente imunocomprometidos, podendo levá-los ao óbito. O objetivo deste trabalho foi avaliar os padrões de susceptibilidade e resistência frente à infecção por *Fusarium oxysporum* em camundongos. Para isso, camundongos das linhagens Swiss, C3H/HePAS e C57Bl/6 (2-3 meses, machos, 15/grupo) foram inoculados por via intraperitoneal com 0,2 mL de suspensão de *Fusarium oxysporum* isolado do solo e mantido em ágar com repiques semanais. Após 1 e 4 semanas pós inoculação (pi), os camundongos foram pesados, exsanguinados, para obtenção do soro e sacrificados e tiveram seus pulmões, baço e fígado removidos, pesados e triturados em 1 mL de solução salina. Uma alíquota destas suspensões foi semeada em ágar batata e o crescimento do fungo foi acompanhado por uma semana. Os 5 animais restantes foram mantidos para acompanhamento da sobrevida. Na primeira semana pi, apenas a linhagem C3H/HePAS apresentou redução no peso corporal, a linhagem C57Bl/6 apresentou aumento do peso do fígado e todas as linhagens apresentaram aumento do peso do baço. Na quarta semana apenas as linhagens C57Bl/6 e C3H/HePAS ainda mantiveram o peso do baço aumentado. Não houve diferenças significativas na avaliação do peso do pulmão em nenhuma das linhagens nos dois tempos. Houve crescimento do fungo nas culturas de todos os órgãos das três linhagens na 1ª semana pi, porém, na 4ª semana pi não houve crescimento no pulmão em nenhuma das linhagens, sendo que a linhagem C3H/HePAS se destacou pelo alto crescimento do fungo no baço. Em relação à sobrevida, a linhagem C3H/HePAS foi a mais susceptível uma vez que após 7 meses de infecção 100% dos animais foram à óbito, contra 60% dos C57Bl/6 e 40% dos Swiss. A linhagem C3H/HePAS apresentou uma maior produção de IFN- γ e uma menor produção de IL-10 quando comparada com as outras linhagens. Os dados nos permitem concluir que das 3 linhagens testadas, a C3H/HePas é a mais susceptível ao *Fusarium oxysporum*, sendo o modelo de infecção intraperitoneal bastante útil para a avaliação da disseminação fúngica e controle da infecção.

ABSTRACT

The fusariosis is a disease caused by a fungus from *Fusarium* genus, a phytopathogen that can also induce local and systemic infection in the human beings, causing death, mainly in the immunosuppressed ones. The aim of this study was to evaluate the susceptibility patterns and resistance against infection by *Fusarium oxysporum* in mice. Swiss, C3H/HePAS and C57Bl/6 mice (2-3 months old, male, 15/group) were inoculated by intraperitoneal route with 0,2 mL *Fusarium oxysporum* suspension. This fungus was isolated from the solo and maintained in agar by weekly replications. After 1 and 4 weeks post infection (pi), the mice of all strains (5/week) were weighed and the blood, spleen, liver and lungs were collected. The organs were weighed and triturated in saline solution (1mL). An aliquot of the cells suspension was added to potatoes agar and the fungal burden was followed by one week. The rest of mice (5/strain) were followed to evaluate the survival. At the first week pi, only the C3H/HePAS strain presented a reduction in the body weight, only the C57Bl/6 strain presented an increase in the liver weight, but all the strains presented increase in the spleen. At the fourth week there were no alterations in body weight and only C57Bl/6 and C3H/HePAS strains still presented the spleen weight increased. The fungal burden was observed in all organs in the first week, but at the fourth week there was no fungal burden in the lungs anymore. The C3H/HePAS presented high fungal burden in the spleen at first and fourth week, and it was the first strain to die, since all mice were death after seven months pi. At this time 40% of C57Bl/6 mice and 60% of Swiss mice were still alive. The C3H/HePAS strain presented bigger IFN- γ production but smaller IL-10 production than the other mice strains. In conclusion, C3H/HePas mice are the most susceptible to *Fusarium oxysporum* infection what can be related with the Th1 pattern of immunological response presented by this strain.

Key-words: *Fusarium oxysporum*, fusariosis, experimental model

INTRODUÇÃO

O gênero *Fusarium* abriga fungos filamentosos amplamente disseminados em solos ricos em resíduos vegetais que contém mais de 20 espécies, freqüentes em áreas tropicais e subtropicais, sendo as *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme* e *Fusarium roseum*, as espécies mais comuns (1,2).

Além de serem fitopatógenos, os fungos do gênero *Fusarium* são também agentes etiológicos da fusariose, uma micose oportunista que pode ser superficial ou sistêmica (3,4,5,6).

Lesões de pele são o principal fator predisponente para o desenvolvimento de infecções cutâneas provocadas pela *Fusarium*. Por outro lado, infecções oportunistas disseminadas desenvolvem-se em hospedeiros imunocomprometidos, particularmente em pacientes neutropênicos e transplantados (5,7,8).

Dois características sugerem o diagnóstico da fusariose disseminada em hospedeiros imunocomprometidos: lesões de pele (ou celulites ou lesões metastáticas) e hemocultura positiva (9). Entretanto a fusariose abriga muitos outros sinais clínicos como ceratite (10,11,12,13), endoftalmite (14,15), otite média (16), onicomiose (17,18), infecções cutâneas (17), particularmente de queimaduras, micetoma, sinusite (19), infecções pulmonares (20), endocardite, peritonite, infecções de cateter venoso central, artrite séptica, infecções disseminadas (3,21,22,23,24) e fungemia (25,26,27,28) causados pelo *Fusarium* sp. têm sido relatados (29,30,31,32).

Fusarium é um dos fungos mais resistentes aos medicamentos. *Fusarium oxysporum*, em geral, tende a ser mais susceptível ao variconazol e ao posaconazol (33,34). Em geral, os pacientes com infecção localizada são susceptíveis de beneficiar de desbridamento cirúrgico, enquanto a infecção disseminada requer o uso de agentes sistêmicos e imunoterapia, quando possível (9).

A fusariose é uma doença emergente no Nordeste do Brasil, especialmente no Estado do Maranhão (35). No entanto, apesar da sua disseminação, não existem muitas informações sobre o desenvolvimento da doença em humanos e muito menos em modelos experimentais, que são ferramentas úteis para a obtenção de informações sobre os mecanismos envolvidos no estabelecimento, desenvolvimento e controle de doenças humanas. Portanto, estes modelos permitem alguns procedimentos que não poderia ser possível com pacientes humanos.

Calich et al. (36), por exemplo, descreveram um modelo murino para o estudo da paracoccidiodomicose. Estes autores têm mostrado que alguns camundongos são altamente resistentes, enquanto outras são altamente suscetíveis a infecção por *Paracoccidioides brasiliensis*. Este modelo murino foi crucial para a compreensão da paracoccidiodomicose.

O primeiro trabalho a estabelecer um modelo de infecção por fungos do gênero *Fusarium* foi o de Legrand et al (37). Nesse trabalho, além de estabelecer um modelo, ele demonstrou que a espécie mais patogênica em animais imunocompetentes foi *Fusarium solani*. Um pouco mais tarde, Anaissie et al (38) demonstraram que a anfotericina B não apresentava efeito nas infecções murinas sistêmicas induzidas por fungos do gênero *Fusarium*. E mais tarde ainda Mayayo et al (39) confirmaram que *Fusarium solani* é a espécie mais virulenta, mesmo em animais imunocompetentes, e que o pulmão, fígado e baço estão entre os órgãos mais afetados.

Contudo, não há trabalhos indicando linhagens ideais para se estudar a infecção por *Fusarium oxysporum* em modelos experimentais. Assim, o objetivo deste trabalho é obter um modelo murino de infecção por *Fusarium oxysporum*, avaliando os padrões de resistência e suscetibilidade de diferentes linhagens de camundongos, considerando, a sobrevivência, a disseminação do fungo, e alguns parâmetros imunológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Fungo

Foi utilizada cepa de *Fusarium oxysporum* isolada do solo do município de Dom Pedro, Maranhão, Brasil. O fungo foi mantido na sua fase filamentosa em ágar Saboraud e meio ágar Batata, conservado entre 3°C e 7°C. Sua passagem foi realizada em animal para manter sua virulência.

Preparação do inóculo

Fusarium oxysporum foi coletado de uma placa de Petri e transferido para um tubo estéril contendo previamente 10 mL de solução salina 0,9% e comparada com a turbidez 1 da escala de Mac Farland (40).

Animais

Para a infecção intraperitoneal foram utilizados camundongos adultos, machos das linhagens Swiss, C57Bl/6 e C3H/HePaS. Os animais foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão. A utilização dos animais seguiu os preceitos éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Infecção Intraperitoneal

Os animais (15/linhagem) foram inoculados pela via intraperitoneal com 0,5 mL da suspensão de *Fusarium oxysporum* comparada com a turbidez 1 da escala de Mac Farland (40).

Na 1ª e 4ª semanas, foram sacrificados 5 animais infectados e 5 animais não infectados de cada linhagem. Estes foram submetidos a um excesso de anestésico pela administração i.p. de 0,2 mL de hidrato de cloral a 10%, antes da morte, e por corte das artérias e veias axilares, foi recolhida amostra de sangue para obtenção de soro. Os cinco animais restantes foram mantidos vivos para avaliação da sobrevivência.

Avaliação do grau de infecção

Para determinar o grau de infecção dos animais, estes foram sacrificados nos períodos determinados e seus órgãos (pulmão, fígado e baço) removidos, pesados e homogeneizados em solução salina estéril 0,9% (2 mL). As suspensões resultantes foram deixadas em processo de sedimentação. Alíquotas de 100µL foram utilizadas para plaqueamento em ágar Sabouraud e ágar Batata. As culturas foram mantidas à temperatura ambiente. A presença de colônias foi observada pelo crescimento do fungo e quantificada pelo método de escores (crescimento intenso +++, crescimento médio ++, crescimento escasso +, sem crescimento -).

Dosagem de citocinas

Para a quantificação das citocinas, foi utilizado o método de ELISA sanduíche, utilizando kit para dosagem de citocinas murinas da eBioScience. Neste método, as placas de ELISA foram sensibilizadas “overnight”, a 4°C, com anticorpo de captura (2µg/mL). Após 24 horas as placas foram lavadas e bloqueadas com Solução Tamponada com Fosfato (PBS) 10% Soro Fetal Bovino (SFB) e foi acrescentado o soro dos animais (100µL/poço). Após 24 horas de incubação as placas foram lavadas 3 vezes com 200µL/poço de PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T20). Foi adicionado o anticorpo de detecção numa concentração de 1µg/mL. O volume de 100µL/poço foi mantido por 45-60 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas 6 vezes com 200µL/poço de PBS-T20 e adicionada avidina-peroxidase (100µL/poço) nas concentrações 1:400 ou 1:2000 (conforme a citocina) em PBS 10% SFB, por 30 minutos. As placas foram lavadas 8 vezes com 200µL/poço de PBS-T20, então, foi adicionado o substrato contendo: 5µL de H₂O₂ à 30% (Merck) em 10 mL de tampão citrato de sódio 0,1M, pH 5.0; nesta solução foram diluídos 5mg do revelador ortofenilenodiamina (OPD), (Merck); desta solução foram colocadas 100µL/poço, por 15 minutos à temperatura ambiente em câmara escura. A interrupção da reação enzimática foi realizada mediante a adição de 50µL/poço de uma solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 4N. A absorbância foi determinada em um leitor de ELISA (Titertek-Multiscan), com filtro de 492 nm, contra branco constituído pelo substrato e ácido sulfúrico 4N. Os resultados foram expressos em D.O.

