

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL-MG

GIULIA MARIA DE ALENCAR CASTRO BANI

**INFLUÊNCIA DA IRRADIAÇÃO A LASER INFRAVERMELHO DE BAIXA
POTÊNCIA EM NEUTRÓFILOS DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM
*Paracoccidioides brasiliensis***

Alfenas/MG
2015

GIULIA MARIA DE ALENCAR CASTRO BANI

**INFLUÊNCIA DA IRRADIAÇÃO A LASER INFRAVERMELHO DE BAIXA
POTÊNCIA EM NEUTRÓFILOS DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM
*Paracoccidioides brasiliensis***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alfenas, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Saúde.

Área de concentração: Doenças infecciosas e parasitárias.

Orientador (a): Profª Dra. Eva Burger

Co-orientador: Profº Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Bani, Giulia Maria de Alencar Castro

Influência da irradiação a laser infravermelho de baixa potência em neutrófilos de camundongos infectados com *Paracoccidioides brasiliensis* / Giulia Maria de Alencar Castro Bani. -- Alfenas/MG, 2015.

96 f.

Orientador: Eva Burger.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) -
Universidade Federal de Alfenas, 2015.

Bibliografia.

1. Paracoccidioidomicose. 2. Neutrófilos. 3. Terapia a Laser de
Baixa Intensidade. I. Burger, Eva. II. Título.

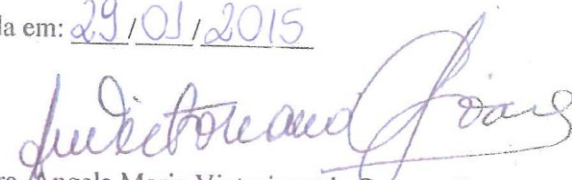
CDD-616.969

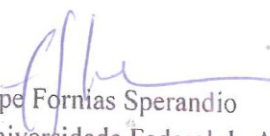
GIULIA MARIA DE ALENCAR CASTRO BANI

INFLUÊNCIA DA IRRADIAÇÃO A LASER INFRAVERMELHO DE BAIXA
POTÊNCIA EM NEUTRÓFILOS DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM
Paracoccidioides brasiliensis

A banca examinadora abaixo-assinada aprova a Tese para obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Aprovada em: 29/01/2015


Profª: Dra. Angela Maria Victoriano de Campos Soares
Instituição: Universidade Estadual Paulista – UNESP – BOTUCATU (SP)
Assinatura:


Profª: Dr. Felipe Fornias Sperandio
Instituição: Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL – Alfenas (MG)
Assinatura:


Profª: Dra. Eva Burger
Instituição: Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL – Alfenas (MG)
Assinatura:

Dedico este trabalho a Deus, que me abençoou em todas as etapas da realização desta pesquisa científica, à minha família e meu esposo pela compreensão, incentivo e amor incondicional, aos meus professores, amigos e funcionários desta Instituição pelo apoio na realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Eva Burger, orientadora, pela dedicação, atenção, paciência, conhecimentos transmitidos e confiança depositada para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias, co-orientador, por todo incentivo e disponibilidade em me auxiliar nas etapas da conclusão deste trabalho e que muito contribuiu para meu crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. Jorge Kleber Chavasco, pelo auxílio no aprendizado das técnicas laboratoriais e incentivo.

Ao Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho e à prof. Dra. Máisa Brigagão pela disponibilidade quanto à utilização do Laboratório de Vacinas e Biquímica, respectivamente.

Aos técnicos e funcionários do Laboratório de Microbiologia/ Imunologia e Laboratório de Vacinas pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais Dêni e Sueli e meus familiares, pelo amparo e auxílio em todos os momentos da minha vida.

Ao meu esposo Luis Filipe, por todo apoio, amor, compreensão e incentivo que recebi em todos os momentos e que foram essenciais para a conclusão da dissertação.

À grande amiga Ana Carolina Mendes, pela contribuição na execução deste projeto e pelo trabalho harmonioso que desenvolvemos juntas e pela amizade nesses meses de convivência.

Aos discentes desta Universidade: Ana Cristina, Letícia e Natália, e que contribuíram de muitas maneiras para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Biotério desta Instituição, em especial ao João e Fernando, pelo suporte e disponibilidade quanto ao uso das dependências do mesmo.

Ao Programa de Pós Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde e a Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade oferecida.

Agradeço a todos que participaram diretamente ou indiretamente para a conclusão desta dissertação e a Deus, autor da vida e fonte de inspiração, principalmente por me cercar de pessoas boas como citado acima.

“Por vezes sentimentos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(MADRE TEREZA DE CALCUTÁ)

RESUMO

O *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) é o agente etiológico causador da Paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica endêmica de maior prevalência na América Latina e no Brasil. Através do estudo de modelo experimental, foi possível estabelecer uma comparação e classificar diversas linhagens de camundongos isogênicos infectados com Pb como resistentes e susceptíveis e o entendimento dos mecanismos de resposta imune envolvidos na doença. Uma vez infectado, o sistema imune do hospedeiro se dispõe de diversos mecanismos, tanto da imunidade inata quanto da adaptativa para conter a infecção. Os fagócitos, como macrófagos e polimorfonucleares neutrófilos (PMN), desempenham um papel central na resposta imune contra o fungo. Além de ser o elo entre imunidade inata e adquirida, os PMN são eficazes na defesa do hospedeiro contra o Pb, pois estas células ficam restritas ao local da lesão causada pelo fungo. Nesta perspectiva, a terapia utilizando laser terapia de baixa potência (LLLT) com raios infravermelhos surge como um método capaz de estimular a atividade desempenhada pelas células imunes, como PMN, sem alterar sua função, por ser descrito como um método modulador de células imunológicas. A LLLT foi aplicada com uma potência de 50mW e comprimento de onda de 780nm em dois pontos de cada pata traseira de camundongos infectados com Pb18 ou inoculados com Zymosan pelo método de bolsa de ar subcutâneo. No grupo de animais irradiados e não irradiados, foram avaliados o efeito da LLLT *in vivo* na produção de proteínas totais, capacidade de produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e capacidade fungicida de PMN recém-isolados do local de infecção. Os resultados demonstraram que a LLLT ativa os PMNs, pois nos grupos de camundongos irradiados independentemente do estímulo para a inflamação, houve aumento na produção de proteínas totais, na capacidade fungicida e produção de ERO, em comparação com o grupo controle. Apesar do *laser* ter diminuído o número total de PMN colhidos de camundongos infectados com Pb18, a viabilidade destas células de todos os grupos experimentais permaneceram altamente viáveis. Os resultados demonstraram que a LLLT ativa os PMNs, o que resultou numa maior capacidade fungicida, sugerindo que o *laser* possa ser utilizado como terapia adicional no tratamento da PCM.

