

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS- UNIFAL- MG

JULIANNE CARAVITA GRISOLIA

AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE
EXPERIMENTAL COM USO DO ANTI-FÚNGICO ITRACONAZOL
ASSOCIADO COM APLICAÇÃO DE LASER DE BAIXA POTÊNCIA

Alfenas-MG
2020

JULIANNE CARAVITA GRISOLIA

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE
EXPERIMENTAL COM USO DO ANTI-FÚNGICO ITRACONAZOL
ASSOCIADO COM APLICAÇÃO DE LASER DE BAIXA POTÊNCIA**

Tese apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor pelo Programa de
Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à
Saúde da Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Fisiopatologia.

Orientadora: Prof. (a) Dra. Eva Burger.

Alfenas-MG
2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

Grisolia, Julianne Caravita.
G869a Avaliação do tratamento da paracoccidiodomicose experimental com uso do anti-fúngico itraconazol associado com aplicação de laser de baixa potência / Julianne Caravita Grisolia. - Alfenas/MG, 2020.
114f. : il. –

Orientadora: Eva Burger.
Tese (Doutorado em Biociências aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, 2020.
Bibliografia.

I. Paracoccidiodomicose. 2. LASER. 3. Neutrófilos. 4. Itraconazol. 5. Modelo experimental murino. I. Burger, Eva. II. Título.

CDD-616.9

Julianne Caravita Grisolia

"AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE EXPERIMENTAL COM USO DO ANTI-FÚNGICO ITRACONAZOL ASSOCIADO COM APLICAÇÃO DE LASER DE BAIXA POTÊNCIA

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Fisiopatologia.

Aprovada em: 02 de março de 2020

Profa. Dra. Eva Burger

Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
UNIFAL-MG

Prof. Dr. Ivo Santana Caldas

Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
UNIFAL-MG

Profa. Dra. Amanda Latércia Tranches Dias

Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
UNIFAL-MG

Prof. Dr. Zoilo Pires de Camargo

Instituição: Universidade Federal de São Paulo
UNIFESP-SP



Documento assinado eletronicamente por **ZOILO PIRES DE CAMARGO, Usuário Externo**, em 02/03/2020, às 18:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Anderson Messias Rodrigues, Usuário Externo**, em 02/03/2020, às 18:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eva Burger, Professor do Magistério Superior**, em 02/03/2020, às 18:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Amanda Latércia Tranches Dias, Professor do Magistério Superior**, em 02/03/2020, às 18:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ivo Santana Caldas, Professor do Magistério Superior**, em 02/03/2020, às 18:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&iid_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0264669** e o código CRC **9C214301**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus.

Agradeço à Prof. Dra. Eva Burger, orientadora, pela dedicação, paciência, conhecimentos transmitidos e confiança depositada para a realização deste trabalho. Saiba que tenho você como exemplo de ser humano e profissional a ser seguido.

Ao Prof. Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias, co-orientador e responsável pela minha Iniciação Científica na Imunologia, e que muito contribuiu para meu crescimento como pessoa e como profissional.

Estes quatro anos em que me dediquei a esta pesquisa foram uma jornada de desafios onde tive o prazer de contar com grandes pessoas que contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional. Aprendi que grandes conquistas só vêm com trabalho duro e que o verdadeiro vencedor é aquele que enfrenta as dificuldades ao invés de desistir de tudo.

Agradeço aos meus pais Eduardo Henrique Pinto Grisolia e Sônia Regina Caravita Grisolia e minha irmã Fabianne Caravita Grisolia, pelo amparo, auxílio e amor incondicional em todos os momentos da minha vida.

Aos meus colegas e amigos de Laboratório, Lauana Aparecida Santos, Nayara Andrade Dias e Bruno José Nascimento Gomes, pelo apoio, amizade e ajuda em toda minha pesquisa, sem vocês nada seria possível.

A minha grande amiga Danubia Pinheiro Teixeira, pela amizade e companheirismo durante esses anos de doutorado.

Aos técnicos, funcionários e alunos dos laboratórios de Microbiologia e Imunologia, Bioquímica, Vacinas e Biologia Molecular desta Universidade pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

A secretária Adriana, e aos Professores coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Biociências aplicadas à Saúde, pelo esclarecimento de dúvidas e apoio durante os anos do Doutorado.

Ao CNPQ por ter possibilitado e financiado esta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) - Código de financiamento 0001.

Muito obrigada!

“O verdadeiro heroísmo é sóbrio em extremo, muito pouco dramático. Não é a vontade de superar todos os outros a qualquer custo, mas o desejo de servir os outros a qualquer custo. ”

Arthur Ashe

RESUMO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada pelo fungo *Paracoccidioides* spp. (Pb), que requer tratamento prolongado, justificando estudos que ampliem as opções terapêuticas. O Itraconazol (Itra) é eficaz para o tratamento da PCM e requer terapia mais curta que outras drogas. A Laserterapia de Baixa Potência (LLLT) é uma aplicação nova, complementar, para o tratamento da PCM, que pode atuar melhorando aspectos inflamatórios da doença. Na presente tese, propusemos avaliar o efeito da administração simultânea da droga antifúngica Itra e da terapia complementar de LLLT em modelo experimental murino. Para tanto, utilizamos modelos experimentais distintos, nos quais primeiramente foram feitos testes em modelo “in vitro” para avaliarmos a utilização de 3 concentrações (3,10 e 50mg/Kg) de Itra, avaliando a atividade antifúngica das concentrações da droga, a toxicidade e sua ação sobre células e fungos de forma conjunta. Em seguida, utilizamos o modelo subcutâneo “air pouch”, foi feita a inoculação de *P. brasiliensis* (Pb18) em camundongos, e após 8 dias foram coletadas células da “air pouch”, constituídas em sua maioria de PMNs, para avaliar os efeitos do antifúngico e da laserterapia nas células provenientes da infecção subcutânea. Neste modelo, foram avaliadas a viabilidade celular, contagem diferencial de células, teor de produtos do metabolismo oxidativo do oxigênio (EROs), do nitrogênio (NO) e de proteínas, e a concentração das citocinas GM-CSF, TNF- α , INF- γ , IL-10, IL-12, IL-4, IL-17 e KC (IL-8). Finalmente, empregamos a infecção com *P. brasiliensis* (Pb18) por via intraperitoneal para avaliação do perfil de infecção/cura após tratamento pela via oral com a concentração mais elevada de Itra (50mg/kg) por 120 dias, no qual avaliamos o perfil de imunidade humoral (produção de anticorpos IgG específicos) e imunidade celular (hipersensibilidade do tipo tardio-HTT), assim como, os efeitos do tratamento sobre órgãos como pulmões, fígado, baço e epíplon, analisando o teor de NO, de proteínas e das citocinas GM-CSF, IL-17, IL-4, IL-12 e KC (IL-8). Os resultados deste modelo “in vitro” mostraram que o Itraconazol possui atividade fungicida contra uma cepa virulenta do Pb (Pb18), sem apresentar efeito tóxico sobre esplenócitos. O modelo “in vitro” permitiu concluir que o responsável pela lise do fungo foi o medicamento, sendo a concentração de 50mg/Kg mais eficiente. Desta forma, os resultados do modelo de infecção subcutâneo por “air pouch” mostraram que a LLLT possui efeitos sobre as células (PMNs) aumentando sua produção de metabólitos do oxigênio (EROs) e nitrogênio (NO), sua atividade metabólica, além de aumentar a produção de citocinas como

KC, INF- γ , TNF- α , IL-10, GM-CSF, e IL-4. O efeito da LLLT é atenuado pela associação ao Itra, sendo observada menor ativação celular à medida que aumentamos as concentrações do antifúngico. A associação os dois tratamentos (Itra e LLLT) resulta em menor ativação das células, verificada por menor produção de EROS e diminuição da síntese de citocinas inflamatórias, em paralelo com uma maior atividade fungicida. Estes resultados indicam que nesta situação experimental é menos necessária a ativação de células imunes para o combate ao fungo. A análise histopatológica nas “air pouch ”permitiu observar uma diminuição do número de células inflamatórias, além de melhora no perfil de cicatrização de lesão, verificando-se aumento do número de fibrócitos, em paralelo com a diminuição número de fungos. Com o aumento das concentrações do antifúngico foram observados menor o número de fungos no local de infecção, fato este que é potencializado pelo uso da LLLT. Os resultados obtidos a partir da infecção intraperitoneal com o tratamento de Itra por via oral (gavagem) mostraram que este modelo de tratamento com a concentração mais elevada do antifúngico (Itra) diminui a inflamação no epíplon, que é o órgão de choque na infecção intraperitoneal por Pb18, possivelmente por diminuir a quantidade de fungos viáveis no local da infecção.

Palavras-chave: Paracoccidiodomicose. LASER. Neutrófilos. Itraconazol. Modelo experimental murino.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by the fungus *Paracoccidioides* spp. (Pb), which requires prolonged treatment, justifying studies that expand therapeutic options. Itraconazole (Itra) is effective for PCM and requires shorter therapy than other drugs. Low Level LASER Therapy (LLLT) is a new application for the treatment of PCM, which can improve inflammatory aspects of the disease. Here we propose to study the effect of simultaneous administration of the antifungal drug Itra and complementary therapy with LLLT in an experimental murine model. We used different experimental models, the first tests were done in an “in vitro” model to evaluate the use of different Itra concentrations, thus 3 concentrations (3, 10 and 50mg/Kg) evaluating their antifungal activity of concentrations of the drug, toxicity and its action on cells and fungi together. Then, we used the subcutaneous “air pouch” model, inoculating the virulent Pb18 isolate of *P. brasiliensis* in mice, and after 8 days, “air pouch” cells constituted mostly of PMNs were collected, to evaluate the effects of antifungal and LASER therapy. In this model, cell viability, differential cell count, content of oxidative oxygen metabolism products (ROS), and nitrogen (NO) metabolism products, proteins, and cytokines GM-CSF, TNF- α , INF- γ , IL-10, IL-12, IL-4, IL-17 and KC (IL-8). Finally, we used intraperitoneal infection with *P. brasiliensis* (Pb18) intraperitoneally to evaluate the infection/cure profile after oral treatment with the highest concentration of Itraconazole (50mg/Kg) for 120 days, in which we evaluated the profile of humoral immunity (production of specific IgG antibodies) Delayed type hypersensitivity (DTH), as well as the effects of treatment on organs such as lungs, liver, spleen and epiploon, analyzing the NO, protein and cytokines GM-CSF, IL-17, IL-4, IL-12 and KC (IL-8) content. The results of this “in vitro” model showed that Itra has fungicidal activity against a virulent strain of Pb (Pb18), with no toxic effect on splenocytes. This “in vitro” model allowed us to conclude that the responsible for the lysis of the fungus was the drug, with the concentration of 50mg/Kg being more efficient. In this way, the results of the model of subcutaneous infection by “air pouch” showed that LLLT has effects on cells (PMNs) increasing their production of oxygen (ROS) and nitrogen (NO) metabolites, their metabolic activity, besides increasing the production of KC, INF- γ , TNF- α , IL-10, GM-CSF, and IL-4 cytokines. The association with Itra attenuates the effect of LLLT, with less cell activation being observed as we increase the concentrations of the antifungal drug increases. The combination of the two treatments (Itra and LLLT) results in less cell activation, as verified by lower production of ROS and decreased synthesis of

inflammatory cytokines, in parallel with increased fungicidal activity. These results indicate that in this experimental situation it is less necessary to activate immune cells to fight the fungus. Histopathological analysis of the "air pouch" showed a decrease in the number of inflammatory cells, in addition to an improvement in the wound healing profile, with an increase in the number of fibrocytes, in parallel with a decrease in the number of fungi. With the increase in the concentrations of the antifungal drug, the number of fungi at the site of infection was lower, a fact that was enhanced by the use of LLLT. The results obtained from the intraperitoneal infection with the treatment of Itra orally (gavage) showed that this treatment model with the highest concentration of the antifungal (Itra) decreases the inflammation in the epiploon, which is the shock organ in the intraperitoneal infection. by Pb18, possibly by decreasing the amount of viable fungi at the infection local.

Keywords: Paracoccidioidomycosis. LASER. Neutrophils. Itraconazole. Experimental Murine Model

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Forma leveduriforme do <i>P. brasiliensis</i>	21
Figura 2-	(A) Cultura de <i>P. brasiliensis</i> (Pb18) em meio Fava Neto, (B) ampliação de colônias da forma leveduriforme do <i>P. brasiliensis</i> , (C) imagem microscópica em câmera de Neubauer do <i>P. brasiliensis</i> corados por coloração Janus Green.....	21
Figura 3-	Representação da resposta imune ao <i>P. brasiliensis</i>	25
Figura 4-	Representação esquematizada dos ensaios “in vitro”.....	35
Figura 5-	Representação esquematizada dos ensaios em modelo experimental da Paracoccidiodomicose por via subcutânea “air pouch”.....	36
Figura 6-	Representação esquematizada do ensaio em modelo intraperitoneal da Paracoccidiodomise.....	37
Figura 7-	Efeito das concentrações de Itraconazol sobre cultura de <i>P. brasiliensis</i> . (A) Número absoluto de células fúngicas viáveis tratadas com diferentes concentrações de Itra, (B) Unidades formadoras de colônias (CFU) de Pb18 após 72 horas nas concentrações de 3, 10 e 50 mg/Kg de Itra.....	53
Figura 8-	Foto do cultivo de Unidades formadoras de Colônia de <i>P. brasiliensis</i> após 72h de exposição ao antifúngico Itraconazol.....	53
Figura 9-	Efeito das concentrações do Itraconazol sobre culturas de esplenócitos. (A) Número absoluto de células, (B) Atividade mitocondrial de esplenócitos cultivados com 24, 48 e 72 horas, com as concentrações de Itra.....	54
Figura 10-	Efeito das concentrações de Itraconazol sobre esplenócitos e <i>P. brasiliensis</i> . Número absoluto de células fúngicas cultivados com esplenócitos e dosagens de Itraconazol com 24, 48 e 72 horas.....	55
Figura 11-	Aspecto interno da infecção subcutânea pelo <i>P. brasiliensis</i> . (A) Animais inoculados com salina estéril (controle) e (B) animais infectados com Pb18 (formação da “air pouch”).....	56
Figura 12-	Efeito do Itraconazol em modelo de infecção subcutânea por <i>P. brasiliensis</i> sobre aspecto macroscópico da “air pouch”. (A) Diâmetro da “air pouch”, (B) Peso da “air pouch” e (C) Volume da “air pouch”.....	57

Figura 13-	Efeito do Itraconazol em modelo de infecção subcutânea por <i>P. brasiliensis</i> (Pb18) sobre (A) número absoluto de células, (B) número relativo de células.....	58
Figura 14-	Morfologia das células obtidas após infecção subcutânea com <i>P. brasiliensis</i> . (A) Aspecto geral das células obtidas da “air pouch”, (B) presença de linfócito, (C) presença de monócito, (D1) presença de neutrófilo e (D2) presença de neutrófilo e monócito.....	59
Figura 15-	Efeito do Itraconazol em modelo de infecção subcutânea por <i>P. brasiliensis</i> sobre atividade celular, (A) Viabilidade celular e (B) Atividade mitocondrial.....	60
Figura 16-	Efeito do Itraconazol em modelo de infecção subcutânea por <i>P. brasiliensis</i> sobre produção de metabólitos oxidativos, (A) Concentração de óxido nítrico e (B) produção de EROs.....	61
Figura 17-	Efeito do Itraconazol em modelo de infecção subcutânea por <i>P. brasiliensis</i> sobre a concentração de proteínas totais.....	61
Figura 18-	Efeito do Itraconazol em modelo de infecção subcutânea por <i>P. brasiliensis</i> na concentração de citocinas: (A) IL-4, (B) IL-10, (C) IL-12, (D) IL-17, (E) KC, (F) GM-CSF, (G), INF- γ e (H) TNF- α	63
Figura 19-	Efeito do Itraconazol em modelo de infecção subcutânea por <i>P. brasiliensis</i> sobre aspectos da inflamação aguda. (A) Quantificação de células inflamatórias e (B) quantificação de vasos.....	65
Figura 20-	- Efeito do Itraconazol em modelo de infecção subcutânea por <i>P. brasiliensis</i> sobre cicatrização das “air pouch”. (A) Quantificação de fibroblastos e (B) quantificação de fibrócitos.....	65
Figura 21-	- Efeito do Itraconazol em modelo de infecção subcutânea por <i>P. brasiliensis</i> sobre números de fungos nas “air pouch”. (A) Quantificação de fungos e (B) Unidades formadoras de colônias (CFU).....	66
Figura 22-	Aspecto interno da infecção subcutânea pelo <i>P. brasiliensis</i> . (A) Animais infectados com Pb18, (B) animais infectados e tratados com LLLT e (C) animais infectados e tratados com 50m/kg de Itraconazol.....	68
Figura 23-	Efeito do Itraconazol associado a LLLT em animais infectados com <i>P. brasiliensis</i> por via subcutânea sobre o aspecto geral da “air pouch”. (A)	

	Diâmetro da “air pouch”, (B) peso da “air pouch” e (C) volume da “air pouch” (C).....	69
Figura 24-	- Efeito do Itraconazol associado à LLLT em modelo de infecção subcutânea por <i>P. brasiliensis</i> sobre perfil celular das “air pouch”. (A) Número absoluto e (B) contagem diferencial de células.....	70
Figura 25-	Efeito do Itraconazol associado à LLLT em modelo de infecção subcutânea por <i>P. brasiliensis</i> sobre atividade celular. (A) Viabilidade celular e (B) atividade mitocondrial.....	71
Figura 26-	Efeito do Itraconazol associado à LLLT em modelo de infecção subcutânea por <i>P. brasiliensis</i> sobre produção de metabólitos oxidativos. (A) Concentração de óxido nítrico e (B) produção de EROs.....	72
Figura 27-	Efeito do Itraconazol associado à LLLT em modelo de infecção subcutânea por <i>P. brasiliensis</i> sobre cinética da concentração de proteínas totais de células obtidas por das “air pouch”.....	73
Figura 28-	Efeito do Itraconazol e da Laserterapia em infecção subcutânea por <i>P. brasiliensis</i> na concentração de citocinas: (A) IL-4, (B) IL-10, (C) IL-12, (D) IL-17, (E) KC, (F) GM-CSF, (G), INF- γ e (H) TNF- α	75
Figura 29-	Efeito do Itraconazol associado a LLLT em infecção com <i>P. brasiliensis</i> por via subcutânea sobre aspectos da inflamação aguda. (A) Quantificação de células inflamatórias e (B) quantificação de vasos.....	77
Figura 30-	Efeito do Itraconazol associado a LLLT em infecção com <i>P. brasiliensis</i> por via subcutânea sobre cicatrização das “air pouch”. (A) Quantificação de fibroblastos e (B) quantificação de fibrócitos (B).....	78
Figura 31-	Efeito do Itraconazol associado a LLLT em infecção com <i>P. brasiliensis</i> por via subcutânea sobre quantidade de fungos nas “air pouch”. (A) Quantidade de fungos e (B) unidades formadoras de colônias (CFU).....	79
Figura 32-	Fotomiografias de <i>P. brasiliensis</i> em infecção subcutânea “air pouch”.....	80
Figura 33-	Peso corpóreo de animais infectados por via intraperitoneal com <i>P. brasiliensis</i> durante 120 dias de infecção.....	82
Figura 34-	Sobrevida de animais infectados por via intraperitoneal com <i>P. brasiliensis</i> durante 120 dias de infecção.....	83
Figura 35-	- Teste de Hipersensibilidade tardia à paracoccidioidina de animais infectados por via intraperitoneal com <i>P. brasiliensis</i> durante 120 dias de infecção.....	84

Figura 36-	Título de anticorpos do tipo IgG Total em animais infectados por via intraperitoneal com <i>P. brasiliensis</i> durante 120 dias de infecção.....	85
Figura 37-	Peso dos órgãos de animais infectados com <i>P. brasiliensis</i> por via intraperitoneal após 120 dias de infecção. (A) Pulmões, (B) fígado, (C) baço e (D) epíplon.....	86
Figura 38-	Diâmetro dos órgãos de animais infectados com <i>P. brasiliensis</i> por via intraperitoneal após 120 dias de infecção. (A) Pulmões, (B) fígado, (C) baço e (D) epíplon.....	87
Figura 39-	Concentração de proteínas totais em animais infectados com <i>P. brasiliensis</i> por via intraperitoneal após 120 dias de infecção. (A) Pulmões, (B) fígado, (C) baço e (D) epíplon.....	88
Figura 40-	Concentração de Óxido Nítrico em animais infectados com <i>P. brasiliensis</i> por via intraperitoneal após 120 dias de infecção. (A) Pulmões, (B) fígado, (C) baço (C) e (D) epíplon.....	89
Figura 41-	Concentração da citocina GM-CSF em animais infectados com <i>P. brasiliensis</i> por via intraperitoneal após 120 dias de infecção. (A) Pulmão, (B) fígado, (C) baço e (D) epíplon.....	90
Figura 42-	Concentração da citocina IL-17 em animais infectados com <i>P. brasiliensis</i> por via intraperitoneal após 120 dias de infecção. (A) Pulmões, (B) fígado, (C) baço e (D) epíplon.....	91
Figura 43-	Concentração da citocina IL-4 em animais infectados com <i>P. brasiliensis</i> por via intraperitoneal após 120 dias de infecção. (A) Pulmões, (B) fígado, (C) baço e (D) epíplon.....	92
Figura 44-	Concentração da citocina IL-12 em animais infectados com <i>P. brasiliensis</i> por via intraperitoneal após 120 dias de infecção. (A) Pulmões, (B) fígado, (C) baço e (D) epíplon.....	93
Figura 45-	Concentração da citocina KC (IL-8) em animais infectados com <i>P. brasiliensis</i> por via intraperitoneal após 120 dias de infecção. (A) Pulmões, (B) fígado, (C) baço e (D) epíplon.....	94
Figura 46-	Fotomicrografias de epíplon de animais não infectados e infectados com <i>P. brasiliensis</i> e infectados e tratados com Itraconazol.....	95

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 AGENTE CAUSADOR DA DOENÇA.....	20
1.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	22
1.3 MODELOS EXPERIMENTAIS DA PARACOCCIDIODOMICOSE.....	20
1.4 RESPOSTA IMUNE À PARACOCCIDIODOMICOSE.....	24
1.5 PAPEL DE NEUTRÓFILOS NA RESPOSTA IMUNE CONTRA FUNGOS.....	26
1.6 TRATAMENTO DA PARACOCCIDIODOMICOSE.....	29
1.7 ITRACONAZOL.....	27
1.8 LASER INFRAVERMELHO DE BAIXA POTÊNCIA.....	31
2 OBJETIVOS	33
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	38
4.2 ANIMAIS.....	38
4.3 ISOLADO DE <i>Paracoccidoides brasiliensis</i>	38
4.4 ITRACONAZOL.....	38
4.5 MODELO "IN VITRO".....	35
4.5.1 Atividade anti <i>Paracoccidoides brasiliensis</i>	39
4.5.2 Efeito do itraconazol “in vitro” sobre as culturas de <i>P. brasiliensis</i> e esplenócitos...39	
4.6 MODELO SUBCUTÂNEO DE “AIR POUCH”.....	40
4.6.1 Grupos experimentais.....	40
4.6.2 Preparação de suspensões de Pb para infecção dos camundongos.....	41
4.6.2 Indução de bolsa “air pouch” subcutânea.....	41
4.6.3 Irradiação dos animais com LASER.....	41
4.6.4 Tratamento com Itraconazol.....	37
4.6.5 Obtenção e cultivo de células de “air pouch”.....	42
4.6.6 Quantificação de <i>P. brasiliensis</i> viáveis.....	42
4.6.7 Quantificação de proteínas totais.....	43
4.6.8 Quantificação dos metabólitos do oxigênio.....	43
4.6.9 Quantificação de óxido nítrico.....	39
4.6.10 Avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais (MTT).....	44
4.6.11 Quantificação de citocinas.....	44

4.6.12 Necrópsia, coleta de material e processamento histológico para microscopia das “air pouch”	45
4.6.13 Análise histopatológica das “air pouch”	45
4.6.14 Quantificação de unidades formadoras de colônias nas “air pouch”	42
4.7 MODELO INTRAPERITONEAL.....	42
4.7.1 Grupos experimentais.....	47
4.6.2 Preparação de suspensão de Pb e infecção dos camundongos.....	47
4.7.3 Tratamento com Itraconazol.....	43
4.7.4 Sobrevida e peso.....	43
4.7.5 Elisa de IgG total para <i>P. brasiliensis</i>	44
4.7.6 Teste de hipersensibilidade tardia à paracoccidioidina.....	44
4.7.7 Necrópsia, coleta de material e processamento histológico para microscopia dos órgãos.....	49
4.7.8 Quantificação de proteínas totais em órgãos.....	49
4.7.9 Quantificação de óxido nítrico em órgãos.....	46
4.7.10 Quantificação de citocinas em órgãos.....	46
4.7.11 Análise histopatológica do epíplon.....	51
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
5 RESULTADO.....	52
5.1 RESULTADOS “IN VITRO”	52
5.1.1 Concentração inibitória mínima.....	52
5.1.2 Toxicidade do Itraconazol	53
5.1.3 Conclusões a respeito dos resultados “in vitro”.....	53
5.2 RESULTADOS EM MODELO SUBCUTÂNEO “AIR POUCH” COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ANTIFÚNGICO ITRACONAZOL.....	56
5.2.1 Conclusões a respeito dos resultados em modelo subcutâneo “air pouch” com diferentes concentrações do antifúngico Itraconazol.....	64
5.3 RESULTADOS EM MODELO SUBCUTÂNEO “AIR POUCH” COM O EFEITO CONJUNTO DE ITRACONAZOL E LASERTERAPIA DE BAIXA POTENCIA.....	67
5.3.1 Conclusões a respeito dos resultados em modelo subcutâneo “air pouch” com diferentes concentrações do antifúngico Itraconazol e LLLT.....	78
5.4 RESULTADOS EM MODELO INTRAPERITONEAL COM A CONCENTRAÇÃO 0MG/KG DO ANTIFÚNGICO ITRACONAZOL.....	80
5.4.1 Conclusões a respeito dos resultados da infecção Intraperitoneal.....	94

6 DISCUSSÃO.....	97
7 CONCLUSÕES.....	104
REFERÊNCIAS.....	105

1 INTRODUÇÃO

Paracoccidioidomicose é uma micose sistêmica causada pelo fungo *Paracoccidioides* spp., originalmente descrita por Adolfo Lutz em 1908. A doença possui uma evolução subaguda ou crônica, e sua incidência é maior em adultos do sexo masculino, na faixa etária produtiva da vida (30-60 anos) e está relacionada às atividades agrícolas (WANKE; LAZER; CAPONE, 2001). A infecção por *Paracoccidioides* spp. ocorre por meio da inalação de conídios do fungo (forma filamentosa), que se converte em leveduras no organismo do paciente devido à mudança de temperatura, dando origem a forma parasitária, a infecção tem como via principal a respiratória e pode se espalhar para outros órgãos ricos em fagócitos, membranas mucosas e pele (MENDES et al. 2017).

A doença é uma das micoses sistêmicas mais prevalentes em regiões tropicais e subtropicais. Sendo considerada como uma doença endêmica na América Latina, a qual sua maior incidência é registrada em países como, Brasil, Argentina, Colômbia e Venezuela (MARTINEZ, 2017). No Brasil sua ocorrência é maior nas regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste. As regiões endêmicas apresentam condições favoráveis para o desenvolvimento do fungo, como temperatura moderada e umidade relativamente elevada, que são constantes ao longo do ano (FRANCO et al., 1987).

1.1 AGENTE CAUSADOR DA DOENÇA

Paracoccidioides spp. é um fungo termodimórfico que se apresenta sobre forma de hifas entre 18° e 25°C no ambiente e leveduriforme a 37 °C, nos tecidos dos hospedeiros e em cultura (MENDES et al. 2017). Atualmente o gênero *Paracoccidioides* abrange duas espécies: *P. brasiliensis* e *P. lutzii* (Pb01). *P. brasiliensis* hoje em dia é classificado em cinco tipos de variações genotípicas, conhecidas como: S1a e S1b que são predominantemente encontradas na América do Sul, especialmente no Sudeste e Sul do Brasil, na Argentina e no Paraguai, PS2 encontrado no Brasil e Venezuela, PS3 exclusivo na Colômbia e PS4 presente apenas na Venezuela (BAGAGLI et al. 2008).

Na forma miceliana, *P. brasiliensis* se apresenta com aspecto cotonoso, esbranquiçado e possuem filamentos hialinos, finos e septados. Na forma leveduriforme apresenta células arredondadas com parede birrefringentes e brotamentos ao redor de uma célula mãe (FIGURA 1). Tem como habitat solos ricos em matéria orgânica e úmidos com vegetação abundante. (CAMARGO, 2008).



Figura 1: Forma leveduriforme do *P. brasiliensis*.

Fonte: do autor

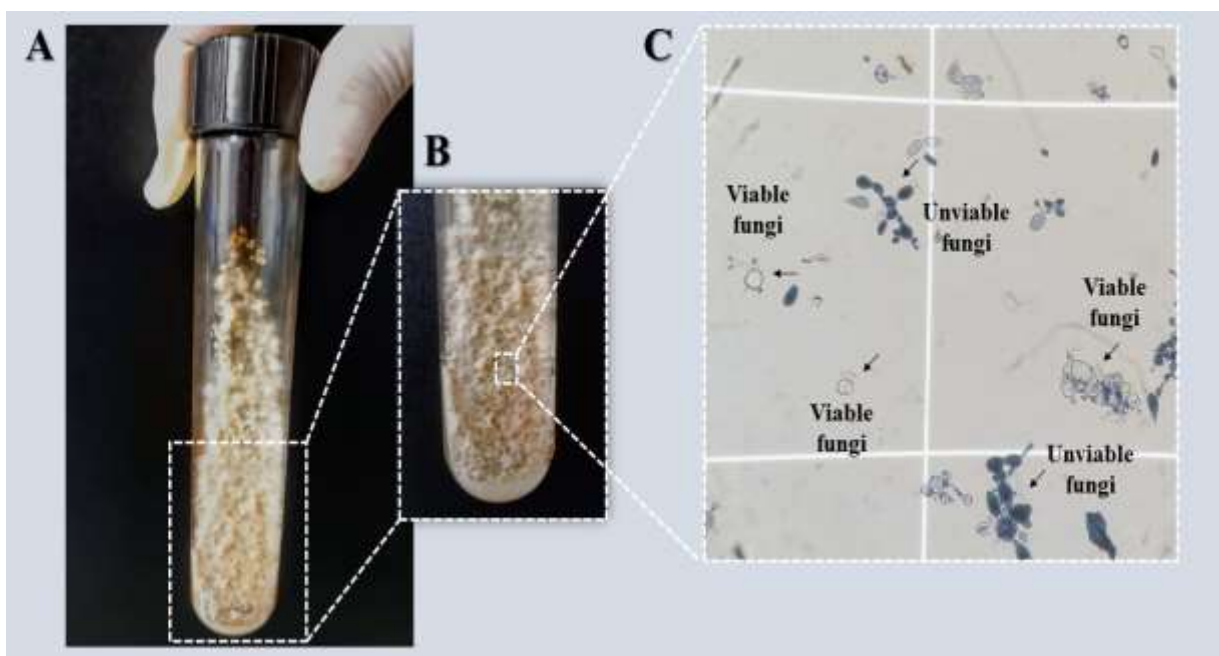


Figura 2: (A) Cultura de *P. brasiliensis* (Pb18) em meio Fava Neto, (B) ampliação de colônias da forma leveduriforme do *P. brasiliensis*, (C) imagem microscópica em câmara de Neubauer do *P. brasiliensis* corados por coloração Janus Green, onde as formas fúngicas coradas de azul representam fungos não viáveis, e formas fúngicas translúcidas representam fungos viáveis.

Fonte: do autor

A cultura das colônias de *P. brasiliensis* na fase leveduriforme apresentam aspecto macio, enrugados e de coloração creme (FIGURA 2A), seu crescimento se torna aparente após 10 a 15 dias de incubação. As colônias são compostas por células leveduriformes de tamanhos diferentes, de formatos geralmente ovais e alongadas, uma das características do fungo é a presença de célula mãe cercadas por células menores que seriam células filhas periféricas (brotamentos) (BRUMMER, CASTANEDA, RESTREPO; 1993).

1.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A via principal de ação da doença é o trato respiratório, atingindo inicialmente os pulmões, e posteriormente pode disseminar para outros órgãos e sistemas, originando lesões secundárias nas mucosas, nos linfonodos, na pele e também nas glândulas adrenais (BRUMMER, CASTAÑEDA, RESTREPO, 1993). A infecção por *P. brasiliensis* ocorre por meio da inalação de conídios, na qual após a inalação as partículas infectantes se transformam em levedura dentro do corpo do paciente, devido a temperatura (FRANCO et al., 1987).

Existem diversas classificações das formas clínicas da PCM, descritas de acordo com critérios de localizações das lesões, gravidade da doença e resultados de diagnósticos sorológicos. Desta forma foi proposto uma classificação das formas clínicas e gravidade da doença, onde adotou-se a classificação apresentada no International Colloquium on Paracoccidioidomycosis realizado em fevereiro de 1986 em Medellín na Colômbia, a PCM foi classificada em paracoccidioidomicose infecção, paracoccidioidomicose doença, forma aguda, forma crônica, unifocal, multifocal e forma residual (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

A forma aguda é a mais grave e representa cerca de 3% a 5% de todos os casos. É caracterizada por um curso rápido, comprometendo o baço, fígado, nódulos linfáticos e medula óssea, resultando na hipertrofia desses órgãos, acomete na maioria das vezes crianças e adultos jovens (de até 30 anos) (BRUMMER; CASTAÑEDA; RESTREPO, 1993). A forma crônica é mais comum, ocorrendo em mais de 90% dos casos, sendo estes a maioria adultos do gênero masculino (PALMIEIRO; CHERUBINI; YURGEL, 2005). Neste caso a doença progride de forma lenta e pode levar meses ou até mesmo anos para se estabelecer plenamente, os sintomas mais evidentes são os pulmonares, pois desenvolve-se a partir de um foco primário ou por reativação de focos já estabelecidos, afetando inicialmente os pulmões (FRANCO et al., 1989).

Existem casos em que a PCM é diagnosticada como PCM-infecção, em que testes intradérmicos apresentam resultados positivos, mas esses indivíduos não possuem manifestações clínicas da doença, diferentemente quando comparados com casos de PCM-doença, nas quais existem manifestações clínicas da doença nos pacientes (MARQUES, 2010). Assim, a manifestação da PCM depende da interação entre o fungo e a resposta imune do paciente, podendo adquirir um carácter assintomático, ou disseminar-se pelo organismo. Além disso, fatores associados ao fungo como virulência e composição de antígenos podem

influenciar no estabelecimento da infecção, pois estão ligados ao desenvolvimento de uma resposta imune eficaz pelo hospedeiro (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

1.3 MODELOS EXPERIMENTAIS DA PARACOCCIDIODOMICOSE

O modelo experimental da PCM foi estabelecido pelo estudo do comportamento de diversas linhagens murinas isogênicas quando estas se relacionavam com o fungo. A classificação de linhagens isogênicas de camundongos em sensíveis (B10.A, B10.D2/oSn e B10.D2/nSn), em intermediárias (BALB/c, C57B1/10, CBA e C3H/Fe) e em resistentes (A/Sn, DBA/2 e C3H/HeJ) permitiu posteriormente o estudo dos mecanismos imunológicos envolvidos no controle da infecção (CALICH, et al., 1985).

Singer-Vermes et al. (1989) estudaram sete diferentes isolados de Pb: Pb265, IVICPb267, Pb192, IVICPb9, PbSN, Pb2052 e Pb18, quanto aos aspectos de patogenicidade e imunogenicidade, e verificaram que estes possuíam virulência alta, média e baixa. O isolado Pb265 foi considerado como sendo de baixa virulência, enquanto o Pb18 foi considerado de alta virulência. Quando camundongos da linhagem B10 foram infectados com o isolado Pb18 ocorreu a disseminação em órgãos como fígado, baço, pulmões, nódulos linfáticos e coração, enquanto com o isolado Pb265 atingiu fracamente os nódulos linfáticos. Essa variação na virulência pode auxiliar a explicação quanto à existência de diferentes manifestações clínicas da doença (FRANCO et al., 1989). Com essa classificação, foi possível entender e conhecer os mecanismos imunológicos relacionados ao controle da infecção por esse fungo, tanto na suscetibilidade quanto na resistência das linhagens de camundongos. Assim, pode reproduzir diferentes formas clínicas da doença, que apresentam diferentes padrões de respostas imunes (CALICH, et al., 1985).

Em animais classificados como resistentes (A/J) e inoculados com *P. brasiliensis*, eles encontraram uma infecção caracterizada por macrófagos e ativação de PMN e baixos níveis de anticorpos anti-Pb. Esses animais mostram inicialmente altos níveis de IFN- γ e pequenas quantidades de citocinas do tipo 2 (IL-4, IL-5 e IL-10). Em camundongos suscetíveis (B10), eles identificaram baixos níveis de IFN- γ e produção relativamente alta de IL-5 e IL-10. (KASHINO et al., 2000). Os linfócitos de camundongos suscetíveis secretam baixos níveis de IFN- γ e IL-2. Camundongos resistentes produzem IL-5 posteriormente, enquanto camundongos suscetíveis produzem picos de IL-5 (CALICH; KASHINO, 1998).