Análise Estatística

Os dados foram expressos como média ± desvio padrão. A análise estatística foi feita por teste “t” de Student bicaudal, sendo o nível de significância $p < 0,05$.

RESULTADOS

Avaliação da disseminação fúngica em diferentes órgãos de camundongos de diferentes linhagens.

A disseminação fúngica para o pulmão, baço e fígado das diferentes linhagens de camundongos infectados está descrita na tabela 1.

Na primeira semana pós-infecção houve um significativo crescimento fúngico em todos os órgãos avaliados, sendo essa disseminação leve nos pulmões, moderada nos fígados e intensa nos baços das três linhagens.

Na quarta semana pós-infecção, o crescimento fúngico nos pulmões que era leve passou a ser ausente nas três linhagens. No fígado, o crescimento fúngico passou de moderado para leve na linhagem C57Bl/6, de moderado para intenso na linhagem Swiss, e permaneceu moderado na linhagem C3H/HePas. Entretanto, quando se avaliou o baço, o crescimento fúngico passou de intenso para leve tanto na linhagem C57Bl/6 quanto na Swiss, enquanto na C3H/HePas ele se manteve intenso.

Tabela 1: Disseminação do *Fusarium oxysporum* para pulmão, baço e fígado de diferentes linhagens de camundongos.

Primeira semana			
	Fígado	Baço	Pulmão
Swiss	++	+++	+
C3H/HePas	++	+++	+
C57Bl/6	++	+++	+
Quarta semana			
	Fígado	Baço	Pulmão
Swiss	+++	+	-
C3H/HePas	++	+++	-
C57Bl/6	+	+	-

Método de escores (crescimento intenso +++, crescimento médio ++, crescimento leve +, em crescimento -).

Avaliação dos órgãos de diferentes linhagens de camundongos infectados

Analisando o peso dos camundongos Swiss, C57Bl/6 e C3H/HePaS, tanto na primeira semana quanto na quarta semana pós infecção com suspensão do fungo (Figuras 1A e 1B), podemos perceber que apenas a linhagem C3H/HePaS sofreu diminuição do peso corporal, sendo essa alteração restrita à primeira semana pós infecção.

A avaliação do peso do fígado nos camundongos infectados, em comparação aos respectivos grupos controles de cada linhagem, demonstrou um aumento apenas na linhagem C57Bl/6, o qual foi restrito à primeira semana pós-infecção (Figuras 2A e 2B).

Observando os resultados da avaliação do peso dos pulmões, pudemos notar que não houve diferenças significativas entre o grupo infectado e o grupo controle em ambos os tempos avaliados (Figuras 3A e 3B). Entretanto, houve uma tendência nítida de aumento de peso neste órgão na primeira semana de infecção.

A avaliação do peso do baço demonstrou que, na primeira semana, houve um aumento significativo no peso em todas as linhagens. Na quarta semana, entretanto, apenas a linhagem C3H/HePaS manteve esse aumento (Figuras 4A e 4B). O mesmo padrão se manteve quando as células do baço foram quantificadas, ou seja, um aumento do número de células esplênicas em todas as linhagens na primeira semana, enquanto na quarta semana esse aumento foi observado apenas na linhagem C3H/HePas (Figuras 5A e 5B).

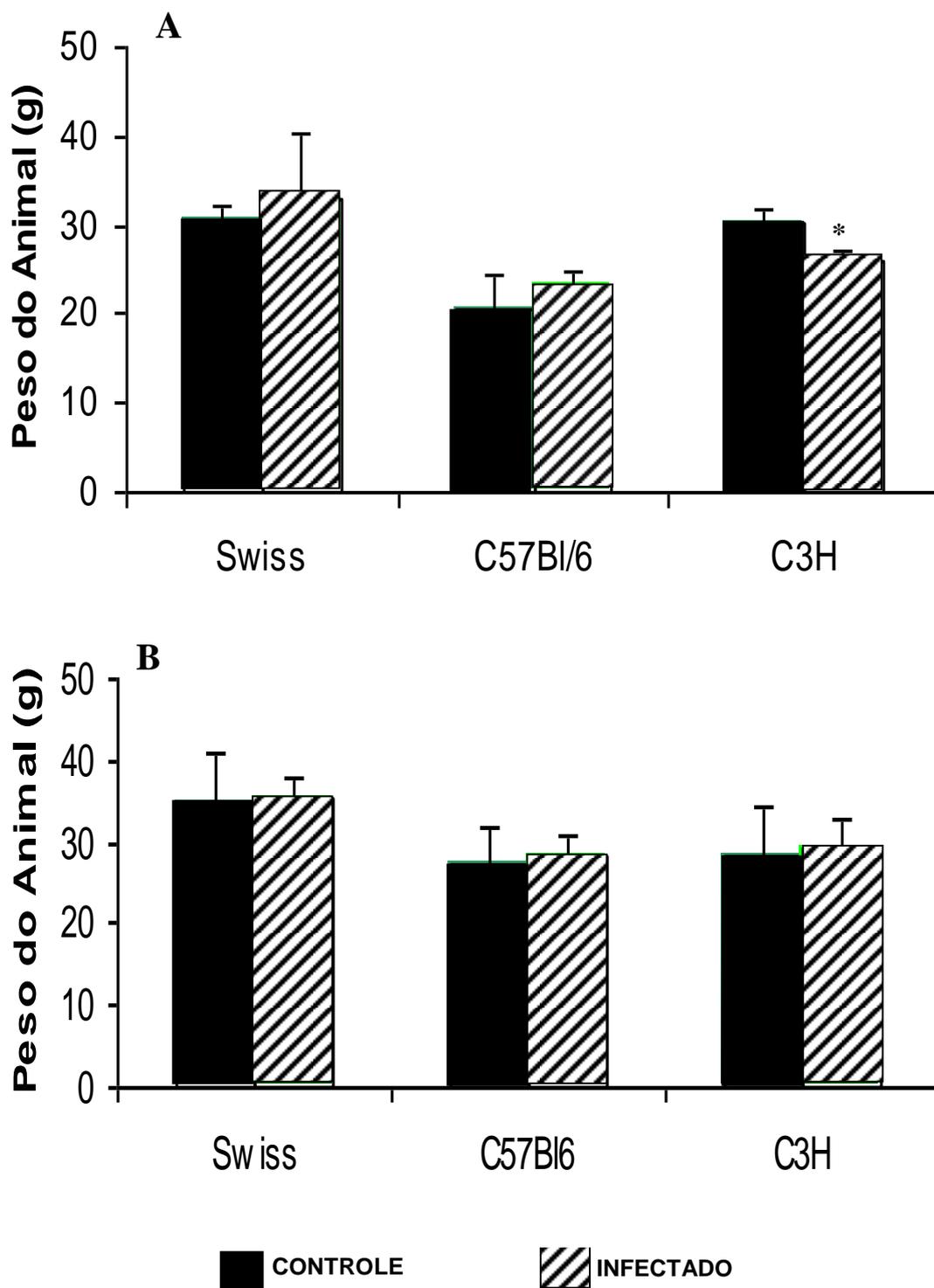


Figura 1 – Efeito da infecção sobre o peso corpóreo dos animais. Camundongos das linhagens Swiss, C57Bl/6 e C3H/HePas foram inoculados com suspensão de *Fusarium oxysporum* e após 1 (A) ou 4 (B) semanas foram pesados. Os dados representam a média \pm desvio padrão de 5 animais/grupo. * $p < 0.05$ quando comparado com o grupo controle da respectiva linhagem.

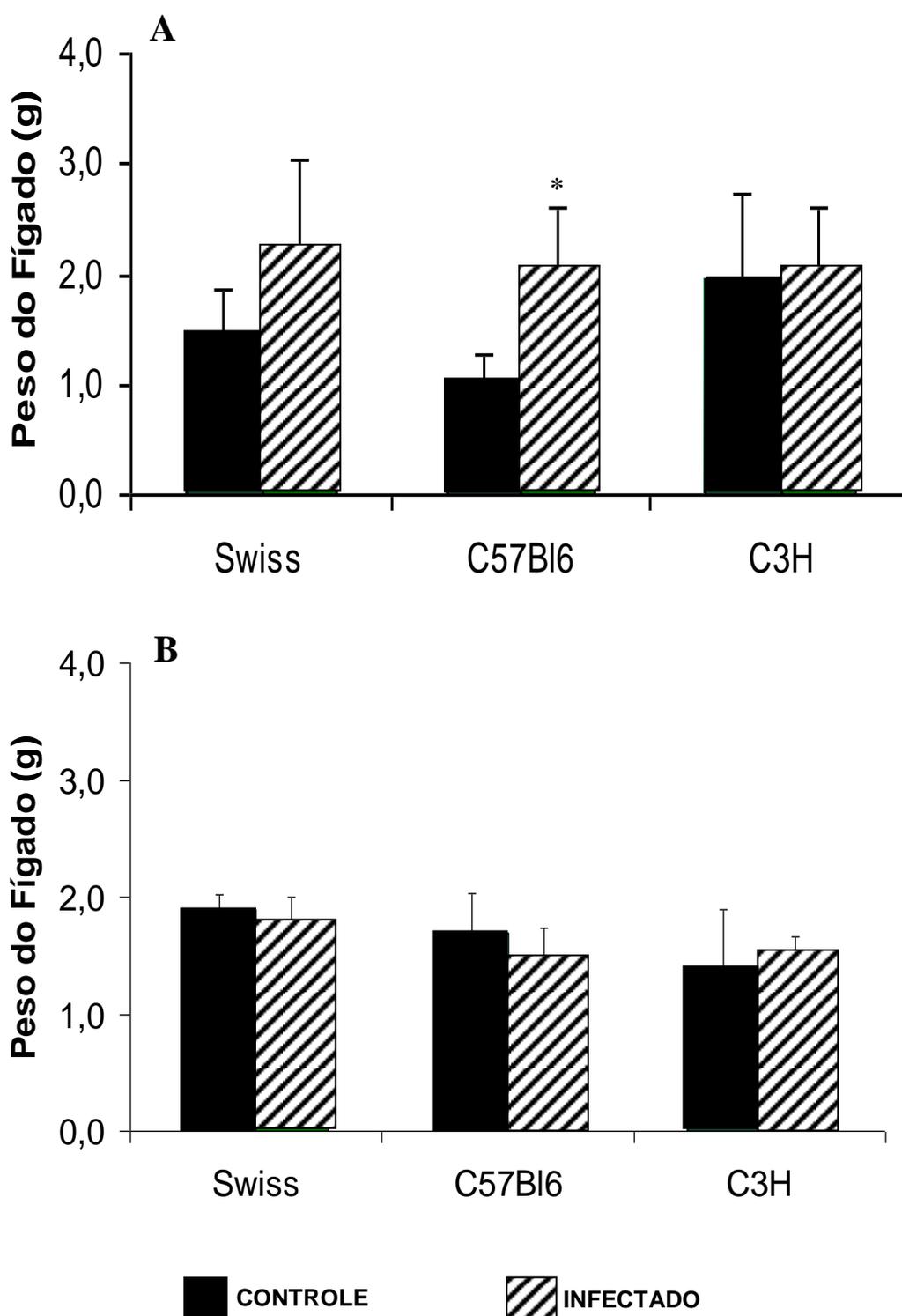


Figura 2 – Efeito da infecção sobre o peso do fígado. Camundongos das linhagens Swiss, C57Bl/6 e C3H/HePas foram inoculados com suspensão de *Fusarium oxysporum* e após 1 (A) ou 4 (B) semanas eles foram sacrificados seguido da coleta e pesagem do fígado (A e B). Os dados representam a média \pm desvio padrão de 5 animais/grupo. * $p < 0.05$ quando comparado com o grupo controle da respectiva linhagem.