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose. Polimorfonucleares neutrófilos. Laser-terapia de baixa potência.

ABSTRACT

Paracoccidioides brasiliensis (Pb) is the etiologic agent of Paracoccidioidomycosis (PCM), an endemic systemic mycosis most prevalent in Latin America and Brazil. Through the study of experimental model, it was possible to make a comparison and classify different strains of inbred mice infected with Pb as resistant or susceptible and the understanding the mechanisms of immune response involved in the disease. Once infected, the host immune system has several mechanisms both the innate to adaptive immunity to contain the infection. Phagocytes, such as macrophages and polymorphonuclear neutrophils (PMN) play a central role in the immune response against the fungus. Besides being the link between innate and acquired immunity, the PMN are effective in host defense against Pb because are restricted to the site of injury caused by fungus. In this perspective, therapy using Low Level Light Therapy (LLLT) with infrared laser *in vivo* emerges as a method to stimulate the activity stimulated by immune cells such as PMN, without changing its function, to be described as a method of modulating immune cells. LLLt was applied ate two points of paw hind mouse, a power of 50 mW and a wavelength of 780nm, mice infected with Pb18 or inoculated with Zymosan by method air pouch. On irradiated and non-irradiated animals, we assessed the effect of LLLT in vivo production of total protein production capacity of reactive oxygen species (ERO) and freshly isolated PMN fungicidal capacity of the site of infection. The results showed that the active LLLT PMNs, for groups of irradiated mice regardless of the stimulus for inflammation, there was an increase in the production of total proteins, the ability fungicide and ROS production compared with the control group. Although the laser has decreased the total number of PMNs collected from mice infected with Pb18, the viability of the cells in all experimental groups remained highly viable. The results showed that the active LLLT PMNs, resulting in a greater capacity fungicide, suggesting that the laser can be used as adjunctive therapy in the treatment of PCM.

Keywords: Paracoccidioidomycosis. Polymorphonuclear neutrophils. Low level light therapy. therapy.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 1- | <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> cepa 18 visto em sua forma leveduriforme parasitária..... | 22 |
| Figura 2- | Visualização da bolsa de ar subcutânea, região látero-lateral dorsal do camundongo Swiss, no décimo primeiro dia de infecção com Pb18..... | 52 |
| Figura 3- | Visualização da bolsa de ar subcutânea na região dorsal do camundongo Swiss, no décimo primeiro dia de infecção com Pb18..... | 52 |
| Figura 4- | Visualização da bolsa de ar subcutânea rompida após décimo primeiro dia de infecção com Pb18..... | 53 |
| Figura 5- | Visualização do aspecto externo de uma bolsa de ar subcutânea de camundongo Swiss no décimo dia de infecção com Pb18..... | 54 |
| Figura 6- | Visualização do aspecto externo de uma bolsa de ar subcutânea de camundongo Swiss no décimo dia de infecção com Zymosan..... | 54 |
| Figura 7- | Visualização do aspecto interno de uma bolsa de ar subcutânea de camundongo Swiss sacrificado após 10 dias de inoculação com salina..... | 55 |
| Figura 8- | Aparelho de Irradiação. Marca Twim flex e camundongo irradiado na região superior da pata traseira direita..... | 56 |
| Figura 9A- | Aspecto da bolsa de ar subcutânea de camundongo Swiss sacrificado após 10 dias de infecção com Pb18. O animal foi irradiado | 57 |
| Figura 9B- | Aspecto da bolsa de ar subcutânea de camundongo Swiss sacrificado após 10 dias de infecção com Pb18. O animal não foi irradiado..... | 58 |

| | | |
|-------------|---|----|
| Figura 10A- | Aspecto de bolsa ar subcutânea de camundongo Swiss sacrificado após 10 dias de inoculação com Zymosan. O animal foi irradiado..... | 58 |
| Figura 10B- | Aspecto da bolsa de ar subcutânea de camundongo Swiss sacrificado após 10 dias de inoculação com Zymosan. O animal foi irradiado..... | 59 |
| Figura 11- | Número absoluto de PMN obtidos de camundongos infectados com Pb18 irradiados (I Pb18) ou não irradiados (NI Pb18) ou inoculados com Zymosan irradiados (I Zy) ou não irradiados (NI Zy) pelo método de bolsa de ar subcutânea..... | 60 |
| Figura 12- | Cinética da viabilidade dos PMN isolados obtidos após infecção com Pb18 pelo método de bolsa de ar subcutânea de camundongos Swiss irradiados (I Pb18) ou não irradiados (NI Pb18), nos tempos de incubação em cultura de 2, 6 e 18 horas..... | 61 |
| Figura 13- | Cinética da viabilidade dos PMN isolados obtidos após inoculação com Zymosan pelo método de bolsa de ar subcutânea de camundongos Swiss irradiados (I Zy) ou não irradiados (NI Zy), nos tempos de incubação em cultura de 2, 6 e 18 horas..... | 62 |
| Figura 14- | Cinética da produção de proteínas por PMN isolados nos tempos de incubação de 2, 6 e 18 horas. Os PMN foram obtidos de camundongos Swiss infectados com Pb18 pelo método de bolsa de ar subcutânea..... | 63 |
| Figura 15- | Cinética da produção de proteínas por PMN isolados nos tempos de incubação de 2, 6 e 18 horas. Os PMN foram obtidos de camundongos Swiss inoculados com Zymosan pelo método de bolsa de ar subcutânea..... | 64 |
| Figura 16- | Quantificação dos metabólitos do oxigênio..... | 65 |
| Figura 17- | Capacidade fungicida de PMN obtidos após infecção com Pb18 pelo | |