1.4 RESPOSTA IMUNE À PARACOCCIDIOIDOMICOSE

O estabelecimento, a disseminação e a gravidade da PCM depende de fatores do próprio fungo, como virulência, composição antigênica, além das condições ambientais e principalmente da capacidade do hospedeiro de desenvolver uma resposta imune eficaz (BENARD, 2008).

A resposta imune inata desempenha papel chave no controle da infecção por fungos, com a ativação do sistema complemento, a atividade microbicida de células NK e dos fagócitos, que possuem uma resposta significativa no combate aos fungos patogênicos. As células da resposta inata, como células natural killer (NK), neutrófilos, monócitos e macrófagos desempenham papel importante na resistência ao *P. brasiliensis*. A participação destas células na reação inflamatória e na atividade fungicida é induzida pelo fungo e também por citocinas produzidas pelas células inflamatórias durante sua interação com fagócitos (BONFIM; MAMONI; BLOTTA, 2009).

A interação entre a superfície do fungo com as principais células fagocitárias da resposta imune inata depende de receptores presentes na membrana dessas células. Dentre esses receptores destacam-se os semelhantes a Toll (TLRs, Toll-like receptors) e receptores lectina tipo C- Like (CLR), que são proteínas transmembrânicas que interagem com estruturas moleculares de patógenos, ativando as células fagocitárias. Os TLRs são capazes de reconhecer porções moleculares associadas ao patógeno (PAMPs) e induzir sinais que resultem na ativação da resposta imune inata e produção de citocinas inflamatórias que regulam a resposta imune humoral (FORTES et al., 2011). Alguns modelos experimentais sugerem que o fungo penetra em macrófagos do hospedeiro através dos receptores TLR2 e TLR4. A interação entre o TLR e o *P. brasiliensis* é considerada um mecanismo de escape desenvolvido pelo fungo para garantir sua sobrevivência dentro das células fagocitárias (BONFIM; MAMONI; BLOTTA, 2009). Foi demonstrado a participação de TLR2, TLR4 no reconhecimento e internalização do *P. brasiliensis* e ativação de neutrófilos (FORTES et al., 2011).

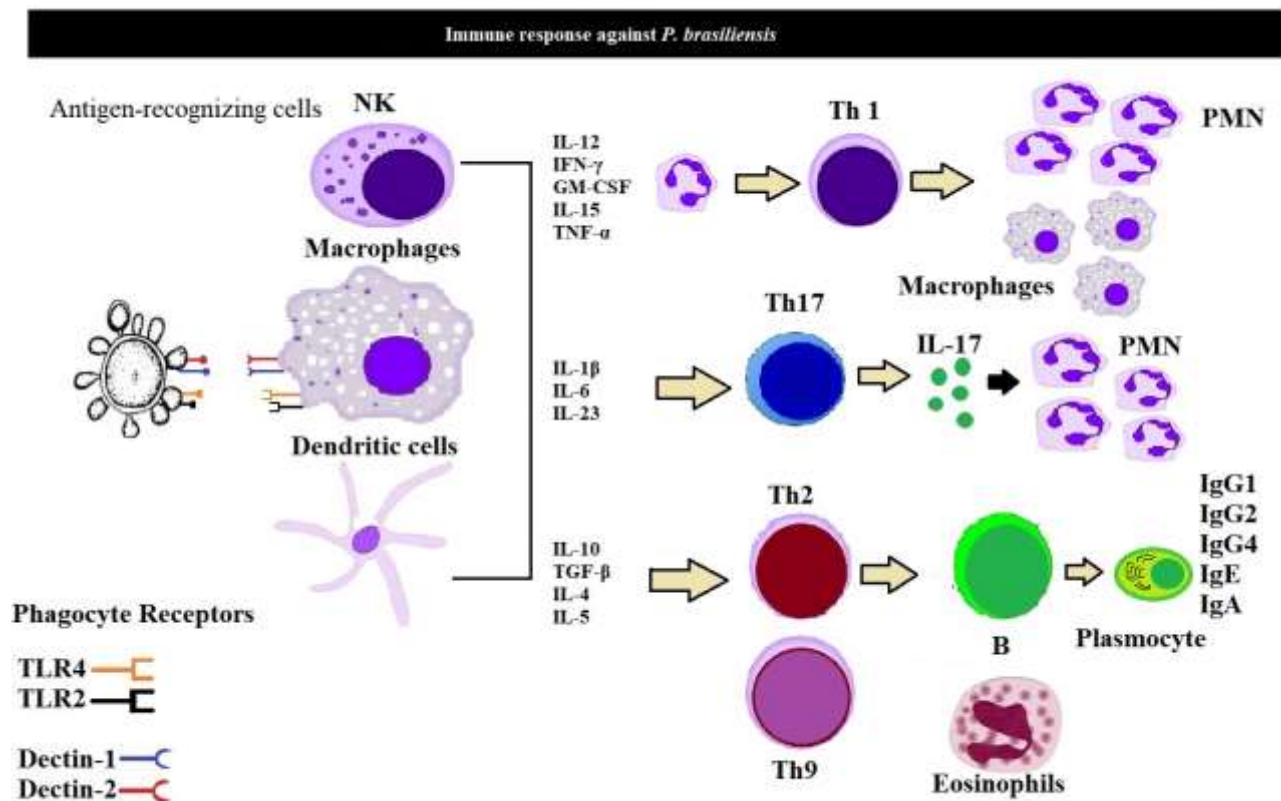


Figura 3: Representação da resposta imune ao *P. brasiliensis*.
Fonte: do autor

O papel da imunidade humoral ocorre por meio dos anticorpos específicos anti-Pb que se fixam nos fungos bloqueando a multiplicação do fungo. São encontrados IgG e C3 na parede dos fungos presentes nos granulomas desde as fases iniciais da infecção (BIAGIONI et al., 1987). A resposta imune adquirida na PCM em animais e indivíduos resistentes é do tipo Th1 ativando a participação de células fagocitárias. Altos títulos de anticorpos específicos são encontrados em casos graves da doença, na qual ocorre um aumento na produção de IL-10. Citocinas do padrão de resposta do tipo Th2 como IL-4 e IL-5 encontram-se aumentadas em formas agudas e crônicas da doença (MAMONI; BLOTTA, 2005). Em modelo animal da PCM, animais suscetíveis tendem a uma produção maior de IL-4, IL-5 e IL-10, e baixos níveis de TNF- α (CALICH, KASHINO, 1998).

Estudos experimentais com *P. brasiliensis* indicam que a resistência ao fungo é dependente das atividades de células T Helper e macrófagos, monócitos, mediadas por IFN- γ , TNF- α , caracterizado pela síntese de citocinas que ativam macrófagos e linfócitos T CD4+ e CD8+, resultando na formação de granulomas compactos. *P. brasiliensis* se instala nos tecidos e causam lesão tecidual provocando um aumento na concentração de macrófagos e

neutrófilos no local, se isso não for suficiente para conter a multiplicação dos fungos os macrófagos se organizam em granulomas (CALICH; KASHINO, 1998). Os pacientes infectados que evoluem para doença apresentam um perfil de resposta Th1. As formas mais graves evoluem com predomínio de resposta imunológica Th2, na qual ocorre a ativação de linfócitos B, hiper gama globulinemia e formação de anticorpos específicos (CALVI et al., 2003).

Os neutrófilos (PMNs) estão presentes em grande número nos tecidos parasitados, tanto em camundongos como em humanos, e apresentam importante papel na defesa contra o *P. brasiliensis* através dos mecanismos dependentes dos metabólitos de oxigênio, como H_2O_2 e ânion superóxido, quando estas células são estimuladas com IFN- γ , TNF- α , GM-CSF e IL-15 (RODRIGES et al., 2007). Quando os PMNs são co-cultivados “in vitro” com *P. brasiliensis*, eles produzem altos níveis de IL-8, desencadeando processo antiapoptótico dessas células e favorecendo a sobrevivência do fungo no interior da célula fagocitária. PMN de camundongos resistentes à infecção obtidos por “air pouch” encontram-se ativados e apresentam maior atividade contra o fungo quando comparados com células de animais suscetíveis. Sendo que um intenso infiltrado neutrofilico obtidos por “air pouch” foi associado com resposta de hipersensibilidade tardia em ambas as linhagens (MELONI-BRUNERI et al., 1996). Os neutrófilos têm um papel fundamental no controle da multiplicação de fungos, sendo que na infecção por *P. brasiliensis* são as primeiras células a chegar no sítio inflamatório, na qual a reação inflamatória é caracterizada por recrutamento abundante de polimorfonucleares e aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias (MELONI-BRUNERI et al., 1996).

1.5 PAPEL DE NEUTRÓFILOS NA RESPOSTA IMUNE CONTRA FUNGOS

Os neutrófilos (PMNs) são gerados a partir de células tronco hematopoiéticas pluripotentes da medula óssea, e possuem estágios de maturação sendo eles o mieloblasto, promielócito, mielócito, metamielócito, bastonetes e finalmente neutrófilos segmentados. São caracterizados por possuírem em núcleo multilobulado e grânulos em abundância no citoplasma. Possuem diferentes grupos de moléculas citotóxicas, como proteases que atuam na degradação do patógeno (ZYCHLINSKY; WEINRAUCH; WEISS, 2003). Através do processo de explosão respiratória os PMN são capazes de liberar seu conteúdo granulocítico no ambiente, promover digestão fagocítica e a formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) (RANE et al. 2018).

Os PMNs possuem papel chave nos estágios iniciais da infecção por *P. brasiliensis*, conferindo resistência ao hospedeiro e contribuindo para o desenvolvimento de resposta imune efetiva ao patógeno (FORTES et al., 2011). Sendo responsáveis por uma reação inflamatória que é caracterizada por recrutamento abundante de polimorfonucleares e aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-1 β e MIP-2 (RESTREPO et al., 1992).

PMNs são recrutados por sinais quimiotáticos de quimiocinas, citocinas, metaloproteínas da matriz extracelular, produtos dos microrganismos invasores (MANTOVANI et al., 2011). Uma grande variedade de agentes é capaz de estimular a atividades dos PMN, entre eles incluem os peptídeos quimiotáticos como formil-metionil-leucil fenilalanina (fKGP) e os ésteres de forbol. Dentre os particulados incluem bactérias, leveduras e complexos antígeno/anticorpo opsonizados por componentes do sistema complemento (GAZENDAM, et al., 2016). Os PMN são atraídos por quimiocinas e mediadores inflamatórios como IL-8 e INF, liberados pelas células endoteliais ativadas, macrófagos e mastócitos, e também pelos produtos C3a e C5a do complemento. A migração é orientada pelo gradiente de concentração de mediadores que são reconhecidos por receptores de superfície dos neutrófilos, esta interação favorece o deslocamento dos neutrófilos pela matriz extracelular e sua rápida chegada ao sítio inflamatório (CRUVINEL et al., 2010).

Desta forma as células deixam de circular ao acaso e seguem rumo ao gradiente quimioatraente que se forma em direção ao sítio de invasão do patógeno. Ao encontrar o patógeno o neutrófilo engloba-o formando um fagossoma e em seguida ocorre a fusão do fagossoma com os grânulos citoplasmáticos, ocorrendo degranulação e formando o fagolisossoma (BACHIEGA, et al. 2016). Dentro deste, o microrganismo é degradado por peptídeos antimicrobianos e espécies reativas de oxigênio (EROs) que compõem o mecanismo microbicida independente e dependente de oxigênio (MANTOVANI et al., 2011).

O mecanismo oxidativo inicia-se pela produção de O₂ pelo complexo enzimático da NADPH oxidase, através do processo de explosão respiratória. A ativação da explosão respiratória envolve profundas mudanças de localização e atividade de diferentes componentes do complexo enzimático NADPH oxidase, e quando as células em repouso são expostas a estímulos, o complexo citosólico é fosforilado e migra para membrana e se associa com o citocromo b558 (MANTOVANI et al., 2011). O complexo NADPH oxidase transporta elétrons do NADPH no sítio citoplasmático para O₂ no fluido extracelular ou no espaço intrafagossômico para formar O₂⁻. A produção de O₂⁻ é acompanhada por um

aumento do consumo de O_2 não relacionado a respiração celular, e aumento da síntese de $NADP^+$ (BELAMBRI et al., 2018). O O_2 produzido pela NADPH oxidase é um oxidante fraco e incapaz de atravessar membranas, pode ser dismutado pela enzima superóxido dismutase (SOD) produzindo H_2O_2 , o qual pode ser utilizado como substrato para a produção de outras EROs e espécies reativas de nitrogênio (EROs) mais efetivas como microbicidas, como HO^{\cdot} , $HOCl$ e $ONNO^{\cdot}$. Assim o H_2O_2 também pode reagir com íons de Fe^{2+} formando outro composto reativo, o radical OH^{\cdot} (BELAMBRI et al., 2018).

O H_2O_2 formado pode ser convertido em água e O_2 por meio de duas reações, a primeira por meio da enzima catalase presente no citoplasma, e a segunda por ação da enzima glutathiona peroxidase que pode oxidar a glutathiona (GSH) e formar água. Também pode ocorrer uma reação com H_2O_2 e um halogênio oxidado formando o oxigênio singlete, este possui uma importante função na morte de microrganismos fagocitados (GAZENDAM, et al., 2016). Além dos mecanismos microbicidas dependentes de oxigênio (mecanismo oxidativo), os neutrófilos possuem mecanismos independentes de oxigênio, realizados pelos constituintes dos diferentes tipos de grânulos citoplasmáticos dos PMN (BACHIEGA, et al. 2016). A eficiência de mecanismos efetores dependentes e independentes de oxigênio, confere aos neutrófilos uma maior eficiência na eliminação dos patógenos (MOLLINEDO; BORREGAARD; BOXER, 1999). Em modelo murino da PCM, camundongos resistentes (A/J) manifestam uma resposta imune do tipo Th1, caracterizado pelo o aumento da produção de citocinas como INF- γ e IL-2 que tendem a um controle da infecção por Pb. Já animais susceptíveis (B10) manifestam uma resoste imune do tipo Th2, na qual temos o aumento de citocinas como IL-10 e IL-5, produzindo um reposta ineficaz contra o fungo. A ativação de resposta do tipo Th1 proporciona um recrutamento de células da resposta imune inata, sendo que PMN são as primeiras células a chegarem no sitio de inflamação, em animais da linhagem B10 a afluxo de PMN para o local da infecção é maior em comparação com animais da linhagem A/J, porém estas células não apresentam atividade fungicida efetiva contra Pb (PINA et al, 2006).

O uso de infecção de cepa virulenta de *P. brasiliensis* (Pb18) por via subcutânea por meio de “air pouch” tem como objetivo o recrutamento de neutrófilos para o local da infecção, desta maneira pode-se avaliar a atividade desses PMN em contato com Pb18, mostrando que estas células possuem atividade fungicida contra o fungo (BURGER et al. 2015). Quando o modelo foi estudado em linhagens A/J e B10, foi demonstrado que os neutrófilos das linhagens resistentes são mais efetivos contra Pb18 em comparação aos da linhagem suscetível, os PMN da linhagem resistente direcionam a resposta imune para o tipo

Th1, enquanto os PMN de linhagem suscetíveis demonstram padrões do tipo Th2 (SPERANDIO et al. 2015).

1.6 TRATAMENTO DA PARACOCCIDIODOMICOSE

P. brasiliensis é sensível à maioria das drogas antifúngicas, desta forma, vários antifúngicos podem ser utilizados para o tratamento de pacientes com PCM, tais como anfotericina B, sulfamídicos (sulfadiazina, associação sulfametoxazol/trimetoprim), azólicos (cetoconazol, fluconazol, itraconazol) (SHIKANAI-YASUDA, 2015).

Medicamentos como sulfamídicos e derivados têm sido usados desde 1940. Consiste em um tratamento longo, na qual a sua posologia é uma das desvantagens pois pode causar efeitos adversos, como reacções de hipersensibilidade, sintomas gastrintestinais, anemia hemolítica, além de ser altamente distribuído por todo o corpo, mesmo no SNC, e 10-30% de pacientes com doença ativa pode ter lesões do SNC (BARRAVIERA et al., 1989).

Também são usados medicamentos azólicos (cetoconazol, fluconazol e itraconazol). O cetoconazol foi usado com sucesso no tratamento PCM, mas por possuir má absorção e produção efeitos adversos como o aumento dos níveis de transaminases, reacção de hipersensibilidade da pele, vômitos, náuseas e anorexia, foi substituído pelo Itraconazol (GOLDANI, WIRTH; 2017). O fluconazol pode ser utilizado de forma oral e intravenosa, e a principal desvantagem é a sua baixa eficácia em casos disseminados. Os efeitos adversos incluem náuseas, erupções cutâneas, vômitos, dor abdominal e diarreia. Já o Itraconazol é considerado de 10 a 100 vezes mais ativo do que o cetoconazol em células fúngicas. Possui uma meia vida de 17 a 21 dias permitindo a sua prescrição, uma vez por dia, 99,9% da droga se liga às proteínas do plasma, e não atravessam a barreira hematoencefálica, desta forma são encontradas em baixos níveis no fluído cerebral (NEGRONI, 1988).

A anfotericina B tem uma meia-vida de alguns dias, podendo ser administrado em dias alternados, considerado um composto fungistático e fungicida altamente ativo. Tem sido usada desde 1958 para o tratamento de casos mais graves de PCM (VALLE et al.; 1993). A anfotericina B é excretada na bÍlis após metabolização hepática, pode causar efeitos adversos como, hipocalemia, acidose tubular renal, diminuição da filtração glomerular e anemia hipocrômica normocítica (SHIKANAI-YASUDA et al.; 2015).

A utilização do Itraconazol para a PCM foi demonstrada tanto “in vivo” como “in vitro” (NARANJO et al., 2010). No Brasil, é encontrado somente na forma de uso oral em

cápsulas. Pode ser administrado em concentrações elevadas (400 mg por dia ou duas vezes por dia), pois os efeitos adversos são pouco frequentes nas concentrações recomendadas. Ocorrendo, tais efeitos são facilmente controlados, e incluem náuseas, vômitos, aumento das transaminases séricas, erupção cutânea, hipocalemia e hiperuricemia (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

De acordo com dados descritos por Shikanai-Yasuda et al. (2002), o tratamento com Itraconazol se mostra eficaz com menos tempo de duração do tratamento. Estudos demonstram que o uso do Itraconazol para o tratamento da PCM tem sido a droga de escolha na maioria dos casos (MENEZES; SOARES; FONTES, 2006). Os azóis de ação rápida são alternativas terapêuticas boas nos casos mais leves da doença. Os casos moderados a graves necessitam de tratamentos mais prolongados. Estudos comparativos mostram que o uso do itraconazol é capaz de induzir cura em pacientes cronicamente infectados. Ainda existe a necessidade de busca por combinações e novas drogas capazes de modular uma resposta imune mais eficaz nos casos graves de PCM (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

Alguns relatos demonstram que os antifúngicos podem interagir de maneira sinérgica com os mecanismos microbicidas de PMN, através de mecanismos diretos e regulados por citocinas inflamatórias, como no caso da anfotericina B. Meier et al. (2003) demonstraram que em camundongos tratados com anfotericina B possuem um aumento na atividade fungicida de macrófagos, na qual foi descrito como sendo um fator ativador de macrófagos, além de aumentar a produção de TNF- α . Também foi demonstrado que a anfotericina B exerce efeitos moduladores sobre PMN, estimulando a produção de citocinas inflamatórias, aumentando a atividade fagocitária (MENDES; NEGRONI; ARECHAVALA, 1994). Dados com relação a capacidade do Itraconazol ser capaz de aumentar a eficiência da resposta de PMN, ou influenciar a resposta imune inata e adquirida ainda não são concretos, apesar de ser a droga de escolha no tratamento da PCM.

1.7 ITRACONAZOL

O antifúngico Itraconazol (Itra) possui amplo espectro de ação quando utilizado para o tratamento de micoses graves, como, espécies de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Sporothrix schenckii*, *Trichophyton rubrum*, *Aspergillus fumigatus* e *Paracoccidioides brasiliensis*. O contato desses microrganismos com o Itraconazol causa alterações morfológicas que variam de acordo com o tempo de exposição e a dose do medicamento utilizado. As alterações estruturais nos fungos

consistem em alterações na membrana plasmática, parede celular e vacúolos citoplasmáticos, causando aumento do volume celular, divisões celulares defeituosas, perda de crescimento e viabilidade celular. A indução de degeneração estrutural causada pelo Itra nos fungos é semelhante ao mecanismo de ação de outros medicamentos azólicos, inibindo a alfa-14-desmetilase do lanosterol, que interfere na síntese do ergosterol. (BORGES; VAN de VEM, 1989).

Itraconazol é um composto triazólico altamente lipofílico, pouco solúvel, possui uma absorção digestiva alta e seu nível plasmático máximo após administração oral de 100mg é de 0,16 mc/mL, 3 ou 4 horas depois da ingestão do medicamento. Sua meia vida varia em torno de 17 a 21 horas e 99,8% se liga em proteínas plasmáticas, especialmente albumina. A metabolização ocorre no fígado, em que há um aumento das concentrações plasmáticas e meia vida do medicamento. Seus níveis teciduais são de 3 a 20 vezes maiores que as concentrações plasmáticas, na pele e unhas. O Itra persiste por longo tempo após o término do tratamento. As concentrações de uso diárias do antifúngico variam de 100 a 400 mg (NEGRONI; ARECHAVALA, 1993).

1.8 LASER INFRAVERMELHO DE BAIXA POTÊNCIA

LASER corresponde à sigla *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, ou seja, amplificação de luz por emissão estimulada de radiação. A radiação a LASER utiliza comprimentos de onda visíveis e específicos que possuem características não ionizantes, desta forma não possui a capacidade de causar mutações (TUNÉR; HODE, 1996). Existem dois tipos de emissão à LASER sendo elas de alta potência (potencial destrutivo) e de baixa potência (sem potencial destrutivo) (ROCHA JÚNIOR et al., 2007).

A terapia com LASER de baixa intensidade ou do inglês *Low Level Light Therapy* (LLLT) é uma forma de aplicar a fototerapia que envolve a utilização da baixa potência, monocromático (produzida por apenas uma cor – apenas um comprimento de onda) e de um feixe de luz (formados por ondas de mesma frequência e direção), com efeitos de fotobioestimulação, utilizado para terapia analgésica (insensibilidade à dor, diminuição da inflamação) e como estimulante do biotrofismo (MESTER et al., 1985).

A radiação LASER de baixa intensidade (LLLT) possui propriedades anti-inflamatórias (MESTER; JASZSAGI-NAG, 1973). A LLLT é utilizada como agente terapêutico após o tratamento convencional, pois, possui propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e acelera a cicatrização de feridas (MESTER; JASZSAGI-NAG, 1973). O

tratamento possui comprimentos específicos de onda, tendo a capacidade de alterar o comportamento celular. Os efeitos do LASER de baixa intensidade na aceleração da cicatrização de feridas têm sido atribuídos ao estímulo de vários sistemas biológicos, como aumento da proliferação e atividade celular, aumento da síntese de DNA, modulação da produção dos fatores de crescimento e redução na produção de prostaglandinas (MENEGUZZO et al., 2013). A laserterapia de baixa intensidade tem sido aplicada em várias áreas da medicina, tanto em estudos realizados em humanos quanto em animais, e também em culturas de células (MESTER, 1996).

Alguns estudos relatam que a LLLT, dependendo do comprimento de onda pode atuar em processos intracelulares, em que a luz pode ser absorvida por componentes da cadeia respiratória mitocondrial, podendo resultar em aumento da produção de EROs (KITCHEN, 2003). Também pode aumentar a síntese de ATP, a taxa de replicação mitocondrial, as taxas de síntese de DNA e RNAm, a produção de prostaglandina, os níveis de β -endorfina e a liberação de substâncias pré-formadas (Histamina) (MENEGUZZO et al., 2013). Também pode ocorrer um aumento no fluxo sanguíneo local aumentando a vasodilatação arteriolar e abertura de novos leitos capilares, que pode normalizar as atividades celulares, e aumentar a taxa de proliferação celular causando um aumento na taxa de síntese de proteínas (KITCHEN, 2003). Assim o LLLT pode ter um papel na terapia imunobiológica para as doenças do sistema imune podendo ativar e aumentar a reação normal dos componentes do sistema imunológico (TADAKUMA, 1993).

O mecanismo exato que a LLLT desempenha ainda não está claro, mas se sabe que sua presença melhora e acelera e direcionada à reparação dos tecidos, além de neutralizar a inflamação e proporcionar alívio da dor em áreas de tecidos lesionados através da bioestimulação de eventos celulares (KARU, 1989). Porém, existem controvérsia sobre os mecanismos que estão envolvidos na modulação de inflamação quando o LASER é utilizado. Alguns estudos sugerem que a laserterapia pode minimizar reações inflamatórias (MEDRADO et al., 2003), outros sugerem que o LASER pode potencializar mediadores inflamatórios (GAO; XING; 2009).

Meneguzzo et al. (2013) demonstraram que a irradiação com LLLT mostrou ter um efeito anti-inflamatório e pró inflamatório de acordo com o local e o momento da irradiação. Desta forma, dados na literatura mostram que camundongos infectados com Pb nas patas e tratados com irradiação a LASER de baixa potência neste local, tiveram uma redução do edema de pata e apresentaram também uma cicatrização mais rápida das feridas e nenhuma forma de Pb detectada no local, enquanto o grupo controle apresentou múltiplos fungos

viáveis no local da infecção (FERREIRA et al., 2006). Em Cerdeira et al. (2017) mostram que a LLLT tem a capacidade aumentar a produção de EROS e metabólitos de oxigênio influenciando principalmente na capacidade fungicida de neutrófilos (PMNs) frente a *Candida albicans*.

Dados apresentados por Burger et al. (2015) demonstrou que o uso do LLLT em camundongos infectados por *P. brasiliensis* foi capaz causar um aumento da capacidade fungicida e também permitiu recrutar PMN mais ativos, capazes de combater a cepa altamente virulenta Pb18.

A paracoccidiodomicose é uma micose sistêmica de alta prevalência na América Latina, sendo considerada uma doença de grande importância no Brasil. Estudos sobre a PCM mostram que os neutrófilos são as primeiras células a chegar no sítio inflamatório na infecção por *P. brasiliensis*, tendo um papel fundamental no controle inicial da multiplicação dos fungos, assim como influenciando a resposta imune adquirida. Em modelo experimental da PCM sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos, assim como os que mostram que o Itraconazol tem sido a droga de escolha na maioria dos casos para o tratamento da PCM. Desta forma, o presente estudo pretende associar o tratamento do Itraconazol com a laserterapia para desenvolver novas possibilidades para facilitar e melhorar o tratamento da paracoccidiodomicose.

2 OBJETIVOS

Avaliar o tratamento da paracoccidiodomicose experimental utilizando o Itraconazol associado à Laserterapia de baixa potência (LLLT).

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Avaliar através do modelo “in vitro” a atividade anti *P. brasiliensis* das concentrações de 3, 10 e 50mg/Kg do antifúngico Itraconazol.
- 2- Avaliar a toxicidade das concentrações de 3, 10 e 50mg/Kg do antifúngico Itraconazol em esplenócitos.
- 3- Avaliar o efeito do antifúngico Itraconazol sobre esplenócitos e *P. brasiliensis* de forma conjunta.

- 4- Avaliar o efeito das concentrações de 3, 10 e 50mg/Kg do Itraconazol sobre neutrófilos provenientes de infecção subcutânea por *P. brasiliensis*, analisando os aspectos macroscópicos, perfil celular, atividade celular, produção de metabólitos oxidativos, concentração de proteínas e de citocinas, efeito sobre os aspectos da inflamação aguda, perfil de cicatrização e números de fungos nas “air pouch”.
- 5- Avaliar o efeito da associação do Itraconazol a Laserterapia de baixa potência sobre neutrófilos provenientes de infecção subcutânea por *P. brasiliensis*, analisando os aspectos macroscópicos, perfil celular, atividade celular, produção de metabólitos oxidativos, concentração de proteínas e de citocinas, efeito sobre os aspectos da inflamação aguda, perfil de cicatrização e números de fungos nas “air pouch”.
- 6- Avaliar o tratamento com Itraconazol na concentração de 50mg/Kg em infecção intraperitoneal durante 120 dias verificando a sobrevivência, peso corporal, títulos de anticorpos, reação a paracoccidina, e análises macroscópicas e imunológicas dos órgãos.

3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

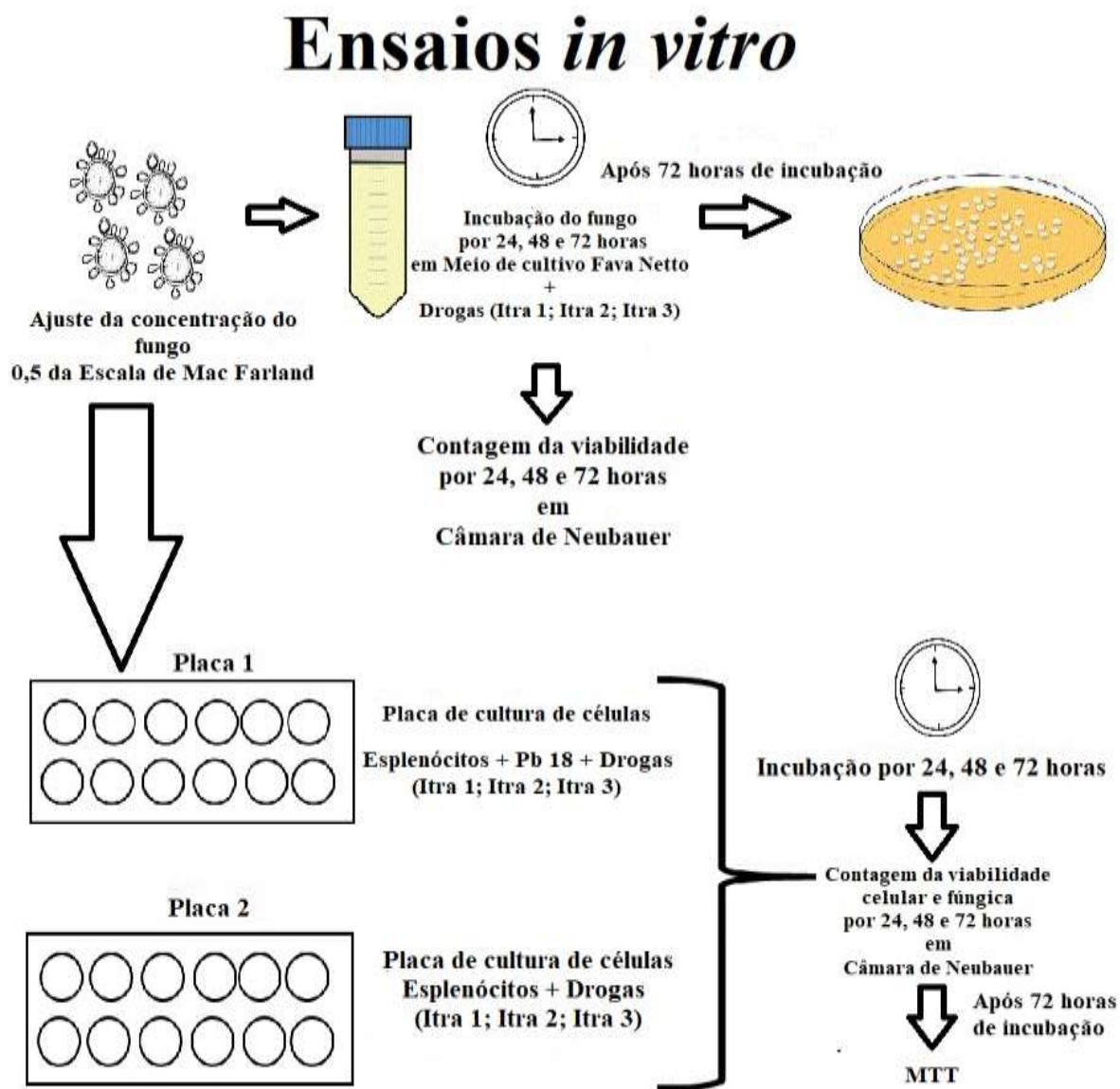


Figura 4: Representação esquematizada dos ensaios “in vitro”.

Fonte: do autor

Modelo "air pouch" - Subcutâneo

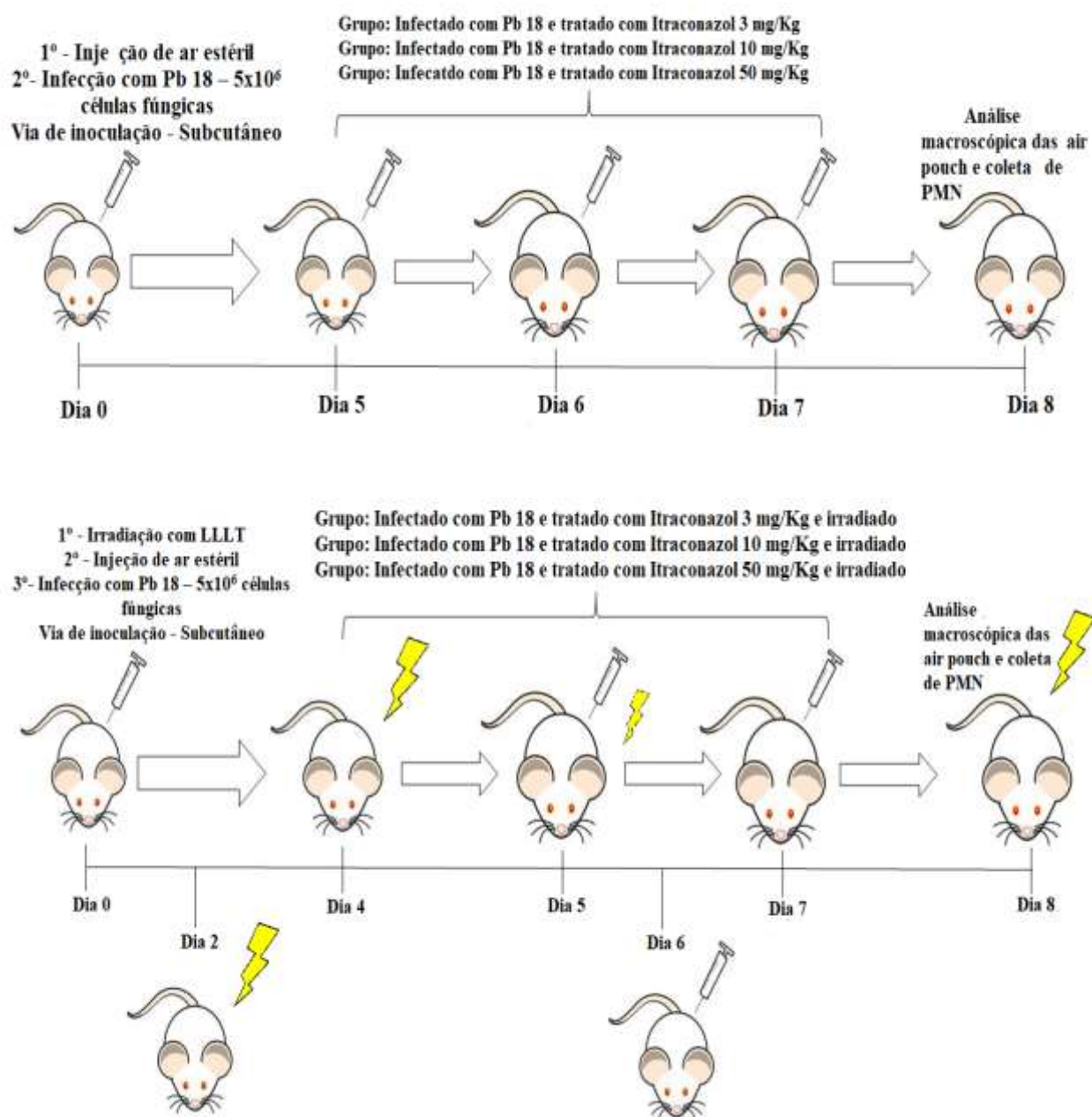


Figura 5: Representação esquematizada dos ensaios em modelo experimental da Paracoccidioidomicose por via subcutânea "air pouch".