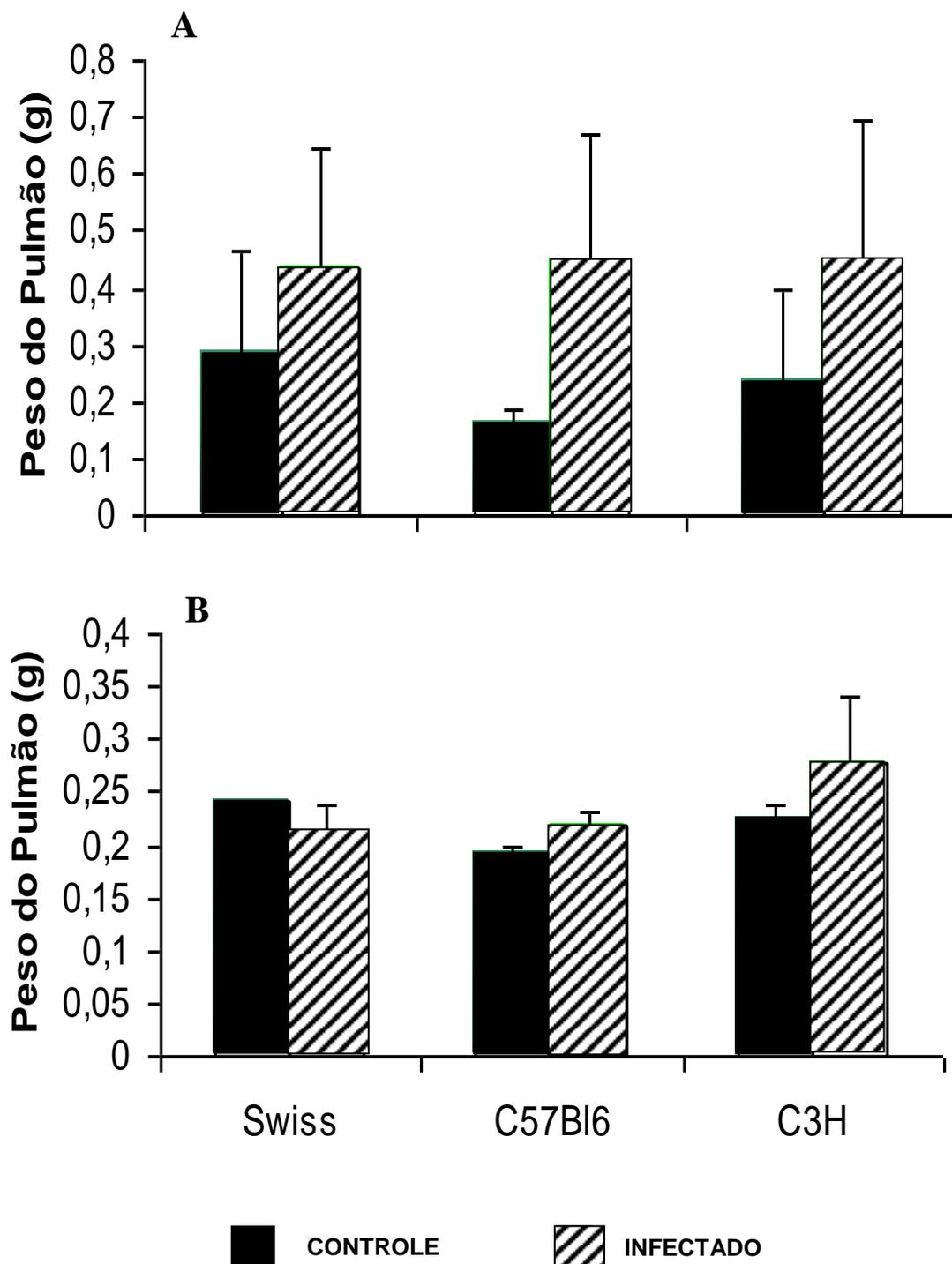


Figura 3 – Efeito da infecção sobre o peso do pulmão. Camundongos das linhagens Swiss, C57Bl/6 e C3H/HePas foram inoculados com suspensão de *Fusarium oxysporum* e após 1 (A) ou 4 (B) semanas pós infecção eles foram sacrificados, seguido da coleta e pesagem do pulmão. Os dados representam a média \pm desvio padrão de 5 animais/grupo. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle.

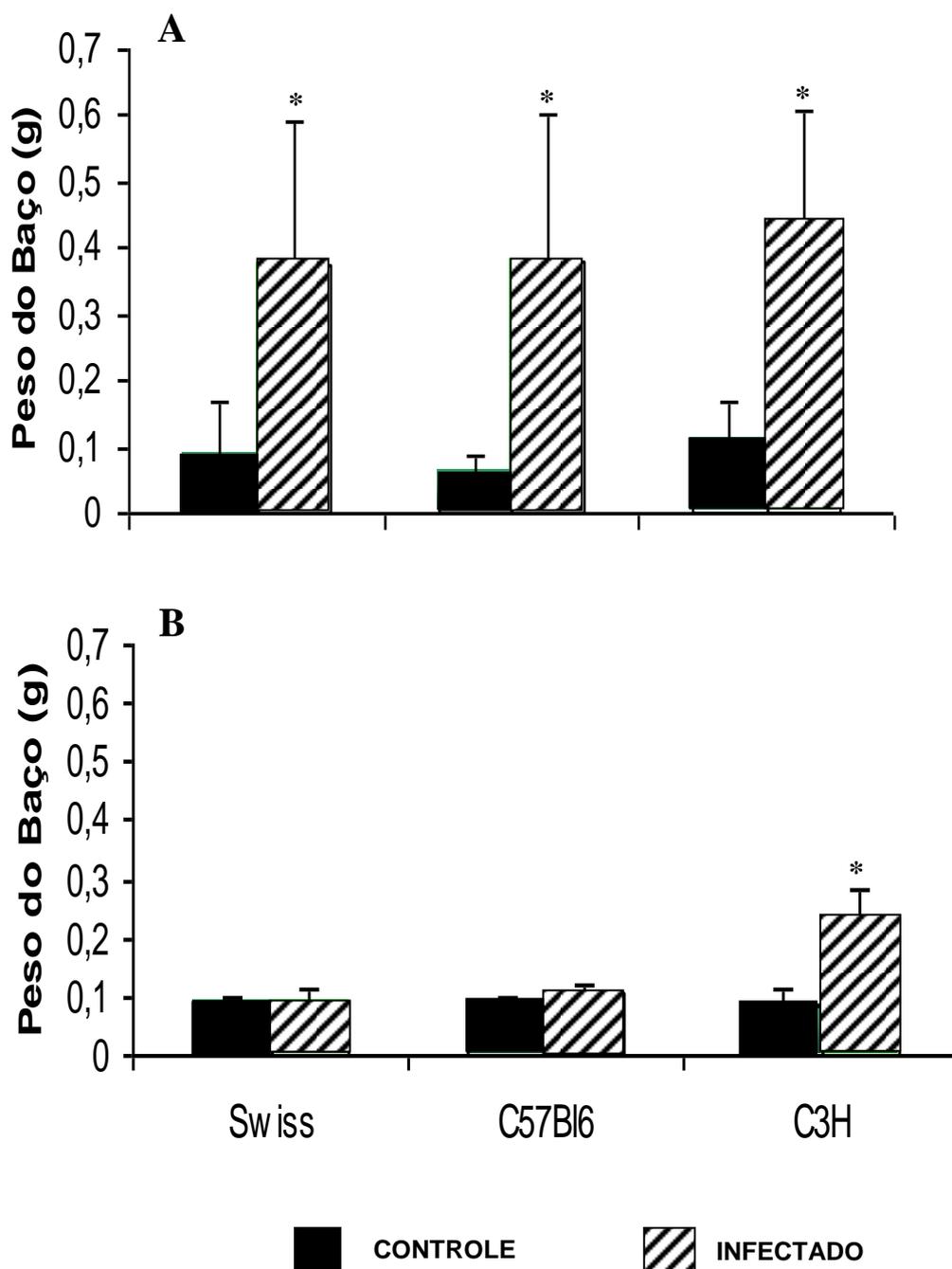


Figura 4 – Efeito da infecção sobre o peso do baço. Camundongos das linhagens Swiss, C57Bl/6 e C3H/HePas foram infectados com suspensão de *Fusarium oxysporum* e após 1 (A) ou 4 (B) semanas pós infecção eles foram sacrificados, seguido da coleta e pesagem baço. Os dados representam a média \pm desvio padrão de 5 animais/grupo. * $p < 0.05$ quando comparado com o grupo controle.

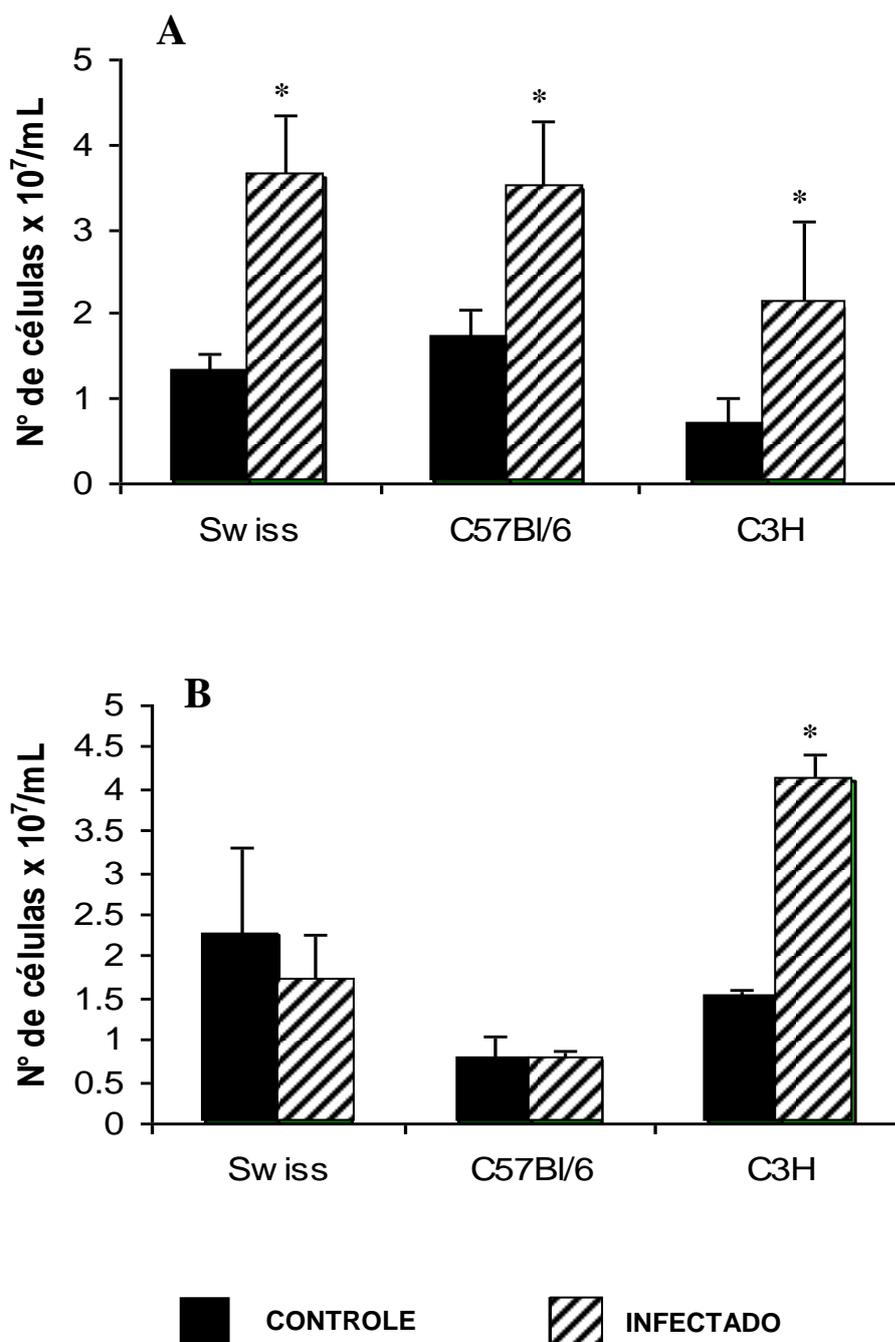


Figura 5 – Efeito da infecção sobre o número de células do baço. Camundongos das linhagens Swiss, C57Bl/6 e C3H/HePas foram inoculados com suspensão de *Fusarium oxysporum* e após 1 (A) ou 4 (B) semanas eles foram sacrificados, seguido da coleta do baço para quantificação de suas células. Os dados representam a média \pm desvio padrão de 5 animais/grupo. * $p < 0.05$ quando comparado com o grupo controle da respectiva linhagem.