| | | |
|------------|--|----|
| | método de bolsa de ar subcutâneo..... | 66 |
| Figura 18- | Placa de petri contendo meio BHI suplementado com colônias de Pb18 provenientes do exsudato da bolsa de ar subcutânea de animais irradiados, por um período de 7 dias em crescimento..... | 67 |
| Figura 19- | Placa de petri contendo meio BHI suplementado com colônias de Pb18 provenientes do exsudato da bolsa de ar subcutânea de animais não irradiados, por um período de 12 dias em crescimento..... | 68 |
| Figura 20- | Visualização externa da região lateral-esquerdo de uma lesão epitelial em camundongos Swiss infectados intraperitonealmente com Pb18. Presença de pápulas eritematosas e queda de pêlos..... | 69 |
| Figura 21- | Visualização externa da região lateral-direito de uma lesão epitelial em camundongos Swiss infectados intraperitonealmente com Pb18, com queda de pêlos..... | 70 |

LISTA DE ESQUEMAS

| | | |
|------------|---|----|
| Esquema 1- | Delineamento experimental dos materiais e métodos..... | 42 |
| Esquema 2- | Ilustração da placa de 12 poços utilizada para cultivo de PMN | 46 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Tabela 1- | Demonstração do estabelecimento do modelo experimental com laser-terapia de baixa potência utilizando raios infravermelhos..... | 45 |
| Tabela 2- | Tempo de maturação das bolsas de ar subcutâneas após inoculação de Pb18..... | 51 |
| Tabela 3- | Sobrevida dos camundongos fêmeas Swiss infectados com Pb18 via intraperitoneal..... | 69 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------|---|
| AmB | Anfotericina B |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| BCA | Ácido bicinconínico |
| BHI | <i>Brain Heart Infusion</i> - Ágar infusão cérebro e coração |
| BSA | Proteína sérica bovina |
| cél/mL | Células leveduriforme viáveis/mililitro |
| C ₃ | Proteína do complemento tipo 3 |
| CO ₂ | Gás carbônico |
| CLR | Receptores de lecitina tipo C |
| CR3 | Receptor do sistema complemento |
| Cu | Cobre |
| CXCL8 | Quimiocina do tipo CXCL8/IL8 |
| DPI | Difeniliodonio |
| ELISA | Ensaio imunoenzimático ligado à enzima |
| ERO | Espécies reativas de oxigênio |
| FC | Fator de crescimento |
| FN | Meio de cultura de Fava Netto |
| G | Força gravitacional |
| GM-CSF | Fator estimulador de crescimento de colônias de granulócitos macrófagos |
| Gp43 | glicoproteína presente na superfície celular |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrogênio |
| HeNe | Hélio-Neônio |
| IFN- γ | Interferon gama |
| Ig | Imunoglobulina |
| IL | Interleucina |
| IRO | Intermediários reativos de oxigênio |
| J/cm ³ | Joule por centímetro cúbico (medida de densidade de energia) |
| KOH | Hidróxido de potássio |
| LASER | Amplificação da luz por emissão estimulada de radiação |
| LLLT | Laser de baixa potência |
| LPS | Lipopolissacarídeos |

| | |
|-----------------------------|---|
| LTB4 | Leucotrienos |
| mL | Mililitros |
| MA | Macrófagos alveolares |
| MPO | Mieloperoxidase |
| MR | Receptor de manose |
| mW | Miliwatt |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| NADPH | Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido |
| Nd | Neodímio |
| nm | Nanômetro |
| NETs | Armadilhas extracelulares de neutrófilos |
| NK | Células natural killer |
| NO | Óxido nítrico |
| O ₂ | Oxigênio |
| O ₂ ⁻ | Ânion superóxido |
| PAMPS | Padrões moleculares associados a patógenos |
| Pb | <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> |
| PCM | Paracoccidioidomicose |
| PGE2 | Prostaglandinas |
| PMA | Acetato miristato de forbol |
| PMN | Polimorfonucleares neutrófilos |
| QL | Quimioluminescência |
| rpm | Rotações por minuto |
| ROR γ t | Fator de transcrição receptor gama-t |
| RPMI | Meio de cultura para cultivo de leucócitos. |
| SBF | Soro Fetal Bovino |
| TCD4+ | Linfócito T receptor positivo para CD4 |
| TCR | Receptor de célula T |
| TGF- β | Fator de transformação do crescimento beta |
| Th | Linfócito helper ou auxiliar |
| Th1 | Linfócito helper ou auxiliar do tipo 1 |
| Th2 | Linfócito helper ou auxiliar do tipo 2 |