Fonte: do autor

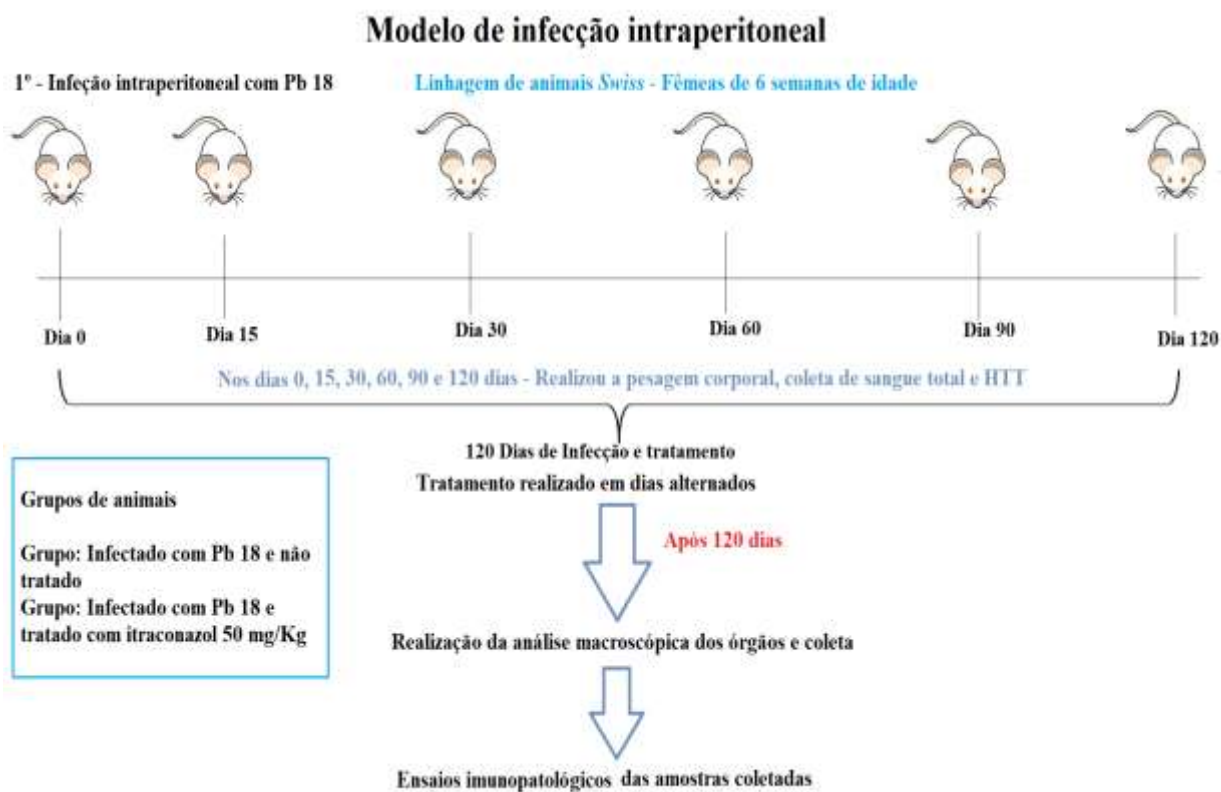


Figura 6: Representação esquematizada do ensaio em modelo intraperitoneal da Paracoccidiodomise
 Fonte: do autor

4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste tópico foram descritos os materiais e métodos de cada procedimento feito em laboratório e as questões éticas do presente estudo.

4.1 CONSIDERAÇÕES ÈTICAS

Este projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em pesquisa com animais da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL – MG), foi analisado pelo Programa de Biociências Aplicadas à Saúde. E se encontra aprovado pelo CEUA da Universidade Federal de Alfenas pelo número de número de protocolo 16/2018.

4.2 ANIMAIS

Os animais utilizados nesse projeto foram camundongos fêmeas da linhagem *Swiss* “outbread”, obtidos do Biotério da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). Os animais foram criados na UNIFAL-MG, mantidos em salas com controle de temperatura, alimentados com comida esterilizada e água filtrada *ad libitum*.

4.3 ISOLADO DE *Paracoccidioides brasiliensis*

O isolado de *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) que foi utilizado neste projeto está sendo mantido no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da UNIFAL-MG. Os fungos foram semeados e cultivados em meio de cultura semi-sólido de Fava Netto em tubos, sendo mantidos em estufa a 35°C, repicados a cada 7 dias (FAVA NETTO, 1955).

4.4 ITRACONAZOL

O Itraconazol que foi utilizado no estudo é um produto da empresa SIGMA (I6657 Sigma Itraconazole 98% (TLC) Synonym: Oriconazole, R51211, Sporanox). Tal formulação encontra-se em pó e foi diluído em clorofórmio na concentração de 50mg/Kg, conforme instrução do fabricante.

4.5 MODELO “IN VITRO”

Para a realização dos testes “in vitro” primeiramente foi realizado o experimento de concentração inibitória mínima do fármaco Itraconazol, o fármaco foi exposto em contato com cultura de *P. brasiliensis* (Pb18). Posteriormente foi feita a análise de toxicidade do Itraconazol em que as concentrações do fármaco foram cultivadas juntamente com células esplênicas proveniente de baço de camundongos saudáveis (6 camundongos de 6 semanas).

4.5.1 Atividade anti *Paracoccidoides brasiliensis*

Para o teste de susceptibilidade antifúngica, foi utilizado o isolado virulento *Paracoccidoides brasiliensis* (Pb18). Neste ensaio a técnica de diluição do caldo foi realizada de acordo com as diretrizes do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008) com adaptações. O inóculo fúngico foi preparado a partir de colônias jovens (7 dias), ajustadas de acordo com a escala de 0,5 de Macfarland (100% de células viáveis) em tubos de falcon e cultivadas em caldo Fava Netto, suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS) por 72 horas a 35°C. As diferentes concentrações de Itraconazol foram testadas (3, 10 e 50 mg/mL), e suas diluições foram realizadas em série no caldo Fava Netto. Os tubos foram agitados durante 72 horas e avaliados todos os dias da cultura (24, 48 e 72 horas) a viabilidade das células foi determinada pela coloração do corante vital Janus Green B. Após o período de 72 horas, a suspensão fúngica foi centrifugada a 1780 g (Centrifuge 5810R, Eppendorf, NY, EUA). Os pellets foram ressuspensos em 100 µL de PBS e dispersos em placas de Petri com o auxílio de um dispensador Drigalski estéril. O crescimento fúngico da placa foi permitido ao longo de um período de 12 dias, quando foi utilizado um marcador de pincel para quantificar as colônias. O meio de cultura utilizado neste procedimento foi ágar BHI (HiMedia Laboratories, Índia) suplementado com glicose a 1%, mistura de fator de crescimento a 30% produzida pelo próprio fungo e FBS a 10%, como descrito por Singer-Vermes et al. em 1992.

4.5.2 Efeito do Itraconazol “in vitro” sobre as culturas de *P. brasiliensis* e esplenócitos

Os animais saudáveis (6 animais) foram anestesiados com uma dose letal (0,5 ml de cloridrato de cetamina a 10% e solução de xilazina a 2%); e coletou o baço. As células do baço de 6 animais foram preparadas por maceração usando uma pinça em 5 mL de meio RPMI 1640 com L-glutamina (Sigma Aldrich, EUA) e depois isolada via centrifugação (500 x g). O sedimento de células foi incubado durante 4 min com tampão de lise de glóbulos

vermelhos (uma parte de 0,17 mol / L de Tris para nove partes de 0,16 mol/L de cloreto de amônio). As células foram novamente lavadas e ressuspensas a uma concentração de 2×10^6 células/mL em meio RPMI 1640 suplementado com 5% de soro bovino fetal e antibióticos (100 mg/mL de penicilina e 100mg/mL de estreptomicina). As células foram cultivadas em placas de fundo plano de 24 e 96 poços a 2×10^5 células/poço com meio durante 24, 48 e 72 horas a 37 °C em uma incubadora com CO₂ a 5%. Após, as células esplênicas foram tratadas com diferentes concentrações Itraconazol (3, 10 e 50 mg/mL) e células não tratadas. Em outra placa as células do baço foram infectadas com 10µl de isolado virulento do Pb18 e tratadas com as diferentes concentrações de Itraconazol (3,10 e 50 mg /mL), e como células controle apenas sem infecção. A viabilidade de células esplênicas tratadas com as diferentes concentrações de Itra e aquelas infectadas com Pb18 e não tratadas foram avaliadas por 24, 48 e 72 horas de incubação utilizando o corante azul de tripano. Também foi avaliada a viabilidade do fungo Pb18 expostos a células esplênicas e tratados com diferentes concentrações de Itraconazol utilizando o corante vital Janus Green B. Após 24, 48 e 72 h, a cultura de células foi utilizada para análise de citotoxicidade das diferentes concentrações de Itraconazol utilizando o ensaio colorimétrico de MTT (tetrazólio).

4.6 MODELO SUBCUTÂNEO DE “AIR POUCH”

Os animais foram infectados por via subcutânea “air pouch” e tratados com o fármaco Itraconazol (3, 10 e 50 mg/kg).

4.6.1 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em 8 grupos experimentais contendo 10 animais por grupo, sendo eles:

- Grupo 1: animais não irradiados infectados com Pb18,
- Grupo 2: animais não irradiados infectados com Pb18 e tratados com Itraconazol (3mg/Kg)
- Grupo 3: animais não irradiados inoculados com Pb18 e tratados com Itraconazol (10mg/Kg),
- Grupo 4: animais não irradiados inoculados com Pb18 e tratados com Itraconazol (50mg/Kg),
- Grupo 5: animais irradiados infectados com Pb18,
- Grupo 6: animais irradiados infectados com Pb18 e tratados com Itraconazol (3mg/Kg),

- Grupo 7: animais irradiados inoculados com Pb18 e tratados com Itraconazol (10mg/Kg),
- Grupo 8: animais irradiados inoculados com Pb18 e tratados com Itraconazol (50mg/Kg).

4.6.2 Preparação de suspensões de Pb para infecção dos camundongos

As células fúngicas foram lavadas com solução salina estéril a 0,9% e centrifugadas a 1300 G por três vezes, e foram utilizadas para preparar as suspensões para inoculações.

A viabilidade das células de Pb18 foi determinada pela coloração empregando o corante Janus Green B (BERLINER; RECA, 1966), para em seguida as suspensões terem a concentração ajustada para que contenham 5×10^6 células leveduriforme viáveis/ml (cél/ml) para a inoculação em bolsa subcutânea, após contagem em hemocitômetro.

4.6.2 Indução de bolsa “air pouch” subcutânea

A técnica “air pouch” subcutânea empregada consiste na indução de uma bolsa de ar produzida na região dorsal de camundongos por injeção subcutânea de 2 mL de ar estéril conforme descrito por Meloni-Bruneri et al. (1996). Após formação da bolsa de ar os animais foram inoculados com 0,1 mL da suspensão Pb18 ou salina previamente preparadas.

4.6.3 Irradiação dos animais com LASER

Os animais dos grupos 5, 6, 7 e 8 foram irradiados em dois pontos de cada pata traseira com laser infravermelho (Twin flex – MMO) a $35,5 \text{ J/cm}^2$ em um módulo de frequência contínua com comprimento de onda equivalente a 780 nm e com potência de 50 mW. Em cada ponto a irradiação teve a duração de 30 segundos com o objetivo de atingir a medula óssea, local em que ocorre o processo de formação das células sanguíneas incluindo os neutrófilos, localizada no osso fêmur. As irradiações foram feitas em dias alternados, e os animais sofreram a primeira irradiação no dia da infecção e a última no dia da coleta no oitavo dia.

4.6.4 Tratamento com Itraconazol

Os animais dos grupos 3, 4, 5, 6, 7 e 8 foram tratados com concentrações de Itraconazol (3, 10 e 50 mg/kg). Estes animais foram tratados por injeção de 100µl diretamente na “air pouch” da dosagem de Itraconazol de seus respectivos grupos

experimentais. O tratamento foi realizado nos últimos 3 dias de infecção pela via subcutânea, com o objetivo dessa “air pouch” de formar tendo o afluxo de células para o local da infecção, e posteriormente a esse afluxo essas células serem tratadas pelo antifúngico.

4.6.5 Obtenção e cultivo de células de “air pouch”

As células foram coletadas após 8 dias da inoculação dos camundongos. Os animais foram anestesiados com uma dose de 0,5 mL da solução de cloridrato de cetamina a 10% e cloridrato de xilasina a 2%, preparadas na proporção de 1:1, considerada como uma dose excessiva, o que levou os animais a óbito. Após foi realizada uma incisão da pele e com o auxílio de uma pipeta estéril de vidro, as células foram coletas e transferidas para um homogeneizador de vidro estéril, foram separadas por maceração e depois as células foram transferidas e armazenadas em tubos Falcon contendo um volume conhecido de RPMI suplemento com 10% de soro fetal bovino (SBF) e mantidas refrigeradas. Posteriormente, as células foram quantificadas em hemocítômetro e a viabilidade foi analisada com o corante Trypan blue a 0,2 e a suspensão de PMN foi ajustada para a concentração para 10^6 células/mL.

Os PMN colhidos a partir de camundongos infectados, tiveram sua concentração ajustada para 1×10^6 células/mL e foram cultivados em placas de 6 ou 12 poços. As placas foram incubadas em estufa a 5% de CO₂ (VWR S/P Sheldon MFG, INC) a 37° C por 2, 6 e 18 horas. Após os tempos de incubação descritos, as células foram centrifugadas a 1780g. Os sedimentos foram semeados em placas para contagem de unidades formadoras de colônia (CFU) e também armazenados a -20°C para determinação da concentração de proteínas totais e óxido nítrico, e os sobrenadantes dessas células foram armazenados em -80°C para determinação das citocinas propostas.

4.6.6 Quantificação de *P. brasiliensis* viáveis

Após a incubação da placa de cultura de células em estufa a 5% de CO₂ (VWR S/P by Sheldon MFG, INC) a 37° C por 2 horas para PMN, as células foram centrifugadas a 1780g e os sedimentos serão coletados e semeados em placas para contagem de unidades formadoras de colônia (CFU).

Estes sedimentos foram semeados em placa de Fava Netto suplementada com 30% de fator de crescimento e de 10% de soro fetal bovino por ser mais eficiente para o

crescimento do Pb18 (MENDES et al., 1994). Foram semeados cem microlitros das suspensões celulares de cada um dos subgrupos, nas placas contendo o meio Fava Netto e espalhadas com auxílio da alça de Drigalski (FAVA NETTO, 1955). Esse experimento foi realizado em triplicata, e o crescimento das colônias foi acompanhado e quantificados por um período de 15 dias.

5.6.7 Quantificação de proteínas totais

A quantificação das proteínas dos sedimentos armazenados foi realizada pelo método do ácido bicinconínico (BCA) (Sigma). Estes ensaios foram realizados em triplicata e a leitura das densidades ópticas foram medidas em micro leitor de ELISA (Anthos Zenyth 200 rt) em comprimento de onda de 560 nm. Os resultados foram expressos em µg de proteína/mL, comparando-se a densidade ótica com uma curva padrão contendo concentrações conhecidas de proteína sérica bovina (BSA). Todas as amostras foram analisadas em triplicatas.

4.6.8 Quantificação dos metabólitos do oxigênio

A quantificação das EROs pelo método do luminol, se dá através da aplicação de ensaios de quimioluminescência (QL), que visa a quantificação da produção de EROs pelos PMN, sendo conhecido como metabolismo oxidativo. A captação da EROs ocorre pela determinação da emissão de luz integrada por segundos (BABIOR, 1984). No ensaio de luminol, as células foram ajustadas para a proporção 5×10^6 células PMN/mL. Foi pipetado em uma cubeta 135µL da suspensão de PMN e 30µL de luminol. A leitura foi realizada em luminômetro (Promega- Glomax 20/20 Luminometer) e a intensidade de QL foi medida durante 30 minutos.

4.6.9 Quantificação de óxido nítrico

As concentrações de oxido nítrico (NO) foram medidas nos sobrenadantes das culturas de células provenientes da infecção por “air pouch” e de órgãos provenientes da infecção intraperitoneal. Foram pipetados 100 µL dos sobrenadantes e 100 µL do reagente Griess em placas de 96 poços (todas as amostras foram feitas em triplicatas) e incubados à temperatura ambiente durante 10 minutos. A absorvância foi medida em leitor de ELISA

(Anthos Zenyth 200 rt) em comprimento de onda de 540 nm. Os resultados foram expressos em μM , pela conversão dos valores a partir de uma curva padrão realizada com nitrito de sódio nas concentrações de 100 a 78 μM para cada placa. O reagente de Griess foi preparado no momento da utilização, utilizando partes iguais da solução de A-sulfanilamida a 1% em H_3PO_4 a 2,5% e a solução de B-naftilenodiamina a 0,1% em água destilada.

4.6.10 Avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais (MTT)

Em uma placa de ELISA de 96 poços, foram pipetados 180 μL da suspensão de PMN na concentração de 10^6 cél/mL e 20 μL do reagente MTT a 20%. Todas as amostras foram pipetadas em triplicatas. As placas foram mantidas em estufa com 5% de CO_2 e temperatura de 37°C e após 4 horas, todo o sobrenadante foi retirado, deixando apenas o pellet no fundo de cada poço, que será utilizado para a análise, após adição de 200 μL de dimetilsulfóxido (DMSO/Vetec), e foi realizada a leitura da placa em leitor de ELISA a 540 nm.

4.6.11 Quantificação de citocinas

Os sobrenadantes das células coletadas foram armazenados à temperatura de -80°C, e estes foram utilizados para dosagem de citocinas que serão feitas através de kits de ELISA disponíveis comercialmente para TNF- α , INF- γ , GMSF, IL-4, IL-12, IL-10 e IL-17 realizados conforme instrução do fabricante (PEPROTECH/ ELISA Development Kit/ Manufacturer of Quality Cytokine Products).

A concentração das citocinas foram determinadas por testes de ELISA de captura, baseados na utilização de pares de anticorpos monoclonais específicos para cada citocina, um dos quais marcados por biotina. O uso dos complexos biotina-avidina e H_2O_2 -peroxidase permite a determinação da concentração da citocina presente através de medidas de densidade óptica. A sensibilização das placas de 96 poços foi feita com anticorpo de captura diluído colocado em cada orifício e as placas serão incubadas por no mínimo 18 horas. Após esse tempo os sítios livres foram bloqueados, e após a incubação pelo tempo adequado foram adicionadas os padrões com concentrações conhecidas de cada citocina, e também os sobrenadantes da cultura celular em triplicata. Após 2 horas foram adicionados os conjugados avidina-peroxidase. A placa foi incubada pelo tempo e na forma adequada e foram adicionados o substrato cromogênico, o ABTS. As placas foram mantidas ao abrigo

da luz e o desenvolvimento da cor foi monitorado até que a curva padrão consiga ser visualizada (aproximadamente 10 minutos). A cada adição de reagente mencionado acima, as placas foram lavadas por quatro vezes com PBS acrescido de 0,05% Tween 20. A leitura das densidades óticas foi realizada em leitor automático, a 405 nm de comprimento de onda.

As concentrações de cada citocina foram determinadas tendo como base a reta de regressão linear contínua obtida com os dados referentes às curvas-padrão. Os resultados foram expressos em picogramas por 100µL de sobrenadante de cultura celular.

4.6.12 Necrópsia, coleta de material e processamento histológico para microscopia das “air pouch”

Ao final do período de tratamento os animais foram eutanasiados e coletadas as “air pouch” dos animais infectados pela via subcutânea.

Após, a coleta as “air pouch” dos animais foram pesadas, e medidas o volume e diâmetro destas. As “air pouch” foram fixados em solução de paraformaldeído tamponado a 10% por 48 horas. Após a fixação os fragmentos foram desidratados, diafanizados e incluídos em parafina. Posteriormente, foram obtidos cortes teciduais de 5 µm de espessura montados em lâmina previamente cobertas com poli-lisina para avaliação histológica. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para análise histológica geral e impregnação pela prata de Grocott será utilizada para identificação fúngica (morfologia e presença de brotamentos). Os cortes foram visualizados em microscópio de luz convencional, imagens digitais foram realizadas em câmera fotográfica acoplada ao microscópio de luz convencional.

4.6.13 Análise histopatológica das “air pouch”

Para avaliação dos efeitos dos tratamentos com diferentes concentrações do Itraconazol e o perfil de cura dos animais infectados pelo *P. brasiliensis*, foi coletado a bolsa “air pouch” dos animais infectados pela via subcutânea dos grupos já pré descritos, para avaliação a inflamação e perfil histopatológico em cada tratamento.

Os cortes histológicos corados com HE e por impregnação pela prata foram analisados para avaliação da área de lesão presentes nos tecidos e presença de células fúngicas de Pb18; evidencia de necrose; padrão de organização e a distribuição de células do parênquima e estroma conjuntivo, morfologia e distribuição de células do interstício e

vasos, neovasos, fibrócitos e fibroblastos. Por fim, foi investigado foco de processo inflamatório e áreas de fibrose. Análise semi-quantitativa foi realizada para calcular a área real no campo de observação ocupada por lesão e que contém o fungo. Foi empregada uma ocular com retículo de contagem e um aumento total de 125x (objetiva de 10x e ocular de 12,5x). Os resultados foram expressos como média das análises semi-quantitativas e observados 10 campos por μm^2 (NOVAES et al., 2013).

A intensidade do processo inflamatório e presença do fungo Pb18 nas “air pouch” foram investigados pelo método estereológico por meio da contagem do número de células no interstício. Para isso, foi utilizada a fórmula: $QA_{\text{inf}}/\text{presença do fungo} = \Sigma_{\text{inf}}/\text{presença do fungo}/At$, em que $\Sigma_{\text{inf}}/\text{presença do fungo}$ representa somatório do número de perfis de núcleos de células do interstício (inflamatórias [inf]) ou presença do fungo Pb18 e At corresponde a dimensão da área de teste usada ($25 \times 10^3 \mu\text{m}^2$). Os parâmetros foram avaliados em 10 campos histológicos aleatórios por animal utilizando objetiva de 40x numa área total de $12,9 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ para cada grupo. Todas as análises estereológicas foram realizadas utilizando o software de análise de imagens Image ProPlus 4.5 (NOVAES et al., 2013).

4.6.14 Quantificação de unidades formadoras de colônias nas “air pouch”

Após a coleta de células das “air pouch”, estas foram separadas em tubos Falcon e mantidas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF) foram e foram centrifugas por 10 minutos 1780 g (Centrifuge 5810R, Eppendorf, NY, EUA). Os pellets foram ressuspensos em 100 μL de PBS e dispersos em placas de Petri com o auxílio de um dispensador Drigalski estéril. O crescimento fúngico da placa foi permitido ao longo de um período de 12 dias, quando foi utilizado um marcador de pincel para quantificar as colônias. O meio de cultura utilizado neste procedimento foi ágar BHI (HiMedia Laboratories, Índia) suplementado com glicose a 1%, mistura de fator de crescimento a 30% produzida pelo próprio fungo e FBS a 10%, como descrito por Singer-Vermes et al. em 1992.

4.7 MODELO INTRAPERITONEAL

Os animais foram infectados por via intraperitoneal com suspensão fúngica de *P. brasiliensis* (Pb18) e tratados com antifúngico Itraconazol na concentração de 50mg/kg.

4.7.1 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais contendo 10 animais por grupo, sendo eles:

- Grupo 1: animais não infectados,
- Grupo 2: animais infectados,
- Grupo 3: animais infectados e tratados com Itra 50mg/kg.

4.6.2 Preparação de suspensão de Pb e infecção dos camundongos

As células fúngicas foram lavadas com solução salina estéril a 0,9% e centrifugadas a 1300 G por três vezes, e serão utilizadas para preparar as suspensões para inoculações. A viabilidade das células de Pb18 foi determinada pela coloração empregando o corante Janus Green B (BERLINER; RECA, 1966), para em seguida as suspensões terem a concentração ajustada para que contenham 5×10^6 células leveduriformes viáveis/ml (cél/mL) para a infecção intraperitoneal após contagem em hemocitômetro. Foi feita a infecção dos camundongos por via intraperitoneal com 500µl da suspensão fúngicas à 5×10^6 (cél/mL).

4.7.3 Tratamento com Itraconazol

Os animais do grupo 3 foram tratados 3 vezes por semana com Itraconazol na concentração de 50mg/kg por via oral (gavagem). Os animais receberam o tratamento em dias alternados, durante a semana.

O fármaco foi diluído em PBS na concentração de 50mg/Kg de animal, onde cada dosagem foi ajustada conforme o peso do animal, sendo administrado 200µl por via oral em cada animal do medicamento.

4.7.4 Sobrevida e peso

Os animais foram pesados durante os 120 dias de infecção. Sendo pesados no dia da infecção e nos dias 15, 30, 60, 90 e 120 dias. Foi feita a curva de ganho de peso desses animais.

Decorrente os 120 dias foi analisada a sobrevida desses animais, sendo anotados os dias de morte de cada animal mantido pelos 120 dias de infecção.

4.7.5 ELISA de IgG total para *P. brasiliensis*

Os animais mantidos por 120 dias de infecção foram submetidos a coleta de sangue nos dias 15, 30, 60, 90 e 120 dias de infecção. Foi separado o soro desses animais e estes utilizados para dosagem de IgG total, conforme descrito abaixo:

A técnica de ELISA foi realizada da seguinte forma. Placas de poliestireno de 96 poços foram sensibilizadas com antígeno (extrato de Pb18- cepa virulenta/ Pb18) na concentração de 5µg/mL de proteína em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M pH 9,6. A placa foi então mantida durante a noite a 4 °C. Posteriormente, a placa foi lavada com solução de NaCl 0,9% e bloqueada com 200 µL por poço com solução de leite em pó desnatado a 5% em PBS-TWEEN a 37°C por uma hora. A placa foi lavada novamente com solução de NaCl a 0,9% e a diluição dos soros (1/200) em PBS-TWEEN com 3% de gelatina foram adicionadas aos respectivos poços. A placa foi então incubada durante uma hora a 37°C e após este tempo, a placa foi lavada com solução de NaCl a 0,9% e incubada com 100 µL por poço do conjugado de soro IgG de cabra anti-mouse marcado com peroxidase (SIGMA-ALDRICH) a uma diluição de 1: 8000 em PBS-TWEEN contendo 3% de gelatina durante uma hora a 37 ° C. A placa foi lavada com solução de NaCl a 0,9%. Em cada poço foram adicionados 100 µL de substrato o-fenilenodiamina (OPD) (SIGMA-ALDRICH) (20 mg OPD, 40 mL de tampão citrato 0,1M pH 4,5 e 40 µL de H₂O₂ 30%) e deixados em repouso por dez minutos à ausência de luz. A reação foi então interrompida pela adição de 30 µL de H₂SO₄ 2N por poço. A leitura da placa foi realizada por densidade óptica usando o comprimento de onda de 490 nm em um leitor de placas (ZENITH).

4.7.6 Teste de hipersensibilidade tardia à paracoccidiodina

Animais infectados por via intraperitoneal foram mantidos em tratamento por 120 dias, desta forma nos dias 15, 30, 60, 90 e 120 dias foram realizados testes cutâneos de hipersensibilidade do tipo tardia a paracoccidiodina nesses animais. Animais não infectados foram utilizados como controle do teste, sendo o teste realizado em animais infectados e animais infectados e tratados com 50mg/kg de Itra. O teste foi realizado por meio de uma injeção nas patas traseiras dos animais, onde na pata direita foi realizada a injeção de 1µL de PBS (controle) e na pata esquerda foi realizada a injeção de 1µL da paracoccidiodina (substância proteica do *P. brasiliensis*), após 48h foi medido a reatividade a

paracoccidioidina nas patas dos animais, sendo a para direita utilizada como controle da medida à reatividade.

4.7.7 Necrópsia, coleta de material e processamento histológico para microscopia dos órgãos

Ao final do período de tratamento os animais foram anestesiados com uma dose de 0,5 mL da solução de cloridrato de cetamina a 10% e cloridrato de xilasina a 2%, preparadas na proporção de 1:1, e exsanguinados pelo plexo retro-orbital e por fim foi realizado o deslocamento cervical desses animais. Foram coletados os órgãos (baço, epíplon, pulmão e fígado) dos animais infectados por via intraperitoneal. Após, a coleta os órgãos dos animais foram pesados, e medidos o diâmetro destes. Foram seccionados, sendo que, uma parte foi macerada com auxílio de macerador de vidro, e este macerado foi centrifugado à 1780g e o sobrenadante foi armazenado a -80°C para posteriormente ser feita a dosagem de proteínas totais, NO e citocinas.

Os epíplons dos animais foram fixados em solução de paraformaldeído tamponado a 10% por 48 horas. Após a fixação os fragmentos foram desidratados, diafanizados e incluídos em parafina. Posteriormente, foram obtidos cortes teciduais de 5 µm de espessura montados em lâmina previamente cobertas com poli-lisina para avaliação histológica. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para análise histológica geral e impregnação pela prata de Grocott foi utilizada para identificação fúngica (morfologia e presença de brotamentos). Os cortes foram visualizados em microscópio de luz convencional, imagens digitais foram realizadas em câmera fotográfica acoplada ao microscópio de luz convencional.

4.7.8 Quantificação de proteínas totais em órgãos

Foi realizada a dosagem de proteínas totais em sobrenadantes de órgão (baço, epíplon, pulmão e fígado) dos animais infectados por via intraperitoneal.

A quantificação das proteínas dos sedimentos armazenados foi realizada pelo método do ácido bicinonínico (BCA) (Sigma). Estes ensaios foram realizados em triplicata e a leitura das densidades ópticas foram medidas em micro leitor de ELISA (Anthos Zenyth 200 rt) em comprimento de onda de 560 nm. Os resultados foram expressos em µg de proteína/mL, comparando-se a densidade ótica com uma curva padrão contendo

concentrações conhecidas de proteína sérica bovina (BSA). Todas as amostras foram analisadas em triplicatas.

4.7.9 Quantificação de óxido nítrico em órgãos

Foi realizada a dosagem de óxido nítrico em sobrenadantes de órgão (baço, epíplon, pulmão e fígado) dos animais infectados por via intraperitoneal.

As concentrações de óxido nítrico (NO) foram medidas nos sobrenadantes das culturas de células provenientes da infecção por “air pouch” e de órgãos provenientes da infecção intraperitoneal. Foram pipetados 100 μ L dos sobrenadantes e 100 μ L do reagente Griess em placas de 96 poços (todas as amostras foram feitas em triplicatas) e incubados à temperatura ambiente durante 10 minutos. A absorvância foi medida em leitor de ELISA (Anthos Zenyth 200 rt) em comprimento de onda de 540 nm. Os resultados foram expressos em μ M, pela conversão dos valores a partir de uma curva padrão realizada com nitrito de sódio nas concentrações de 100 a 78 μ M para cada placa. O reagente de Griess foi preparado no momento da utilização, utilizando partes iguais da solução de A-sulfanilamida a 1% em H₃PO₄ a 2,5% e a solução de B-naftilenodiamina a 0,1% em água destilada.

4.7.10 Quantificação de citocinas em órgãos

Os sobrenadantes dos órgãos coletados foram armazenados à temperatura de -80°C, e estes foram utilizados para dosagem de citocinas que foram feitas através de kits de ELISA disponíveis comercialmente para GMSF, IL-4, IL-12, e IL-17 realizados conforme instrução do fabricante (PEPROTECH/ ELISA Development Kit/ Manufacturer of Quality Cytokine Products).

A concentração das citocinas foram determinadas por testes de ELISA de captura, baseados na utilização de pares de anticorpos monoclonais específicos para cada citocina, um dos quais marcados por biotina. O uso dos complexos biotina-avidina e H₂O₂-peroxidase permite a determinação da concentração da citocina presente através de medidas de densidade óptica. A sensibilização das placas de 96 poços foi feita com anticorpo de captura diluído colocado em cada orifício e as placas serão incubadas por no mínimo 18 horas. Após esse tempo os sítios livres foram bloqueados, e após a incubação pelo tempo adequado foram adicionadas os padrões com concentrações conhecidas de cada citocina, e também os sobrenadantes da cultura celular em triplicata. Após 2 horas foram adicionados

os conjugados avidina-peroxidase. A placa foi incubada pelo tempo e na forma adequada e foram adicionados o substrato cromogênico, o ABTS (SIGMA-ALDRICH). As placas foram mantidas ao abrigo da luz e o desenvolvimento da cor foi monitorado até que a curva padrão consiga ser visualizada (aproximadamente 10 minutos). A cada adição de reagente mencionado acima, as placas foram lavadas por quatro vezes com PBS acrescido de 0,05% Tween 20. A leitura das densidades óticas foi realizada em leitor automático, a 405 nm de comprimento de onda.

As concentrações de cada citocina foram determinadas tendo como base a reta de regressão linear contínua obtida com os dados referentes às curvas-padrão. Os resultados foram expressos em picogramas por 100µL de proteínas.

4.7.11 Análise histopatológica do epíplon

Para avaliação dos efeitos dos tratamentos com diferentes concentrações do Itraconazol e o perfil de cura dos animais infectados pelo *P. brasiliensis*, foi coletado o epíplon, (órgão de coque) dos animais infectados por via intraperitoneal para avaliação a inflamação e perfil histopatológico em cada tratamento.

Os cortes histológicos foram corados com HE e por impregnação pela prata e foram analisados para avaliação da área de lesão presentes nos tecidos e presença de células fúngicas de Pb18, e foi investigado foco de processo inflamatório.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão. A variância dos dados foi avaliada por meio de análise One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey e o teste Two-way ANOVA, seguido pelo pós teste de Tukey, e a análise para comparações múltiplas. Os resultados com valor de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos (NISHIKAKU et al. 2009).

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos no presente estudo foram descritos em tópicos sendo eles resultados “in vitro”, resultados em modelo subcutâneo de “air pouch”, somente com Itra e associação dos tratamentos (Itra + LLLT), respectivamente, e por fim os resultados obtidos pelo modelo intraperitoneal.

5.1 RESULTADOS ‘IN VITRO’

Para análise da eficiência do fármaco Itraconazol como potencial antifúngico contra *P. brasiliensis* foram feitos teste “in vitro” com as diferentes concentrações a serem utilizadas no presente estudo. O Itraconazol utilizado (I6657 Sigma Itraconazole $\geq 98\%$ (TLC) Synonym: Oriconazole, R51211, Sporanox), foi diluído nas concentrações de 3mg/mL, 10mg/ mL e 50mg/ mL, e foram realizados experimentos de análise da concentração inibitória mínima e índice de toxicidade das diferentes concentrações do Itraconazol.

5.1.1 Concentração inibitória mínima

Para o experimento do teste de concentração inibitória mínima o fungo foi cultivado em meio Fava Netto e incubadas com Itraconazol nas 3 concentrações de 3mg/mL, 10mg/ mL e 50mg/ mL.

Com base nesse experimento podemos avaliar a atividade antifúngica do Itraconazol nas concentrações testadas no presente estudo. Desta forma na Figura 7A observa-se o número absoluto de Pb viáveis após 24, 48 e 72 horas cultivadas com o Itra nas 3 concentrações testadas, sendo que a droga na concentração de 50mg/ mL se mostra mais efetiva no combate ao fungo. O uso do antifúngico na dosagem de 50mg/mL ele é mais efetivo ao combate ao fungo do que as demais concentrações. Com base nos resultados de Unidades formadoras de colônia (FIGURA 7B e 8), *P. brasiliensis* cultivado com as diferentes concentrações de Itra possuem menores quantidades de CFU.

Desta forma mostramos que o Itraconazol é efetivo no combate ao fungo e que a dose mais efetiva é a de 50mg/mL.

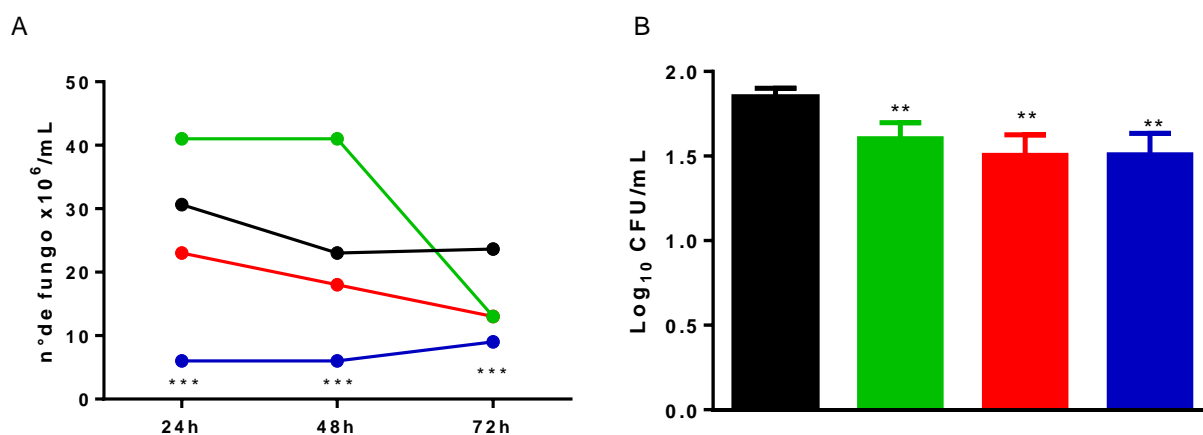


Figura 7- Efeito das concentrações de Itraconazol sobre cultura de *P. brasiliensis*. (A) Número absoluto de células fúngicas viáveis tratadas com diferentes concentrações de Itra, (B) Unidades formadoras de colônias (CFU) de Pb18 após 72 horas nas concentrações de 3, 10 e 50 mg/Kg de Itra. Notas: Em preto somente Pb18, em verde Pb18+ Itra 3mg/Kg, em vermelho Pb18+Itra 10mg/Kg e em azul Pb18+ Itra 50mg/Kg. Os resultados de todos os grupos foram expressos em média \pm desvio padrão. (A) Teste Two-way ANOVA pós teste de Tukey, (B) Teste One-way ANOVA pós teste de Tukey. Significância de $p < 0,001$ (***), $p < 0,05$ (**) entre Pb18 e Itra de 3, 10 e 50 mg/Kg).