Avaliação do perfil de citocinas em camundongos infectados

A análise dos resultados de produção de citocinas do padrão Th1 (IFN- γ) e Th2 (IL-10), após quatro semanas de infecção, mostrou uma tendência à diminuição na produção destas citocinas nos animais infectados de todas as linhagens. Entretanto, esta diminuição foi significativa apenas na linhagem Swiss quando se tratando do IFN- γ e na linhagem C3H/HePAS quando se tratando da IL-10. Além disso, a comparação da produção de citocinas pelos animais infectados das três linhagens estudadas demonstrou que a linhagem C3H/HePas apresentou uma maior produção de IFN- γ e ao mesmo tempo, uma menor produção de IL-10 quando comparada com as demais linhagens (Figuras 6A e 6B).

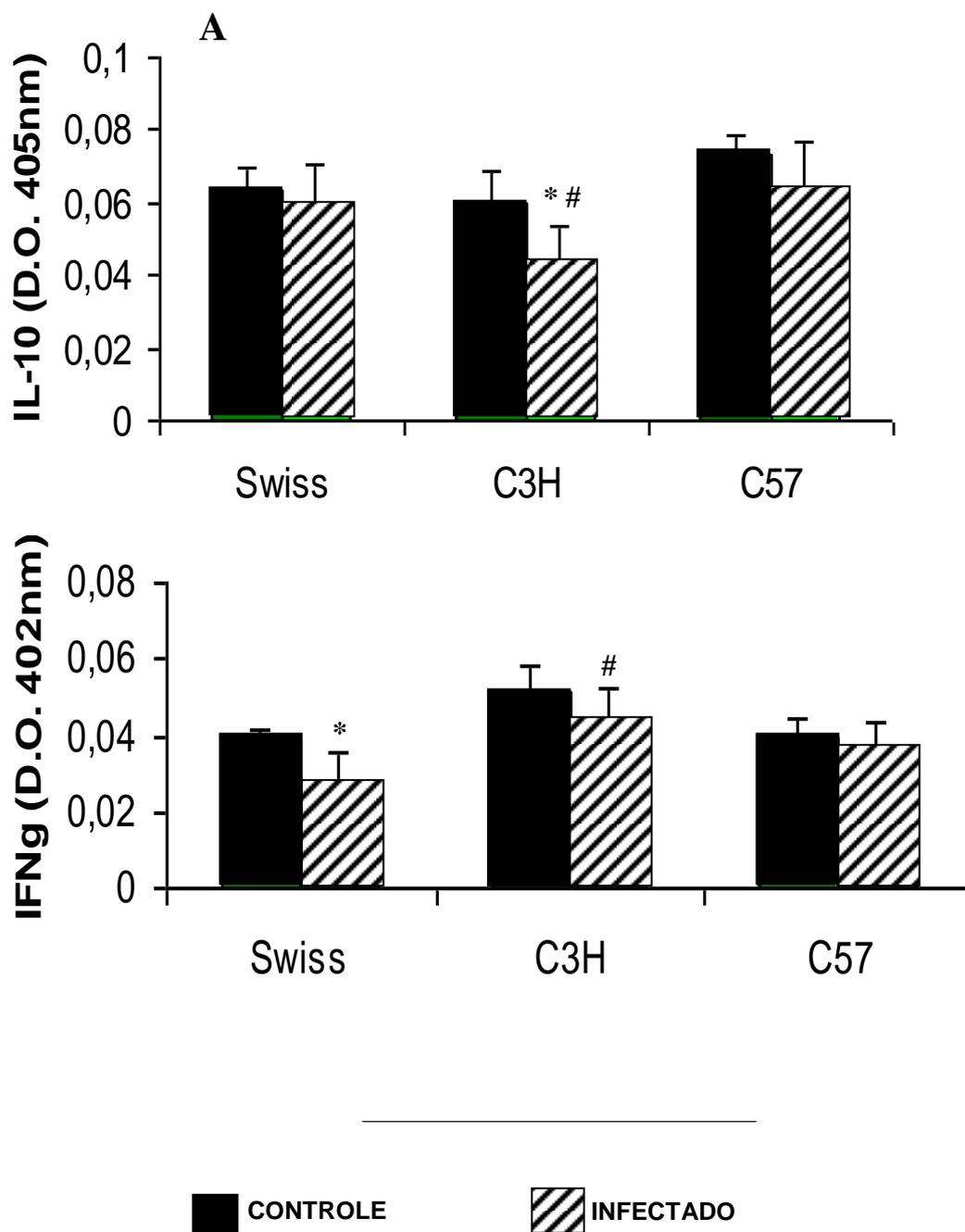


Figura 6 – Dosagem de IL-10 e IFN γ no soro de camundongos inoculados com *Fusarium oxysporum*. Camundongos das linhagens Swiss, C57Bl/6 e C3H/HePas foram inoculados com suspensão de *Fusarium oxysporum* e após 4 semanas foram exsanguinados para obtenção do soro. A dosagem das citocinas IL-10 (A) e IFN- γ (B) foi realizada pelo método de ELISA sanduíche. Os dados representam a média \pm desvio padrão das absorvâncias óticas (D.O.) de 5 soros/grupo dosados em triplicata. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle. # $p < 0,05$ quando comparado com as demais linhagens.

Análise do tempo de sobrevida de camundongos infectados

O tempo de sobrevida dos camundongos infectados está representado na figura 7. Os últimos animais infectados das linhagens C3H/HePas, C57Bl/6 e Swiss morreram após 7, 9 e 10 meses de infecção, respectivamente. A sobrevida média foi de 5 meses para a C3H/HePas, 6,8 meses para a C57Bl/6 e 7,5 meses para a linhagem Swiss, o que representou uma inibição da sobrevida em 44%, 39% e 25%, respectivamente, quando comparado ao tempo de sobrevida dos animais não infectados. Dessa forma, mostrou-se que a linhagem C3H/HePas foi a mais susceptível das três analisadas.

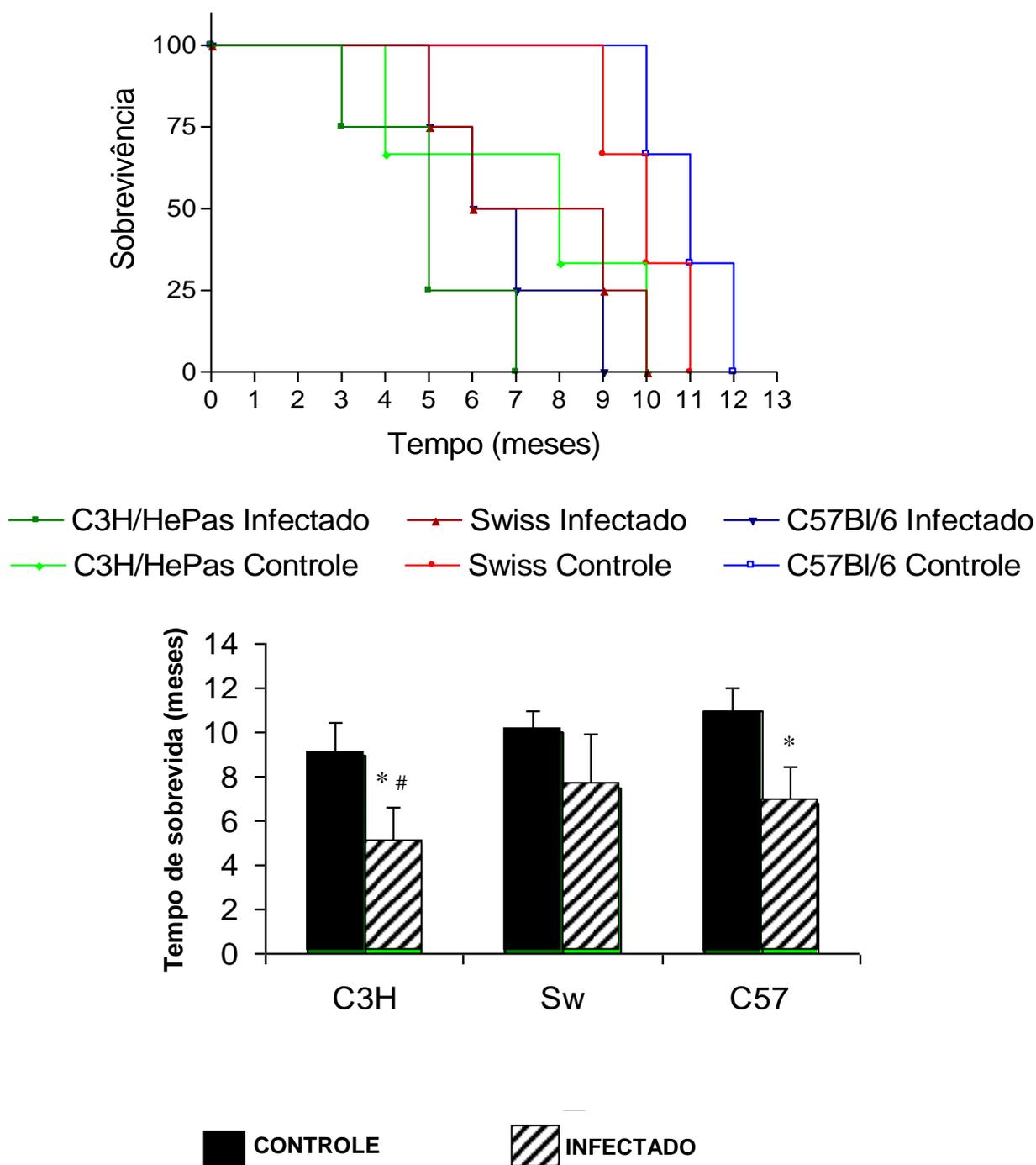


Figura 7 – Efeito da infecção sobre o tempo de sobrevivida de camundongos de diferentes linhagens. Camundongos das linhagens Swiss, C57Bl/6 e C3H/HePas foram inoculados ou não (controle) com suspensão de *Fusarium oxysporum* e tiveram a sobrevivida acompanhada durante 12 meses. Os dados representam 4 animais/grupo. O gráfico A representa a sobrevivida individual dos animais e o gráfico B representa a média \pm desvio padrão do tempo de sobrevivida em meses. * $p < 0.05$ quando comparado com o grupo controle. # $p < 0.05$ quando comparado com as demais linhagens.