| | |
|---------------|---------------------------------|
| TLR | Receptores tipo <i>toll</i> |
| TNF- α | Fator de necrose tumoral alfa |
| Treg | Linfócito T regulatório |
| UFC | Unidades formadoras de colônias |
| v:v | Volume:volume |
| μL | Microlitro |
| μg | Micrograma |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|----|------------------------------|
| ® | Marca registrada |
| % | Porcentagem |
| °C | Graus Celsius |
| x | Vezes (Aumento) |
| < | Menor |
| α | Alfa (alfabeto grego) |
| β | Beta |
| γ | Gama |
| λ | Lambda (comprimento de onda) |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 1 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 21 |
| 1.1 | PARACOCCIDIOIDOMICOSE E SEU AGENTE – <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> | 21 |
| 1.2 | RESPOSTA IMUNOLÓGICA PROTETORA NA PCM HUMANA E EXPERIMENTAL..... | 23 |
| 1.2.1 | Resposta imunológica desenvolvida por pacientes..... | 24 |
| 1.2.2 | Modelo experimental e patrimônio genético..... | 26 |
| 1.3 | IMUNIDADE INATA - PAPEL DOS POLIMORFONUCLEARES NA INFECÇÃO FÚNGICA..... | 27 |
| 1.4 | VIAS DE ATIVAÇÃO IMUNOLÓGICA POR FUNGOS..... | 32 |
| 1.5 | TRATAMENTO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE..... | 35 |
| 1.6 | APLICAÇÃO DE LASER INFRAVERMELHO DE BAIXA POTÊNCIA EM PROCESSOS TERAPÊUTICOS..... | 36 |
| 2 | OBJETIVOS..... | 40 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL..... | 40 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 40 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 41 |
| 3.1 | COMITÊ DE ÉTICA..... | 41 |
| 3.2 | ANIMAIS..... | 41 |
| 3.3 | DELINEAMENTO EXPERIMENTAL..... | 42 |
| 3.4 | FUNGOS..... | 43 |
| 3.4.1 | Manutenção do isolado de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb18..... | 43 |
| 3.4.2 | Zymosan..... | 43 |
| 3.4.3 | Preparação de suspensões de Pb ou Zymosan para infecção ou inoculação dos animais pelo método de bolsa de ar subcutâneo..... | 43 |
| 3.4.4 | Preparação de suspensões para infecção intraperitoneal dos animais..... | 44 |
| 3.5 | INFECÇÃO OU INOCULAÇÃO DOS CAMUNDONGOS PELO MÉTODO DE FORMAÇÃO DE BOLSA SUBCUTÂNEA..... | 44 |
| 3.6 | APLICAÇÃO DA LASER-TERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA COM LASER INFRAVERMELHO..... | 44 |

| | | |
|---------------|--|-----------|
| 3.7 | COLETA DOS PMN..... | 45 |
| 3.8 | QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE METABÓLICA DOS FAGÓCITOS USANDO O MÉTODO DO ÁCIDO BICINCONÍNICO..... | 47 |
| 3.9 | QUANTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO PELO MÉTODO DE QUIMILUMINESCÊNCIA..... | 47 |
| 3.10 | QUANTIFICAÇÃO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS..... | 48 |
| 3.10.1 | Preparação de meios de cultura..... | 49 |
| 3.10.2 | Semeadura de Pb em placas de Petri por espalhamento e contagem de UFC..... | 49 |
| 3.11 | INFECÇÃO INTRAPERITONEAL DOS CAMUNDONGOS SWISS COM PB18 PARA ANÁLISE DA SUSCEPTIBILIDADE VERSUS RESISTÊNCIA..... | 50 |
| 3.12 | ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 50 |
| 4 | RESULTADOS..... | 51 |
| 4.1 | PADRONIZAÇÃO DA BOLSA DE AR SUBCUTÂNEA..... | 51 |
| 4.2 | VISUALIZAÇÃO DA BOLSA DE AR SUBCUTÂNEA OBTIDA APÓS INFECÇÃO COM PB18, INOCULAÇÃO COM ZYMOSAN OU SALINA..... | 53 |
| 4.3 | ESTABELECIMENTO DO MODELO PARA APLICAÇÃO DA LASER-TERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA..... | 55 |
| 4.4 | VISUALIZAÇÃO MACROSCÓPICA DO ASPECTO INTERNO DA BOLSA DE AR SUBCUTÂNEA OBTIDA APÓS INFECÇÃO COM Pb18 OU INOCULAÇÃO COM ZYMOSAN..... | 57 |
| 4.5 | NÚMERO TOTAL DE PMN OBTIDOS DA BOLSA DE AR SUBCUTÂNEA..... | 59 |
| 4.6 | CINÉTICA DA VIABILIDADE DOS PMN ISOLADOS DE BOLSA DE AR SUBCUTÂNEA APÓS DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO EM CULTURA..... | 60 |
| 4.6.1 | Cinética da viabilidade dos PMN isolados de bolsa subcutânea obtida após infecção com Pb18 nos diferentes tempos de incubação..... | 60 |
| 4.6.2 | Cinética da viabilidade dos PMN isolados de bolsa subcutânea obtida após inoculação com Zymosan nos diferentes tempos de incubação..... | 61 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.7 | AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS POR PMN ISOLADOS DE BOLSA DE AR SUBCUTÂNEA..... | 62 |
| 4.7.1 | Avaliação da cinética da produção de proteínas por PMN isolados obtidos após infecção com Pb18..... | 62 |
| 4.7.2 | Avaliação da cinética da produção de proteínas por PMN isolados obtidos após inoculação com Zymosan..... | 64 |
| 4.8 | QUANTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS DO OXIGÊNIO EMITIDOS POR PMN OBTIDOS APÓS INFECÇÃO COM PB18 OU INOCULAÇÃO COM ZYMOSAN..... | 65 |
| 4.9 | CAPACIDADE FUNGICIDA DE PMN OBTIDOS APÓS INFECÇÃO COM PB18..... | 66 |
| 4.10 | SOBREVIDA DOS CAMUNDONGOS SWISS INFECTADOS COM PB18..... | 68 |
| 5 | DISCUSSÃO..... | 71 |
| 5.1 | PADRONIZAÇÃO DA BOLSA DE AR SUBCUTÂNEA..... | 71 |
| 5.2 | MODELO DA LLLT..... | 71 |
| 6 | CONCLUSÃO..... | 77 |
| | REFERÊNCIAS | 78 |
| | ANEXO 1 | 91 |
| | APENDICE A..... | 92 |

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesse capítulo serão descritos alguns estudos que demonstram as características do *Paracoccidioides brasiliensis*, o percurso da doença, as manifestações clínicas, a resposta imunológica, tratamento, entre outras informações de importância na paracoccidioidomicose que contribuem para o desenvolvimento deste trabalho.

1.1 A PARACOCCIDIOIDOMICOSE E SEU AGENTE - *Paracoccidioides brasiliensis*

O *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) é um fungo termo-dimórfico causador da doença denominada Paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica e endêmica de maior prevalência nas regiões tropicais e subtropicais dos países da América Latina (CADAVID; RESTREPO, 1993; SHIKANAI-YASUDA, et al. 2006).