Fonte: do autor

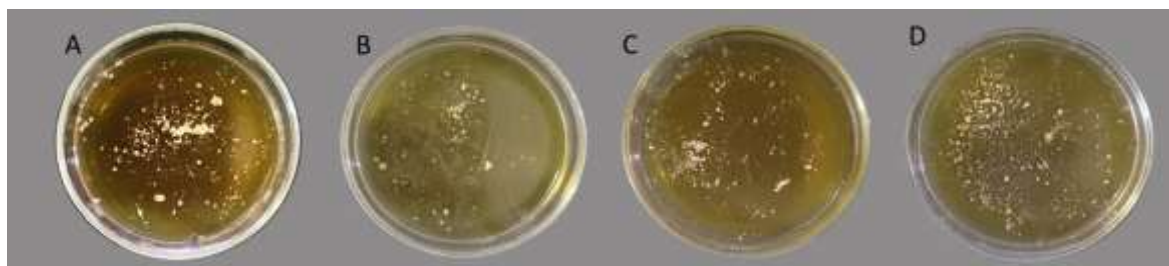


Figura 8- Foto do cultivo de Unidades formadoras de Colônia de *P. brasiliensis* após 72h de exposição ao antifúngico Itraconazol. (A) Somente Pb18, (B) Pb18 + Itra 50mg/Kg, (C) Pb18 + Itra 10mg/Kg e (D) Pb18 + Itra 3mg/Kg.

Fonte: do autor

5.1.2 Toxicidade do Itraconazol

Para avaliação a toxicidade do Itraconazol, foi feita cultura de células de baço (esplenócitos) de camundongos saudáveis e estas foram cultivadas na presença de Itra nas concentrações de 3mg/mL, 10mg/mL e 50mg/mL. A Figura 3 mostram o número absoluto de células com as 3 concentrações de Itra, assim como o índice de toxicidade, mostrando que o Itra mesmo na concentração de 50mg/mL não se mostra tóxico para as células. Sendo que os esplenócitos cultivados com as diferentes concentrações do Itraconazol não afetou a

quantidade de células nos tempos de 14, 48 e 72 horas, sendo que temos mais células viáveis quando em contato com o antifúngico em comparação ao controle (somente células) (FIGURA 9A).

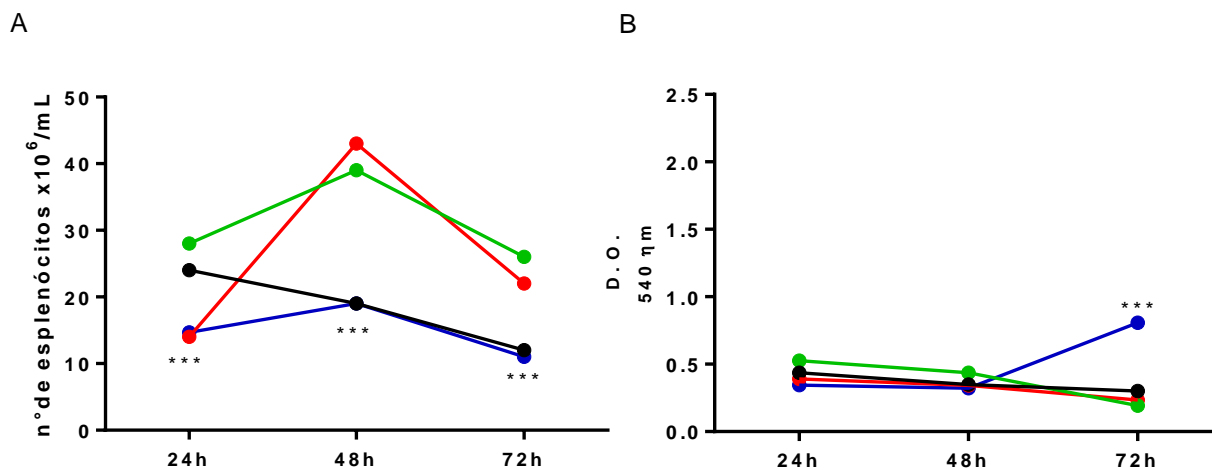


Figura 9- Efeito das concentrações do Itraconazol sobre culturas de esplenócitos. (A) Número absoluto de células, (B) Atividade mitocondrial de esplenócitos cultivados com 24, 48 e 72 horas, com as concentrações de Itra.

Notas: Em preto somente esplenócitos, em verde esplenócitos + Itra 3mg/Kg, em vermelho esplenócitos + Itra 10mg/Kg e em azul esplenócitos + Itra 50mg/Kg. Os resultados de todos os grupos foram expressos em média \pm desvio padrão. Teste Two-way ANOVA pós teste de Tukey, significância de $p < 0,001$ (***), entre somente esplenócitos e esplenócitos + Itra de 3, 10 e 50 mg/Kg).

Fonte: do autor

Além do índice de toxicidade das concentrações de Itra, foi realizado a análise da atividade mitocondrial dos esplenócitos cultivados juntamente com o Itra, como mostrado no gráfico o uso do antifúngico não alterou a atividade das células, sendo que Itra na concentração de 50mg/mL mostrou ter papel de aumentar a atividade celular dos esplenócitos as células a 72 horas, o que pode sugerir um mecanismo compensatório, onde mesmo com menos células elas se mostram mais ativas (FIGURA 9B).

Os esplenócitos também foram cultivados com fungo Pb18. Foi quantificado o número absoluto de fungos viáveis. Desta forma podemos perceber que quando o fungo é somente exposto em contato com os esplenócitos é possível verificar seu crescimento conforme a passagem das horas. Quando exposto a células juntamente com o antifúngico o número de fungos viáveis é menor, sendo que, na concentração de 50mg/mL temos menos fungo viáveis, mostrando que a concentração mais elevada possui maior atividade fungicida contra o fungo em comparação com as demais concentrações (FIGURA 10).

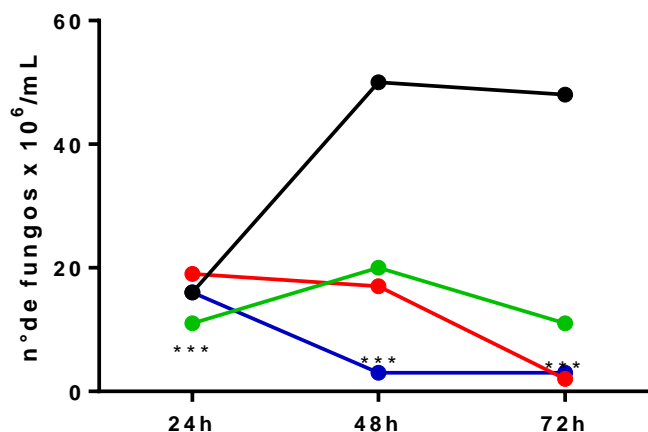


Figura 10- Efeito das concentrações de Itraconazol sobre esplenócitos e *P. brasiliensis*. Número absoluto de células fúngicas cultivados com esplenócitos e concentrações de Itraconazol com 24, 48 e 72 horas.

Notas: Em preto somente esplenócitos + Pb18, em verde esplenócitos + Pb18 + Itra 3mg/Kg, em vermelho esplenócitos + Pb18 + Itra 10mg/Kg e azul esplenócitos + Pb18 + Itra 50mg/Kg. Os resultados de todos os grupos foram expressos em média \pm desvio padrão. Teste Two-way ANOVA pós teste de Tukey, significância de $p < 0,001$ (***) , $p < 0,05$ (*) entre Pb18 e Itra de 3, 10 e 50 mg/Kg).

Fonte: do autor

5.1.3 Conclusões a respeito dos resultados “in vitro”

A partir dos resultados “in vitro” apresentados nos itens 6.1, 6.1.1 e 6.1.2 concluímos que o Itraconazol possui ação antifúngica eficaz contra *P. brasiliensis*.

Nas concentrações de Itra testadas (3, 10 e 50mg/mL) ele não apresenta toxicidade celular, tendo em vista que esplenócitos não tiveram sua viabilidade alterada em contato com o antifúngico em nenhuma das concentrações da droga utilizadas. O antifúngico tem ação microbicida matando o fungo, isto é provado pelo experimento da Figura 10, em que o fungo é colocado em contato com esplenócitos e as concentrações de Itraconazol, e dessa forma pode se notar que quando temos somente células, o fungo se encontra mais viável em comparação quando temos o contato do fungo e células em contato com a droga, ainda se conclui que a concentração de 50mg/mL possui maior ação fungicida e não se mostra tóxica para as células.

5.2 RESULTADOS EM MODELO SUBCUTÂNEO “AIR POUCH” COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ANTIFÚNGICO ITRACONAZOL

Foi realizada a infecção com *P. brasiliensis* de forma subcutânea por via “air pouch” dos grupos:

- Grupo 1: animais não irradiados infectados com Pb18,
- Grupo 2: animais não irradiados infectados com Pb18 e tratados com Itraconazol (3mg/Kg)
- Grupo 3: animais não irradiados inoculados com Pb18 e tratados com Itraconazol (10mg/Kg),
- Grupo 4: animais não irradiados inoculados com Pb 18 e tratados com Itraconazol (50mg/Kg).

Na Figura 11A foi demonstrado a indução da “air pouch”, onde foi injetado na bolsa salina estéril como controle, desta forma fica evidente que não temos a formação de “air pouch” no local, onde não temos afluxo de células inflamatórias para o local da inoculação. Diferentemente na Figura 11B, quando temos a indução da “air pouch” com a infecção subcutânea com a forma virulenta do *P. brasiliensis* (Pb18), onde mostramos um afluxo grande de células inflamatórias. Sendo assim nosso controle passou a ser a infecção com Pb18, pois a indução de uma infecção subcutânea com inoculo não infeccioso não gera inflamação no local, impossibilitando a coleta e análise do material, sendo assim prosseguimos nossos experimentos somente com grupos infectados com Pb18 tratados ou não com Itraconazol e suas respectivas concentrações.

A



B



Figura 11- Aspecto interno da infecção subcutânea pelo *P. brasiliensis*. (A) Animais inoculados com salina estéril (controle) e (B) animais infectados com Pb18 (formação da “air pouch”).

Fonte: do autor

Foram realizadas também análises macroscópicas da “air pouch” de animais somente infectados e de animais infectados e tratados com as 3 concentrações de Itra. As

“air pouch” foram retiradas após óbito do animal, sendo que para estas análises macroscópicas foram medidos diâmetro, volume e peso das “air pouch”, na Figura 12, podemos mostrar que as bolsas dos animais tratados com 50mg/Kg são menores em peso, diâmetro e volume em comparação com os demais grupos.

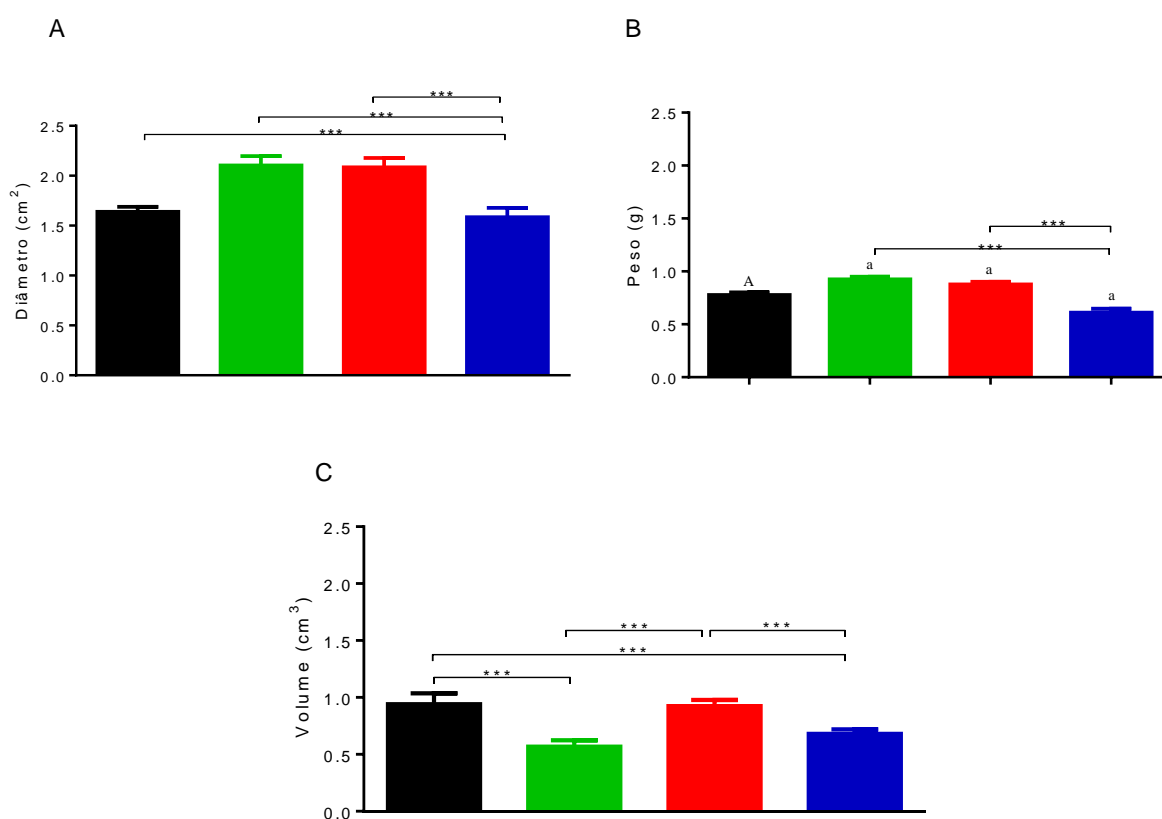


Figura 12- Efeito do Itraconazol em modelo de infecção subcutânea por *P. brasiliensis* sobre aspecto macroscópico da “air pouch”. (A) Diâmetro da “air pouch”, (B) Peso da “air pouch” e (C) Volume da “air pouch”.

Notas: Em preto animais somente infectados com Pb18, em verde animais infectados com Pb18+ Itra 3mg/Kg, em vermelho animais infectados com Pb18 + Itra 10mg/Kg e em azul animais infectados com Pb18 + Itra 50mg/Kg. Significância de $p < 0,001$ (***) diferença significativa entre grupos tratados e não tratados (A/a) ($p < 0,05$). Os resultados de todos os grupos foram expressos em média \pm desvio padrão. Teste One-way ANOVA pós teste de Tukey.

Fonte: do autor

As células foram coletadas das “air pouch” dos grupos descritos acima e partir disso foi feita a contagem absoluta de número de células das bolsas dos animais somente infectados com Pb18 e de animais tratados com a 3 concentrações de Itra, onde na Figura 13 A, mostra que fluxo de células no local da infecção é menor quando tratado com o Itra nas

3 concentrações, sendo que animais tratados com 50mg/Kg possui menos células em comparação com as demais concentrações.

Dados de contagem diferencial (FIGURA 13 B), mostram que a maioria das células obtidas pela infecção subcutânea são neutrófilos. O perfil celular muda conforme o uso do tratamento com antifúngico, tendo um aumento da população de linfócitos.

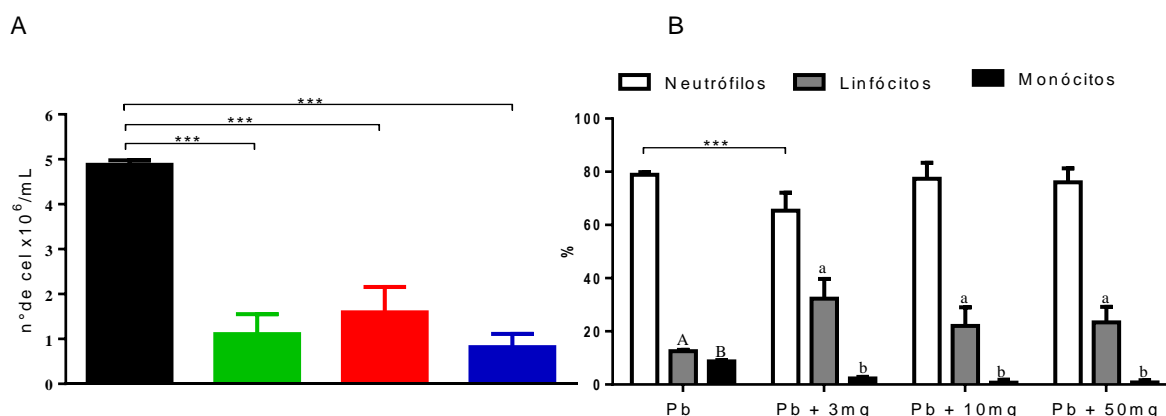


Figura 13- Efeito do Itraconazol em modelo de infecção subcutânea por *P. brasiliensis* (Pb18) sobre (A) número absoluto de células, (B) número relativo de células.

Notas: Em preto animais somente infectados com Pb18, em verde animais infectados com Pb18+ Itra 3mg/Kg, em vermelho animais infectados com Pb18 + Itra 10mg/Kg e em azul animais infectados com Pb18 + Itra 50mg/Kg. Significância de $p < 0,001$ (***) , diferença significativa entre grupos (A/a) (B/b) ($p < 0,05$). Os resultados de todos os grupos foram expressos em média \pm desvio padrão. Teste One-way ANOVA pós teste de Tukey.

Fonte: do autor

A Figura 14 mostra a morfologia das células encontradas nas “air pouch” após coleta de células das infecções subcutâneas tratadas e não tratadas, onde nota-se a presença de neutrófilos, monócitos e linfócitos.

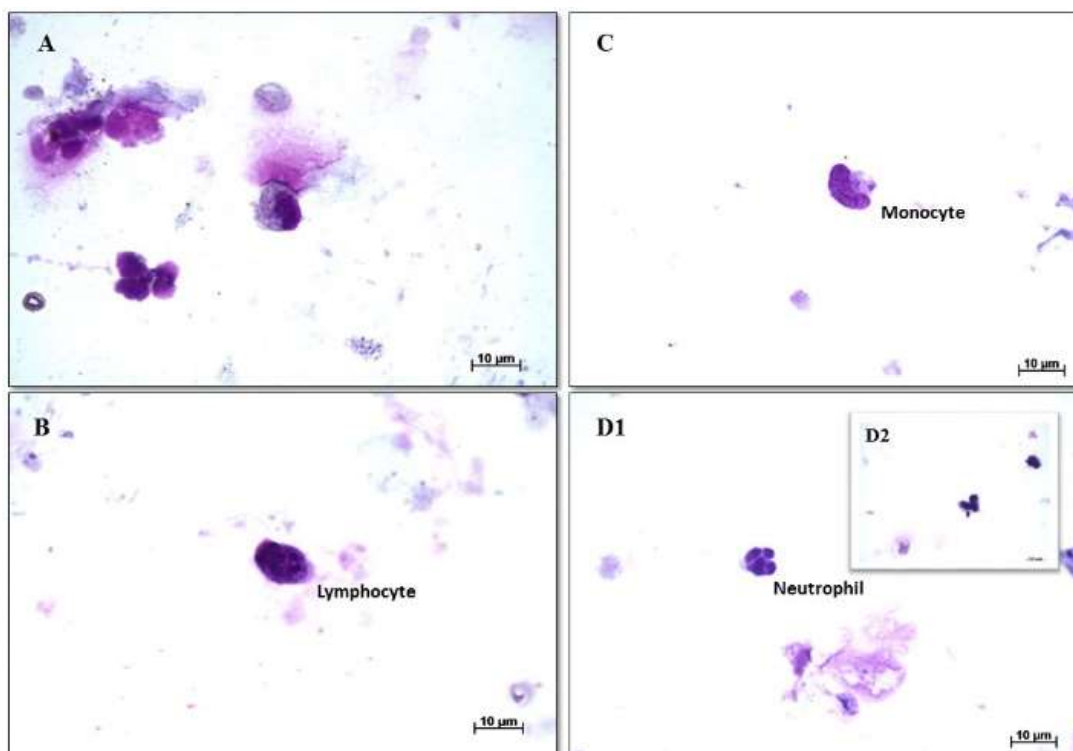


Figura 14- Morfologia das células obtidas após infecção subcutânea com *P. brasiliensis*. (A) Aspecto geral das células obtidas da “air pouch”, (B) presença de linfócito, (C) presença de monócito, (D1) presença de neutrófilo e (D2) presença de neutrófilo e monócito.

Notas: Coloração utilizada May Grunwald Giemsa, todas as fotomicrografias foram obtidas em objetiva de 100x em microscopia de campo claro.

Fonte: do autor

Com relação à viabilidade celular dados da Figura 15A, as células das “air pouch” mostram-se viáveis em todas as concentrações, sendo a viabilidade celular sempre superior a 80%, mostrando que o tratamento com antifúngico não se torna tóxico. As células dos animais tratados com a concentração de 50mg/Kg estão mais viáveis em comparação aos animais somente infectados e animais tratados com a menor dose de Itra. A atividade mitocondrial das células mostra que o uso de Itra em todas as concentrações diminuem a atividade das células, e quando Itra é utilizado na maior concentração essa atividade é mais reduzida em comparação as concentrações de 3mg e 10mg/Kg, mostrando uma possível ação do antifúngico, possibilitando uma menor ativação das células do sistema imune contra Pb18 (FIGURA 15 B).

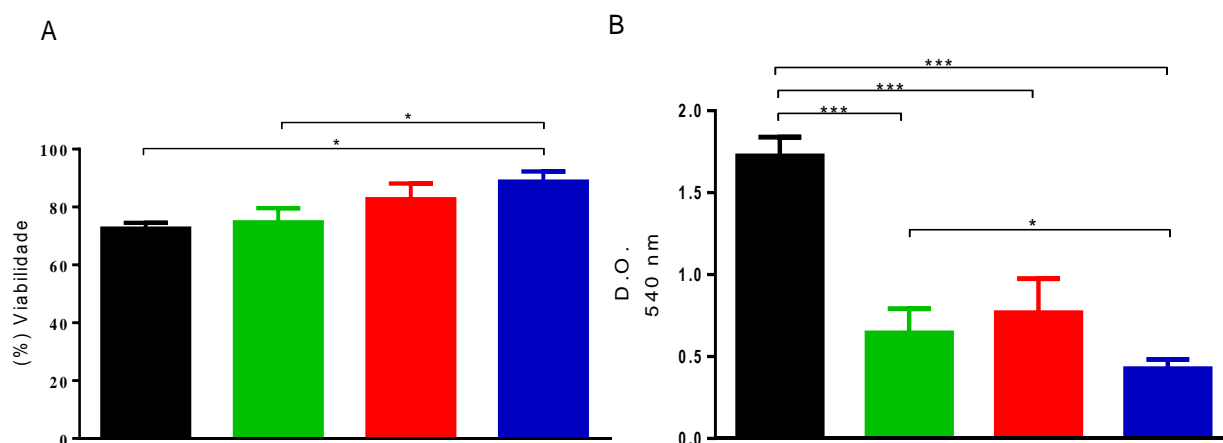


Figura 15- Efeito do Itraconazol em modelo de infecção subcutânea por *P. brasiliensis* sobre atividade celular, (A) Viabilidade celular e (B) Atividade mitocondrial.

Notas: Em preto animais somente infectados com Pb18, em verde animais infectados com Pb18+ Itra 3mg/Kg, em vermelho animais infectados com Pb18 + Itra 10mg/Kg e em azul animais infectados com Pb18 + Itra 50mg/Kg. Significância de $p < 0,001$ (***) , $p < 0,01$ (*) e diferença significativa entre grupos tratados e não tratados (A/a) ($p < 0,05$). Os resultados de todos os grupos foram expressos em média \pm desvio padrão. Teste One-way ANOVA pós teste de Tukey.

Fonte: do autor

A produção de metabólitos do oxigênio EROs e do nitrogênio (NO) mostram a ativação de PMNs para combate ao fungo. A liberação de NO não é alterada em comparação aos animais não tratados e tratados com as concentrações de 10 e 50mg/Kg, na concentração de 3mg/Kg tivemos uma diminuição da produção de NO, em que está possui diferença significativa entre os tratamentos de 10 e 50mg/Kg (FIGURA 16A).

Com relação a produção de EROs podemos perceber que nos animais não tratados essa produção é bem baixa em comparação a quando tratados com o Itra, as concentrações do antifúngico aumentam a produção de EROs, principalmente na concentração intermediária, e cai a produção na concentração mais alta. Tais resultados podem ser explicados pelo fato de que a dose baixa ativa a produção de EROs, mais a dose intermediária ativa mais ainda, e na dose alta a ativação de EROs não é tão necessária, pois provavelmente já conseguiu lisar Pb18 de forma mais efetiva (FIGURA 16B).

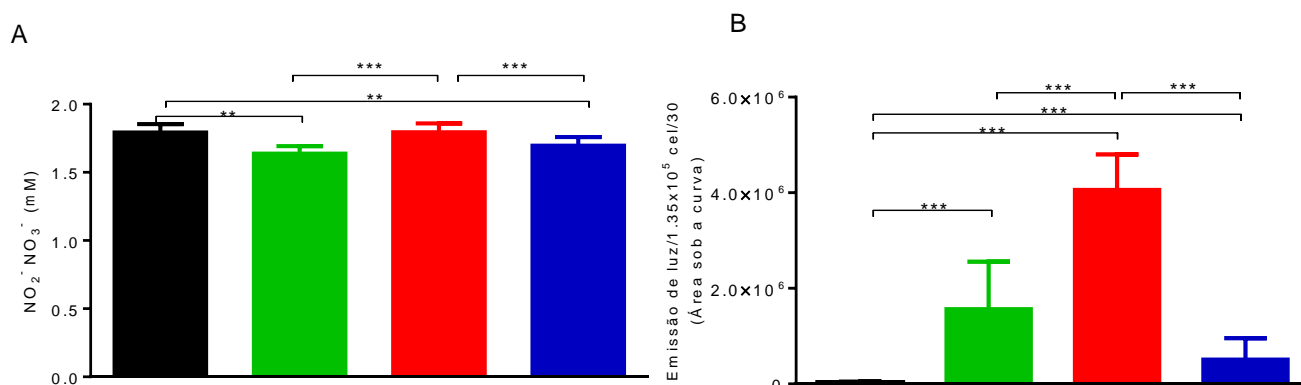


Figura 16- Efeito do Itraconazol em modelo de infecção subcutânea por *P. brasiliensis* sobre produção de metabólitos oxidativos, (A) Concentração de óxido nítrico e (B) produção de EROs.

Notas: Em preto animais somente infectados com Pb18, em verde animais infectados com Pb18+Itra 3mg/Kg, em vermelho animais infectados com Pb18 + Itra 10mg/Kg e em azul animais infectados com Pb18 + Itra 50mg/Kg. Significância de $p < 0,001$ (***), diferença significativa entre grupos tratados e não tratados (A/a) ($p < 0,05$). Os resultados de todos os grupos foram expressos em média \pm desvio padrão. Teste One-way ANOVA pós teste de Tukey.

Fonte: do autor

Para a concentração de proteínas totais das amostras de células das “air pouch” foi feita uma cinética com sedimentos obtidos às 2, 6 e 18 horas de incubação. Nas primeiras horas (2 e 6h) de incubação não houve diferença significativa na produção de proteínas totais no animais infectados e entre os animais tratados com as diferentes concentrações de Itra. No tempo de 18h há uma maior produção de produção de proteínas na concentração de 10mg/Kg em relação as outras concentrações de Itra (FIGURA 17).

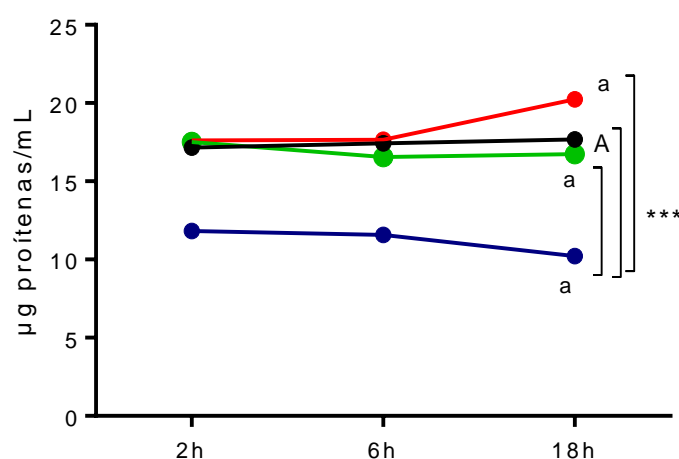


Figura 17- Efeito do Itraconazol em modelo de infecção subcutânea por *P. brasiliensis* sobre a concentração de proteínas totais.

Notas: Em preto animais somente infectados com Pb18, em verde animais infectados com Pb18+Itra 3mg/Kg, em vermelho animais infectados com Pb18 + Itra 10mg/Kg e em azul animais infectados com Pb18 + Itra 50mg/Kg. Significância de $p < 0,001$ (***), diferença significativa

entre grupos tratados e não tratados (A/a) ($p < 0,001$). Os resultados de todos os grupos foram expressos em média \pm desvio padrão. Teste Two-way ANOVA pós teste de Tukey.

Fonte: do autor

As dosagens de citocinas foram realizadas para GM-CSF, TNF- α , INF- γ , IL-10, IL-12, IL-4, IL-17 e KC (IL-8).

Não houve diferença na produção de IL-12 nos grupos tratados e não tratado com Itra. IL-17 possui um aumento de sua produção às 18h quando tratado com Itra na dose de 50mg/Kg em comparação com os demais grupos. GM-CSF e INF- γ é produzido em maior quantidade quando os animais são somente infectados e não tratados com antifúngico, sendo assim o uso de Itra nas diferentes concentrações diminui a produção destas citocinas. A produção de TNF- α em animais não tratados é aumentada às 2h e 18h de incubação em comparação aos animais tratados com Itra, ocorre uma queda na produção de TNF- α às 6h em animais somente infectados, com relação aos tratamentos a produção não é alterada (FIGURA 18).

A produção de citocinas inibitórias como a IL-4 é maior em animais infectados e não tratados, sendo que quando administrado Itra na concentração de 50mg/Kg ocorre a diminuição da produção de IL-4 nas primeiras 2 horas. Em animais não tratados a produção de IL-10 é aumentada às 2h e 18h de incubação em comparação aos animais tratados com Itra, às 6h a produção de IL-10 em animais não tratados cai, e animais tratados com as concentrações 3 e 10mg/Kg é maior (FIGURA 18).

A produção de KC (IL-8) é maior em animais somente infectados as 6 e 18h, animais tratados com as concentrações de Itra diminuem a produção de KC, sendo que a dose de 50mg/Kg diminui ainda mais a sua produção, desta forma podemos indicar que ocorre uma diminuição de PMNs nas “air pouch” de animais tratado, sendo que na maior dose isso é mais efetivo, mostrando possivelmente um maior perfil de cura de infecção por *P. brasiliensis* (FIGURA 18).

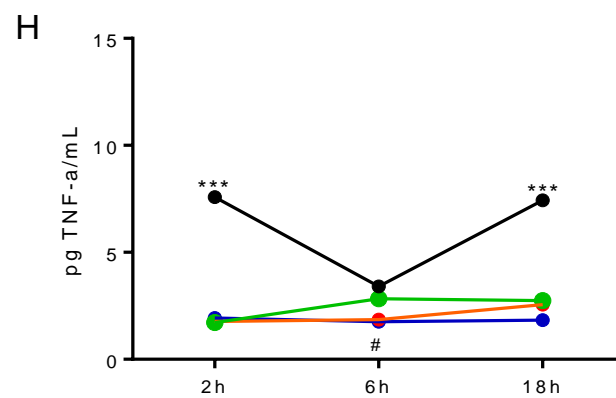
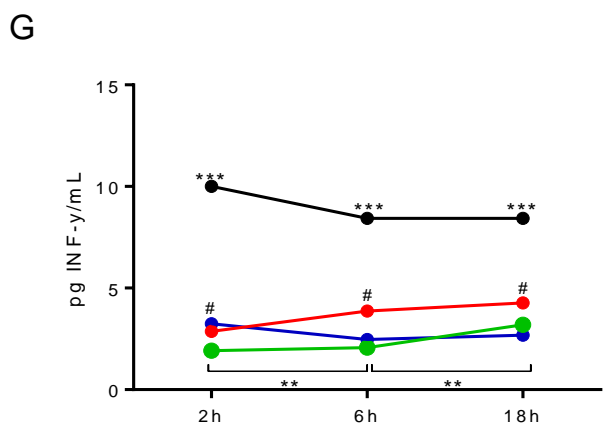
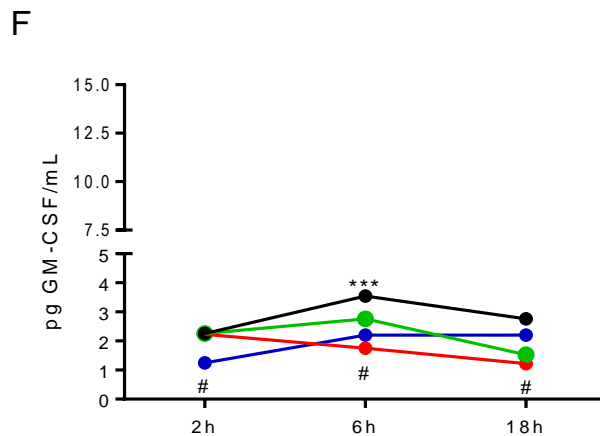
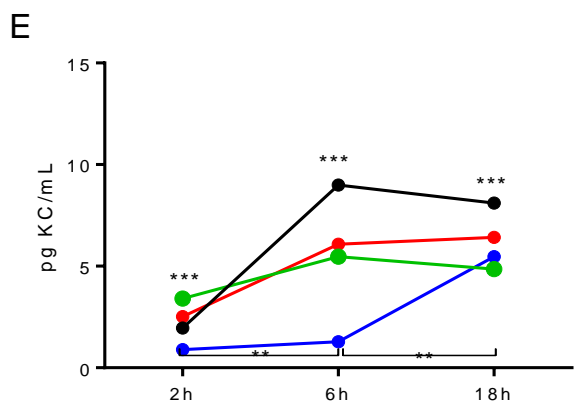
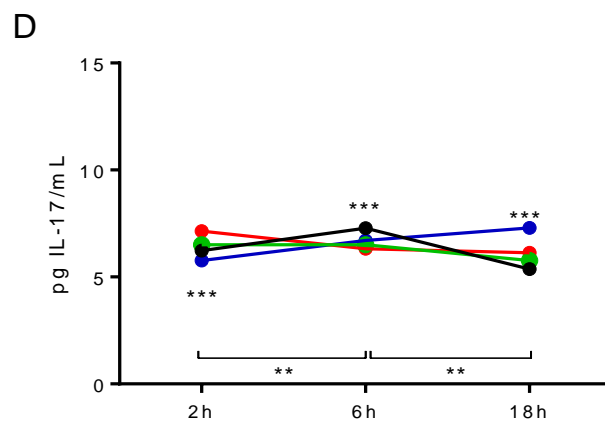
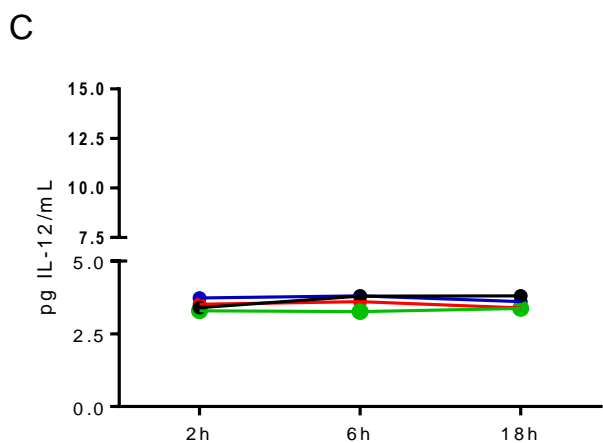
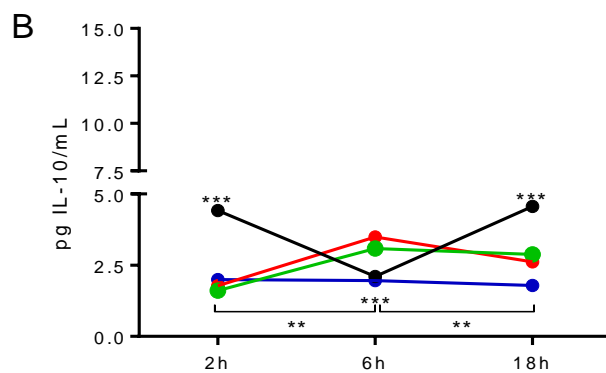
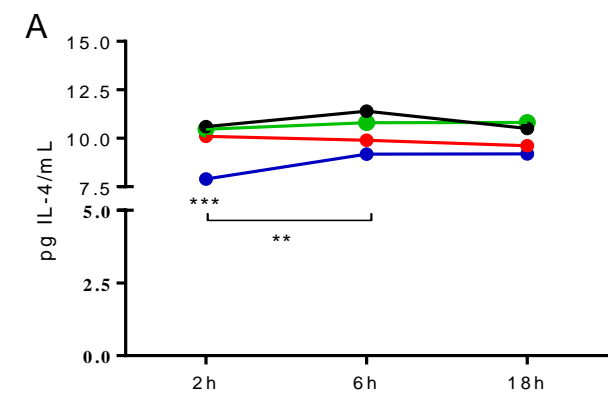


Figura 18- Efeito do Itraconazol em modelo de infecção subcutânea por *P. brasiliensis* na concentração de citocinas: (A) IL-4, (B) IL-10, (C) IL-12, (D) IL-17, (E) KC, (F) GM-CSF, (G), INF- γ e (H) TNF- α .

Notas: Em preto animais somente infectados com Pb18, em verde animais infectados com Pb18+ Itra 3mg/Kg, em vermelho animais infectados com Pb18 + Itra 10mg/Kg e em azul animais infectados com Pb18 + Itra 50mg/Kg. Significância de $p < 0,001$ (***), $p < 0,05$ (**) e diferença significativa entre horas de tratamento (#) ($p < 0,05$). Os resultados de todos os grupos foram expressos em média \pm desvio padrão. Teste Two-way ANOVA pós teste de Tukey.