DISCUSSÃO

Este trabalho buscou avaliar o padrão de resistência/susceptibilidade de linhagens diferentes de camundongos imunocompetentes utilizando um modelo experimental de fusariose. Para investigar o desenvolvimento da infecção, avaliamos parâmetros como peso dos animais, peso dos órgãos (pulmão, baço e fígado), disseminação do fungo, padrão de citocinas e sobrevida dos animais.

As linhagens escolhidas para o estudo foram a Swiss, a C3H/HePas e a C57Bl/6. A linhagem Swiss é uma linhagem não isogênica, bastante utilizada em trabalhos com modelos experimentais. As linhagens C3H/HePas e C57Bl/6 são isogênicas e já foram relatadas em trabalhos de modelos experimentais em infecções fúngicas com *Paracoccidioides brasiliensis*, tendo apresentado fenótipo de resistência moderada ou forte respectivamente (41).

Nascimento et al. (42) relatando um caso de fusariose em um horticultor, citaram que uma das vias fisiológicas de infecção é a via cutânea. Apesar da sugestão de que a via fisiológica de infecção é a via cutânea, a via de infecção escolhida neste trabalho foi a intraperitoneal por ser uma via de fácil acesso e por ser a cavidade peritoneal rica em órgãos vitais, o que poderia facilitar a penetração do fungo e posterior disseminação.

Nossos dados demonstraram que o método utilizado para indução da infecção foi eficaz nas três linhagens de camundongos estudadas, mesmo sem eles serem previamente imunossuprimidos. Após terem sido infectados intraperitonealmente com o fungo, os animais foram sacrificados na primeira e quarta semana já que o fungo é muito agressivo e cresce rapidamente (2). A análise do crescimento fúngico, realizada pelo método de escores, revelou que os 3 órgãos testados, fígado, baço e pulmão, apresentaram fungos após a primeira semana pós infecção. (Tabela 1). A presença de fungos no fígado e baço, até certo ponto, era

esperada, uma vez que a via de infecção foi a intraperitoneal. Porém a presença de fungos no pulmão revela que, realmente, houve disseminação do fungo pela corrente sanguínea, já que este órgão encontra-se isolado da cavidade peritoneal pelo diafragma. Entretanto, na quarta semana, houve detecção do fungo no fígado e baço, mas já não houve crescimento fúngico no pulmão (Tabela 1). Estes dados revelam que muito embora o fungo seja muito agressivo, disseminando rapidamente, nos primeiros dias de infecção, ele não parece se manter no organismo imunocompetente por muito tempo. Vale ressaltar, no entanto, que este fungo acomete indivíduos com um certo grau de comprometimento imunológico (42), o que sugere a existência de imunidade protetora, a qual induziria uma auto-resolução da infecção, ou auto-cura. Esta hipótese ainda será investigada futuramente pelo acompanhamento dos animais infectados por períodos mais longos de infecção.

Nas doenças infecciosas, o aumento dos órgãos pode ser um importante sinal diagnóstico. Isso porque os agentes patogênicos podem induzir direta ou indiretamente, reações inflamatórias locais, com formação de edema, recrutamento e ainda, proliferação celular, se este órgão for do sistema imunológico. Neste trabalho, o pulmão, baço e fígado foram escolhidos para avaliação por serem órgãos vitais comprometidos em infecções, sendo úteis no diagnóstico de muitas doenças, e terem sido citados por Nascimento et al (43) como órgãos importantes na avaliação de disseminações fúngicas, como por exemplo, no caso do *Paracoccidioides brasiliensis*. Especial atenção foi dada ao baço, inclusive com a quantificação de suas células, por ser este um órgão imunológico secundário fundamental no desenvolvimento da resposta imunológica, já que é um local de captação de antígeno e proliferação de linfócitos T e B, responsáveis pelo reconhecimento do antígeno e produção de anticorpos respectivamente (44), portanto, sendo um dos principais locais de respostas imunológicas a antígenos provenientes do sangue (45).

Nenhuma das linhagens analisadas apresentou alterações evidentes no peso do fígado na primeira e quarta semanas de infecção (Figura 2). O pulmão por outro lado apresentou uma tendência de aumento de peso nas três linhagens na primeira semana, mas voltou ao normal na quarta semana. Maiores alterações, no entanto, foram observadas em relação ao baço, que apresentou peso significativamente maior em todas as linhagens na primeira semana. Este resultado sugere um possível aumento da proliferação de células imunológicas, desencadeada pela infecção, o que ficou evidente quando se quantificou as células deste órgão. Na quarta semana, entretanto, apenas a linhagem C3H/HePas apresentou aumento do peso do baço e do número de células esplênicas.

Além da análise do peso dos órgãos, o peso dos animais também é um parâmetro importante para avaliação do estado geral do indivíduo. Os dados demonstraram que apenas a linhagem C3H/HePas apresentou uma redução de seu peso corporal na primeira semana de infecção, mas o mesmo não ocorreu na quarta semana. Esta redução do peso corporal pode indicar uma debilidade desta linhagem frente à infecção ou mesmo, a produção de alguma citocina, como por exemplo, o Fator de Necrose Tumoral (TNF) que tem sido relacionada em animais com infecções fúngicas (43). O quadro apresentado pela linhagem C3H/HePas, com diminuição no peso corpóreo e aumento do peso do baço, sugere a presença de um quadro infeccioso semelhante a outros descritos na literatura como no estudo da susceptibilidade camundongos ao fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, por Calich et al. (36).

A análise do peso e número de células do baço nos revela que o aumento destes dois parâmetros parece estar diretamente relacionado ao crescimento fúngico. Na primeira semana quando todas as linhagens apresentaram crescimento fúngico acentuado no baço (Tabela 1), também houve aumento de proliferação celular neste órgão, enquanto na quarta semana que

apenas a linhagem C3H/HePas apresentou alto índice de crescimento fúngico no baço, apenas ela também apresentou maior número de células esplênicas (Figura 5).

Da mesma forma, o crescimento moderado de fungos no pulmão das três linhagens (tabela 1), parece ter induzido um aumento no peso deste órgão (Figura 3). Este aumento de peso, entretanto, não foi significativo, mas sugere uma possível correlação já evidenciada no baço, entre crescimento fúngico e aumento do peso do órgão.

Apesar da linhagem C3H/HePas apresentar alto índice de proliferação de células esplênicas, a mesma foi a que apresentou maior crescimento fúngico no baço e a menor sobrevivência total, tanto em relação as demais linhagens, quanto em relação aos animais não infectados utilizados como controle. Este resultado indica que esta linhagem foi a mais susceptível à infecção pelo fungo.

Com o intuito de investigar a razão desta maior susceptibilidade da linhagem C3H/HePas, foram quantificadas no soro dos animais as citocinas do padrão Th1 e Th2, IFN- γ e IL-10, respectivamente. O tempo escolhido para esta quantificação foi o de quatro semanas tendo em vista que este foi o tempo em que foram detectadas diferenças significativas entre as linhagens tanto em relação ao crescimento fúngico quanto em relação ao peso e número de células no baço. A análise dos dados demonstrou que a linhagem C3H/HePas apresentou menor produção de IL-10 e maior produção de IFN γ quando comparada com as demais linhagens. Com isso podemos sugerir que a linhagem mais susceptível ao *Fusarium oxysporum* segue o padrão Th1 de resposta imunológica provavelmente com ativação de macrófagos e reativos de oxigênio e nitrogênio principalmente NO, enquanto a mais resistente segue o padrão Th2.

Esses resultados se diferenciam de outros modelos experimentais como o da *Leishmania major* onde a linhagem Balb/c, a mais susceptível, segue um padrão de resposta

Th2, consequentemente uma diminuição na produção de NO (46). Já o *Fusarium oxysporum*, sendo um fungo filamentosos, é um patógeno extracelular e ao invés desse NO produzido eliminar o parasito, pode, pelo contrário, induzir um quadro de imunossupressão no animal o que favoreceria a progressão da infecção. Tal quadro imunossupressor, já foi demonstrado na infecção experimental por *Paracoccidioides brasiliensis*, onde a linhagem de camundongos susceptível ao fungo apresenta uma elevada produção de NO enquanto a linhagem resistente apresenta uma baixa produção deste metabólito, porém suficiente para lhe conferir resistência (43). Da mesma forma, em pacientes com paracoccidioidomicose foi demonstrado um decréscimo na produção de IFN- γ e uma elevação na produção de IL-10, sugerindo que a progressão dessa micose sistêmica depende da ativação da resposta do padrão Th2 (47,48,49).

Ainda não há relatos na literatura sobre o padrão de respostas imunológicas envolvidos na progressão da infecção por fungos do gênero *Fusarium*. Dessa forma, nosso trabalho é um primeiro passo em direção a uma caracterização do perfil imunológico relacionado com a susceptibilidade a esse fungo, bem como é um dos primeiros a sugerir um possível mecanismo de indução de quadros de susceptibilidade ou resistência a essa infecção.

REFERÊNCIAS

- 1 LACAZ, C.S.; POERO, E. MARTINS, J.E.C. *Micologia Médica*. São Paulo: Sarvier, 695p, 1991.
- 2 GUARRO, J.; GENÉ, J. *Fusarium* infections. Criteria for the identification of the responsible species. *Mycoses* 1992; 35: 109-114.
- 3 RICHARDSON, S.E.; BANNATYNE, R.M.; SUMMERBELL, R.C.; MILLIKEN, J.; GOLD, R.; WEITZMAN, S.S. Disseminated fusarial infection in the immunocompromised host. *Rev. Infect. Dis.* 1988; 10:1171-1181.
- 4 VENDITTI, M.; MICOZZI, A.; GENTILE, G.; POLONELLI, L.; MORACE, G.; BIANCO, P.; et al. Invasive *Fusarium solani* infections in patients with acute leukemia. *Rev. Infect. Dis.* 1988; 10:653-660.
- 5 VARTIVARIAN, S.E.; ANAÏSSIE, E.J.; BODEY, G.P. Emerging fungal pathogens in immunocompromised patients: classification, diagnosis and management. *Clin. Infect. Dis.* 1993; 17: 487-491.
- 6 GUARRO J, GENE J. Opportunistic fusarial infections in humans. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14: 741-754.
- 7 BOUTATI, E.I.; ANAÏSSIE, E.J. *Fusarium*, a significant emerging pathogen in patients with hematologic malignancy: ten years experience at a cancer Center and implications for management. *Blood* 1997; 90:999-1008.
- 8 GIRMENIA, C; IORI, A.P.; BOECKLIN, F. et al. *Fusarium* infections in patients with severe aplastic anemia: review and implications for management. *Haematologica* 1999; 84: 114-118.
- 9 NUCCI, M.; ANAÏSSIE, E. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clin Microb Rev* 2007; 20: 695-704.
- 10 DESHPANDE, S. D.; KOPPIKAR, G. V. A study of mycotic keratitis in Mumbai. *Indian J Pathol Microbiol.* 1999; 42:81-87.
- 11 LIESEGANG, T. J.; FORSTER, R. K.. Spectrum of microbial keratitis in South Florida. *Am J Ophthalmol.* 1980; 90:38-47.