O *Paracoccidioides brasiliensis* caracteriza-se por apresentar dimorfismo termo dependente, apresentando a forma miceliana, constituído por hifas septadas e conídeos, e a forma leveduriforme (Figura 1), responsável pela doença no paciente, a qual permite o diagnóstico microscópico da PCM, por ser a morfologia relacionada com a vida “parasitária” do fungo (LACAZ et al., 1991). A forma miceliana é responsável por infectar o hospedeiro através da inalação dos conídeos que se depositam nos alvéolos pulmonares. (WANKE; AIDÉ, 2009). Uma vez instalada, a infecção pode evoluir para duas formas clínicas distintas: a forma aguda ou subaguda (juvenil) e a crônica ou adulta da doença (FRANCO; 1987).



Figura 01- *Paracoccidioides brasiliensis* cepa 18 visto em sua forma leveduriforme parasitária. KOH - 400x.

Fonte: Do autor.

Segundo Lutz, (1908) a Paracoccidioidomicose foi descrita pela primeira vez como uma doença mais frequente entre adultos entre a faixa etária de 20 a 60 anos, que exercem atividades agrícolas, principalmente indivíduos do sexo masculino, conforme descrito por Fava Netto et al. (1965) e Ramos; Saraiva (2008), apresentando uma incidência de (1:10-15 homens), sendo infrequente abaixo dos 14 anos, faixa etária na qual não existe predomínio de sexo (PANIAGO et al., 2003). Foi demonstrado que os hormônios femininos, especialmente o estrogênio, inibem a transição da fase miceliana para leveduriforme, conferindo proteção contra o desenvolvimento da doença, o que explica o fato dos homens serem os principais acometidos (RESTREPO et al., 1984). A infecção causada pelo Pb é caracterizada por diferentes aspectos clínicos, podendo ser assintomática ou não, sendo a infecção assintomática a mais frequente entre indivíduos infectados. Dentre os órgãos mais afetados, destacam-se os pulmões, porém, a disseminação da doença em outros sistemas e tecidos é comumente encontrada, o que pode resultar em diversas lesões no hospedeiro dependendo de sua susceptibilidade e das características inerentes ao agente patogênico (FRANCO et al., 1987). Há outros fatores que contribuem com a debilitação imunológica, favorecendo o aparecimento da doença nesta população de risco, como o tabagismo e o consumo de álcool (MARQUES et al., 2007).

Na Paracoccidioidomicose a forma aguda é caracterizada por disseminação em todo o organismo do hospedeiro, podendo comprometer diversos órgãos, como o fígado, linfonodo, medula óssea e baço, resultando na hipertrofia desses órgãos (BRUMMER, CASTAÑEDA; RESTREPO, 1993). Essa forma clínica da doença representa uma porcentagem equivalente a 3-5% de acometimento entre crianças e adolescentes (LONDERO;

MELO, 1983). Por sua vez, a forma crônica é caracterizada por progredir lentamente no hospedeiro, a partir de um foco previamente estabelecido pela infecção fúngica (FRANCO et al., 1989). Inicialmente há um comprometimento pulmonar, onde 25% dos casos da PCM ficam restritos a este órgão. Porém, pode ocorrer disseminação da doença para outros órgãos, como nos linfonodos, mucosas e adrenais, devido ao seu estado de latência e progressão lenta no hospedeiro, mas com menor frequência na medula óssea, órgãos genitais e sistema nervoso (RESTREPO et al., 1976; BRUMMER, CASTAÑEDA; RESTREPO, 1993).

A evolução clínica da doença depende tanto do hospedeiro, quanto do fungo. Os fatores associados a este estão relacionados à sua virulência e composição antigênica. Os fatores relacionados ao hospedeiro implicam no estado nutricional, idade, sexo e na capacidade de desenvolver uma resposta imune eficaz contra o fungo. Esses fatores contribuem com a evolução e o aspecto fisiopatológico da doença. (FRANCO, 1987; SHIKANAI-YASUDA, 2006).

No Brasil, esta é uma das micoses de maior importância, por ser um país que apresenta a maior área endêmica para esta doença no mundo, o que torna o seu estudo extremamente relevante, uma vez que o relato da doença no país não é obrigatório e não há nenhum programa de controle específico ou um diagnóstico padronizado para classificação da doença (WANKE; AIDÊ; 2009), fatores estes que evidenciam a importância do estudo da doença e a relação parasita-hospedeiro. Em um estudo realizado por Coutinho et al, (2002), ficou clara a distribuição da PCM por todos os estados brasileiros, bem como o índice de mortalidade da doença de acordo com o número de habitantes de cada estado, sendo que em Minas Gerais, nos anos de 1980 a 1995, a taxa de mortalidade anual foi equivalente à 1.66 por 100.000 habitantes, com um total de óbitos igual a 398 casos. É importante ressaltar que, apesar de haver correlatos da doença em outras áreas fora da região endêmica, o motivo da ocorrência está relacionado a indivíduos que já residiram ou visitaram um país do continente latino americano.

1.2 RESPOSTA IMUNOLÓGICA PROTETORA NA PCM HUMANA E EXPERIMENTAL

Este item apresenta dados sobre a resposta imunológica frente a infecção causada pelo *Paracoccidioides brasiliensis* em humanos e em camundongos.