Fonte: do autor

Foram feitas contagem de células inflamatórias, vasos, fibrócitos, fibroblastos e fungos. De acordo com os dados da Figura 19, a quantidade de células inflamatórias encontradas nas bolsas dos animais é menor nas concentrações de 10 e 50mg/Kg, sendo que a maior dose de Itra diminui significativamente o número de células inflamatórias causada pela infecção fúngica (FIGURA 19A). Com relação ao número de vasos na “air pouch” podemos perceber que o Itra aumenta a quantidade de vasos nas concentrações de 3 e 10mg/Kg nas quais podemos inferir que o Itra pode aumentar a vascularização do tecido recrutando mais células para o local da infecção com o objetivo de conter a doença. Na concentração mais alta esse processo se inverte diminuindo o número de vasos, provavelmente por a concentração mais alta ter conseguido conter a infecção, e não ser necessário um maior afluxo de células para o local da infecção (FIGURA 19B).

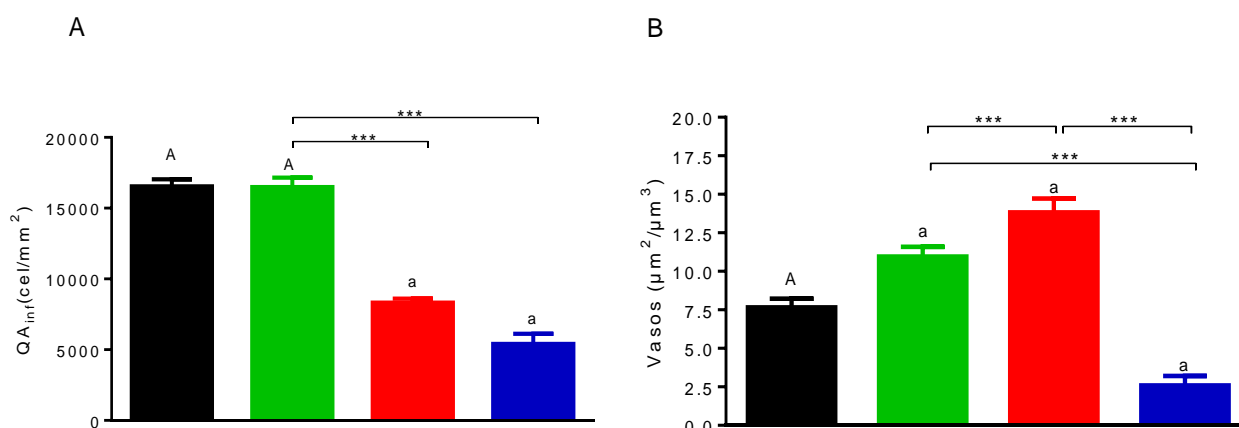


Figura 19- Efeito do Itraconazol em modelo de infecção subcutânea por *P. brasiliensis* sobre aspectos da inflamação aguda. (A) Quantificação de células inflamatórias e (B) quantificação de vasos.

Notas: Em preto animais somente infectados com Pb18, em verde animais infectados com Pb18+ Itra 3mg/Kg, em vermelho animais infectados com Pb18 + Itra 10mg/Kg e em azul animais infectados com Pb18 + Itra 50mg/Kg. (QA) = quantidade de células por área $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$. Significância de $p < 0,001$ (***) , diferença significativa entre grupos tratados e não tratados (A/a) ($p < 0,05$). Os resultados de todos os grupos foram expressos em média \pm desvio padrão. Teste One-way ANOVA pós teste de Tukey.

Fonte: do autor

Com relação à presença de fibroblastos na lesão, seu número mostra-se diminuído quando os animais estão sendo tratados com Itra, ao contrário do número de fibrócitos que se mostra aumentada com o uso do tratamento, mostrando um perfil de cicatrização na “air pouch” (FIGURA 20).

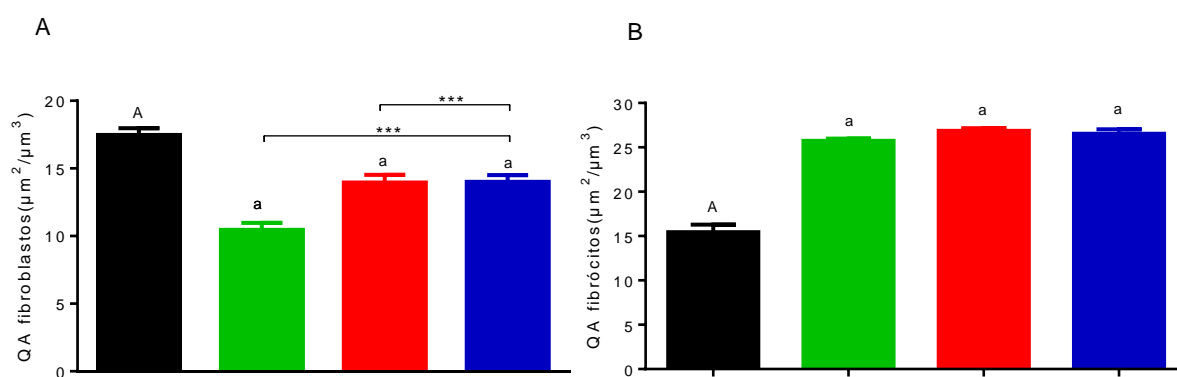


Figura 20- Efeito do Itraconazol em modelo de infecção subcutânea por *P. brasiliensis* sobre cicatrização das “air pouch”. (A) Quantificação de fibroblastos e (B) quantificação de fibrócitos.

Notas: Em preto animais somente infectados com Pb18, em verde animais infectados com Pb18+ Itra 3mg/Kg, em vermelho animais infectados com Pb18 + Itra 10mg/Kg e em azul animais infectados com Pb18 + Itra 50mg/Kg. (QA= quantidade de células por área $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$), significância de $p < 0,001$ (***) , diferença significativa entre grupos tratados e não tratados (A/a) ($p < 0,05$). Os resultados de todos os grupos foram expressos em média \pm desvio padrão. Teste One-way ANOVA pós teste de Tukey.

Fonte: do autor

Também foram quantificados número de fungos na “air pouch” dos animais somente infectados por Pb18 e de animais infectados e tratados com o Itraconazol. Na Figura 21 A, mostra que com tratamento com Itra o número de fungos na bolsa é significativamente menor com relação aos animais não tratados, sendo que a droga na concentração de 50mg/Kg se mostra mais eficiente apresentando um menor número de fungos presentes na “air pouch”, o que é confirmado pela quantificação de unidades formadoras de colônia, nas quais com o aumento das concentrações de Itra temos uma diminuição da formação de CFU das células retiradas das “air pouch” (FIGURA 21 B).

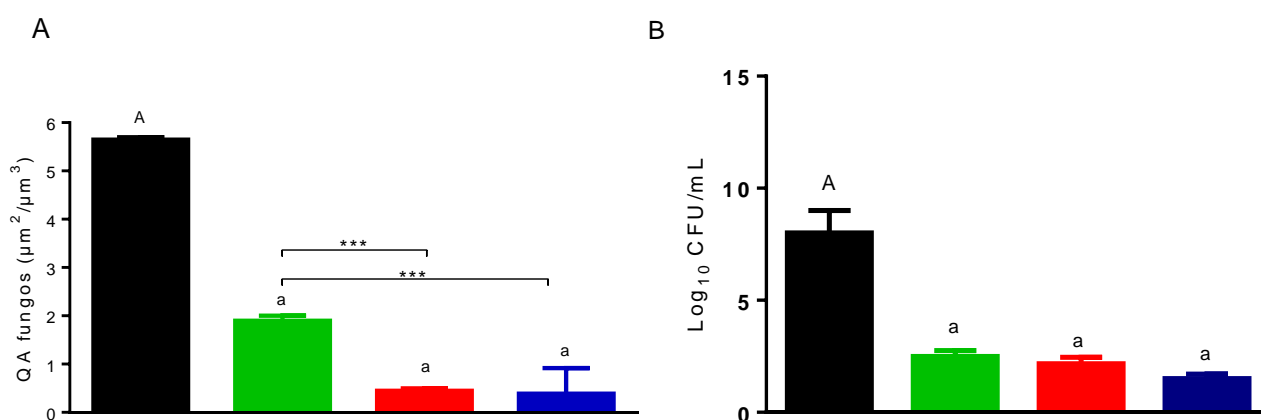


Figura 21- Efeito do Itraconazol em modelo de infecção subcutânea por *P. brasiliensis* sobre números de fungos nas “air pouch”. (A) Quantificação de fungos e (B) Unidades formadoras de colônias (CFU).

Notas: Em preto animais somente infectados com Pb18, em verde animais infectados com Pb18+ Itra 3mg/Kg, em vermelho animais infectados com Pb18 + Itra 10mg/Kg e em azul animais infectados com Pb18 + Itra 50mg/Kg. (QA) = quantidade de células fúngicas por área $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$, significância de $p < 0,001$ (***) , diferença significativa entre grupos tratados e não tratados (A/a) ($p < 0,05$). Os resultados de todos os grupos foram expressos em média \pm desvio padrão. Teste One-way ANOVA pós teste de Tukey.

Fonte: do autor

5.2.1 Conclusões a respeito dos resultados em modelo subcutâneo “air pouch” com diferentes concentrações do antifúngico Itraconazol

Com base nos resultados sobre o efeito do Itraconazol em modelo subcutâneo “air pouch”, mostramos que o Itraconazol não afeta o perfil celular encontrado nas “air pouch” nas quais estas células são em sua maioria neutrófilos (PMNs). Em contrapartida temos um menor afluxo de células para o local da infecção conforme o aumento das concentrações de Itra, porém estas células se mostram mais ativas, nas quais temos um aumento de atividade

mitocondrial e aumento de produção de EROs e concentração de proteínas. Na concentração mais elevada (50mg/Kg) isso se inverte, na qual observamos uma menor ativação de células, provavelmente pela ação fungicida do medicamento contra o fungo.

Desta forma, percebemos uma diminuição dos níveis de citocinas inflamatórias conforme o aumento das dosagens de Itra, assim como a diminuição de número de células inflamatórias nas “air pouch”. Embora tenhamos um aumento de vasos nas concentrações de 3 e 10mg/Kg, mas quando administrado a dose 50mg/Kg temos uma diminuição, provavelmente pelas concentrações mais baixas ainda necessitarem de um recrutamento celular para poder conter o fungo e a concentração mais elevada conseguir conter a infecção por ela mesma.

Também vemos uma melhora na cicatrização nas “air pouch” dos animais tratados, onde temos um aumento de fibroblastos no local da infecção. A partir dos resultados da análise de número de fungos na lesão e CFU das células obtidas das “air pouch”, pudemos demonstrar que suposições feitas anteriormente com relação as concentrações de Itra terem ação fungicida sobre o fungo.

5.3 RESULTADOS EM MODELO SUBCUTÂNEO ‘AIR POUCH’ COM O EFEITO CONJUNTO DE ITRACONAZOL E LASERTERAPIA DE BAIXA POTENCIA

Foi realizado a infecção com *P. brasiliensis* de forma subcutânea por via “air pouch” dos grupos:

- Grupo 1: animais não irradiados infectados com Pb18,
- Grupo 2: animais não irradiados infectados com Pb18 e tratados com Itraconazol (3mg/Kg)
- Grupo 3: animais não irradiados inoculados com Pb18 e tratados com Itraconazol (10mg/Kg),
- Grupo 4: animais não irradiados inoculados com Pb 18 e tratados com Itraconazol (50mg/kg),
- Grupo 5: animais irradiados infectados com Pb18,
- Grupo 6: animais irradiados infectados com Pb18 e tratados com Itraconazol (3mg/Kg),
- Grupo 7: animais irradiados inoculados com Pb18 e tratados com Itraconazol (10mg/Kg),
- Grupo 8: animais irradiados inoculados com Pb 18 e tratados com Itraconazol (50mg/Kg).

Os animais foram infectados e tratados com Itraconazol e LLLT conforme descrito em material e métodos, na Figura 22 podemos mostrar o aspecto interno das “air pouch”. Sendo que animais infectados com Pb18 visivelmente possuem uma “air pouch” com um

exsudado celular mais rico (FIGURA 22 A), animais tratados somente com a LLLT possuem o aspecto do exsudado celular da “air pouch” um pouco menos rico em células (FIGURA 22 B) e animais tratados com a concentração de 50mg/Kg apresentam a “air pouch” um pouco menor e menos rica em células em relação aos grupos anteriores (FIGURA 22 C).



Figura 22- Aspecto interno da infecção subcutânea pelo *P. brasiliensis*. (A) Animais infectados com Pb18, (B) animais infectados e tratados com LLLT e (C) animais infectados e tratados com 50m/kg de Itraconazol.

Fonte: do autor

Na análise macroscópica da “air pouch” observamos diferenças significativas entre os grupos tratados com diferentes concentrações de Itraconazol e também quando este tratamento foi associado à LLLT. A LLLT sozinha causou uma diminuição da “air pouch” quando nos referimos a peso e diâmetro, já o peso da bolsa aumenta quando os animais são tratados com LLLT. A concentração mais elevada de 50 mg/Kg de Itraconazol resultou em redução significativa da bolsa de ar em relação ao peso, volume e diâmetro (FIGURA 23). Onde temos a diminuição do tamanho da “air pouch” conforme o aumento das concentrações de Itra, e isso é potencializado pelo uso da laserterapia.

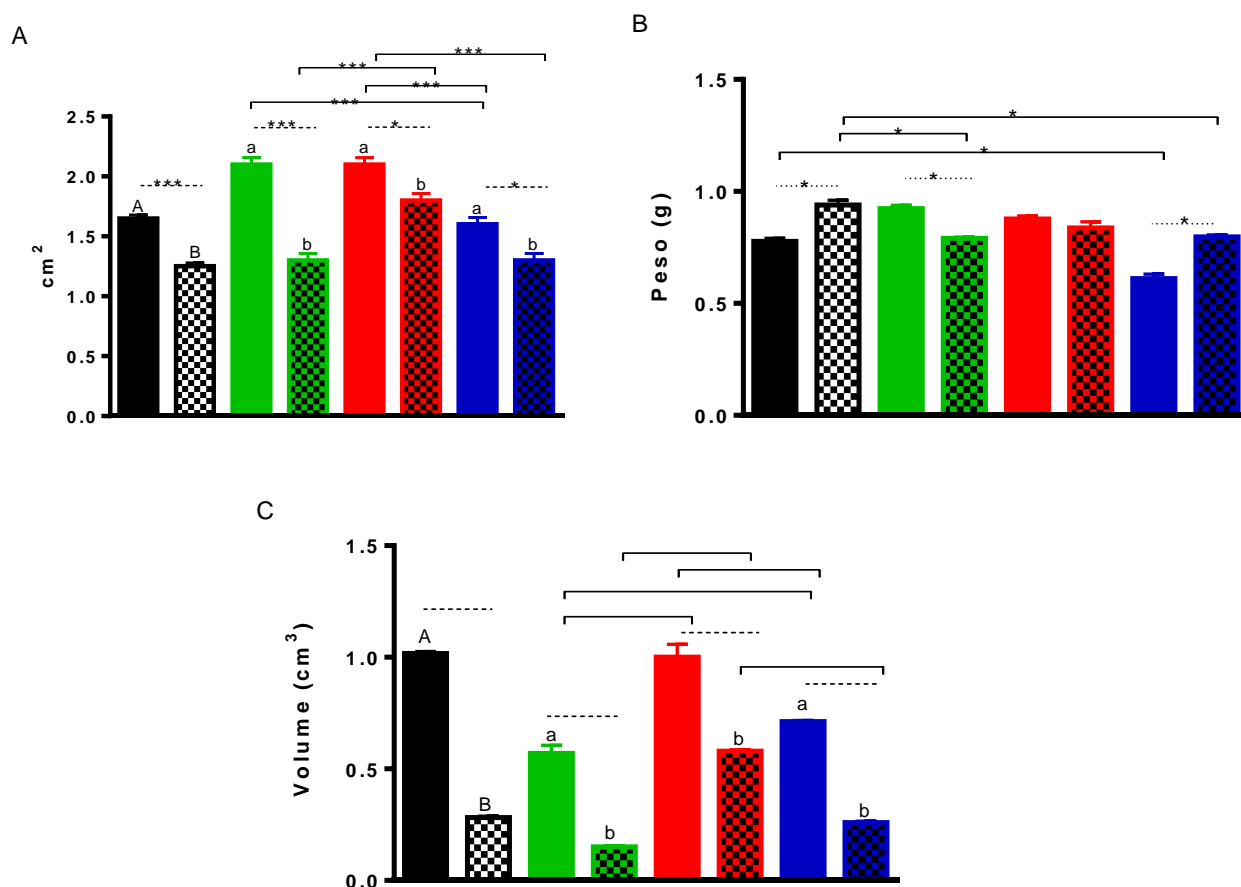


Figura 23- Efeito do Itraconazol associado a LLLT em animais infectados com *P. brasiliensis* por via subcutânea sobre o aspecto geral da “air pouch”. (A) Diâmetro da “air pouch”, (B) peso da “air pouch” e (C) volume da “air pouch” (C).

Notas: Em preto animais somente infectados com Pb18, em preto quadriculado animais infectados com Pb18 e irradiados, a em verde animais infectados com Pb18+ Itra 3mg/Kg, em verde quadriculado animais infectados com Pb18 + Itra 3mg/Kg + LLLT, em vermelho animais infectados com Pb18 + Itra 10mg/Kg, em vermelho quadriculado animais infectados com Pb18 + Itra 10mg/Kg + LLLT, em azul animais infectados com Pb18 + Itra 50mg/Kg e em azul quadriculado animais infectados com Pb18 + Itra 50mg/Kg + LLLT. Significância de $p < 0,001$ (***) , $p < 0,01$ (*) e diferença entre tratamentos Pb vs Pb + Itra 3, 10 e 50mg/Kg (A/a) e Pb + LLLT vs Pb+ LLLT+ Itra 3, 10 e 50mg/Kg (B/b) ($p < 0,05$) e diferença entre concentrações sozinhas e concentrações com LLLT (----/—) ($p < 0,05$). Os resultados de todos os grupos foram expressos em média \pm desvio padrão. Teste One-way ANOVA pós teste de Tukey.

Fonte: do autor

Desta forma o gráfico de contagem diferencial das células mostram que a composição do exsudado celular na bolsa de ar subcutânea não foi alterada pela terapia antifúngica com as concentrações do Itraconazol, e quando utilizado a associação da laserterapia, mostrando que sempre a contagem diferencial das células possuem a mesma proporção e que temos uma maior quantidade de neutrófilos no local da infecção. Podemos observar que 75% das células coletadas são PMNs, com um pequeno número de linfócitos e monócitos também presentes (FIGURA 24).

Os resultados contagem absoluta de células mostraram diferenças significativas entre os grupos não tratados e tratados com LASER, e entre os camundongos tratados com diferentes concentrações de Itraconazol com ou sem LLLT, onde temos uma diminuição do afluxo de células para o local de infecção, o que também sugere que a infecção está diminuindo conforme o aumento da dose de Itraconazol (FIGURA 24).

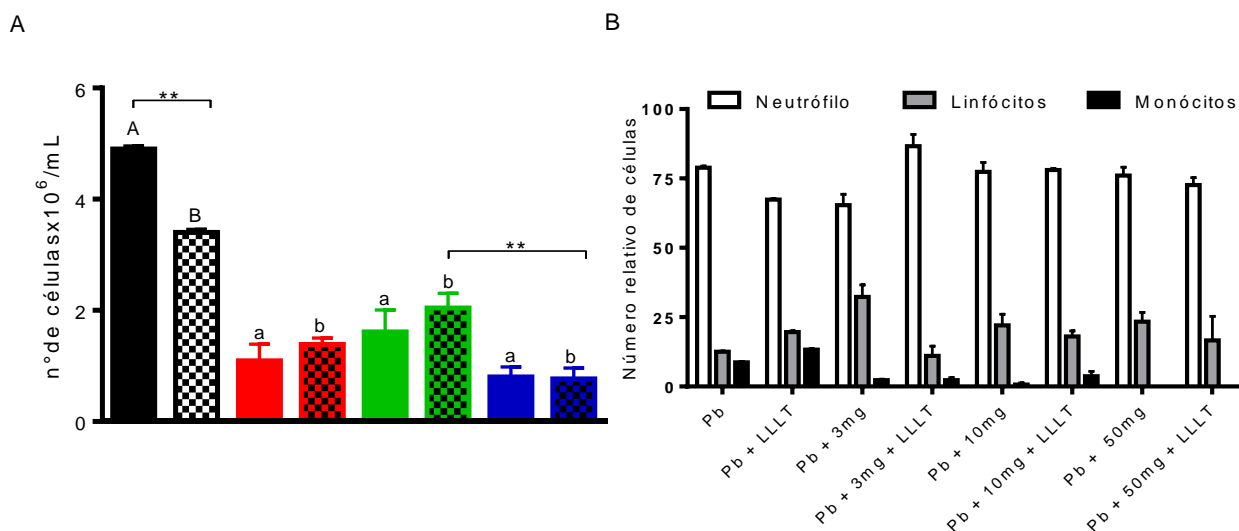


Figura 24- Efeito do Itraconazol associado à LLLT em modelo de infecção subcutânea por *P. brasiliensis* sobre perfil celular das “air pouch”. (A) Número absoluto e (B) contagem diferencial de células.

Notas: Em preto animais somente infectados com Pb18, em preto quadriculado animais infectados com Pb18 e irradiados, a em verde animais infectados com Pb18+ Itra 3mg/Kg, em verde quadriculado animais infectados com Pb18 + Itra 3mg/Kg + LLLT, em vermelho animais infectados com Pb18 + Itra 10mg/Kg, em vermelho quadriculado animais infectados com Pb18 + Itra 10mg/Kg + LLLT, em azul animais infectados com Pb18 + Itra 50mg/Kg e em azul quadriculado animais infectados com Pb18 + Itra 50mg/Kg + LLLT. Significância de $p < 0,05$ (**) e diferença entre tratamentos Pb vs Pb + Itra 3, 10 e 50mg/Kg (A/a) e Pb + LLLT vs Pb+ LLLT + Itra 3, 10 e 50mg/Kg (B/b) ($p < 0,05$). Os resultados de todos os grupos foram expressos em média \pm desvio padrão. Teste One-way ANOVA pós teste de Tukey.

Fonte: do autor

Com relação à viabilidade celular podemos mostrar que a viabilidade das células são sempre acima de 75%, desta forma podemos concluir que o uso do Itraconazol não é tóxico para as células obtidas por meio de infecção subcutânea, além disso pode-se notar um pequeno aumento do número de células para o grupo sem tratamento com relação aos grupos tratados, mostrando que os tratamentos combinados ou não possibilitam uma maior viabilidade células no local de infecção, sugerindo uma diminuição do número de fungos viáveis (FIGURA 25 A).

A atividade mitocondrial teve um aumento quando utilizado somente a laserterapia, e nos grupos onde tivemos o uso de terapia antifúngica com o Itraconazol tivemos uma diminuição significativa com relação ao grupo não tratado, e quando utilizamos a droga associada a LLLT tivemos uma menor atividade mitocondrial das células obtidas por infecção subcutânea (FIGURA 25 B).

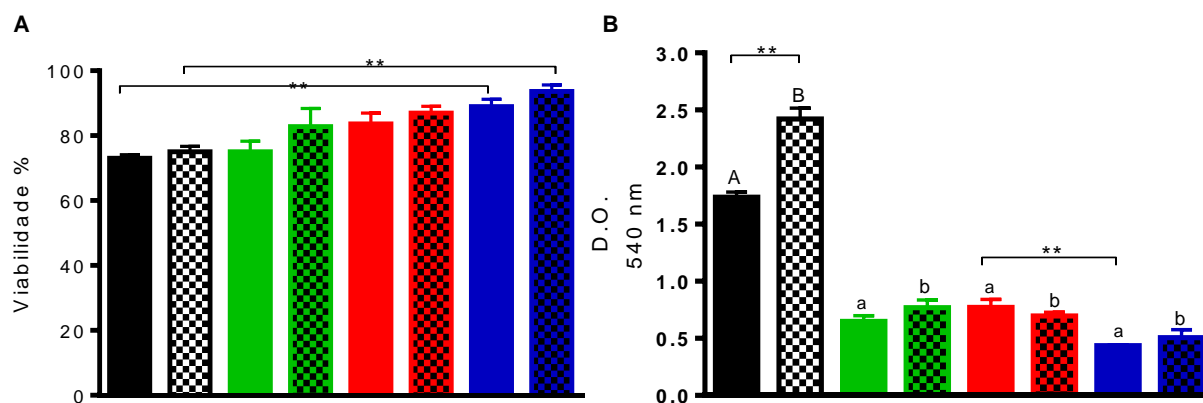


Figura 25- Efeito do Itraconazol associado à LLLT em modelo de infecção subcutânea por *P. brasiliensis* sobre atividade celular. (A) Viabilidade celular e (B) atividade mitocondrial.

Notas: Em preto animais somente infectados com Pb18, em preto quadriculado animais infectados com Pb18 e irradiados, a em verde animais infectados com Pb18+ Itra 3mg/Kg, em verde quadriculado animais infectados com Pb18 + Itra 3mg/Kg + LLLT, em vermelho animais infectados com Pb18 + Itra 10mg/Kg, em vermelho quadriculado animais infectados com Pb18 + Itra 10mg/Kg + LLLT, em azul animais infectados com Pb18 + Itra 50mg/Kg e em azul quadriculado animais infectados com Pb18 + Itra 50mg/Kg + LLLT. Significância de $p < 0,05$ (**) e diferença entre tratamentos Pb vs Pb + Itra 3, 10 e 50mg/Kg (A/a) e Pb + LLLT vs Pb+ LLLT + Itra 3, 10 e 50mg/Kg (B/b) ($p < 0,05$). Os resultados de todos os grupos foram expressos em média \pm desvio padrão. Teste One-way ANOVA pós teste de Tukey.

Fonte: do autor

Com relação ao efeito do Itraconazol associado a LLLT sobre produção de metabólitos oxidativos, temos que para concentração de NO notamos que a produção é relativamente parecida em todos os grupos, onde somente o uso de LLLT causou um aumento em sua produção (FIGURA 26 A).

A produção de espécies reativas de oxigênio é maior na dose de 10mg/Kg, como mostrado na Figura 26 B, quando associado a LLLT, a produção de EROs é menor em relação aos grupos tratados somente com Itra. Desta forma podemos dizer que o uso de das duas terapias simultaneas estimulam a produção de EROs em comparação ao grupo não tratado, e quando comparamos com os grupos somente tratados com Itra a produção de EROs é menor, o que pode inferir que o tratamento em conjunto pode estar matando mais fungos no local da infecção, não necessitando de uma maior ativação de EROs.

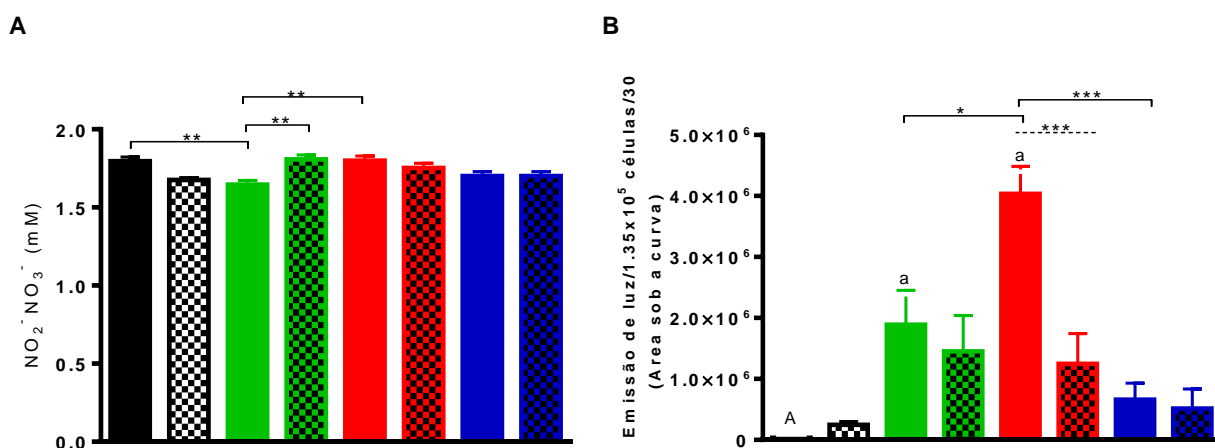


Figura 26- Efeito do Itraconazol associado à LLLT em modelo de infecção subcutânea por *P. brasiliensis* sobre produção de metabólitos oxidativos. (A) Concentração de óxido nítrico e (B) produção de EROs.

Notas: Em preto animais somente infectados com Pb18, em preto quadriculado animais infectados com Pb18 e irradiados, a em verde animais infectados com Pb18+ Itra 3mg/Kg, em verde quadriculado animais infectados com Pb18 + Itra 3mg/Kg + LLLT, em vermelho animais infectados com Pb18 + Itra 10mg/Kg, em vermelho quadriculado animais infectados com Pb18 + Itra 10mg/Kg + LLLT, em azul animais infectados com Pb18 + Itra 50mg/Kg e em azul quadriculado animais infectados com Pb18 + Itra 50mg/Kg + LLLT. Significância de $p < 0,05$ (**), diferença entre tratamentos Pb vs Pb + Itra 3, 10 e 50mg/Kg (A/a) e Pb + LLLT vs Pb + LLLT + Itra 3, 10 e 50mg/Kg (B/b) ($p < 0,05$). Os resultados de todos os grupos foram expressos em média \pm desvio padrão. Teste One-way ANOVA pós teste de Tukey.

Fonte: do autor

Para concentração de proteínas tivemos diferenças significativas em todos os grupos experimentais, sendo que o uso do Itraconazol em todas as dosagens aumenta a produção de proteínas. Quando utilizado a LLLT notamos que no grupo somente infectado em comparação com o grupo somente tratado com a LLLT que ela diminui a produção de proteínas totais, mais em conjunto com o Itraconazol a LLLT aumenta a sua produção. Nas concentrações de 10 e 50mg/Kg em conjunto com LLLT essa produção diminuiu um pouco a produção de proteínas (FIGURA 27).

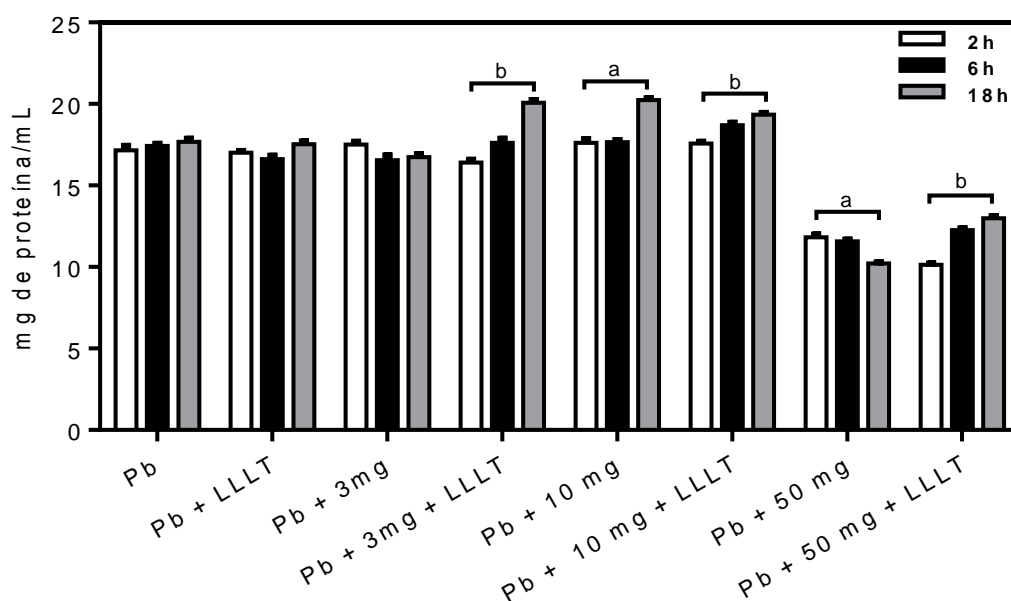


Figura 27- Efeito do Itraconazol associado à LLLT em modelo de infecção subcutânea por *P. brasiliensis* sobre cinética da concentração de proteínas totais de células obtidas por das “air pouch”. Notas: Significância de $p < 0,05$, diferença entre tratamentos Pb vs Pb + Itra 3, 10 e 50mg/Kg (A/a) e Pb + LLLT vs Pb+ LLLT + Itra 3, 10 e 50mg/Kg (B/b). Os resultados de todos os grupos foram expressos em média \pm desvio padrão. Teste One-way ANOVA pós teste de Tukey.

Fonte: do autor

As concentrações das citocinas GM-CSF, TNF- α , INF- γ , IL-10, IL-12, IL-4 e IL-17 e KC (IL-8) foram realizadas para os grupos tratados com Itraconazol e tratados com laserterapia.

A síntese da citocina IL-12 apresentou diferenças entre animais somente infectados e animais somente irradiados, nos quais a produção de IL-12 é menor em animais submetidos a LLLT, o uso de Itra nas concentrações de 10 e 50mg/Kg mostraram uma leve diminuição da produção de IL-12 em comparação ao grupo não tratado, e os grupos com a dosagens de Itra de 3 e 10mg/Kg e irradiados com LLLT mostraram um aumento em comparação ao grupo somente irradiado (FIGURA 28). IL- 17 teve uma diminuição da sua produção quando utilizado a LLLT, sendo que quando combinada com a droga de 10 e 50mg/Kg teve um aumento de sua produção, sendo que o tratamento com 50mg/Kg aumentou a produção de IL-17 (FIGURA 28).

GM-CSF foi produzido em maior quantidade quando utilizado a LLLT em comparação ao grupo sem tratamento, o Itra diminui a produção de GM-CSF em todas com concentrações testadas, mesmo com o uso conjunto com a LLLT (FIGURA 28). O perfil de produção de INF- γ é semelhante ao de GM-CSF, onde aumenta com a LLLT, mais o uso de

Itra diminui sua produção (FIGURA 28). TNF- α aumenta com a LLLT e diminui com o uso de Itra (FIGURA 28).

A produção de citocinas inibitórias foi medida pela expressão de IL-4, IL-17 e TNF- α , onde IL-4 é produzida em maior quantidade quando os animais são irradiados em comparação aos animais não tratados, o uso do antifungico diminui a produção de IL-4 em todas as 3 dosagens testadas, sozinhas ou aplicadas em conjunto com o uso da LLLT (FIGURA 35). A citocina IL-10 também tem um aumento de sua produção quando administrado a LLLT, sendo que Itra diminui sua expressão (FIGURA 28).

Com relação a KC (IL-8), temos que o LLLT aumenta a produção de KC, e o tratamento com Itra diminui a sua produção, quando LLLT está associada ao tratamento com o Itra temos uma diminuição da produção de KC, desta forma podemos dizer que a LLLT possui um papel ativador de PMNs, mais em associação ao Itra a ativação de PMNs é menor, provavelmente devido ao antifungico conseguir conter a infecção por *P. brasiliensis* no local da infecção.

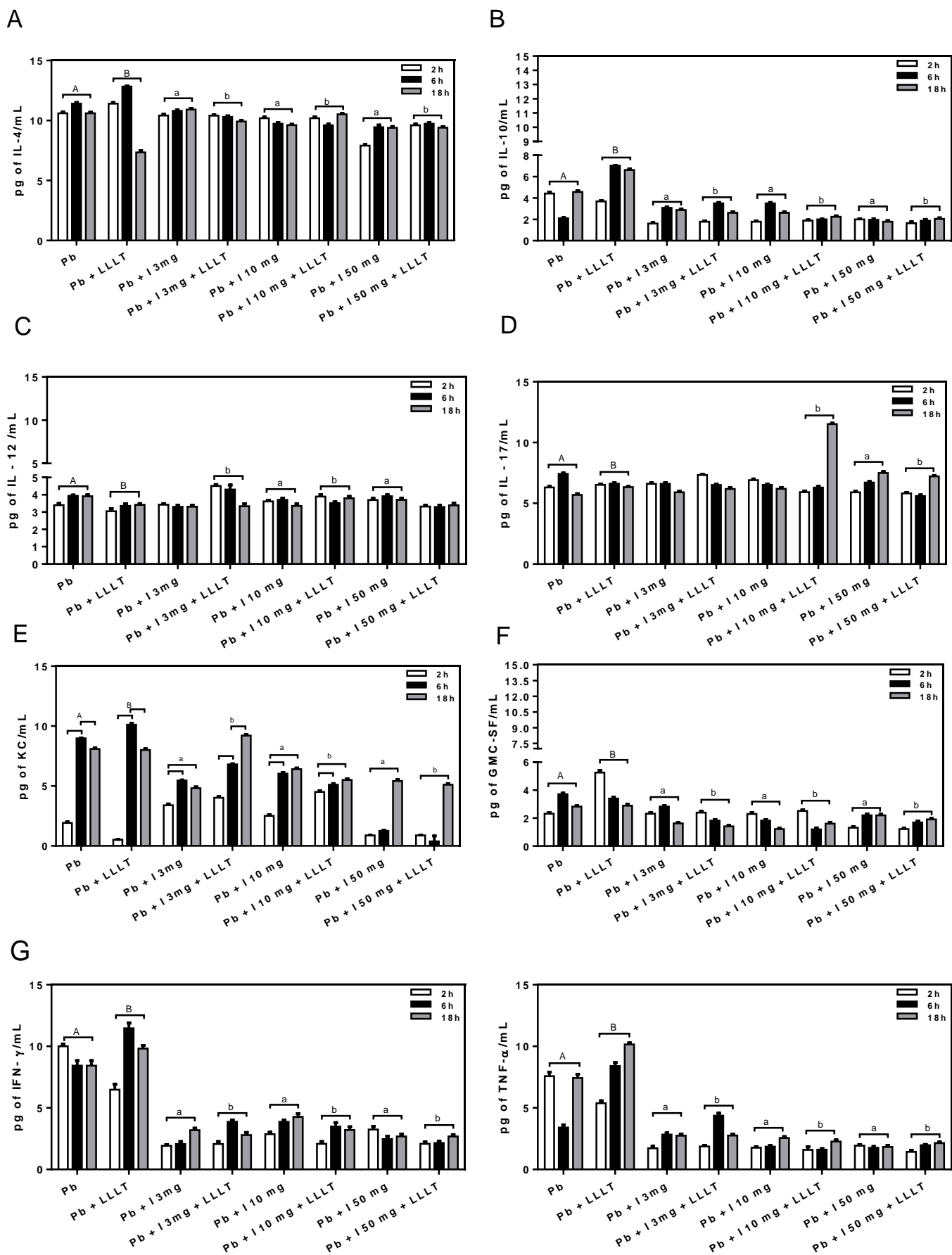


Figura 28- Efeito do Itraconazol e da Laserterapia em infecção subcutânea por *P. brasiliensis* na concentração de citocinas: (A) IL-4, (B) IL-10, (C) IL-12, (D) IL-17, (E) KC, (F) GM-CSF, (G), INF- γ e (H) TNF- α .