- 12 MORIARTY, A. P., CRAWFORD, G. J.; MCALLISTER, I. L.; CONSTABLE, I. J. Severe corneoscleral infection. A complication of beta irradiation scleral necrosis following pterygium excision. *Arch Ophthalmol.* 1993; 111:947-51.
- 13 ROSA, R. H., MILLER, JR.; D., ALFONSO, E. C. The changing spectrum of fungal keratitis in south Florida. *Ophthalmology* 1994.; 01:1005-13.
- 14 LOUIE T.; EL BABA, F.; SHULMAN, M; JIMENEZ-LUCHO, V. Endogenous endophthalmitis due to *Fusarium*: case report and review. *Clin. Infect. Dis.* 1994; 18: 585-588.
- 15 DURSUN, D.; FERNANDES, V.; MILLER, D.; ALFONSO, E.C. Advanced *Fusarium* keratitis progressing to endophthalmitis. *Cornea* 2003; 22: 300-303.
- 16 WADHWANI, K. and SRIVASTANA, A.K. Fungi from otitis media of agricultural workers. *Mycopathologia* 1984; 88: 155-159.
- 17 ROMANO, C., MIRACCO, C.; DIFONZO, E. M. Skin and nail infections due to *Fusarium oxysporum* in Tuscany, Italy. *Mycoses.* 1998; 41:433-437.
- 18 GUPTA, A. K.; SUMMERBELL, R. C. Combined distal and lateral subungual and white superficial onychomycosis in the toenails. *J Am Acad Dermatol.* 1999; 41:938-44.
- 19 SCHELL, W. A. Histopathology of fungal rhinosinusitis. *Otolaryngol Clin N Amer.* 2000; 33:251-276.
- 20 ROLSTON, K. V. I. The spectrum of pulmonary infections in cancer patients. *Curr Opin Oncol.* 2001; 13:218-223.
- 21 MANFREDINI, L.; GARAVENTA, A.; CASTAGNOLA, E.; VISCOLI, C.; MORONI, C.; DINI, G.; et al.. Fungal infections in pediatric oncology. *Pediatr Med Chir.* 1995; 17:435-41.
- 22 MORRISON, V. A.; HAAKE, R. J.; WEISDORF, D. J. The spectrum of non-*Candida* fungal infections following bone marrow transplantation. *Medicine (Baltimore)* 1993; 72:78-89.

- 23 PONTON, J.; RUCHEL, R.; CLEMONS, K. V.; COLEMAN, D. C.; GRILLOT, R.; GUARRO, J. Emerging pathogens. *Med Mycol* 2000; 38:225-236.
- 24 SEGAL, B. H.; WALSH, T. J.; LIU, J. M.; WILSON, J. D.; KWON-CHUNG, K. J. Invasive infection with *Fusarium chlamydosporum* in a patient with aplastic anemia. *J Clin Microbiol* 1998. 36:1772-1776.
- 25 FARINA, C.; VAILATI, F.; MANISCO, A.; GOGLIO, A. Fungaemia survey: a 10-year experience in Bergamo, Italy. *Mycoses* 1999; 42:543-548.
- 26 KOVACICOVA, G.; SPANIK, S.; KUNOVA, A.; TRUPL, J.; SABO, A.; KOREN, P. Prospective study of fungaemia in a single cancer institution over a 10-y period: Aetiology, risk factors, consumption of antifungals and outcome in 140 patients. *Scand J Infec Dis.* 2001; 33:367-374.
- 27 KRČMERY, V. JR.; KOVACICOVA, G. Longitudinal 10-year prospective survey of fungaemia in Slovak Republic: trends in etiology in 310 episodes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000; 36:7-11.
- 28 YILDIRAN, S. T.; KOMURCU, S.; SARACLI, M. A.; GONLUM, A.; BEYAN, C.; GUN, H. et al. *Fusarium* fungaemia in severely neutropenic patients. *Mycoses* 1998; 41:467-469.
- 29 RIPPON, J.W. Hialohifomicois. In: Ripon JW (ed) **Tratado micología médica**. 3ra edición, Interamericana. Mc Graw Hill, México: 787-805, 1990.
- 30 WARNOCK D.W.; JOHSON, E.M. Clinical manifestations and management of hyalohyphomycosis in the compromised patient. In: Warnock DW, Richardson M.P. (ed) **Fungal infection in the compromised patient**, 2nd edition, John Wiley & Sons Ltd, Chischester, New York 1991; 247-310,
- 31 THOMAS P.A; GERALDINE P. Fungal keratitis due to *Fusarium* and other fungi. *J. Mycol. Médicale* 1992; 2:121-131.
- 32 NASCIMENTO, M.D.S.B.; SILVA, L.M.; SILVA, R.D.L.; SILVA, G.F.C.; MATOS, P.; VIEGAS, I.; BEZERRA, G.F.B.; ZAROR, L.C. Fusariose no Maranhão, Brasil: Relato do primeiro caso da micose emergente. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2002; 35:199.

- 33 ARIKAN, S.; LOZANO-CHIU, M; PAETZNICK, V.; NANGIA, S.; REX, J.H. Microdilution susceptibility testing of amphotericin B, itraconazole and variconazole against clinical isolates of *Aspergillus* and *Fusarium* species. *J. Clin Microbiol* 1999; 37: 3946-3951.
- 34 CUENCA-ESTRELA, M.; GOMES-LOPEZ, A.; MELLADO, E.; BUITRAGO, M. J.; MONZON, A.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L. Head-to-head comparison of the activities of currently available antifungal agents against 3,378 spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi. *Antimicrob* 2006; 50: 917-921.
- 35 NASCIMENTO, M.D.S.B.; ARAUJO, D.R.; BEZERRA, G.F.B.; SILVA, J.R.S.; MORAES FILHO, G.J.B.; SILVA, M.L. Fungos queratinofílicos na ilha de São Luis-Ma. *Rev. da Soc. Bras. Med. Trop.* 2001; 37:465
- 36 CALICH, V. L. G., L. M. SINGER-VERMES, A. M. SIQUEIRA, and E. Burger..Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Br. J. Exp. Pathol.* 1985; 66:585.
- 37 LEGRAND C.; ANAISSIE E.; HASHEM R.; NELSON P.; BODEY G.P.; RO J. Experimental fusarial hyalohyphomycosis in a murine model. *J Infect Dis* 1991; 164: 944-948.
- 38 ANAISSIE E.J.; HACHEM R.; LEGRAND C.; LEGENNE P.; NELSON P.; BODEY G.P. Lack of activity of amphotericin B in systemic murine fusarial infection. *J Infect Dis* 1992; 165: 1155-1157.
- 39 MAYAYO, E.; PUJOL, I.; GUARRO; J. Experimental pathogenicity of four opportunist *Fusarium* species in a murine model *J. Med. Microbiol.* 1999; 48: 363-366.
- 40 LIMA, A.O.; SOARES, J.B.; GRECO, J.B.; GALIZZI, J.; CANÇADO, J.R. Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- 41 CALICH, V. L. G. Mecanismos de resistência do hospedeiro à infecção experimental pelo *Paracoccidioides brasiliensis*. Tese de Livre Docência. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, USP; 1993.

- 42 NASCIMENTO, M.D.S.B; SILVA, L.M; GONÇALVES, M.G; BEZERRA, G.F.B; VIANA, G.M.C; FIGUEIREDO, I.A. Fusariose no Maranhão: Relato de dois casos da Micoose Emergente. *Rev. News Lab.* 2003; 56: 142-146.
- 43 NASCIMENTO, FRF; CALICH,VLG; RODRIGUEZ, D; RUSSO, M. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: Essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. *The J. of Immunol* 2002; 168: 4593-4600.
- 44 JANEWAY JR, C. A.; TRAVERS, P. Imunobiologia:o Sistema Imunológico na Saúde e na Doença. 5ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 2009.
- 45 ABBAS, A. k.; LICHTMAN, A. H. Imunologia celular e molecular.5ªed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009.
- 46 ALMEIDA, MC; VILHENA, V; BARRAL, A; BARRAL-NETO, M. Leishmanial infection: Analysis of its first steps. A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2003; 98: 861-870.
- 47 BERNARD, G.; ROMANO, C. C.; CACERE, C.C.; JUVENALE, M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; DUARTE, A. J. S. Imbalance of IL-12, IFN- γ and IL-10 secretion in the immunosuppression associates with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine* 2001; 13: 248-252.
- 48 BAVA, A. J.; MISTCHENKO, A. S.; PALACIOS, M. F.; ESTEVEZ, M. E.; TIRABOSHI, N. I. SEM, L.; et al. Lymphocyte subpopulations and cytokine production in paracoccidioidomycosis patients. *Microbiol. Immunol.* 1991; 35:167-174.
- 49 KARHAWI, A. S. K.; COLOMBO, A. L.; SALOMÃO, R. Production of IFN- γ is impaired in patients with paracoccidioidomycosis during active disease and is restored after clinical remission. *Med. Mycol.* 2000; 38: 225-229.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A inoculação com suspensão de *Fusarium oxysporum* por via intraperitoneal pode induzir infecção em camundongos, o que pôde ser comprovado pela disseminação fúngica para os diferentes órgãos, pela diminuição da sobrevida dos animais, pelas alterações esplênicas e pela modulação do padrão de resposta imunológica.

Das três linhagens estudadas, a linhagem C3H/HePas é a mais susceptível ao *Fusarium oxysporum*, apresentando maior crescimento fúngico no baço, maiores alterações esplênicas e menor sobrevida. Esta susceptibilidade parece estar associada ao padrão Th1 de resposta imunológica.

REFERÊNCIAS

- ADEREM, A. & UNDERHILL, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Ann. Rev. Immunol.**, 17: 593-623, 1999.
- ANAÏSSIE EJ, HACHEM R, LEGRAND C, LEGENNE P, NELSON P, BODEY GP. Lack of activity of amphotericin B in systemic murine fusarial infection. **J Infect Dis** 1992; **165**: 1155-1 157.
- BRILHANTE, R.S.; CORDEIRO, R.A.; MEDRANO, D.J.; ROCHA, M.F.; MONTEIRO, A.J.; CAVALCANTE, C.S. et al. Onychomycosis in Ceará (Northeast Brazil): epidemiological and laboratory aspects. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 100:131-135; 2005.
- CANO, L. E., SINGER-VERMES, L. M., VAZ, C. A. C., RUSSO, M., and CALICH, V. L. G., Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: Relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response and specific isotype patterns. **Infect. Immun.** 63, 1777–1783, 1995.
- DARINI, M; SOARES, M. M. S. R. & CAZANAVE, S. O. S. **Isolamento e identificação de fungos filamentosos a partir de “Cannabis sativa I”** Pontifícia Universidade Católica de Campinas – São Paulo, 2003.
- DING,A.H.; NATHAN,C.F.;STUEHR,D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J. Immunol.**,141:2407-2412, 1988.
- GODOY, P.; NUNES, E.; SILVA, V.; TOMIMORI-YAMASHITA, J.; ZAROR, L.; FISHMAN, O. Onychomycosis caused by *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* in São Paulo, Brazil. **Mycopathologia** 157: 287-290; 2004.
- GREEN, J. M.; TURKA, L. A.; JUNE, C.H. & THOMPSON, C. B. CD28 and staphylococcal enterotoxins synergise to induce MHC-independent T-cell proliferation. **Cell. Immunol.**, 145:11, 1992.
- GUARRO, J.; GENÉ, J. *Fusarium* infections. Criteria for the identification of the responsible species. **Mycoses**; 35(5-6): 109-14, 1992.