1.2.1 Resposta imunológica desenvolvida por pacientes

Para que a PCM-doença se estabeleça, diversos fatores devem ser considerados, como aqueles associados ao fungo: virulência e fatores ligados ao hospedeiro: resposta imunológica e susceptibilidade. Portanto, a interação entre o fungo e a resposta imunológica do hospedeiro são fatores desencadeantes para a PCM-doença, o que pode evoluir para cura espontânea da PCM ou disseminação do *Pb* por todo o organismo, causando granulomatose crônica (PALMEIRO et al., 2005). Algumas formas clínicas características da doença são manifestadas devido ao grave comprometimento da resposta imune celular (MOTA et al., 1985; FRANCO et al., 1989). O padrão da resposta imune celular mediada por células $CD4^+$ determina a resistência ou a susceptibilidade, durante o curso da infecção. Células produtoras de citocinas Th1 e do padrão histológico de granulomas compactos caracterizam a resistência contra o *Pb*. Por outro lado, um padrão de citocinas Th2 e granulomas mal organizados estão relacionados com a susceptibilidade aos *Pb* (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

Quando um indivíduo saudável entra em contato com *Pb*, a partir do local de inóculo, as células imunológicas podem conter esta infecção através do desenvolvimento das respostas imunes inatas e adquiridas, sendo esta através da resposta mediada por células Th1, o que leva à formação de granulomas densos. Porém, quando ocorre uma ineficiência nesta resposta, há um desvio para outros mecanismos de respostas imunes, como a resposta desencadeada pelas células Th2, o que resulta na incapacidade de contenção da propagação do processo infeccioso ocasionado pelo *Pb* (SANDOVAL et al., 1996; PAGLIARI; SOTTO, 2003), estando correlacionada com a gravidade da doença.

Segundo Benard et al. (2001), portadores da PCM em atividade apresentam uma diminuição da resposta imune celular resultante da baixa síntese de citocinas produzidas pelas respostas mediadas por células Th1, tais como IL-2, IFN- γ e IL-12, com consequente aumento dos níveis de IL-4, IL-5 e IL-10, característico do padrão de resposta imune mediado por células Th2, não protetora ao hospedeiro.

A imunorregulação na PCM está associada a padrões de resposta regulados por células T auxiliares do tipo Th1, Th2 e células T regulatórias $CD4^+CD25^+$ (Treg). A defesa efetiva contra *Pb* depende principalmente das células Th1, e a resistência adquirida é mediada por citocinas que ativam células T e macrófagos. Nesse contexto, o TNF- α e o IFN- γ possuem um papel particularmente proeminente (CALICH; VAZ; BURGER, 1998). Contudo, a incapacidade de desenvolvimento da resposta efetiva mediada por Th1 resulta na maioria das

formas clínicas características da PCM, como a formação de granulomas compactos, possibilitando, portanto, a partir desta incapacidade de resposta imune por Th1 em outros padrões de resposta imune também ineficientes para conter a infecção pelo Pb, como resposta mediada por Th2 (PAGLIARI; SOTTO; 2003). Indivíduos saudáveis, quando entram em contato com Pb podem resolver a infecção no local do inoculo a partir de resposta imune inata e do desenvolvimento de resposta Th1, com formação de granulomas densos (SANDOVAL et al., 1996).

Novas subpopulações de células TCD4⁺ efetoras foram descritas, sendo capazes de desempenhar um papel importante nas respostas imunológicas às infecções fúngicas, tais como: célula Th17, Th22 e células Th9. As Th17 são caracterizadas pela produção de IL-17 e são diferenciadas na presença de TGF- β , IL-6 e com a participação de um fator de transcrição denominado de ROR γ t e, a produção de TGF- β pelas células TCD4⁺ estabelece uma ligação entre células Treg e Th17 (NETEA et al, 2004). Células Th17 parecem ter sido desenvolvidas pela linhagem de células progenitoras do sistema imune para facilitar a remoção de agentes patogênicos que não são eficazmente destruídas por linhagens Th1 ou Th2. Um papel importante já evidenciado das células Th17 é que estas produzem citocinas e quimiocinas inflamatórias, tais como: CXCL8, IL-1 β , IL-23 e IL-6 e peptídeos antimicrobianos como as defensinas, que induzem o grande acúmulo de PMN e outras células inflamatórias, que desempenham um importante papel no controle das infecções fúngicas (ZHU; YAMANE; PAUL, 2010; KORN et al, 2009).

Em estudo realizado por CASTRO et al., (2013), mostrou que em diferentes formas clínicas da infecção causada por Pb possuem uma participação particular de células Th. Os pacientes assintomáticos apresentaram resposta celular predominantemente mediada por células Th1, diferente de pacientes que possuem a forma juvenil da doença, que foram caracterizados por uma resposta imune mediada por células Th2 e células Th9. Já os pacientes que apresentavam a forma adulta da infecção, foram caracterizados por uma resposta predominante de células Th17 e células Th22 com uma participação substancial de Th1, o que denota a existencia de diferentes respostas imunes associadas tanto com a resistência ou susceptibilidade à infecção ocasionada por Pb. A participação e a ativação de células Th17 e a inflamação pulmonar na PCM estão associadas com um alto número de PMN nas lesões e com consequente diminuição da presença de células Treg (LOURES et al., 2009).

A resposta mediada por linfócitos B – imunidade humoral não é efetiva contra o Pb. Esta caracteriza-se pela elevada produção de anticorpos das classes IgG4, IgA e IgE, associadas a citocinas dos granulomas como IL-4, IL-5 e TGF- β . Esse padrão de resposta

imune é observado em pacientes com formas mais graves da PCM (forma adulta), reforçando que a resposta mediada por células Th2 não confere proteção ao paciente (MAMONI et al., 2002; OLIVEIRA, et., 2002).

1.2.2 Modelo experimental e patrimônio genético

A partir de estudos realizados com diferentes isolados de Pb, foi possível caracterizar os aspectos envolvidos na patogenicidade e imunogenicidade de cada cepa, o que denotou a capacidade do fungo de se comportarem como cepas de alta, média e baixa virulência. O isolado Pb265 foi caracterizado como cepa de baixa virulência, diferente de Pb18, como de alta virulência. (SINGER-VERMES et al., 1989).

Um estudo realizado com diversas linhagens murinas isogênicas, correlacionou o patrimônio genético com a infecção causada pelo Pb. Foi possível classificar as linhagens isogênicas em quatro grupos relacionados à susceptibilidade à infecção pelo Pb: grupo de animais muito resistente (DBA/2, A/J e A/Sn); grupo de animais resistentes (C3H/He); grupo intermediário (C3H/HeB, CBA, C57Bl/10 e BALB/c) e por último o grupo de animais muito sensíveis (B10.A, B10.D2/oSn e B10.D2/nSn), (CALICH et al., 1985). Através desta classificação, foi possível estudar e conhecer os mecanismos imunológicos relacionados ao controle da infecção pelo Pb, na susceptibilidade e resistência de linhagens de camundongos, reproduzindo diferentes formas clínicas da doença, que apresentam diferentes respostas imunológicas, envolvidos tanto com células da imunidade inata como adquirida.