Notas: Significância de $p < 0,05(**)$ diferença entre tratamentos Pb vs Pb + Itra 3, 10 e 50mg/Kg (A/a) e Pb + LLLT vs Pb+ LLLT + Itra 3, 10 e 50mg/Kg (B/b) ($p < 0,05$). Os resultados de todos os grupos foram expressos em média \pm desvio padrão. Teste Two-way ANOVA pós teste de Tukey.

Fonte: do autor

Os resultados de histologia de “air pouch” proporcionou uma visão de como o tratamento com o Itraconazol e a associação de LLLT melhoraram as lesões causadas pela inoculação de *P. brasiliensis* em via subcutânea. A quantidade de células inflamatórias diminuem conforme o aumento das concentrações de Itraconazol (FIGURA 29 A). O número de vasos são maiores nos grupos tratados com LLLT, mostrando que a LLLT aumenta a vascularização no tecido, aumentando o afluxo de células para o local da infecção. Animais infectados e tratados com 50mg/Kg de Itra pode se notar um menor número de vasos, provavelmente devido a dosagem mais alta ter conseguido conter a infecção fúngica (FIGURA 29 B).

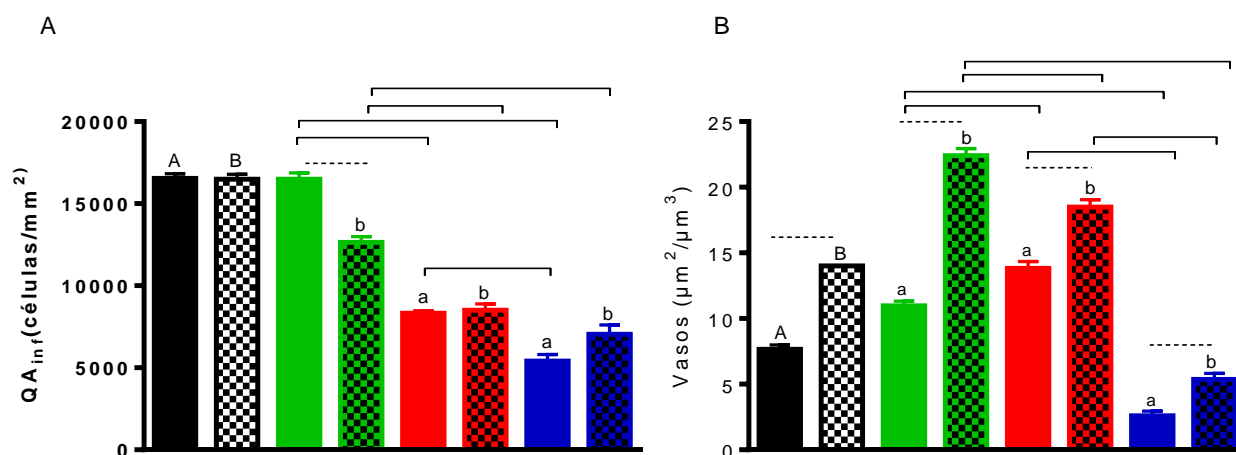


Figura 29- Efeito do Itraconazol associado a LLLT em infecção com *P. brasiliensis* por via subcutânea sobre aspectos da inflamação aguda. (A) Quantificação de células inflamatórias e (B) quantificação de vasos.

Notas: Em preto animais somente infectados com Pb18, em preto quadriculado animais infectados com Pb18 e irradiados, a em verde animais infectados com Pb18+ Itra 3mg/Kg, em verde quadriculado animais infectados com Pb18 + Itra 3mg/Kg + LLLT, em vermelho animais infectados com Pb18 + Itra 10mg/Kg, em vermelho quadriculado animais infectados com Pb18 + Itra 10mg/Kg + LLLT, em azul animais infectados com Pb18 + Itra 50mg/Kg e em azul quadriculado animais infectados com Pb18 + Itra 50mg/Kg + LLLT. Significância de $p < 0,001$ (***) , $p < 0,01$ (*) e diferença entre tratamentos Pb vs Pb + Itra 3, 10 e 50mg/Kg (A/a) e Pb + LLLT vs Pb+ LLLT+ Itra 3, 10 e 50mg/Kg (B/b) ($p < 0,05$) e diferença entre concentrações sozinhas e concentrações com LLLT (----/—) ($p < 0,05$). (QA= quantidade de células por área $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$). Os resultados de todos os grupos foram expressos em média \pm desvio padrão. Teste One-way ANOVA pós teste de Tukey.

Fonte: do autor

Com relação aos efeitos do Itraconazol associado a LLLT sobre perfil de cicatrização nas “air pouch” podemos dizer que tivemos uma diminuição de fibroblastos nos grupos tratados com Itraconazol e associados a laserterapia e um aumento de quantidade de fibrócitos (FIGURA 30), o que pode se associar a uma melhora na organização tecidual dos animais que foram tratados com Itra e LLLT.

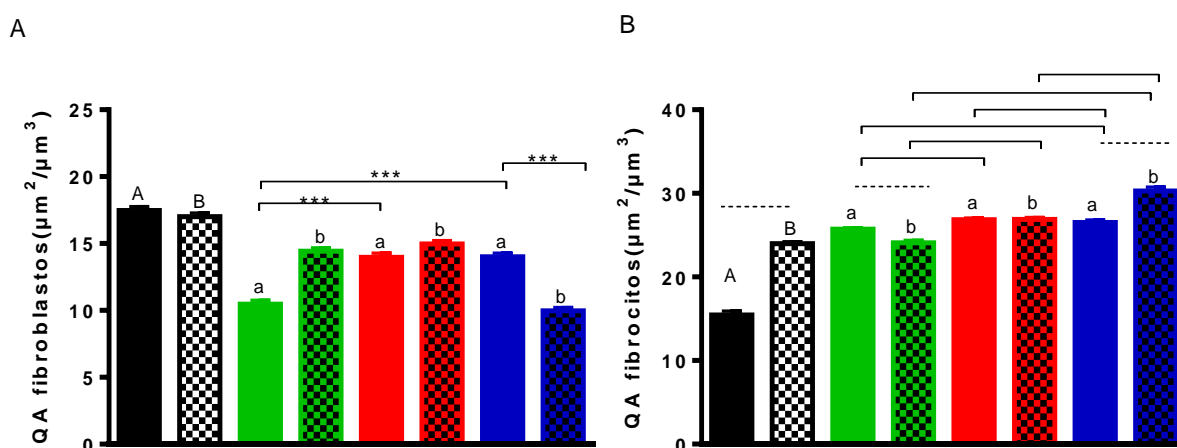


Figura 30- Efeito do Itraconazol associado a LLLT em infecção com *P. brasiliensis* por via subcutânea sobre cicatrização das “air pouch”. (A) Quantificação de fibroblastos e (B) quantificação de fibrocitos (B).

Notas: Em preto animais somente infectados com Pb18, em preto quadriculado animais infectados com Pb18 e irradiados, a em verde animais infectados com Pb18+ Itra 3mg/Kg, em verde quadriculado animais infectados com Pb18 + Itra 3mg/Kg + LLLT, em vermelho animais infectados com Pb18 + Itra 10mg/Kg, em vermelho quadriculado animais infectados com Pb18 + Itra 10mg/Kg + LLLT, em azul animais infectados com Pb18 + Itra 50mg/Kg e em azul quadriculado animais infectados com Pb18 + Itra 50mg/Kg + LLLT. Significância de $p < 0,001$ (***) , $p < 0,01$ (*) e diferença entre tratamentos Pb vs Pb + Itra 3, 10 e 50mg/Kg (A/a) e Pb + LLLT vs Pb+ LLLT + Itra 3, 10 e 50mg/Kg (B/b) ($p < 0,05$) e diferença entre concentrações sozinhas e concentrações com LLLT (----/—) ($p < 0,05$). (QA) = quantidade de células por área $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$). Os resultados de todos os grupos foram expressos em média \pm desvio padrão. Teste One-way ANOVA pós teste de Tukey.

Fonte: do autor

Com relação aos número de fungos na “air pouch” podemos perceber que eles diminuem significativamente com o aumento das concentrações de Itraconazol, onde com a dose de 50mg/Kg quase não se ve *P. brasiliensis* na lesão, sendo este efeito potencializado pela associação do tratamento a LLLT (FIGURA 31 A). Ainda podemos demonstrar que este efeito se reflete na análise das unidades formadoras de colônias (CFU) onde temos a diminuição da formação de CFU conforme o aumento das concentrações de Itra e sua associação a LLLT, ainda podemos mostrar que a LLLT sozinha é capaz de diminuir CFU das células obtidas das “air pouch” (FIGURA 31 B).

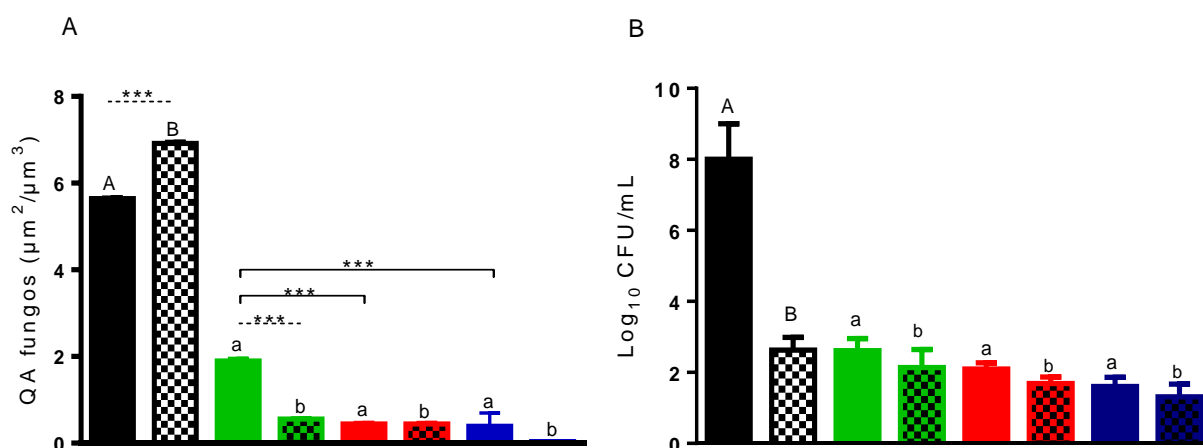


Figura 31- Efeito do Itraconazol associado a LLLT em infecção com *P. brasiliensis* por via subcutânea sobre quantidade de fungos nas “air pouch”. (A) Quantidade de fungos e (B) unidades formadoras de colônias (CFU).

Notas: Em preto animais somente infectados com Pb18, em preto quadriculado animais infectados com Pb18 e irradiados, a em verde animais infectados com Pb18+ Itra 3mg/Kg, em verde quadriculado animais infectados com Pb18 + Itra 3mg/Kg + LLLT, em vermelho animais infectados com Pb18 + Itra 10mg/Kg, em vermelho quadriculado animais infectados com Pb18 + Itra 10mg/Kg + LLLT, em azul animais infectados com Pb18 + Itra 50mg/Kg e em azul quadriculado animais infectados com Pb18 + Itra 50mg/Kg + LLLT. Significância de $p < 0,001$ (***) , $p < 0,01$ (*) e diferença entre tratamentos Pb vs Pb + Itra 3, 10 e 50mg/Kg (A/a) e Pb + LLLT vs Pb+ LLLT + Itra 3, 10 e 50mg/Kg (B/b) ($p < 0,05$) e diferença entre concentrações sozinhas e concentrações com LLLT (---/—) ($p < 0,05$). (QA) = quantidade de células fúngicas por área $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$. Os resultados de todos os grupos foram expressos em média \pm desvio padrão. Teste One-way ANOVA pós teste de Tukey.

Fonte: do autor

Em animais somente infectados a morfologia do fungo se mantém preservada, quando os animais são irradiados ainda se observa numerosa quantidade de células fúngicas com a morfologia preservada (FIGURA 32). A medida que se inicia o tratamento com o Itraconazol ocorre a redução do número de fungos e nota-se poucos fungos com a morfologia ainda preservada. Nos animais que receberam uma maior concentração de Itra com associação da laserterapia não se observa células fúngicas com morfologia preservada, sendo visto somente restos celulares

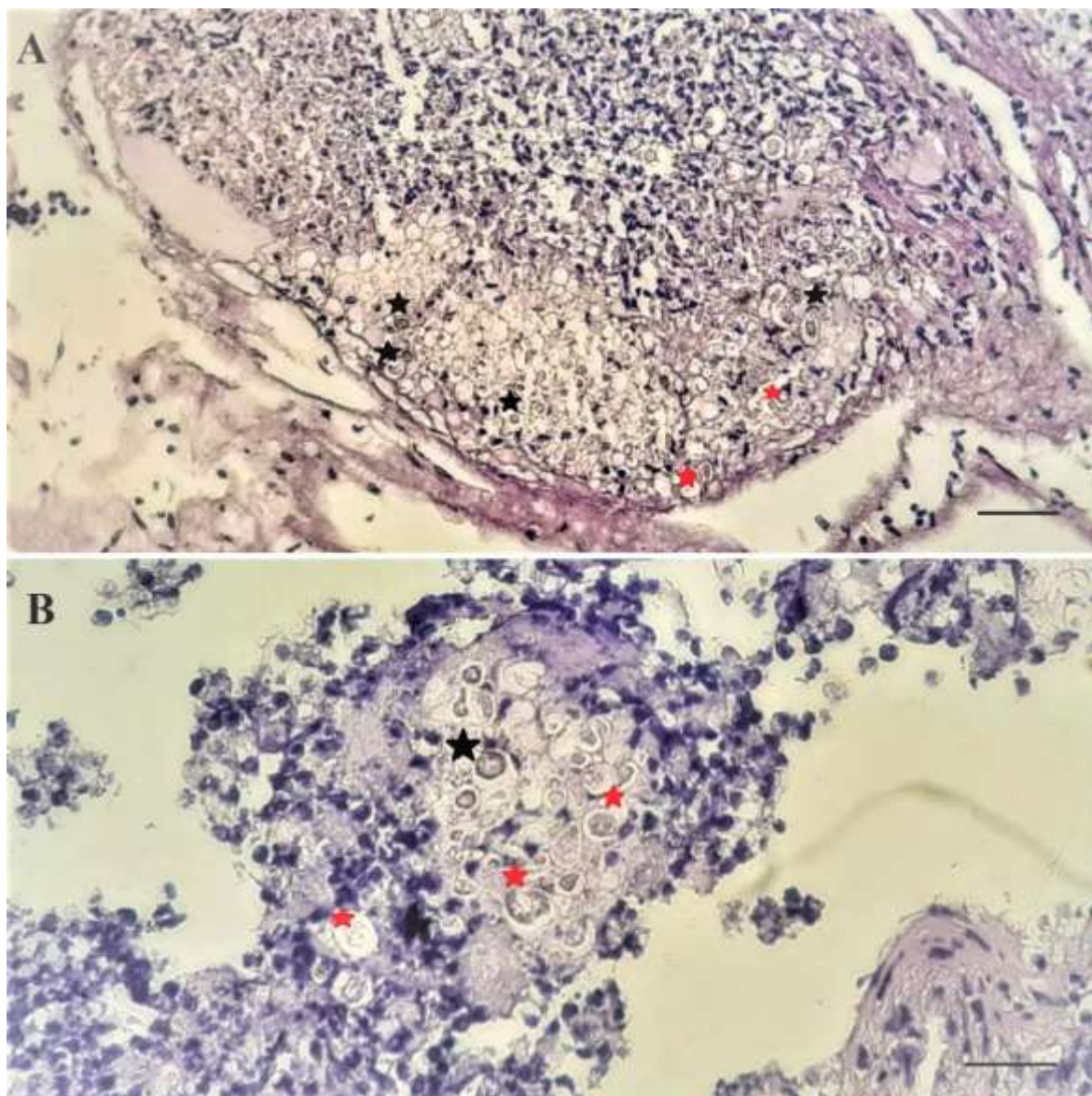


Figura 32- Fotomicrografias de *P. brasiliensis* em infecção subcutânea “air pouch”. (A) Animais infectados por Pb18 e (B) Animais infectados por Pb18 e tratados com LLLT.

Notas: Estrelas pretas correspondem a fungos com morfologia preservada, estrelas vermelhas correspondem a fungos com morfologia não preservada. Microscopia de campo claro, coloração por PAS, objetiva de 40 x e barras indicam 50 μ m.

Fonte: do autor

5.3.1 Conclusões sobre os resultados em modelo subcutâneo “air pouch” com diferentes concentrações do antifúngico Itraconazol e LLLT

Com base nos resultados apresentados aqui pudemos mostrar que LLLT possui grande efeito sobre PMNs, mostrando ativar as células obtidas da “air pouch”, aumentando a produção de metabólitos do oxigênio (EROs e NO) e atividade celular, além de aumentar a produção de citocinas como KC, INF- γ , TNF- α , IL-10, GM-CSF, e IL-4.

Em contrapartida o efeito da LLLT é atenuado pela associação ao Itraconazol, onde temos menos ativação celular a medida que aumentamos as concentrações do antifúngico. A associação os dois tratamentos ativa menos células, tendo menor produção de EROS e diminuição de citocinas inflamatórias, indicando uma maior atividade fungicida e desta forma, sendo cada vez menos necessário a ativação de células imunes para o combate ao fungo.

Isso é provado pela diminuição de número de células inflamatórias, pela melhora no perfil de cicatrização de lesão, onde temos aumento de fibrócitos, e pela diminuição número de fungos nas “air pouch”. Com o aumento das concentrações do antifúngico menores os números de fungo no local de infecção e isso é potencializado pelo uso da LLLT.

5.4 RESULTADOS EM MODELO INTRAPERITONEAL COM A DOSE DE 50MG/KG DO ANTIFÚNGICO ITRACONAZOL

Após a realização dos experimentos em modelo de infecção subcutânea “air pouch” foi possível concluir que a dose de Itraconazol mais efetiva no tratamento da PCM foi a de 50mg/kg. Com base em todos os resultados apresentados até o momento como resultados da concentração inibitória mínima, e resultados de índice de toxicidade e resultados de “air pouch” com as diferentes concentrações de Itraconazol, mostramos que a dose de 50mg/kg não é tóxica para as células, e possui maior atividade fungicida em comparação com as demais concentrações testadas. Desta forma procedemos experimentos em modelo experimental com infecção intraperitoneal do fungo *P. brasiliensis*, onde a droga de escolha foi a de 50mg/kg de Itraconazol por via oral (gavagem) por três vezes na semana no grupo tratado e dois controles de infecção, animais não infectados e animais infectados e não tratados. Desta forma esses animais ficaram mantidos por 120 dias de infecção.

Durante o decorrer do tempo de 120 dias os animais foram submetidos a pesagem no dia da infecção, 15 dias após e depois mensalmente pesados até a finalização dos 120 dias. Dados apresentados na Figura 18, mostram que animais infectados e não tratados possuem um ganho de peso maior a partir de 60 dias de infecção, e os animais tratados com Itra (50mg/kg) possuem um perfil de peso corpóreo mais próximo ao de animais não infectados (FIGURA 32).

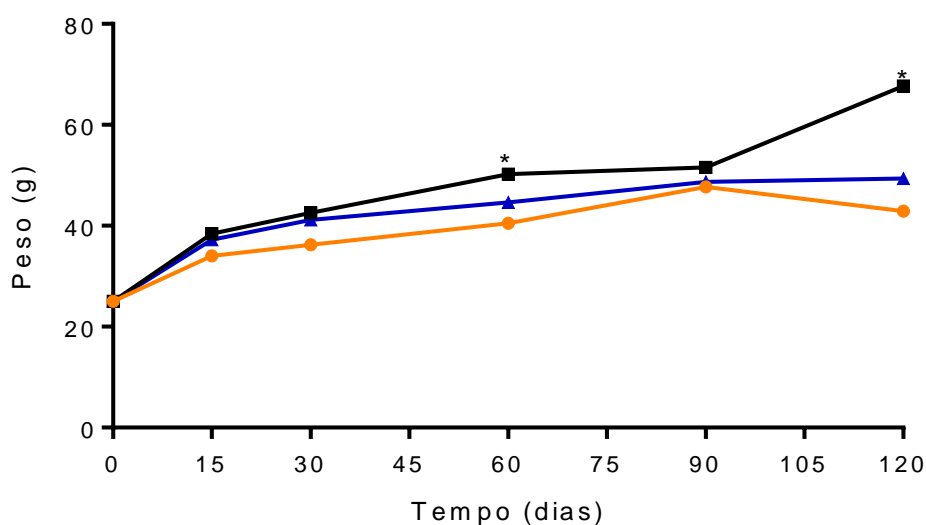


Figura 33– Peso corpóreo de animais infectados por via intraperitoneal com *P. brasiliensis* durante 120 dias de infecção.

Notas: Em amarelo animais não infectados, em preto animais infectados com Pb18 e não tratados e em azul animais infectados com Pb18 e tratados com Itra 50mg/Kg. Significância de $p < 0,01$ (*), os resultados de todos os grupos estão expressos em média, teste utilizado Two-way ANOVA pós teste de Tukey.

Fonte: do autor

Foi feita a curva de sobrevivência desses animais infectados por via intraperitoneal e mantidos por 120 dias, animais não infectados e animais infectados e tratados tiveram 100% de taxa de sobrevivência, e animais infectados tiveram sua taxa de sobrevivência perto de 80%. Sendo que animais infectados tiveram morte com 30 dias de infecção, provavelmente devido ao pico de infecção da doença. De forma geral a taxa de sobrevivência de 80% com 120 dias de infecção mostra que animais do tipo *Swiss* se comportam como animais resistentes a infecção por *P. brasiliensis* (FIGURA 33).

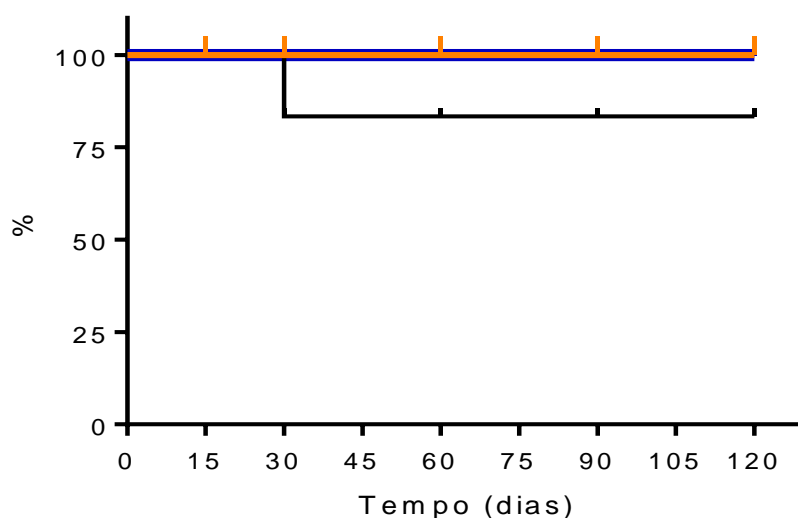


Figura 34- Sobrevida de animais infectados por via intraperitoneal com *P. brasiliensis* durante 120 dias de infecção.

Notas: Em amarelo animais não infectados, em preto animais infectados com Pb18 e não tratados e em azul animais infectados com Pb18 e tratados com Itra 50mg/Kg. Os resultados de todos os grupos estão expressos em média.

Fonte: do autor

Os animais infectados por via intraperitoneal foram mantidos em tratamento por 120 dias, onde com 15, 30, 60, 90 e 120 dias foram submetidos a teste de hipersensibilidade do tipo tardia à paracoccidioidina, e foi medido o edema de pata desses animais 48h após a inoculação desta preparação. Conforme se mostra no gráfico a hipersensibilidade do tipo tardia é maior nos primeiros meses de infecção, sendo que animais não tratados apresentam uma reatividade maior em comparação com os animais infectados e tratados com Itra, e animais não infectados não apresentam reatividade (FIGURA 35).

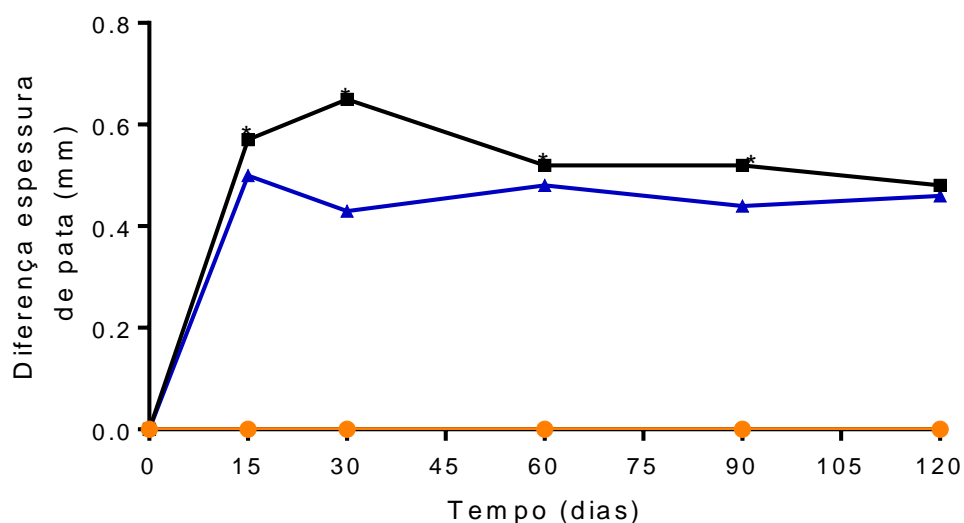


Figura 35 - Teste de Hipersensibilidade do tipo tardia à paracoccidiodina de animais infectados por via intraperitoneal com *P. brasiliensis* durante 120 dias de infecção.

Notas: Em amarelo animais não infectados, em preto animais infectados com Pb18 e não tratados e em azul animais infectados com Pb18 e tratados com Itra 50mg/Kg. Significância de $p < 0,01$ (*), os resultados de todos os grupos estão expressos em média, teste utilizado Two-way ANOVA pós teste de Tukey.

Fonte: do autor

Além do teste de hipersensibilidade, esses animais foram submetidos a coleta de sangue com 15, 30, 60, 90 e 120 dias. O sangue desses animais foi utilizado para dosagem de IgG total contra *P. brasiliensis*. Com base no gráfico mostramos o perfil de produção de títulos de anticorpo do tipo IgG em animais infectados tratados com Itra e animais infectados e sem tratamento, onde mostra que a produção de IgG total é aumentada a partir de 30 dias de infecção, tendo seu pico de produção aos 60 dias, e depois a taxa de IgG começa a baixar. Sendo que animais infectados e não tratados possuem maiores títulos de IgG em comparação com animais infectados e tratados com Itra (FIGURA 36).

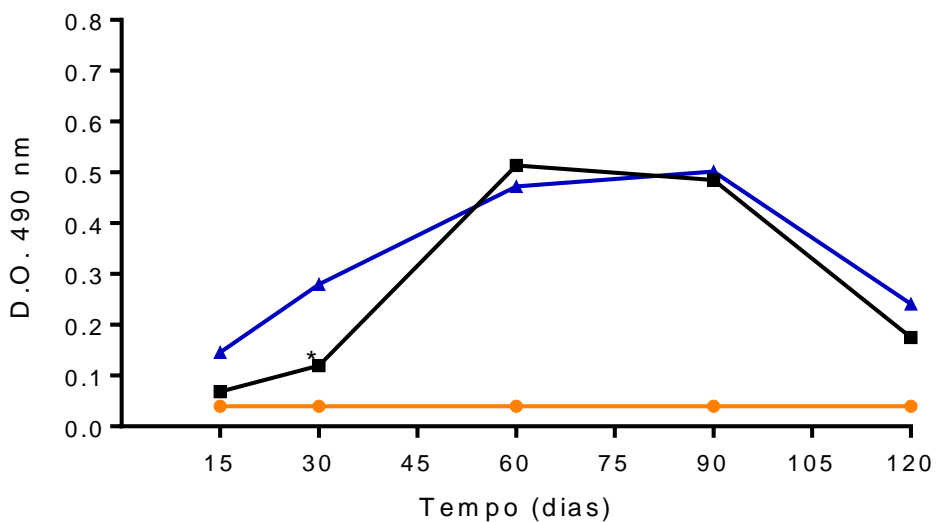


Figura 36- Título de anticorpos do tipo IgG Total em animais infectados por via intraperitoneal com *P. brasiliensis* durante 120 dias de infecção.

Notas: Em amarelo animais não infectados, em preto animais infectados com Pb18 e não tratados e em azul animais infectados com Pb18 e tratados com Itra 50mg/Kg. Significância de $p < 0,01$ (*), os resultados de todos os grupos estão expressos em média, teste utilizado Two-way ANOVA pós teste de Tukey.

Fonte: do autor

Para a pesagem de órgão, notamos diferenças estatísticas entre os animais não infectados e os animais tratados com Itraconazol, onde o baço, o pulmão e o fígado apresentaram um peso maior (FIGURA 37).

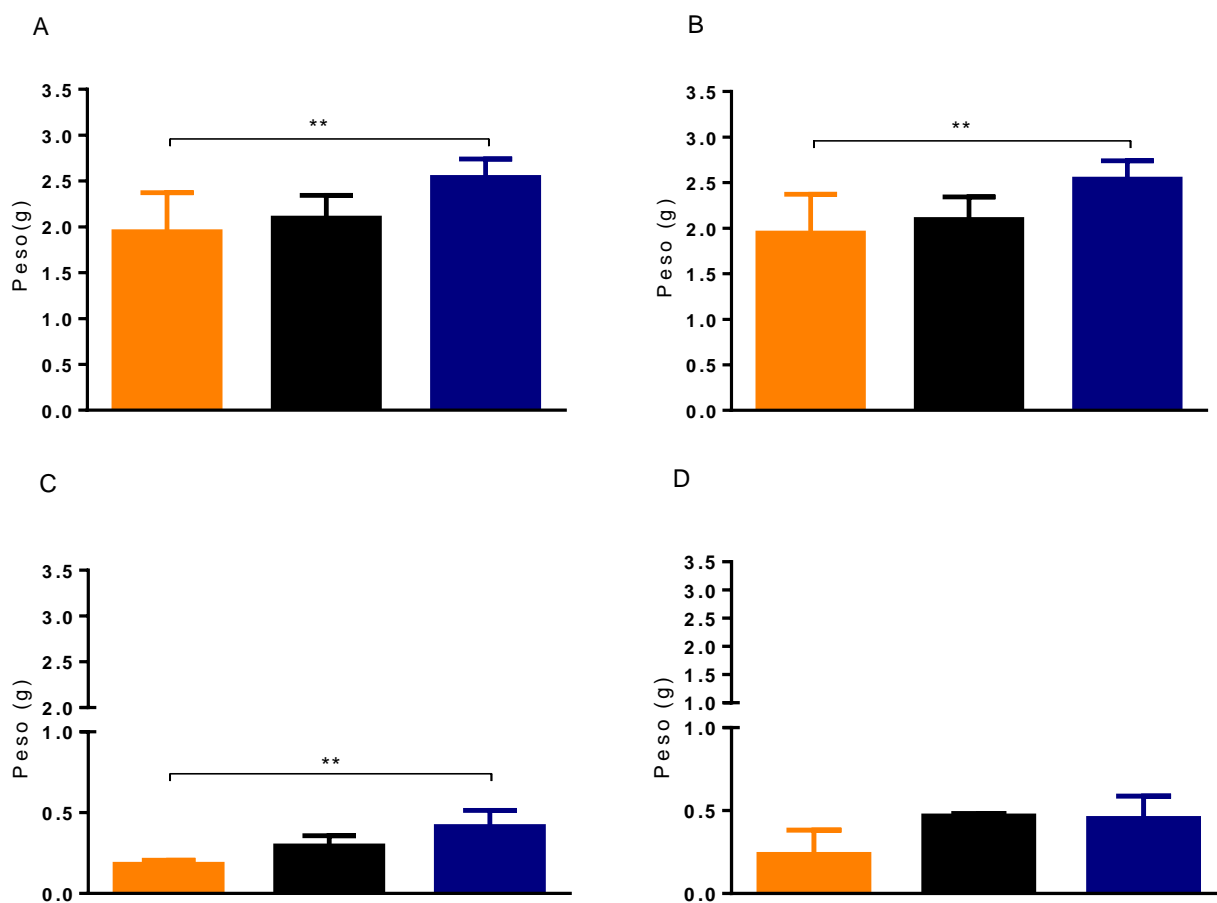


Figura 37- Peso dos órgãos de animais infectados com *P. brasiliensis* por via intraperitoneal após 120 dias de infecção. (A) Pulmões, (B) fígado, (C) baço e (D) epíplon.

Notas: Em amarelo animais não infectados, em preto animais infectados com Pb18 e não tratados e em azul animais infectados com Pb18 e tratados com Itra 50mg/Kg. Significância de $p < 0,05$ (**). Os resultados de todos os grupos foram expressos em média \pm desvio padrão. Teste One-way ANOVA pós teste de Tukey.

Fonte: do autor

Foi analisado também o diâmetro dos órgãos coletados, sendo que não foram notadas diferenças entre os grupos não infectados, os infectados e os infectados e tratados com 50mg/Kg de Itra. O único órgão que apresentou diferenças foi o fígado, onde os fígados dos animais infectados e tratados com Itra tiveram um pequeno aumento de diâmetro em relação aos animais saudáveis (FIGURA 38).

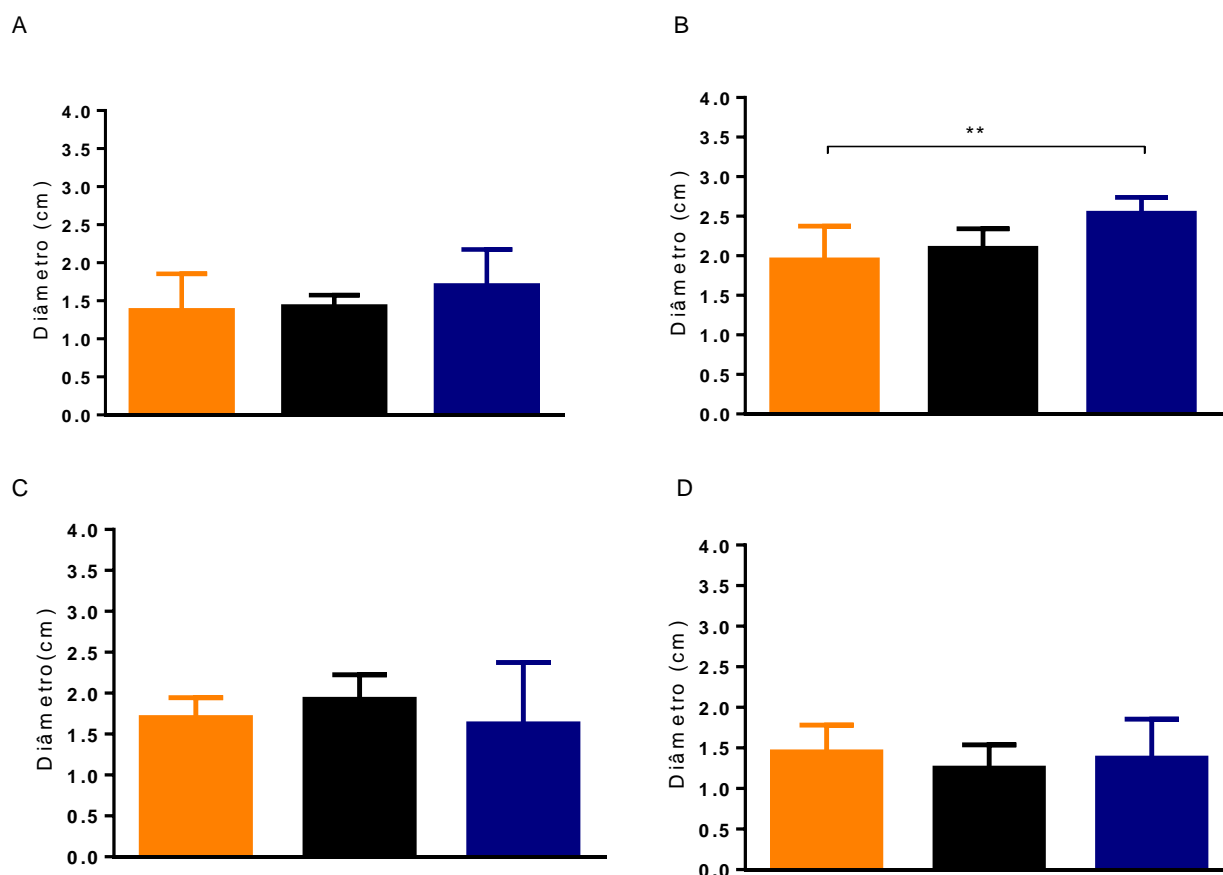


Figura 38- Diâmetro dos órgãos de animais infectados com *P. brasiliensis* por via intraperitoneal após 120 dias de infecção. (A) Pulmões, (B) fígado, (C) baço e (D) epíplon.