- GUARRO J, GENE J. Opportunistic fusarial infections in humans. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 14: 741-754, 1995.
- LACAZ, C.S.; POERO, E. MARTINS, J.E.C. Micologia Médica. São Paulo: Sarvier, 695p, 1991.
- LEGRAND C, ANAISSIE E, HASHEM R, NELSON P, BODEY GP, RO J. Experimental fusarial hyalohyphomycosis in a murine model. *J Infect Dis*; 164: 944-948, 1991.
- MacMICKING, J.; XIE, Q.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. *Ann. Rev. Immunol.*, 15: 323-350, 1997.
- MAYAYO, E.; PUJOL, I.; GUARRO; J. Experimental pathogenicity of four opportunist *Fusarium* species in a murine model *J. Med. Microbiol.* 48: 363-366, 1999.
- NASCIMENTO, M.D.S.B.; ARAUJO, D.R.; BEZERRA, G.F.B.; SILVA, J.R.S.; MORAES FILHO, G.J.B.; SILVA, M.L. Fungos queratinofílicos na ilha de São Luis-Ma. *Rev. da Soc. Bras. Med. Trop.* 37: 465-465; 2001.
- NASCIMENTO, M.D.S.B.; SILVA, L.M.; SILVA, R.D.L.; SILVA, G.F.C.; MATOS, P.; VIEGAS, I.; BEZERRA, G.F.B.; ZAROR, L.C. Fusariose no Maranhão, Brasil: Relato do primeiro caso da micose emergente. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* .35:199, 2002.
- NASCIMENTO, M.D.S.B; SILVA, L.M; GONÇALVES, M.G; BEZERRA, G.F.B; VIANA, G.M.C; FIGUEIREDO, I.A. Fusariose no Maranhão: Relato de dois casos da Micose Emergente. *Rev. News Lab.* 56: 142-146, 2003.
- NATHAN, C. F.; MURRAY H. W.; WIEBE, M.E.; RUBIN, B. F. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J. Exp. Med.*, 158: 670-689, 1983.
- NELSON, P.E.; DIGNANI, M.C.; ANAISSIE, E.J. Taxonomy, biology and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin Microbiol. Rev.* 7:479-504; 1994.
- NINET, B.; JAN, I.; BONTEMS, O.; LECHENNE, B.; JOUSSON, O.; LEW, D. et al. Molecular identification of *Fusarium* species in onychomycosis. *Dermatology* 210:21-25; 2005.

- NIR-PAZ, R.; STRAHILEVITZ J., SHAPIRO,M., KELLER, N. GOLDSCHMIED-REOUVEN, A, YARDEN O., BLOCK C., POLACHECK I. Clinical and Epidemiological Aspects of Infections Caused by *Fusarium* Species: a Collaborative Study from Israel. **J. Clin Microbiol.** 42:3456–3461, 2004.
- NUCCI M.; ANAISSIE, E. Cutaneous Infection by *Fusarium* Species in Healthy and Immunocompromised Hosts: Implications for Diagnosis and Management **Clin. Inf. Dis.**; 35:909–920, 2002.
- NUCCI, M.; ANAISSIE, E. Fusarium infections in immunocompromised patients. **Clin Microb Rev** 20: 695-704; 2007.
- PINCELLI, T. P. H., BRANDT, H R C, MOTTA A L, MACIEL F.V. R. CRIADO, P R. Fusariose em paciente imunocomprometido: sucesso terapeutico com voriconazol. **An Bras Dermatol.**; 83(4):331-4, 2008.
- RIPPON, J.W. Hialohifomicois. In: Ripon JW (ed) **Tratado micologia médica**. 3ra edición, Interamericana. Mc Graw Hill, México: 787-805, 1990.
- SNYDER & HANSEN. Murcha de *Fusarium* – *Fusarium oxysporum*. <http://www.agroalerta.com.br>. Acessado em 2 de maio de 2004.
- STEEG, P. S.; MOORE, R. N.; JOHNSON, H., J.; OPPENHEIM, J. J. Regulation of murine macrophage la expression by a lymphokinen with immune interferon activity. **J. Exp. Med.**, 156: 1780-1793, 1982.
- TELLES, F. Q. Infecções por fungos filamentosos invasores. **Rev de prática Hospitalar**, 36, 2004.
- THOMAS P.A; GERALDINE P. Fungal keratitis due to *Fusarium* and other fungi. **J. Mycol. Médicale** 2:121-131, 1992.
- Van FURTH, R. Development and distribution of mononuclear phagocytes. In: **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**, Second Edition, Eds. Gallin, J.I., Goldstein, I. M. e Snyderman, R. Raven Press, Ltd., New York, 325-339, 1992.
- WARNOCK D.W.; JOHSON, E.M. Clinical manifestations and management of hyalohyphomycosis in the compromised patient. In: Warnock DW, Richardson M.P. (ed)

Fungal infection in the compromised patient, 2nd edition, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, New York: 247-310, 1991.

ZAITZ, C., CAMPBELL, I., MARQUES, S. A., RUIZ, L. R. B., SOUZA, V. M. Fungos Oportunistas: **Compêndio de Micologia Médica**, 1 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1998.

ANEXO A - NORMAS PARA PUBLICAÇÃO BRAZILIAN JOURNAL OF MEDICAL AND BIOLOGICAL RESEARCH

Organization of the Manuscript

Most articles published in the Brazilian Journal of Medical and Biological Research will be organized into the following sections: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Key words, Introduction, Results, Material and Methods, Discussion, References, Acknowledgments, Tables with legends and footnotes, Figure legends and Figures. Uniformity in format will facilitate the experience of readers and users of the journal. Continuous page numbers are required for all pages including figures. There are no specific length restrictions for the overall manuscript or individual sections. However, we urge authors to present and discuss their findings concisely. We recognize that some articles will not be best presented in our research article format. If you have a manuscript that would benefit from a different format, please contact the editors to discuss this further.

Our online submission system can support a large range of formats for text and graphics, but if you experience difficulties with the site or are concerned about the suitability of your files, please see the [manual](#) for submission or contact the Production Department of the Brazilian Journal of Medical and Biological Research (bjournal@fmrp.usp.br).

Title Page

Title

The title should be as short and informative as possible, should not contain non-standard acronyms or abbreviations, and should not exceed two printed lines.

Example:

Single-step purification of crotapotin and crotactine from *Crotalus durissus terrificus* venom using preparative isoelectric focusing

Please also provide a brief "running title" of approximately 60 characters.

Example:

Purification of crotapotin and crotactine

Authors and Affiliations

Initials and last name(s) of author(s) (matched with superscript numbers identifying institutions). Institution(s) (Department, Faculty, University, city, state, country) of each author (in Portuguese if authors are from Brazil).

Example:

A.S. Aguiar¹, A.R. Melgarejo¹, C.R. Alves² and S. Giovanni-De-Simone^{2,3}

¹**Divisão de Animais Peçonhentos, Instituto Vital Brazil, Niterói, RJ, Brasil**

²**Laboratório de Microsequenciamento de Proteínas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil**

³**Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil**

One of the authors should be designated as the corresponding author. It is the corresponding author's responsibility to ensure that the author list, and the summary of

the author contributions to the study are accurate and complete. If the article has been submitted on behalf of a consortium, all consortium members and affiliations should be listed after the Acknowledgments.

Corresponding author: Name, complete mailing address, including zip code, telephone number, Fax number and E-mail of author to whom correspondence should be sent.

Acknowledgment of research grants and fellowships (agency and grant number).

Key Words

A list of key words or indexing terms (no more than 6) should be included. A capital letter should be used for the first letter of each key word, separated by a semicolon. The Journal recommends the use of medical subject headings of Index Medicus for key words to avoid the use of several synonyms as entry terms in the index for different papers on the same subject. Remember, key words are used by the Scielo Database (see http://www.scielo.br/bjmbr;articles_search/subject) to index the article.

Running title

This short title, to be used as a page heading, should not exceed 60 letters and spaces.

Abstract

Since abstracts are published separately by Information Services, they should contain sufficient hard data, to be appreciated by the reader. The Brazilian Journal publishes unstructured abstracts.

The abstract should briefly and clearly present the problem, experimental approach, new results as quantitative data if possible, and conclusions. It should mention the techniques used without going into methodological detail and mention the most important results.

Abbreviations should be kept to a minimum and should be defined in both the Abstract and text.

Please do not include any reference citations in the abstract. If the use of a reference is unavoidable, the full citation should be given within the abstract.

The abstract should not exceed 250 words and should be written as a single paragraph double-spaced on a separate page following the title page.

Please see <http://www.bjournal.com.br/writing_a_good_abstract.html> for suggestions on writing a good abstract

Introduction

The Introduction should put the focus of the manuscript into a broader context. As you compose the introduction, think of readers who are not experts in this field. Include a brief review of the key literature. This should state the purpose of the investigation and justification for undertaking the research and relationship to other work in the field. An extensive listing or review of the literature should not be used. If there are relevant controversies or disagreements in the field, they should be mentioned so that a non-expert reader can delve into these issues further. The Introduction should conclude with a brief statement of the overall aim of the experiments and a comment about what was achieved.

Material and Methods

Sufficient information should be provided in the text or by referring to papers in generally available journals to permit the work to be repeated.

This section should provide enough detail for reproduction of the findings. Protocols for new methods should be included, but well-established protocols may simply be referenced. We encourage authors to submit, as separate files, detailed protocols for newer or less well-established methods. These will be linked to the article and will be fully accessible.

Results

The results should be presented clearly and concisely. Tables and figures should be used only when necessary for effective comprehension of the data. In some situations, it may be desirable to combine Results and Discussion into a single section. The Results section should provide results of all of the experiments that are required to support the conclusions of the paper. There is no specific word limit for this section, but a description of experiments that are peripheral to the main message of the article and that detract from the focus of the article should not be included. The section may be divided into subsections, each with a concise subheading. Large datasets, including raw data, should be submitted as supplemental files; these are published online alongside the accepted article. The Results section should be written in past tense.

Discussion

The purpose of the Discussion is to interpret the results and relate them to existing knowledge. Information given elsewhere in the text, especially in Results, may be cited but all results not repeated in detail in the Discussion. The Discussion should spell out the major conclusions and interpretations of the work including some explanation of the significance of these conclusions. How do the conclusions affect the existing assumptions and models in the field? How can future research build on these observations? What are the key experiments that must be done? The Discussion should be concise and tightly argued. If warranted, the Results and Discussion may be combined into one section.

Acknowledgments

When appropriate, briefly acknowledge technical assistance, advice and contributions from colleagues. People who contributed to the work, but do not fit the criteria for authors should be listed in the Acknowledgments, along with their contributions. Donations of animals, cells, or reagents should also be acknowledged. You must also ensure that anyone named in the Acknowledgments agrees to being so named. Financial support for the research and fellowships should be acknowledged on the title page.

References

Only published or accepted manuscripts should be included in the reference list. Meeting abstracts, conference talks, or papers that have been submitted but not yet accepted should not be cited. Limited citation of unpublished work should be included in the body of the text only. All personal communications should be supported by a letter from the relevant authors. Authors are responsible for the accuracy and completeness of their references and for correct text citation. When possible, references which are easily available in English should be cited.

The BJMBR uses the numbered citation (citation-sequence) method. References are listed and numbered in the order that they appear in the text. In the text, citations should be indicated by the reference number in parentheses. Multiple citations within a single set of parentheses should be separated by commas without a space (1,5,7) . Where there are more than three sequential citations, they should be given as a range. Example: "...has been shown previously (4–9)." Make sure the parts of the manuscript are in the correct order before numbering the citations.