Em camundongos resistentes inoculados com Pb verificou-se uma infecção caracterizada por ativação de macrófagos e PMN e baixos níveis de anticorpos anti-Pb. Esses animais inicialmente apresentaram altos níveis de IFN- γ e pequenas quantidades de citocinas do tipo 2 (IL-4, IL-5 e IL-10). Nos camundongos susceptíveis foram encontrados níveis baixos de IFN- γ e produção relativamente alta de IL-5 e IL-10. (KASHINO et al., 2000). Linfócitos de camundongos resistentes produzem IL-12, IFN- γ , IL-10, IL-4 e IL-5 em resposta ao fungo. Em contraste, linfócitos de camundongos susceptíveis secretam baixos níveis de IFN- γ e IL-2. Animais resistentes produzem IL-5 tardiamente, enquanto camundongos susceptíveis produzem picos de IL-5 (CALICH; KASHINO, 1998).

1.3 IMUNIDADE INATA - PAPEL DOS POLIMORFONUCLEARES NA INFECÇÃO FÚNGICA

Os PMN são gerados e maturados, especificamente na medula óssea, constituindo a linhagem mielóide, na qual células-tronco totipotentes se diferenciam em células precursoras de todo o sistema imune, incluindo os mieloblastos, precursores dos leucócitos polimorfonucleares neutrófilos. O PMN, após passar pelo processo de geração e maturação, contém no interior de seu citoplasma três tipos de grânulos distintos, diferenciados de acordo com a fase de maturação e formação destas células, sendo estes: grânulos azurófilos ou primários formados na fase de pró-mielócito, grânulos específicos ou secundários formados na fase de mielócito e os grânulos terciários que são formados na fase de metamielócito.

Os grânulos primários são ricos em mieloperoxidase (MPO), lisozima e defensinas, os secundários ricos em lisozima, colagenase, gelatinase e lactoferrinas e os terciários ricos em gelatinase. Os neutrófilos atingem a plena maturidade na medula óssea, que destina cerca de 60% de sua atividade à sua produção, e ficam ali retidos por um período de cinco dias. Após esse período são liberados e constituem 50% a 70% dos leucócitos circulantes, e possuem um tempo de sobrevivência de aproximadamente seis horas quando não são ativados. Se durante a circulação são levados a um tecido inflamado, os neutrófilos se aderem ao endotélio ativado das vênulas pós-capilares locais e chegam ao tecido afetado e, essa migração e ativação dos PMN ocorre quando fatores quimioatraentes secretados por muitos tipos de células em resposta a lesão tecidual são expressos pelo endotélio ou sofrem difusão no sangue a partir do tecido lesado, ligando-se à superfície dos neutrófilos. Esse processo de migração dos neutrófilos recebe o nome de marginação e é composto de três fases: rolamento, ativação e migração (PARSLOW et. al., 2004).

Nos tecidos, os PMNs são capazes de reconhecer padrões moleculares associados a antígenos (PAMPs) através de receptores de reconhecimento padrão expressos em sua superfície celular. Dentre estes receptores, destacam-se os receptores do tipo Toll (TLRs, *Toll-like receptors*), receptores N-formil-metionina e receptores para manose, nos localizados na membrana do núcleo destacam-se os TLR3, TLR7 e TLR9 e nos citoplasmáticos destacam-se os NOD-like e, a partir deste reconhecimento do antígeno, os PMN englobam partículas por endocitose ou fagocitose (RIGBY; FRANK, 2012). No englobamento por endocitose macromoléculas ou partículas submicroscópicas (p. ex.: vírus), se ligam a um determinado receptor específico de reconhecimento. Após a ligação, ocorre a polimerização

da proteína clatrina na face citoplasmática da membrana, o que resulta em invaginação do receptor e formação de uma depressão coberta. O englobamento por fagocitose ocorre com partículas maiores, sólidas, como as bactérias e fungos. Um número maior de receptores da membrana entra em contato com a superfície da partícula, até que esta seja totalmente internalizada no fagossoma. Muitos tipos de partículas, incluindo a maioria das espécies encapsuladas, não interagem efetivamente com nenhum receptor celular, não podendo ser fagocitada diretamente, pois estas cápsulas conferem resistência ao microrganismo. Essas partículas são então revestidas por opsoninas, podendo desta forma serem reconhecidas pelos fagócitos. As principais opsoninas são as imunoglobinas e as proteínas derivadas do sistema complemento (NATHAN, 2006).

Os PMN possuem dois mecanismos para combater diferentes patógenos: os dependentes de oxigênio, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ânion superóxido, quando estas células são estimuladas com $INF-\gamma$, $TNF-\alpha$, GM-CSF e IL-15, e os mecanismos independentes de oxigênio. Quanto ao mecanismo dependente de oxigênio, destaca-se a geração de ERO, que ocorre de duas maneiras. A primeira geração de ERO ocorre da seguinte forma: os conteúdos do fagossoma estão sujeitos a poderosos agentes oxidantes gerados por um complexo denominado oxidase NADPH dependente. Esse complexo é organizado a partir de pelo menos cinco subunidades proteicas diferentes, sendo três encontradas no citoplasma e duas presentes nas membranas de seus grânulos. Durante a degranulação, essas proteínas entram em contato na membrana e organizam-se numa oxidase ativa que se projeta na luz do fagossoma. Esse sistema transforma oxigênio molecular em oxigênio singlete, altamente reativo, que sofre dismutação espontânea formando H_2O_2 . Na presença da MPO esse peróxido combina-se com o íon cloreto formando ácido hipocloroso. Esse ácido é consumido quase instantaneamente e oxida aminas, tióis, proteínas e ácidos nucleicos. Uma porção do ácido reage para formar cloraminas orgânicas, um agente oxidante menos potente, porém de vida mais longa. Já na segunda via de formação de ERO, ocorre formação de óxido nítrico (NO) a partir de oxigênio molecular, um gás radical livre e altamente lábil. Quando ativados os PMN expressam uma enzima denominada óxido nítrico oxidase, que gera NO a partir do aminoácido arginina e oxigênio molecular. Na presença de outras espécies reativas de oxigênio, o NO é convertido em peróxi-nitrito, altamente tóxico para bactérias, leveduras, vírus e outros patógenos (RODRIGUES et al., 2007; TAVIN et al., 2008; NATHAN, 2006).