Notas: Em amarelo animais não infectados, em preto animais infectados com Pb18 e não tratados e em azul animais infectados com Pb18 e tratados com Itra 50mg/Kg. Significância de $p < 0,05$ (**). Os resultados de todos os grupos foram expressos em média \pm desvio padrão. Teste One-way ANOVA pós teste de Tukey.

Fonte: do autor

Os sobrenadantes de órgãos foram utilizados para análise da concentração de proteínas totais, concentração de NO e citocinas.

Desta forma foram realizadas as análises da concentração total de proteínas, sendo que, no baço e no fígado observa-se uma maior produção de proteínas totais em animais infectados e tratados com Itra, em comparação com os grupos não infectados e infectados e não tratados. No pulmão a produção de proteínas também é maior nos animais infectados e tratados em comparação com o não tratado e no epíplon a produção de proteínas é igual em todos os grupos (FIGURA 39).

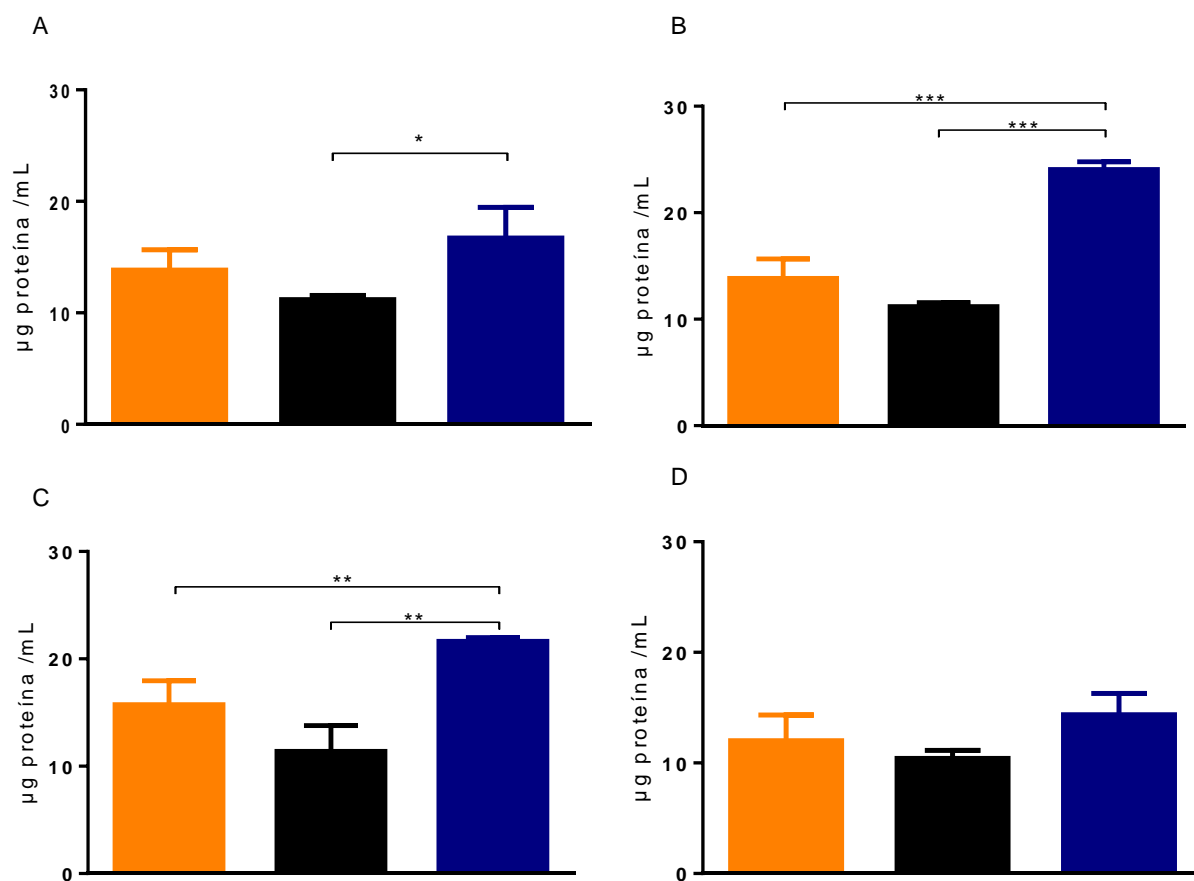


Figura 39- Concentração de proteínas totais em animais infectados com *P. brasiliensis* por via intraperitoneal após 120 dias de infecção. (A) Pulmões, (B) fígado, (C) baço e (D) epíplon.

Notas: Em amarelo animais não infectados, em preto animais infectados com Pb18 e não tratados e em azul animais infectados com Pb18 e tratados com Itra 50mg/Kg. Significância de $p < 0,001$ (***), $p < 0,05$ (**) e $p < 0,01$ (*). Os resultados de todos os grupos foram expressos em média \pm desvio padrão. Teste One-way ANOVA pós teste de Tukey.

Fonte: do autor

Com o sobrenadante de órgãos também foi realizada a concentração de óxido nítrico (NO) produzido no tecido, sendo que, no epíplon a produção de NO é maior em animais somente infectados e não tratados. No fígado a produção de NO é maior em animais não infectados. E no baço e pulmão a produção de NO é igual em todos os grupos experimentais (FIGURA 40).

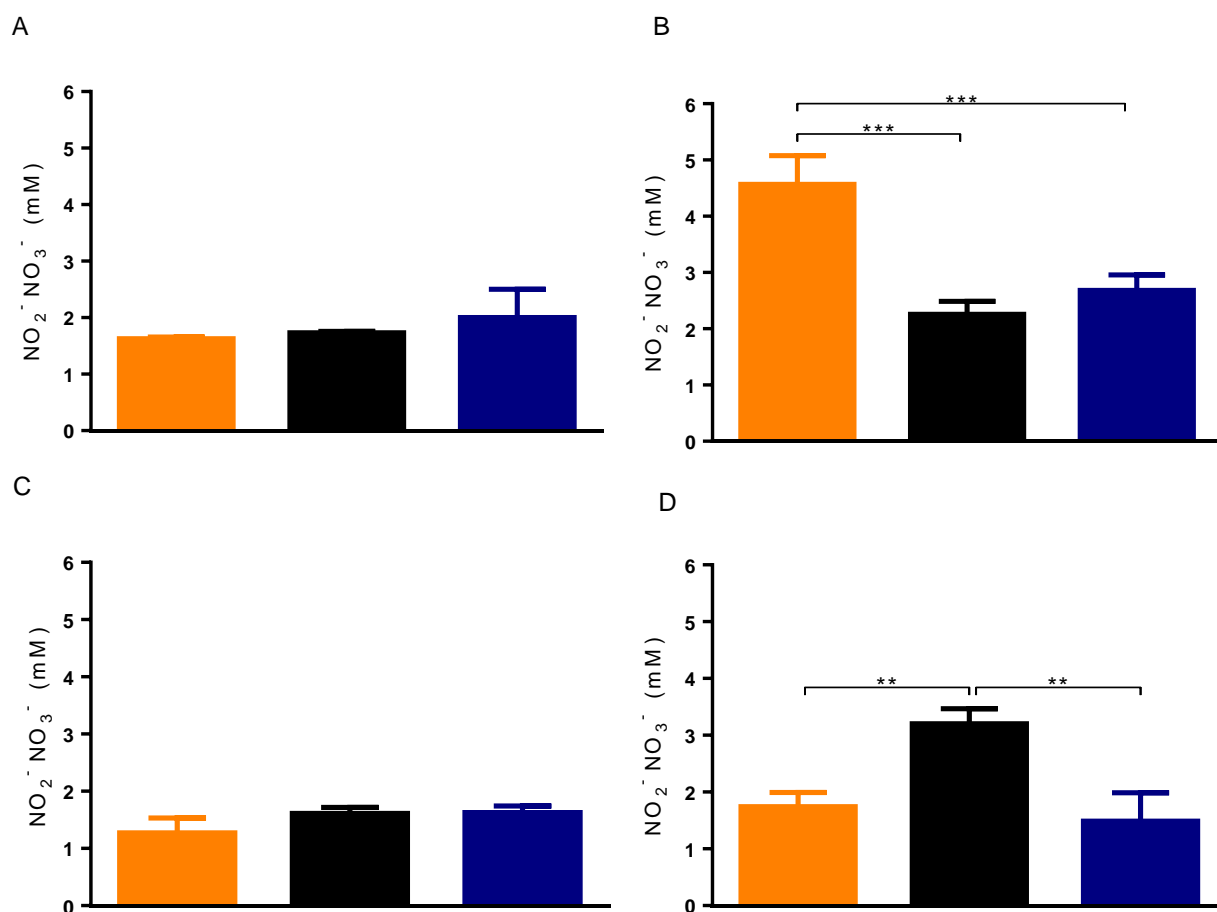


Figura 40- Concentração de Óxido Nítrico em animais infectados com *P. brasiliensis* por via intraperitoneal após 120 dias de infecção. (A) Pulmões, (B) fígado, (C) baço (C) e (D) epíplon.

Notas: Em amarelo animais não infectados, em preto animais infectados com Pb18 e não tratados e em azul animais infectados com Pb18 e tratados com Itra 50mg/Kg. Significância de $p < 0,001$ (***), $p < 0,05$ (**). Os resultados de todos os grupos foram expressos em média \pm desvio padrão. Teste One-way ANOVA pós teste de Tukey.

Fonte: do autor

Foram dosadas citocinas como GM-CSF, IL-17, IL-4 e IL-12 nos sobrenadantes dos órgãos coletados. Para GM-CSF com relação a infecção com Pb18 podemos perceber que o epíplon produz mais GM-CSF, por se tratar de um órgão de choque, nos demais órgãos a sua produção não se altera somente com a infecção. Quando utilizado o tratamento com Itra podemos perceber um aumento da produção de GM-CSF no fígado, e uma diminuição na produção no baço e epíplon, talvez indicando uma menor presença de fungo no órgão de choque (FIGURA 41).

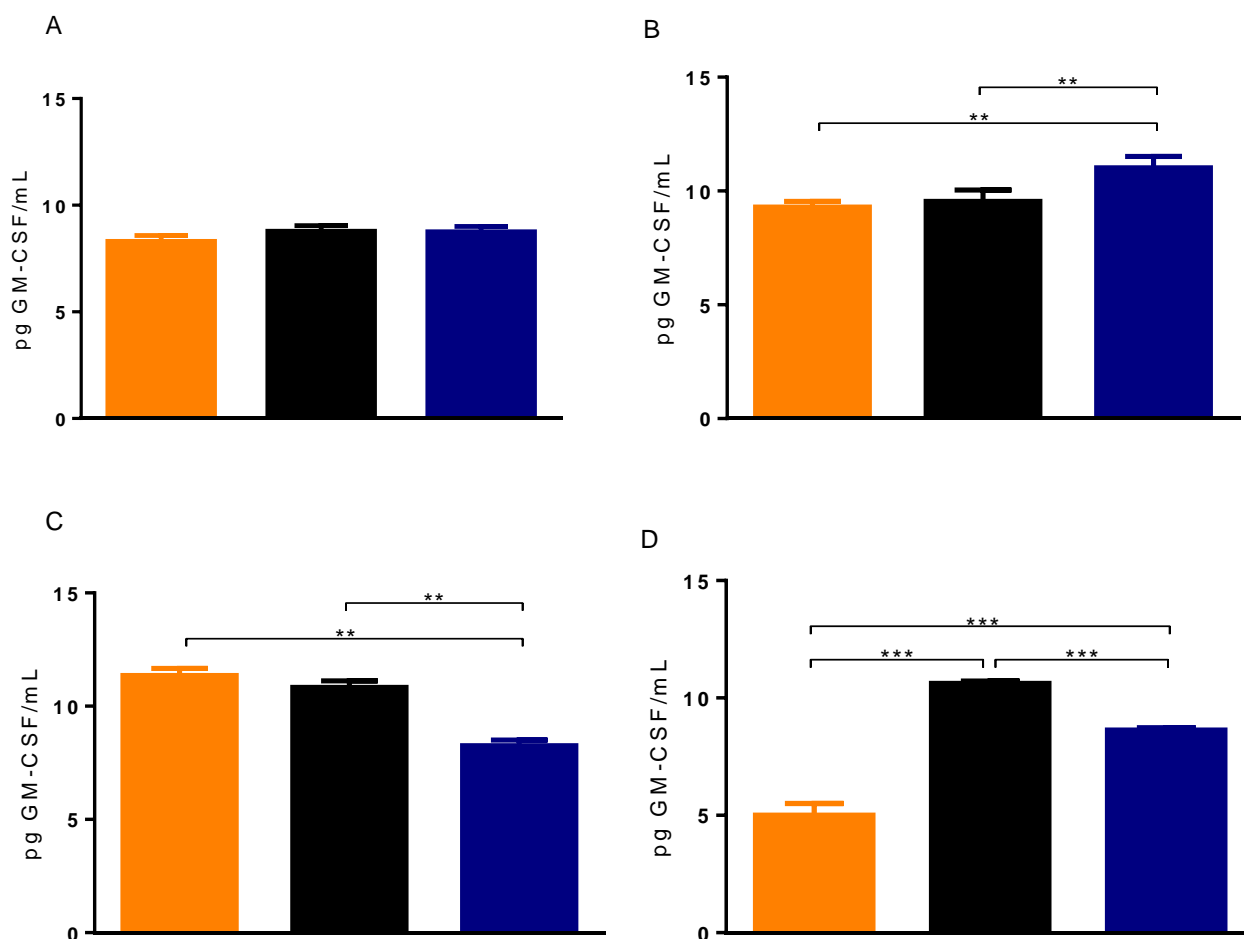


Figura 41- Concentração da citocina GM-CSF em animais infectados com *P. brasiliensis* por via intraperitoneal após 120 dias de infecção. (A) Pulmões, (B) fígado, (C) baço e (D) epíplon.

Notas: Em amarelo animais não infectados, em preto animais infectados com Pb18 e não tratados e em azul animais infectados com Pb18 e tratados com Itra 50mg/Kg. Significância de $p < 0,001$ (***) , $p < 0,05$ (**). Os resultados de todos os grupos foram expressos em média \pm desvio padrão. Teste One-way ANOVA pós teste de Tukey.

Fonte: do autor

Para IL-17, com relação a somente infecção pelo Pb18 temos que a produção de IL-17 é maior no epíplon e fígado, nos demais órgãos ela não se altera. Quando os animais são tratados pelo antifúngico, notamos uma diminuição da produção de IL-17 no baço, e nos demais órgãos ela se mantém (FIGURA 42).

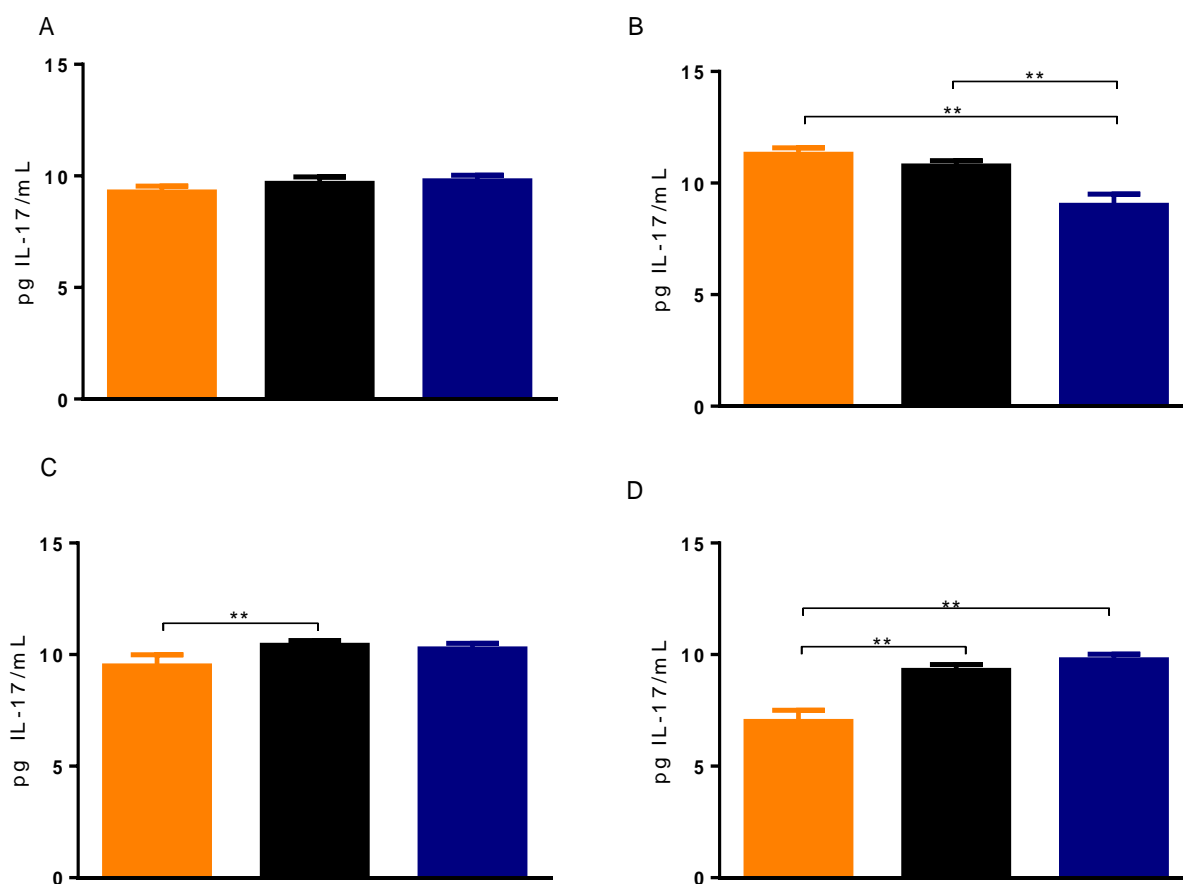


Figura 42- Concentração da citocina IL-17 em animais infectados com *P. brasiliensis* por via intraperitoneal após 120 dias de infecção. (A) Pulmões, (B) fígado, (C) baço e (D) epíplon.

Notas: Em amarelo animais não infectados, em preto animais infectados com Pb18 e não tratados e em azul animais infectados com Pb18 e tratados com Itra 50mg/Kg. Significância de $p < 0,05$ (**). Os resultados de todos os grupos foram expressos em média \pm desvio padrão. Teste One-way ANOVA pós teste de Tukey.

Fonte: do autor

IL-4 mostra-se sendo produzida em menor quantidade pelo órgão de choque na presença somente do Pb18. Quando utilizado a tratamento com o Itra a produção de IL-4 é aumentada no órgão de choque. IL-4 possui um aumento em sua produção no pulmão. E nos demais órgãos sua produção é diminuída com o tratamento com Itra (FIGURA 43).

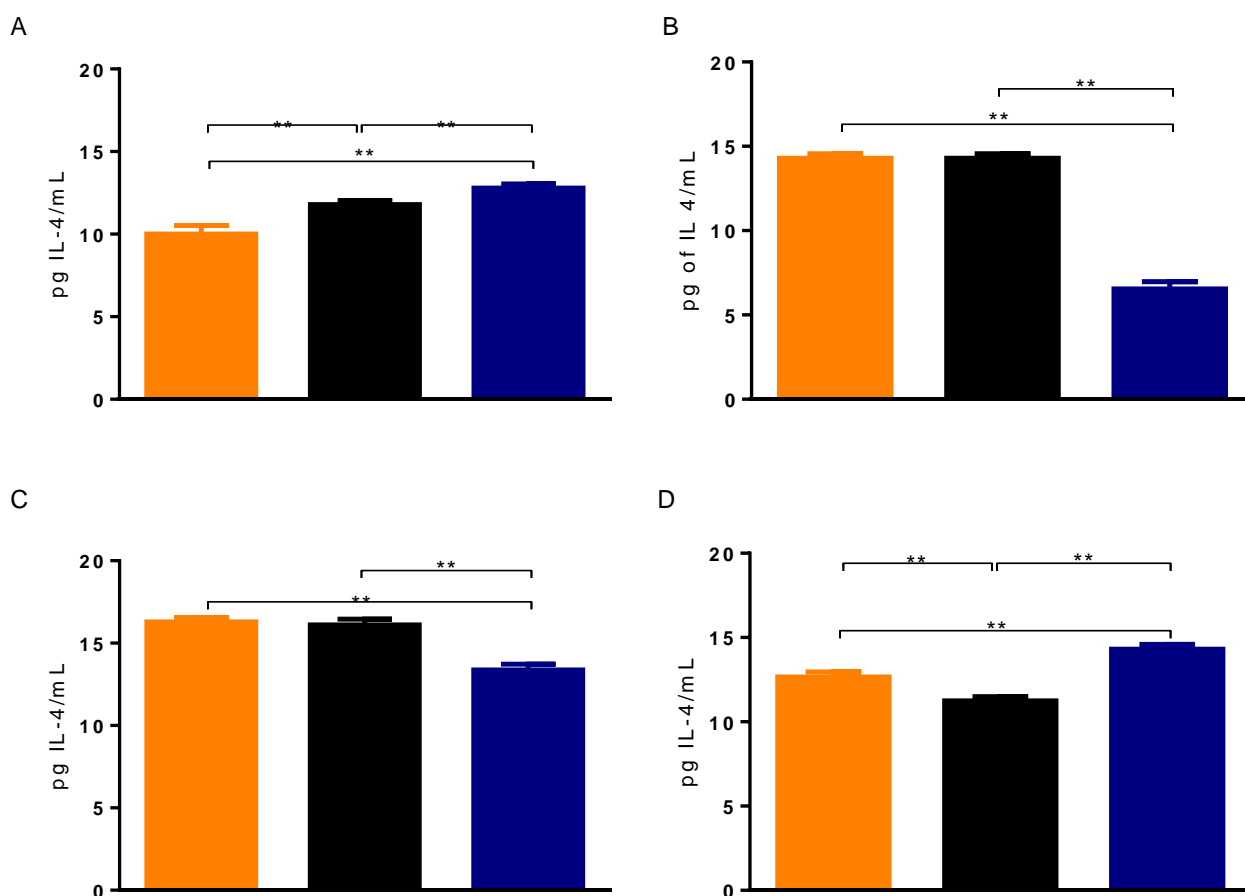


Figura 43- Concentração da citocina IL-4 em animais infectados com *P. brasiliensis* por via intraperitoneal após 120 dias de infecção. (A) Pulmões, (B) fígado, (C) baço e (D) epiplon.

Notas: Em amarelo animais não infectados, em preto animais infectados com Pb18 e não tratados e em azul animais infectados com Pb18 e tratados com Itra 50mg/Kg. Significância de $p < 0,05$ (**). Os resultados de todos os grupos foram expressos em média \pm desvio padrão. Teste One-way ANOVA pós teste de Tukey.

Fonte: do autor

A citocina IL-12 é produzida em maior quantidade pelo epiplon e pelo baço em animais infectados, e em menor quantidade no pulmão. Quando os animais são tratados pelo Itra temos um aumento da produção de IL-12 no pulmão e no fígado, sendo que no epiplon e baço ela se mantém igual com o tratamento (FIGURA 44).

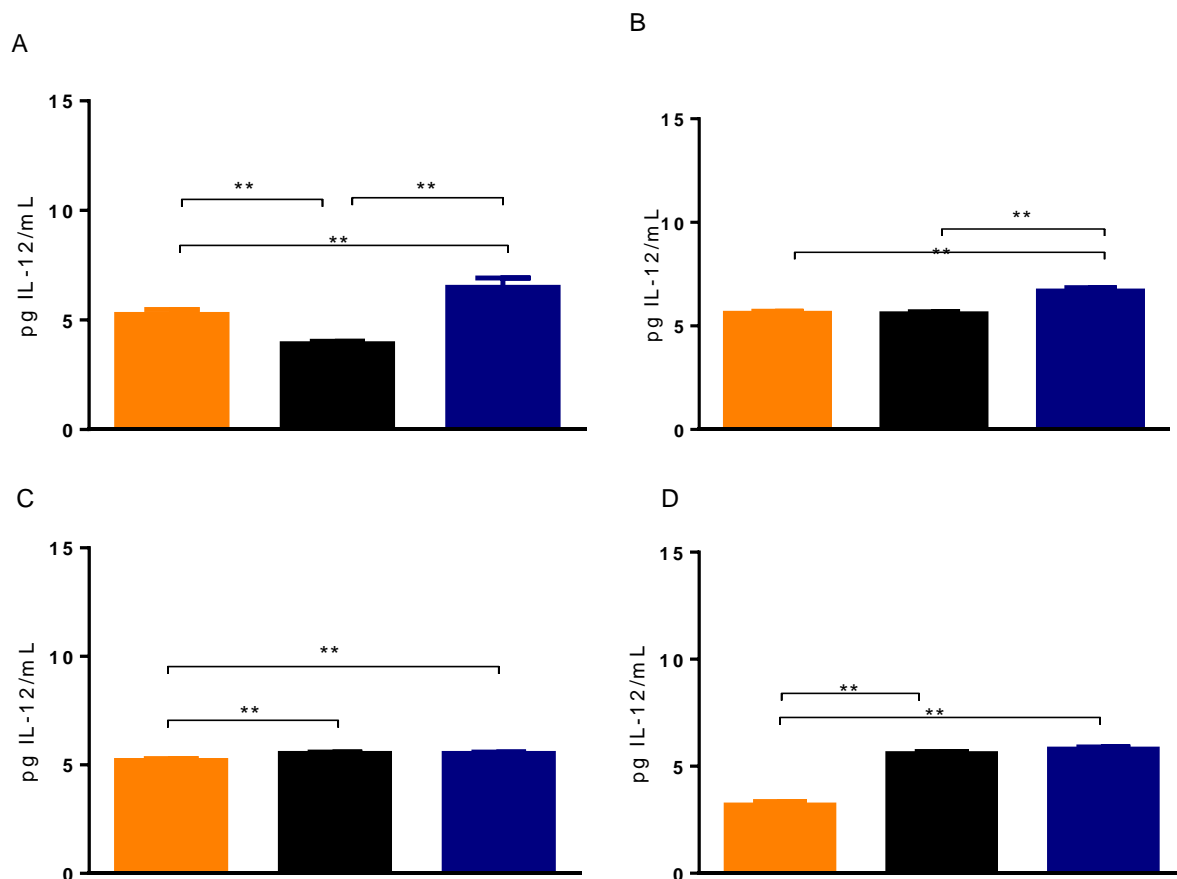


Figura 44- Concentração da citocina IL-12 em animais infectados com *P. brasiliensis* por via intraperitoneal após 120 dias de infecção. (A) Pulmões, (B) fígado, (C) baço e (D) epíplon.

Notas: Em amarelo animais não infectados, em preto animais infectados com Pb18 e não tratados e em azul animais infectados com Pb18 e tratados com Itra 50mg/Kg. Significância de $p < 0,05$ (**). Os resultados de todos os grupos foram expressos em média \pm desvio padrão. Teste One-way ANOVA pós teste de Tukey.

Fonte: do autor

Os resultados de dosagens de citocinas em órgãos, sugerem que as citocinas como GM-CSF e IL-17 são produzidas em grande quantidade pelos órgãos de choque, quando a infecção por *P. brasiliensis* é realizada pela via intraperitoneal. Desta forma podemos sugerir que exista uma grande proliferação de neutrófilos na região de infecção, pela presença de GM-CSF, IL-17 e também de IL-12, sendo que este último fato resultaria em ativação de resposta do tipo Th1.

Para a produção de KC (IL-8) temos que animais somente infectados com Pb18 aumentam a produção de KC em órgãos, quando os animais são tratados com a dose de 50mg/Kg de Itraconazol ocorre uma diminuição KC em órgãos como epíplon e baço, o que pode indicar uma menor quantidade de células inflamatórias no local, pois KC induz o aumento de PMNs no local da infecção. Temos um aumento de KC em animais órgãos de

animais somente infectados mostrando que o aumento desta citocina pode estar relacionado com a presença de PMNs nestes órgãos, característico em infecção por *P. brasiliensis*, onde estas células são a primeiras a serem recrutadas para conter a infecção.

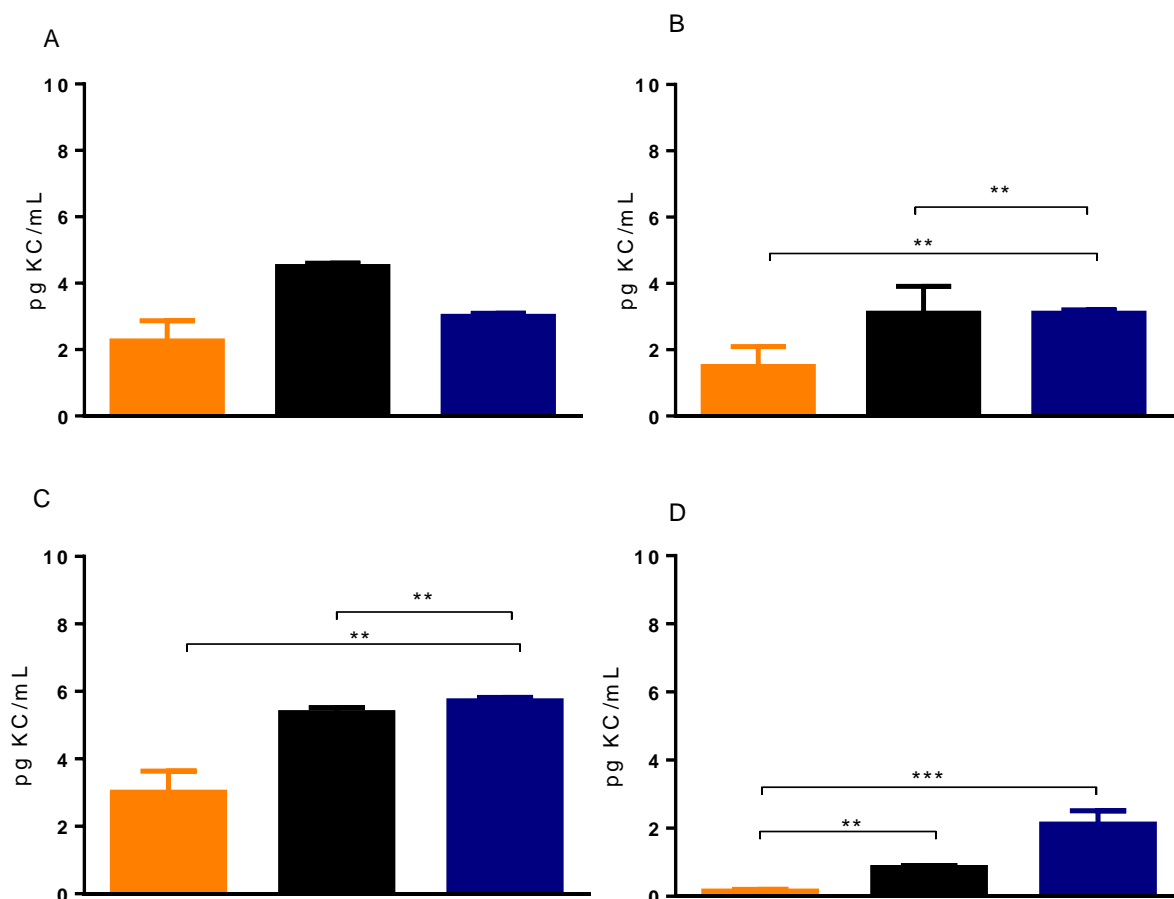


Figura 45- Concentração da citocina KC (IL-8) em animais infectados com *P. brasiliensis* por via intraperitoneal após 120 dias de infecção. (A) Pulmões, (B) fígado, (C) baço e (D) epíplon.

Notas: Em amarelo animais não infectados, em preto animais infectados com Pb18 e não tratados e em azul animais infectados com Pb18 e tratados com Itra 50mg/Kg. Significância de $p < 0,05$ (**) e $0,001$ (***). Os resultados de todos os grupos foram expressos em média \pm desvio padrão. Teste One-way ANOVA pós teste de Tukey.

Fonte: do autor

Tendo em vista que os órgãos de choque apresentam maiores alterações em relação a infecção intraperitoneal e tratamento, foi feita a análise histopatológica de visão geral de tecido do epíplon dos animais infectados, infectados e tratados e não infectados. Sendo que no epíplon de animais infectados e não tratados nota-se moderada quantidade de células fúngicas com morfologia preservada, presença de congestão vascular entremeio aos adipócitos, as células mesoteliais apresentam-se em cordões espaçados e a presença de vasos distribuídos pelo tecido e moderada presença de granulomas. Nos animais infectados e tratados com Itra nota-se pouca quantidade de células fúngicas com morfologia preservada,

os adipócitos e a células mesoteliais apresenta-se com padrões celulares definidos e normais, há pouca quantidade de granuloma. Nos animais saudáveis a morfologia tecidual apresentou-se dentro dos padrões de normalidade (FIGURA 46).

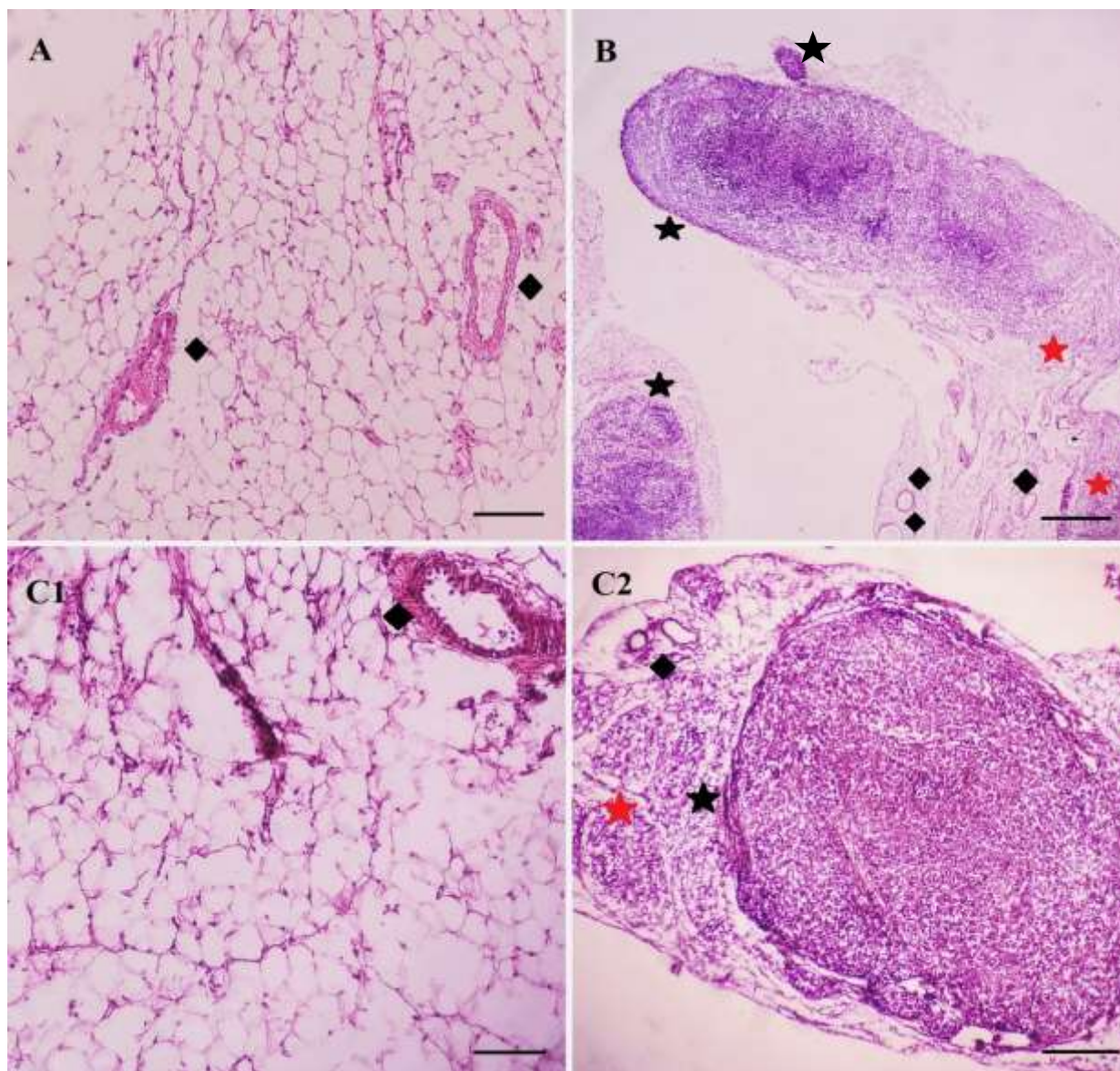


Figura 46- Fotomiografias de epíplon de animais não infectados e infectados com *P. brasiliensis* e infectados e tratados com Itraconazol. (A) animal não infectado e não tratado (objetiva de 40 x), (B) animal infectado com Pb18 (Objetiva de 5X). (C1 e C2) animal infectado e tratado com Itra 50 mg/Kg (objetiva de 40 x) e barras indicam 50µm.