Because all references will be linked electronically as much as possible to the papers they cite, proper formatting of the references is crucial. For all references, list the first 6 authors followed by et al., Title, Journal (abbreviation), Year, Volume, Complete Pages,

The Brazilian Journal of Medical and Biological Research follows the reference format of the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, which can be found on the website of the National Library of Medicine (http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html). Use the Medline journal abbreviations and follow the reference style shown on the Website noted above, with several exceptions. See below for details. If the author uses the program "Reference Manager", copy the file containing the [style of the Brazilian Journal of Medical and Biological Research](#) and place it in the folder of "Styles". When submitting the manuscript, send the file produced in Reference Manager (".rmd") as an attachment.

Please use the following style for the reference list:

Published Papers. First 6 authors followed by et al., Title, Journal (abbreviation in italics), Year, Volume, Complete Pages.

Lammers AE, Hislop AA, Flynn Y, Haworth SG. The 6-minute walk test: normal values for children of 4-11 years of age. *Arch Dis Child* 2008; 93: 464-468.

Zhang Q, Malik P, Pandey D, Gupta S, Jagnandan D, Belin de CE, et al. Paradoxical activation of endothelial nitric oxide synthase by NADPH oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 1627-1633.

National Heart Lung and Blood Institute. Global Initiative for Asthma (GINA). *Global strategy for asthma management and prevention: NHLBI/WHO Workshop Report*. Bethesda: National Institute of Health. National Heart, Lung and Blood Institute publication No. 02-3659; 2006.

Article accepted for publication but not yet published. First 6 authors followed by et al., Title, Journal (abbreviation), Year of expected publication, (in press) at the end of the citation.

Janiszewski M, Lopes LR, Carmo AO, Pedro MA, Brandes RP, Santos CXC, et al. Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2005 (in press).

Electronic Journal Articles (Online Journals). Ensure that URLs are active and available.

American Academy of Ophthalmology. Diabetic retinopathy disease severity scale. *Am Acad Ophthalmol*
http://www.aao.org/education/library/recommendations/international_dr.cfm; 2005.
 Accessed 11 August 2006.

Simon JA, Hudes ES. Relationship of ascorbic acid to blood lead levels. *JAMA* <http://jama.ama-assn.org/cgi/content/abstract/281/24/2289>; 1999. Accessed 11 August 2006.

Internet Communication. Ensure that URLs are active and available.

Brasil. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade: pesquisa da população brasileira. <http://www.abeso.org.br>. Accessed February 22, 2008.

Information behaviour of the researcher of the future, CIBER Report. <http://www.bl.uk/news/2008/pressrelease20080116.html>.

CAPES Statistics. <http://www.capes.gov.br/capes/portal>. Accessed March 16, 2006.

CNPq Plataforma Lattes, "Investimentos do CNPq em CT&I". <http://fomentonacional.cnpq.br/dmfomento/home/index.jsp>. Accessed March 16, 2006.

Audiovisual Material

Physician's Desk Reference (PDR). Release 2003.1AX. [CD-ROM]. Montvale: Thomson PDR; 2003.

Computer Program

Dean AG, Dean JA, Coulombier D, Brendel KA, Smith DC, Burton AH, et al. *Epi info, version 6.04: a word processing database and statistics program for public health on IBM-compatible microcomputers*. [Computer program]. Atlanta: Centers of Disease Control and Prevention; 1998.

Statistical Package for the Social Sciences (SPSS). Version 12.0. [Computer program]. Chicago: SPSS Inc.; 2006.

Patent

Larsen CE, Trip R, Johnson CR. Methods for procedures related to the electrophysiology of the heart. Patent No. 5.529.067. Novoste Corporation; 1995.

Book, Whole. Authors, Book title, Edition, City, Publisher, Year.

American College of Sports Medicine. *Diretrizes do ACSM para os testes de esforço e sua prescrição*. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan; 2007.

Book, Chapter. Authors, Chapter Title, Editors, Book title, Edition, City, Publisher, Year, Pages of citation.

Kronfol A. Behavioral effects of cytokines: a psychiatrist's perspective. In: Plotnikoff NP, Faith RE, Murgu AJ, Good RA (Editors), *Cytokines stress and immunity*. London: CRC Press; 2007. p 1-16.

Kintzios SE. What do we know about cancer and its therapy? In: Kintzios SE, Barberaki MG (Editors), *Plants that fight cancer*. New York: CRC Press; 2004. p 1-14.

Report

WHO (World Health Organization), IPCS (International Program in Chemical Safety). *Environmental health criteria: 118 Inorganic mercury*. Geneva: World Health Organization; 1991.

National Commission on Sleep Disorders Research. *Wake up America: a national sleep alert*. Washington: Government Printing Office; 1993.

Thesis

Joselevitch C. Visão no ultravioleta em *Carassius auratus* (Ostariophysi, Cypriformes, Cyprinidae): estudo eletrofisiológico do sistema cone - células horizontais. [Master's thesis]. São Paulo: Instituto de Psicologia, USP; 1999.

Conference, Symposium Proceedings. Cite papers only from published proceedings.

Hejzlar RM, Diogo PA. The use of water quality modelling for optimising operation of a drinking water reservoir. *Proceedings of the International Conference Fluid Mechanics and Hydrology*. 1999 Jun 23-26; Prague. Prague: Institute of Hydrodynamics AS CR; 1999. p 475-482.

"Unpublished results", "Personal communication" and "Submitted papers". Reference should appear in the text with the individual name(s) and initials and not in the reference list.

(Santos CS, da-Silva GB, Martins LT, unpublished results).

It is assumed that the author has obtained permission from the source when "personal communication" is cited.

Abstract. First 6 authors followed by et al., Title, Journal (abbreviation), Year, Volume, Complete Pages (Abstract).

Lima SM, Bonci DM, Grotzner SR, Ribeiro CA, Ventura DF. Loss of amacrine cells in MeHg-treated retinae in a tropical fish. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: E-5172 (Abstract).

Competing Interest

Authors are asked at submission to state whether they have any financial, personal, or professional interests that could be construed to have influenced their paper. Reviewers are also asked to declare any interests that might interfere with their objective assessment of a manuscript. Any relevant competing interests of authors must be available to editors and reviewers during the review process and will be stated in published articles.

Abbreviations

Abbreviations should be kept to a minimum. Define all abbreviations upon first use in the text. Non-standard abbreviations should not be used unless they appear at least three times in the text.

- Explain all abbreviations in the text, figure and table legends when they first appear. Keep the number of abbreviations to a minimum.
- Do not explain abbreviations for units of measurement [3 mL, not 3 milliliters (mL)] or standard scientific symbols [Na, not sodium (Na)].

- Abbreviate long names of chemical substances and terms for therapeutic combinations. Abbreviate names of tests and procedures that are better known by their abbreviations than by the full name (VDRL test, SMA-12).
- Use abbreviations in figures and tables to save space, but they must be defined in the legend.

Nomenclature

The use of standardized nomenclature in all fields of science and medicine is an essential step toward the integration and linking of scientific information reported in published literature. We will enforce the use of correct and established nomenclature wherever possible:

We strongly encourage the use of [SI units](#). If you do not use these exclusively, please provide the SI value in parentheses after each value. Examples:

- s for second
- min for minute
- h for hour
- L for liter
- m for meter
- kDa for mass in kilodaltons
- 5 mM rather than 5×10^{-3} M or 0.005 M

Species names should be italicized (e.g., *Homo sapiens*).

Genes, mutations, genotypes, and alleles should be indicated in italics. Use the recommended name by consulting the appropriate genetic nomenclature database, e.g., HUGO for human genes. It is sometimes advisable to indicate the synonyms for the gene the first time it appears in the text.

The [Recommended International Non-Proprietary Name \(rINN\)](#) of drugs should be provided.

Figures

Figures must be submitted in high-resolution version. Please ensure that the files conform to our [Guidelines for Figure Preparation](#) when preparing your figures for production.

Preparing figure files for submission

Brazilian Journal of Medical and Biological Research encourages authors to use figures where this will increase the clarity of an article. The use of colour figures in articles is free of charge. The following guidelines must be observed when preparing figures. Failure to do so is likely to delay acceptance and publication of the article.

- Illustrations for publication should be provided as separate files.
- Each figure of a manuscript should be submitted as a single file.
- Tables should NOT be submitted as figures but should be included in the main manuscript file.
- Figures should be numbered in the order they are first mentioned in the text, and uploaded in this order.
- Figure titles and legends should be provided in the main manuscript, not in the graphic file.

- The aim of the figure legend should be to describe the key messages of the figure, but the figure should also be discussed in the text. An enlarged version of the figure and its full legend will often be viewed in a separate window online, and it should be possible for a reader to understand the figure without moving back and forth between this window and the relevant parts of the text. Each legend should have a concise title of no more than 15 words. The legend itself should be succinct, while still explaining all symbols and abbreviations. Avoid lengthy descriptions of methods.
- Each figure should be closely cropped to minimize the amount of white space surrounding the illustration. Cropping figures improves accuracy when placing the figure in combination with other elements, when the accepted manuscript is prepared for publication on our site. For more information on individual figure file formats.
- Individual figure files should not exceed 5 MB. If a suitable format is chosen, this file size is adequate for extremely high quality figures.
- Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures (or tables) that have previously been published elsewhere. In order for all figures to be open-access, authors must have permission from the rights holder if they wish to include images that have been published elsewhere in non-open-access journals. Permission should be indicated in the figure legend, and the original source included in the reference list.

Supported file types

The following file formats can be accepted. Detailed information for each file type can be found by clicking on individual links.

- EPS (suitable for diagrams and/or images)
- PDF (suitable for diagrams and/or images)
- Microsoft Word (suitable for diagrams and/or images, figures must be a single page)
- PowerPoint (suitable for diagrams and/or images, figures must be a single page)
- TIFF (suitable for images)
- JPEG (suitable for photographic images, less suitable for graphical images)
- BMP (suitable for images)

Micrographs should be treated like photographs with the following additional guidelines.

- Details of the magnification should be given.
- Details of any stains used and the method of preparation the sample should be given in the figure legend or in the Methods section.
- Detailed information about the microscope used should be included in the figure legend or in the Methods section.
- The type of camera, photographic software and details of any subsequent image manipulation should be given in the article text.

Tables

- Tables must be submitted in word (.doc) or Excel (.xls).
- Tables must be numbered consecutively with Arabic numerals in the text.
- Tables must have a concise and descriptive title.
- All explanatory information should be given in a footnote below the table. Footnotes should be used to explain abbreviations and provide statistical information.

- All abbreviations must be defined in this footnote, even if they are explained in the text.
- Tables must be understandable without referring to the text.
- Each table should be on a separate page after the Reference section in the submitted manuscript. Tables occupying more than one printed page should be avoided, if possible.
- Vertical and diagonal lines should not be used in tables; instead, indentation and vertical or horizontal space should be used to group data.
- Adapting/Reproducing Tables and Relevant Permissions. Acknowledgments of original sources of copied material should be given as a reference in the table footnote.
- Tables must be cell-based; do not use picture elements, text boxes, tabs, or returns in tables.

Submission of Research Manuscripts

You are Ready to Submit Your Manuscript. Text files can be submitted for review in the following formats: DOC or RTF.

Files with figures can be submitted in the following formats: EPS, Excel, JPEG, PhotoShop, PowerPoint, or TIFF.

Electronic Submission

Detailed [instructions for submission](#) can be found on the Brazilian Journal of Medical and Biological Research Manuscript Submission and Peer Review Web site. Files are uploaded individually and are combined into a single PDF file.

Outline of the Production Process

Once an article has been accepted for publication, the manuscript files are transferred into our production system. Manuscripts are then copyedited by professional copyeditors who correspond directly with the authors concerning queries and corrections. Any corrections should be made before the article is formatted. Once the article has been formatted, PDF proofs are generated so that authors can approve the final article. The prompt return of proofs by authors will expedite the production process.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)