Notas: As estrelas em preto indicam a presença de granuloma, já as estrelas em vermelho significam a presença de processo inflamatório. O losango indica a presença vasos sanguíneos. Microscopia de campo claro, coloração de hematoxilina-eosina.

Fonte: do autor

5.4.1 Conclusões sobre os resultados da infecção Intraperitoneal

Os resultados apresentados com relação a infecção com *P. brasiliensis* por via intraperitoneal possibilitaram avaliar o tratamento com a dosagem mais concentrada de Itraconazol. Assim pode-se perceber que camundongos infectados e tratados com 50mg/Kg durante 120 dias, apresentaram maiores taxas de sobrevivência em comparação ao grupo não tratado, tiveram menores índices de reatividade à paracoccidina, e menores títulos de anticorpos do tipo IgG total em comparação com os animais não tratados. Com relação à análise dos órgãos, tivemos um aumento de proteínas quando os animais foram tratados, uma diminuição na produção de NO, mostrando uma menor ativação de metabólitos oxidativos em comparação com animais infectados e não tratados.

Foi visto o aumento de algumas citocinas em epíplon (órgão de choque em modelo intraperitoneal de infecção murina por Pb18), como IL-17, IL-4, IL-12 e KC. O que nos mostra que o epíplon é o órgão onde o fungo tem mais afinidade, e onde a infecção por via intraperitoneal é realizada, sendo um órgão onde o afluxo de células inflamatórias deve ser maior para conter a infecção pelo fungo.

6 DISCUSSÃO

A paracoccidiodomicose é uma micose sistêmica que possui um difícil e longo tratamento que consiste em uso de antifúngicos específicos por um período de no mínimo 6 meses, podendo se estender dependendo da gravidade das formas clínicas da doença e estado imunológico do paciente. O padrão “ouro” até o momento no tratamento da PCM é o uso do antifúngico Itraconazol, que é utilizado na dosagem de 200mg/mL em pacientes adultos durante 9-18 meses de tratamento, por apresentar efeitos colaterais mais brandos e ser mais eficaz na cura da doença (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

O estado imunológico do paciente é de extrema importância para contenção da infecção por *P. brasiliensis*, sendo que os PMNs possuem papel chave no controle da infecção pelo fungo, especialmente nos estágios iniciais da PCM (ACORCI-VALERIO et al., 2010). O uso da laserterapia de baixa potência pode estimular a inflamação em algumas circunstâncias, mas também é frequentemente utilizada para reduzir uma resposta inflamatória. Estudos utilizando diversos modelos de inflamação aguda apresentam uma diminuição na formação de edema (MENEGUZZO et al., 2013) e um declínio na migração de PMN após tratamento com LLLT (LIMA et al., 2011). Burger et al. (2015) demonstraram que o uso do LLLT em camundongos infectados por *P. brasiliensis* foi capaz causar um aumento da capacidade fungicida e também permitiu recrutar PMN mais ativos, capazes de combater a cepa altamente virulenta (Pb18).

Em nosso estudo, o Itraconazol foi utilizado para o tratamento da PCM em dosagens mais concentradas, juntamente com o uso do LASER de baixa potência. Podendo tornar a resposta imune ao *P. brasiliensis* mais efetiva.

Testou-se 3 concentrações distintas do antifúngico Itraconazol em modelo experimental da PCM. Sendo escolhida uma dose de 3mg/Kg, dose que corresponde a dose de uso no tratamento da PCM extrapolada para o modelo animal, uma dose intermediária de 10mg/Kg, e uma dose alta de 50mg/Kg. Primeiramente foram feitos ensaios “in vitro” para depois passarmos a utiliza-las em modelo animal. Resultados de concentração inibitória mínima da droga foi realizada em cultura de *P. brasiliensis* em meio Fava Netto (FAVA NETTO, 1955). A atividade fungicida do Itraconazol é maior conforme o aumento da dosagem de Itra, mostrando maior a atividade antifúngica, e menor quantidade de unidades formadoras de colônia. Desta forma, podemos afirmar que a concentração maior, tem maior atividade fungicida contra a cepa virulenta do *P. brasiliensis* (Pb18).

Testes em culturas de células com esplenócitos de camundongos saudáveis mostraram que o antifúngico não é tóxico para células, mesmo na concentração mais alta de Itra. Os esplenócitos foram cultivados com Pb18 e com as concentrações de Itra, onde as células somente cultivadas com o Pb18 mostraram uma maior viabilidade do fungo em comparação quando em contato com as diferentes concentrações de Itra.

Cunha-Azevedo et al. (2011) mostraram a eficácia do Itraconazol por meio da determinação da concentração inibitória mínima em cultura de *P. brasiliensis*, igualmente demonstrado pelos nossos resultados “in vitro”. Em cultura de macrófagos Benkoo et al. (1999) mostraram a toxicidade do antifúngicos incluindo o Itra, onde mostram que a droga teve efeito antifúngico na dosagem padrão utilizada para tratamento de micoses. O Itraconazol vem sendo utilizado como uma droga de amplo espectro na medicina, sendo utilizado para tratamento de diversas doenças e em diferentes concentrações (de até 800mg/mL) (WANG et al, 2017). Seu uso vem sendo descrito para o tratamento de câncer, onde são utilizadas altas dosagens de Itraconazol sendo capaz proporcionar uma atividade anticancerígena (CHOI et al., 2017).

Os resultados “in vitro” mostraram que o Itraconazol pode ser administrado em doses mais concentradas, por possuir uma boa resposta antifúngica e não apresentar toxicidade celular. Desta forma o Itraconazol foi utilizado no tratamento em infecção por *P. brasiliensis* (Pb18) subcutânea nas concentrações de 3, 10 e 50mg/Kg.

As células obtidas por meio da infecção “air pouch” mostraram que a composição do exsudato celular na bolsa de ar não foi alterada pela terapia antifúngica com qualquer concentração de Itra empregada, onde 75% das células coletadas são PMNs. O número absoluto de células no local da infecção diminui significativamente quando utilizado o tratamento com Itra, mostrando um menor afluxo de células para o local da infecção. Os tratamentos não apresentaram efeitos adversos na viabilidade celular, sendo sempre superior a 70%, e a viabilidade celular após o tratamento com Itra na concentração de 50mg/Kg foi significativamente maior do que os outros tratamentos, sugerindo que a diminuição no número de Pb viável resultou no aumento da viabilidade celular. A atividade mitocondrial das células é menor com o tratamento com Itra, sendo que na concentração de 50mg/Kg ela é ainda menor, o que pode estar relacionado com a diminuição de fungos no local da infecção e, portanto, não ativação de células imunes (FIGURA 14). Com relação a produção de metabólitos do oxigênio temos que NO foi produzido em menor quantidade na concentração menor de Itra, e EROs foi produzido em grande quantidade pela concentração intermediária,

sendo que o Itra aumenta a produção de EROs em todas as concentrações testadas. A concentração intermediária também aumentou a produção de proteínas totais.

Com relação as citocinas pró inflamatórias podemos destacar uma maior produção de IL-17 após às 18h quando tratados com a concentração mais alta de Itra. Uma maior produção de GM-CSF, TNF- α e INF- γ pelos animais infectados. Para as inibitórias de PMNs, a produção de IL-4 e IL-10 é maior em animais infectados, sendo que IL-10 possui um aumento da produção às 6h em animais tratados.

Burger et al. (2015) apresentam resultados semelhantes aos descritos aqui com relação à composição celular das “air pouch”, sendo que o perfil de migração para o local da infecção é semelhante mesmo com o uso do antifúngico, onde a maioria das células são neutrófilos. O uso de Itraconazol tem como objetivo a ação fungicida no local da infecção, com base nos resultados apresentados aqui podemos dizer que conforme o aumento da concentração essa atividade fungicida é maior, onde temos um afluxo menor de células para o local da infecção, porém temos maior viabilidade dessas células, que por sua vez estão menos ativadas pelo fato do próprio antifúngico conter a infecção, desta forma o perfil de citocinas no local da infecção também tende mostrar isso, onde temos uma menor ativação de citocinas estimulatórias de PMNs em animais tratados, e uma maior produção quando somente infectados.

As manifestações clínicas mais graves na PCM estão relacionadas ao perfil de resposta Th2, onde ocorre uma depressão de resposta do tipo celular, diminuindo a síntese de citocinas de padrão Th1 como IL-2, IFN-gama e IL-12, e aumento dos níveis de IL-4, IL-5 e IL-10 desencadeando uma resposta imune não protetora ao hospedeiro (MAMONI; BLOTTA, 2006).

PMNs são estimulados pela produção das citocinas IFN- γ , TNF- α , GM-CSF e IL-15, além disso citocinas como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e TNF- α são capazes de promoverem respostas inflamatórias contra *P. brasiliensis* (PAGLIARI, SOTTO; 2003). Puerta-Arias et al. (2018), mostrou que o uso de Itra em animais infectados com *P. brasiliensis* diminuiu a expressão de IL-17, IL-10 e TNF- α , diminuindo a resposta inflamatória, semelhante ao que observamos em nosso estudo.

Considerando que o controle do dano tecidual está diretamente relacionado a uma resposta imune regulatória, observamos um aumento em quase todas as citocinas testadas quando os animais são irradiados. Desta forma podemos sugerir que as citocinas podem estar ativando o processo de diferenciação de fibroblastos em fibrócitos e contribuindo para a presença de fibrose tecidual. Estudos anteriores descrevem que a LLLT pode atuar no

processo de cicatrização precisamente, estimulando a migração de células como queratinócitos, permitindo assim uma organização da matriz extracelular, produção de colágeno e metaloproteinase-2 MMP-2 (FERREIRA et al., 2009). Também foi relatado que os fibroblastos expostos ao LLLT foram capazes de modular a secreção de algumas citocinas, incluindo IL-1 β e aumentar os níveis de IL-10 (SZEZERBATY et al., 2018).

Os parâmetros macroscópicos da “air pouch” mostraram uma relação de dose-resposta, onde o tamanho diminuiu conforme a concentração de Itra administrada. Os parâmetros de microscopia indicam uma menor quantidade de inflamação e um maior perfil de cicatrização nas “air pouch” conforme o aumento das concentrações, simultaneamente com uma diminuição de números de fungo no local da infecção. Tais dados mostram um perfil de cura da infecção na “air pouch”.

A intensa resposta inflamatória por *P. brasiliensis* apesar de controlar a disseminação do fungo, é a principal causa de dano tecidual associado ao desenvolvimento de paracoccidiodomicose (TAVARES et al., 2007). O LLLT foi capaz de recrutar células mais ativas e mostrou uma remodelação patológica da “air pouch”, além disso, a LLLT permitiu uma melhora no dano tecidual, onde foi observado menores danos histológicos e esteriológicos e uma maior organização tecidual. Também foi observado a presença de fungos com morfologia alterada e presença de vasos, sugerindo uma maior adaptação tecidual nos grupos tratados com diferentes concentrações de Itra e com a associação da laserterapia.

Puerta-Arias et al. (2018) mostrou que o uso do Itraconazol diminuiu a resposta inflamatória e a fibrose tecidual, resultados semelhantes aos encontrados nas “air pouch” onde temos uma diminuição de fibroblastos no local.

Quando utilizado o tratamento simultâneo de Itra e LASER, percebemos que a laserterapia de baixa potência potencializa a ação do antifúngico, onde ocorre um aumento de viabilidade em relação as concentrações e as concentrações com LLLT, temos uma diminuição de atividade mitocondrial das células da “air pouch” quando associado ao Itra. A produção de EROs e proteínas totais são aumentadas, tanto com o uso da LLLT sozinha ou associada ao Itra. A produção de citocinas estimulatórias a LLLT aumenta a produção de GM-CSF, IFN- γ , TNF- α , e quando associado ao Itra diminui. IL-17 e IL12 aumenta em associação de LLLT e Itra. Já as citocinas inibitórias são aumentadas com o uso somente da LLLT e diminuem com a associação ao Itra. Macroscopicamente o LLLT diminuiu a “air pouch”, onde temos uma diminuição de inflamação no local e maior cicatrização que é mais acentuada com o uso associado da LLLT e Itra, sozinha a LLLT não foi capaz de diminuir

o número de fungos no local da infecção, mais associada ao Itra ela aumenta a capacidade fungicida do fármaco.

O perfil celular no exsudato de células provenientes de “air pouch” foi semelhante aos dados descritos por Burger et al. (2015), onde neutrófilos obtidos após infecção com Pb18, apresentaram atividade mitocondrial aumentada quando receberam tratamento com LLLT. Outros autores demonstraram que a LLLT possui efeitos sobre o aumento de atividade mitocondrial (HU et al.; 2007), e que este aumento está relacionado a liberação de fatores de crescimento e citocinas (GAO; XING; 2009). Em Cerdeira et al. 2016, demonstram o uso da LLLT em neutrófilos humanos incubados com *Candida albicans*, no qual obtiveram um aumento da síntese de EROs e aumento da capacidade fungicida de PMNs quando estimulados por LLLT.

Observamos que em animais irradiados a quantidade de óxido nítrico foi menor em comparação aos animais não irradiados. A quantidade de óxido nítrico foi medida logo após a coleta das células da “air pouch”, considerando que a meia-vida do NO é curta (COLEMAN, 2001). A baixa quantidade de óxido nítrico no grupo de animais irradiados pode ser explicada pela alteração do perfil celular, ou seja, há uma redução na quantidade de monócitos, fato que pode estar contribuindo para diminuição na produção de NO. Os monócitos são células importantes na resposta imune, pois ativam citocinas inflamatórias, também são precursores de macrófagos teciduais que produzem quantidades significativas de NO (CENCI et al., 1993). Nascimento et al. (2002) descreve que o NO derivado da iNOS são essenciais para a resistência à paracoccidiodomicose, mas a alta produção contínua de NO pode estar associada à suscetibilidade a doença.

Wagner et al. (2016), mostrou que a laserterapia pode aumentar os níveis teciduais de citocinas como IL-1 β e TNF- α . Já Peat et al. (2018) notou um aumento de produção de IL-10 quando utilizado a LLLT. A laserterapia de baixa potência é tratamento novo, onde ainda pouco se sabe sobre sua associação com outros medicamentos. Ela induz uma resposta inflamatória como pode ser visto pela ativação celular e produção de níveis mais altos de citocina estimulatórias, confirmando dados mostrados por Burger et al. (2015), onde a LLLT promove a ativação de PMNs. Quando associado ao Itra ocorre uma diminuição da resposta inflamatória no local da infecção, onde temos ativação de células por meio da produção de EROs e proteínas, mais a produção de citocinas é mais branda, mostrando um perfil de cura da infecção por *P. brasiliensis*.

Estudos mostram que o LLLT é capaz de modular alguns genes responsáveis pelo processo de cicatrização de feridas na pele e “in vitro” de regular a síntese de proteínas que

regulam a expressão gênica de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em fibroblastos (MIGLIARIO et al., 2018). A LLLT macroscopicamente diminui à “air pouch”, há também uma diminuição da inflamação e maior cicatrização no local da infecção, além de diminuir a formação de unidades formadoras de colônias (CFU), microscopicamente temos um grande número de fungos no local da infecção, mas com morfologia menos preservada em comparação aos animais somente infectados.

Com o tratamento sistêmico do Itraconazol na maior dosagem em animais infectados intraperitonealmente com Pb18, percebemos que os animais da linhagem *Swiss* utilizados no presente estudo manifestam um perfil de infecção compatível com animais de linhagens resistentes (A/J) a *P. brasiliensis* (CALICH, VAZ, BURGER, 1998). Onde a sobrevivência desses animais é alta, cerca de 80%, além de apresentarem um perfil de resposta de títulos de IgG e hipersensibilidade tardia (HTT) semelhantes aos animais resistentes ao Pb18, onde ocorre um aumento na produção de IgG e HTT após 30 dias de infecção, que se mantém até os 90 dias (XIDIEH et al.;1994). Os animais tratados produzem títulos de anticorpos um pouco inferiores aos animais não tratados (SINGER-VERMES et al., 1992).

O peso desses animais aumenta com a infecção, este aumento sendo um pouco menor em animais tratados, isso é refletido no peso e tamanho de órgãos, onde animais infectados possuem alguns órgãos aumentados em relação ao grupo controle, provavelmente devido a presença de inflamação e edema provenientes da infecção fúngica. Animais tratados com Itra produzem mais proteínas e NO em comparação com os animais não tratados.

Órgãos de choque como epíplon e fígado produzem maiores quantidades de citocinas estimulatórias de PMNs como GM-CSF e IL-17 e menores quantidades de citocinas inibitórias como IL-4. Quando tratados com Itra a produção de GM-CSF e IL-17 é diminuída, e temos o aumento de IL-12 em pulmão e fígado. Assim, caracteriza-se por uma diminuição da inflamação nos órgãos de choque quando os animais são tratados.

Xidieh et al. (1994) relatam características de intensidade das lesões fúngicas microscópicas observadas na região referente aos órgãos de choque na infecção intraperitoneal em camundongos suscetíveis e resistentes estavam relacionados ao seu grau de resistência ao *P. brasiliensis* e correlacionam estes resultados com a taxa de mortalidade dos animais, que também foram observadas em uma fase inicial da doença. Dados apresentados aqui, indicam uma diminuição da carga fúngica em órgãos de choque quando os animais são tratados com Itra, mostrados por imagens de epíplon de animais infectados e de animais infectados e tratados, e perfil de citocinas inflamatórias diminuído quando

tratados com antifúngico, o que podemos correlacionar com os óbitos no grupo infectado nos primeiros 30 dias de infecção.

Naranjo et al. (2010) mostraram que o tratamento com Itraconazol diminui carga fúngica, e níveis de citocinas pró inflamatórias como IL-1 β e TNF- α , onde encontraram uma diminuição na resposta inflamatória pulmonar, além de uma mudança no perfil de células encontradas com uma significativa redução da proporção de PMNs. Resultados apresentados em nosso estudo com relação a infecções em “air pouch” e intraperitoneal mostram uma diminuição do perfil de resposta inflamatória pela queda na produção de citocinas como GM-CSF, INF- γ , TNF- α e IL-17, ao mesmo tempo em que temos uma menor quantidade de fungos na lesão, uma menor inflamação tecidual e um aumento na presença de células cicatriciais.

Nosso estudo demonstra pela primeira vez o uso de Itraconazol em modelo subcutâneo “air pouch” da paracoccidiomicose, e sua relação entre concentração e resposta, e o uso deste antifúngico associado a Laserterapia de baixa potência. Com base nos resultados aqui apresentados, podemos afirmar que o uso do Itra em dosagem mais elevada não apresenta toxicidade celular, podendo ser administrado por via oral. O uso em forma concentrada do Itra apresentou resultados mais efetivos contra a forma virulenta do *P. brasiliensis*, apresentando um potencial fungicida mais potente, uma resposta inflamatória ao fungo mais controlada e perfil de cicatrização de lesão mais avançado. A LLLT apresentou atividade como adjuvante no tratamento contra a PCM experimental, mostrando efeitos como potencializador da ação do antifúngico, sendo que o uso do Itra na maior concentração, associado a LLLT mostrou um potencial fungicida mais efetivo.

O uso do Itraconazol mais concentrado apresentou bons resultados quando utilizado por via oral, diminuindo o perfil de inflamação em órgãos de choque, além de uma diminuição de títulos de anticorpos específicos contra o *P. brasiliensis*, sugerindo controle da infecção.

7 CONCLUSÕES

Neste trabalho, demonstramos que o antifúngico Itraconazol é fungicida para *P. brasiliensis*. A concentração mais elevada da droga proporcionou uma maior atividade fungicida sobre a cepa virulenta Pb18, comprovado pelos resultados de concentração inibitória mínima. O Itraconazol não provoca efeitos tóxicos nas células do hospedeiro, conforme demonstramos pelos resultados de índice de toxicidade em cultivo de esplenócitos. Desta forma, a droga antifúngica Itraconazol é a responsável pela morte do fungo, conforme mostrado pelo cultivo de esplenócitos juntamente com Pb18 e em contato com as 3 concentrações de Itraconazol.

A concentração de 50mg/Kg é mais efetiva no tratamento da PCM experimental, atuando como fungicida contra Pb18 e promovendo menor resposta inflamatória local. O Itraconazol possui atividade como desativador de células inflamatórias atraídas para o local da infecção, quando temos uma menor produção de citocinas inflamatórias KC, INF- γ , TNF- α , IL-10, GM-CSF, e IL-4 .

Nossos resultados permitiram demonstrar que a LLLT possui um papel ativador de PMNs, promovendo o aumento da atividade mitocondrial, produção de EROs, NO e de proteínas. Também possui efeito ativador de citocinas inflamatórias como KC, INF- γ , TNF- α , IL-10, GM-CSF, e IL-4. A LLLT confere maior potencial fungicida aos neutrófilos, efeitos em conjunto resultando em uma maior resolução da infecção causada pela cepa virulenta Pb18. Desta forma, mostramos que o LLLT administrado juntamente com o Itraconazol, atua como uma terapia adjuvante no tratamento da PCM experimental, potencializando a ação do fármaco no local da infecção. Estes nossos resultados sobre o efeito do composto Itraconazol no próprio local da infecção são inéditos.

A administração de Itraconazol concentração de 50mg/Kg por via oral resultou em uma taxa de sobrevivência de 100% durante os 120 de infecção por *P. brasiliensis* comparado a a taxa de 80% em camundongos não tratados. Animais tratados com esta concentração da droga tiveram menores índices de HTT e menores títulos de IgG em comparação aos animais não tratados. A produção das citocinas KC, IL-10, GM-CSF, IL-4 e IL-12 foi maior no órgão de choque de camundongos infectados por via intraperitoneal em comparação com animais não infectados, sendo caracterizado por um aumento de células inflamatórias no local da infecção.

Finalmente, nosso trabalho esclareceu alguns dos mecanismos de proteção do antifúngico Itraconazol, além de propor uma terapia combinada empregando este composto azólico em laserterapia.

REFERÊNCIAS

- ACORCI, M. J.; et al. Inhibition of human neutrophil apoptosis by *Paracoccidioides brasiliensis*: role of interleukin-8. **Scand J Immunol.** v. 69, p. 73-79. 2009.
- BABIOR, B. M.; The respiratory burst of phagocytes. **J Clin Invest.** v. 73, n. 3, p. 599-601. 1984.
- BACHIEGA, T. F. et al. Participation of dectin-1 receptor on NETs release against *Paracoccidioides brasiliensis*: Role on extracellular killing. **Immunobiology**, v. 221, p. 228–235, 2016.
- BAGAGLI, E. et al. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathologia**, v.165, n. 4, p. 97-207, 2008.
- BARRAVIERA, B.; et al.; Evaluation of acetylator phenotype, renal function and serum sulfadiazine levels in patients with paracoccidioidomycosis treated with cotrimazine (a combination of sulfadiazine and trimethoprim). **Mycopathologia**, v.108, p. 107-12, 1989.
- BENARD, G.; An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 165, p.209-21, 2008.
- BENKOO, I.; et al.; Comparison of the toxicity of fluconazole and other azole antifungal drugs to murine and human granulocyte -macrophage progenitor cells *in vitro*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 43, n. 5, p. 675–681, 1999.
- BELAMBRI, S. A. et al.; NADPH oxidase activation in neutrophils: Role of the phosphorylation of its subunits. **Eur J Clin Invest.**, v. 48, n. 2, 2018.
- BIAGIONI, L. M. V, et al.; Imunoglobulinas e C3 no granuloma paracoccidiódico. **Rev Ist Med Trop.** v. 29, n. 2, p. 97-103. 1987.
- BOYCE, K. J.; ANDRIANOPOULOS, A.; Fungal dimorphism: the switch from hyphae to yeast is a specialized morphogenetic adaptation allowing colonization of a host. **FEMS Microbiol Rev.** Nov, v.39, n.6, p. 797-811, 2015.

- BONFIM, C. V.; MAMONI, L. R.; BLOTTA, M. H. S. L.; TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Medical Mycology**. v. 47, p. 722–733, 2009.
- BORGERS, M.; VAN de VEN, M. A. Mode of Action of Itraconazole: Morphological Aspects. **Mycoses**, v. 32, n.1, p. 53-59, 1989.
- BRUMMER, E. CASTAÑEDA, E.; RESTREPO, A.; Paracoccidioidomycosis: an Update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n.2, p. 89-117, 1993.
- BURGER E.; et al.; Low-level Laser Therapy to the Mouse Femur Enhances the Fungicidal Response of Neutrophils against *Paracoccidioides brasiliensis*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, February, v.10, n.1371, 2015.
- CAMARGO, Z. P.; Serology of Paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia** v. 165, p. 289-302, 2008.
- CALICH, V. L. et al.; Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Br. J. exp. Path.**, v. 66, p. 585-594, 1985.
- CALICH, V. L. G.; KASHINO, S. S.; Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Braz J Med Biol Res**, May, v. 31, n. 5, p. 615-623, 1998.
- CALICH, V. L.; VAZ, C. A.; BURGER, E.; Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* Infection. **Res Immunol**, v. 149, n. 4, p. 407-17, 1998.
- CALVI, S. A., et al. Effect of cytokines on the in vitro fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. **Microbes Infect.** v. 5, p. 107-113. 2003.
- CENCI, E. et al.; Interleukin-4 and interleukin-10 inhibit nitric oxide-dependent macrophage killing of *Candida albicans*. **Eur J Immunol** , v. 23, n. 5, p. 1034-8, 1993.

CERDEIRA, C. D. et al. Low-level laser therapy stimulates the oxidative burst in human neutrophils and increases their fungicidal capacity. **J Biophotonics**, v. 9, n. 12, p. 1180-1188, 2016.

COLEMAN, J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. *International Immunopharmacology*, v. 1, n. 8, p. 1397–1406, 2001.

CHOI, C. H.; et al.; The anti-cancer effects of itraconazole in epithelial ovarian cancer. **Scientific Reports**, v.7, n. 6552, 2017.

CRUVINEL, W. M., et al.; Immune system - part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Rev Bras Reumatol.** v. 50, n. 4, p. 434-61, 2010.

CUNHA- AZEVEDO, H. E.; et al.; In vitro antifungal activity and toxicity of itraconazole in DMSA-PLGA nanoparticles. **J Nanosci Nanotechnol**, v.11, n.3, p. 2308-14, 2011.

FORTES et al.; Immunology of paracoccidioidomycosis; **An Bras Dermatol.**; v. 86, n. 3, p. 516-25, 2011.

FERREIRA, M. C., et al.; Effects of HeNe laser irradiation on experimental paracoccidioidomycotic lesions. **J Photoche Photobio B: Biology.** v. 84, p. 141-149, 2006.

FERREIRA, M. C., et al.; Effect of Low Intensity Helium–Neon (HeNe) Laser Irradiation on Experimental Paracoccidioidomycotic Wound Healing Dynamics. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, p. 227–233, 2009.

FAVA NETTO, C.; Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na blastomicose sulamericana, com antígeno polissacarídico. **Arq Cir Clin Exp S Paulo.** v. 18, p. 1997-2254, 1955.

FRANCO, M. F.; et al.; Paracoccidioidomycosis: a recent proposed classification of clinical forms. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 20, p. 129-132. 1987.

GAZENDAM, R. P.; et al.; How neutrophils kill fungi. **Immunological Reviews**; v. 273, p. 299–311, 2016.

GOLDANI, L. Z.; WIRTH, F.; Animal Models and Antifungal Agents in Paracoccidioidomycosis: An Overview. **Mycopathologia**, v.182, p. 633–643, 2017.

GAO, X.; XING, D.; Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. **J Biomed Sci.** v.16, p.4. 2009

HU, W. P.; et al. Helium-neon laser irradiation stimulates cell proliferation through photostimulatory effects in mitochondria. **J Invest Dermatol.** v. 127, p. 2048–2057. 2007

KITCHEN, S.; Laserterapia de baixa intensidade. Eletroterapia: prática baseada em evidências. Manole, São Paulo, 11. Ed. p. 171-179. 2003.

LOPERA, D. et al.; Lysozyme plays a dual role against the dimorphic Fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Rev. Inst. Med. trop.** v. 50, n. 3, p. 169-175, 2008.

LIMA, F. M. et al. Dual Effect of low-level laser therapy (LLLT) on the acute lung inflammation induced by intestinal ischemia and reperfusion: Action on anti- and pro-inflammatory cytokines. **Lasers Surg Med.** v. 43, p. 410-420. 2011.

LUTZ, A.; Una mycose pseudococcidica localisada na bocca e observada no Brazil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas. **Brazil Med.** v. 22, p. 121-124/141-144, 1908.

MAMONI, R. L, BLOTTA, M. H.; Flow-cytometric analysis of cytokine production in human paracoccidioidomycosis. **Cytokine.** v. 35, p. 207–216. 2006

MAMONI, R. L, BLOTTA, M. H.; Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. **Cytokine**, v. 32, p. 20-29, 2005.

- MARQUES, S. A. Paracoccidioidomicose. **Compêndio de micologia médica**, Rio de Janeiro, p.294 -312, 2010.
- MARTINEZ, R.; New Trends in Paracoccidioidomycosis Epidemiology. **J. Fungi**, v. 3, n. 1, 2017.
- MANTOVANI, A., et al.; Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*. v. 11, p.519-531, 2011.
- MELONI-BRUNERI, L. H., et al.; Neutrophil oxidative metabolism and killing of *P. brasiliensis* after air pouch infection of susceptible and resistance mice. **J Leuk Biol.** v. 59, n. 4, p. 526-533. 1996.
- MESTER, A.F.; JASZSAGI-NAG, I. E.; The effect of laser radiation on wound healing and collagen synthesis. **Studia Biophys.** v. 35, p. 227-30, 1973.
- MESTER, E.; MESTER, A. F.; MESTER, A. The biomedical effects of laser application. **Laser Surg. Medical**, v.5, n.8, p. 31-39, 1985.
- MESTER E.; The use of laser beam in therapy. **Orv Hetil.** v. 107, p. 1012-1016. 1996.
- MENEGUZZO, D. T.; et al. Prevention and treatment of mice paw edema by near-infrared low-level laser therapy on lymph nodes. **Lasers Med Sci.** v. 28, p. 973-980. 2013.
- MENEZES, V. M.; SOARES, B. G.; FONTES, C. J; Drugs for treating paracoccidioidomycosis. **Cochrane Database Syst. Rev.**, 2006.
- MENDES, R. P; NEGRONI, R.; ARECHAVALA, A.; Treatment and controlo f cure. **Paracoccidioidomycosis.** p. 373-91. 1994.
- MENDES, R. P. et al. Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. **The Open Microbiology Journal**, v. 11, p. 224-282, 2017.

MEDRADO, A. R. et al. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. **Lasers Surg. Med.**, v. 32, p.239–244, 2003.

MEIER, A.; et al.; Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 are essential for *Aspergillus*-induced activation of murine macrophages. **Cell Microbiol.** v.5, n.8, p. 561- 70, 2003.

MIGLIARIO, M. et al.; Near infrared low level laser therapy and cell proliferation: the emerging role of redox sensitive signal transduction pathways. **J Biophotonics**, v. 11, n. 11, 2018.

MOLLINEDO, F.; BORREGAARD, N.; BOXER, L. A.; Novel trends in neutrophil structure, function and development. **Immunology Today.** v. 20, n. 12, P. 535-537, 1999.

NARANJO, T. W.; et al. Histopathologic and immunologic effects of the itraconazole treatment in a murine model of chronic pulmonary paracoccidioidomycosis. **Microbes and Infection**, v.12, p. 1153- 1162, 2010.

NASCIMENTO, F. R. F. et al.; Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. **J Immunol**, v. 168, p. 4593-4600, 2002.

NOVAES, R. D. et al. *Trypanosoma cruzi* infection induces morphological reorganization of the myocardium parenchyma and stroma, and modifies the mechanical properties of atrial and ventricular cardiomyocytes in rats. **Cardiovasc Pathol**, v. 22, n. 4, p. 270–279, 2013.

NOVAES, R. D. et al. *Trypanosoma cruzi* infection and benznidazole therapy independently stimulate oxidative status and structural pathological remodeling of the liver tissue in mice. **Parasitol Res**, v. 114, n. 8, p. 2873-2881, 2015.

NEGRONI, R.; Azole derivatives in the treatment of paracoccidioidomycosis. **Acad Sci.** v. 544, p. 497-503, 1988.

NEGRONI, R.; ARECHAVALA, A. I. Itraconazole: Pharmacokinetics and Indications. **Arch. Med. Res.**, v. 24, n. 4, p. 387-93, 1993.

RESTREPO, S.; et al. Development of pulmonary fibrosis in mice during infection with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **J Med Vet Mycol.** v. 30, p. 173-184. 1992.

RODRIGUES, D. R., et al. *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN-gamma, TNF-alpha and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites. **Med Mycol.** v.45, p. 27–33. 2007.

RUMMER, E., CASTAÑEDA, E.; RESTREPO, A.; Paracoccidioidomycosis: An Update; **Clinical Microbiology Rev.**; v. 6, n. 2, p. 89-117, 1993.

PALMIEIRO M.; CHERUBINI K.; YURGEL L.S.; Paracoccidioidomicose – Revisão da Literatura; **Scientia Medica**, v.15, n. 4, p. 274-278, 2005.

PAGLIARI C, SOTTO MN. Dendritic cells and pattern of cytokines in paracoccidioidomycosis skin lesions. **Am J Dermatopathol**, v. 25, n.107-12, 2003.

PEAT, F. J.; et al.; *In Vitro* Effects of High-Intensity Laser Photobiomodulation on Equine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Viability and Cytokine Expression. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 36, n. 2, 2018.

PINO-TMAYO, P. A.; et al.; Depletion of Neutrophils Exacerbates the Early Inflammatory Immune Response in Lungs of Mice Infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mediators of Inflammation**, 2016.

PUERTA-ARIAS, J. D.; et al.; Itraconazole in combination with neutrophil depletion reduces the expression of genes related to pulmonary fibrosis in an experimental model of paracoccidioidomycosis. **Medical Mycology**, v. 56, n. 5, p. 579–590, 2018.

ROCHA-JUNIOR. C. T. Terapia laser, cicatrização tecidual e angiogênese. **RBPS**, v. 17, n. 1, p.44-48, 2007.

SHIKANAI-YASUDA M. A., et al; Guideliness in paracoccidioidomycosis; **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 297-310, 2006.

SHIKANAI-YASUDA M. A; Paracoccidioidomycosis Treatment. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, September, n.57, v. 19, p. 31-37, 2015.

SHIKANAI-YASUDA M. A; Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Rev Soc Bras Med Trop**, September-October, v. 50, n. 5, p. 715-740, 2017.

SINGER-VERMES, L. M. et al.; Evaluation of the Pathogenicity and Immunogenicity of Seven *Paracoccidioides brasiliensis* Isolates in Susceptible Inbred Mice. **J Med Vet Mycol.**, v.27, n. 2, p. 71-82, 1989.

SINGER-VERMES, L. M. et al.; Specific Recognition Pattern of IgM and IgG Antibodies Produced in the Course of Experimental Paracoccidioidomycosis. **Clin Exp Immunol.**, v. 88, n.1, p. 119-123, 1992.

SZEZERBATY, S. K. F. et al. The effect of low-level laser therapy (660 nm) on the gene expression involved in tissue repair. **Lasers Med Sci**, v. 33, p. 315–321, 2018.

TADAKUMA, T.; Possible application of the laser in immunobiology. **Keio J Med**, v.4, p.180–182, 1993.

TAVARES, A. H. et al. Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophages, **Microbes Infect.**, v. 9, p. 583-590, 2007.

TUNÉR, J.; HODE, L. Low Level Laser Therapy. Granges berg (Sweden): **Prima Books**, p. 403, 1999.

VALLE, A. C.; et al.; Tratamento da paracoccidioidomycose: estudo retrospectivo de 500 casos. **An. Bras Dermatol.**, v.68, p. 65-70, 1993.

WAGNER, V. P., et al.; Photobiomodulation regulates cytokine release and new blood vessel formation during oral wound healing in rats. **Lasers Med Sci**, v. 31, p.665–671, 2016.

WANKE, B.; LAZER, M. S.; CAPONE, D.; Paracoccidioidomicose. In: Sociedade de Pneumologia e Tisiologia do Estado do Rio de Janeiro, Aidé MA, editors. Pneumologia aspectos práticos e atuais. Rio de Janeiro, **Revinter**, p. 147-52, 2001.

WANG, X.; et al.; Anti-proliferation of breast cancer cells with itraconazole: Hedgehog pathway inhibition induces apoptosis and autophagic cell death. **Cancer Letters**, v. 385, p.128-136, 2017.

XIDIEH, C. F.; et al.; Plasma amylase levels as a marker of disease severity in an isogenic murine model of paracoccidioidomycosis. **J Med Vet Mycol**, v.32, p.37-46, 1994.

ZYCHLINSKY, A.; WEINRAUCH, Y.; WEISS, J.; Introduction: Forum in immunology on neutrophils. **Microbes Infect.**, v. 5, n. 14, p. 1289-91, 2003.