Para os mecanismos independentes de oxigênio, destaca-se a degranulação e a formação de “armadilhas” extracelulares (NETs- Neutrophil Extracellular Traps). Após a internalização do Pb, os grânulos de armazenamento presentes no citoplasma do PMN

começam a se fundir com o fagossoma, liberando seu conteúdo que possui substâncias capazes de matar e degradar ou dissolver os materiais fagocitados. Esse processo é chamado degranulação. Dentre as substâncias liberadas destacam-se as defensinas, que agem tornando as membranas dos microrganismos permeáveis. A célula também bombeia íons hidrogênio que promove hidrólise direta do alvo e aumenta a atividade de muitas enzimas granulares. As NETs são estruturas compostas principalmente por DNA associado a histonas e pelas proteínas elastina, lactoferrina e gelatinase, presentes no interior dos grânulos azurófilos, específicos e de gelatinase, respectivamente. São formadas por uma variedade de estímulos como a presença de lipopolissacarídeos (LPS), IL-8, vírus e diversos microrganismos. Diversos patógenos desenvolveram estratégias para escapar das NETs, como a expressão de DNases ou modificações na estrutura da parede celular (BRINKMANN et al., 2004).

A imunidade inata desempenha um papel importante na defesa do hospedeiro contra a infecção por Pb (PAGLIARI et al., 2012): atividade microbocida de células Natural Killer (NK) (PERACOLI et al., 1995), ativação do sistema complemento, monócitos (SOARES et al., 2001) e macrófagos (MOTA et al., 1985) . Em especial a participação de PMN que desempenham um papel importante contra infecções causadas por Pb (BONFIM et al., 2009),

Uma vez instalada, a PCM-doença é agravada juntamente com o comprometimento da resposta imune celular, portanto, o padrão de resposta imune mediado por células da imunidade inata possui um papel protetor contra a disseminação da doença (MUSATTI, et al., 1976). A inalação dos fragmentos de Pb na forma miceliana e sua deposição nos alvéolos pulmonares (WANKE; AIDÉ, 2009) marcam o processo infeccioso da doença, e o Pb ao instalar-se nos tecidos, atrai macrófagos e neutrófilos aumentando as defesas locais. Se afluxo destas células não for suficiente para conter a lesão, os macrófagos se organizam em granulomas e sua organização e a atividade fungicida são auxiliadas pelo estabelecimento da resposta imune celular anti-Pb, uma vez que os anticorpos fixam-se nos Pb, bloqueando a difusão antigênica. Além dos anticorpos específicos anti-Pb, são encontrados IgG e C₃ na parede dos fungos presentes nos granulomas e, no decorrer da infecção, os linfócitos TCD4 Th1 produzem citocinas que conferem proteção ao hospedeiro, como IFN- γ , TNF- α e IL-12, evitando a disseminação do Pb conforme descrito por Biogioni et al. (1987), conforme apresentado no item 1.2.

Apesar da ação dos linfócitos Th1 ser fundamental na proteção contra o Pb, os PMN possuem um papel muito importante na infecção, sendo as primeiras células a chegarem no sítio inflamatórios após serem atraídos por quimiocinas produzidas por macrófagos alveolares (MA) (KEER et al., 1988).

Em modelo de animais susceptíveis à PCM, como a linhagem B10.A, os macrófagos alveolares (MA) apresentaram uma capacidade fungicida mais eficaz em comparação com MA provenientes de camundongos susceptíveis à infecção pelo Pb como a linhagem A/J. Os MA provenientes de animais susceptíveis produziram níveis elevados de NO e IL-12, associadas com baixa produção de IL-10 e GM-CSF. Em contraste, MA de camundongos resistentes produziram maiores quantidade de IL-10 e GM-CSF, o que inviabilizou a atividade fungicida dessas células, porém, com a neutralização de TGF- β produzido neste processo de resposta imune, houve reativação da atividade fungicida de MA proveniente de animais A/J e este padrão de resposta imune pode se reverter quando concomitantemente à resposta da imunidade inata entra a resposta adaptativa, marcada pela secreção de IL-12 e INF- γ (PINA; BERNARDINO; CALICH, 2008). Juntamente com os macrófagos, os PMN também conduzem a união da imunidade inata e adaptativa, possuindo um papel fundamental na resposta imune em favor do hospedeiro. Mesmo com esta diferença de ação celular e resposta imunológica em ambos os animais. Um estudo utilizando animais depletados de PMN durante as primeiras fases iniciais da infecção, demonstrou que os neutrófilos são de grande importância para os mecanismos de defesa do hospedeiro frente à infecção com Pb, principalmente em situações onde há deficiência da imunidade mediada por células (PINA et al., 2006).

Os neutrófilos são capazes de reconhecer diferentes cepas de Pb. No reconhecimento de Pb18 há um envolvimento de TLR2 e receptor de manose (MR) diferente para cepas de Pb não virulenta (Pb265) que envolve apenas o reconhecimento pelo TLR2. Porém, a partir do reconhecimento de ambos Pb, os PMN secretam prostaglandinas (PGE2) envolvidas com a patogenia da doença e leucotrienos (LTB4) um poderoso agente quimiotático, além de produzir IL-10, cujos níveis foram maiores para Pb18. Essa diferença de reconhecimento envolvendo diferentes receptores demonstrou que os PMN possuem um papel dinâmico na resposta imune frente ao Pb, além da capacidade de modular a resposta da imunidade adaptativa pela produção de mediadores lipídicos e citocinas (BALDERRAMAS et al., 2014).

Dentro do contexto descrito acima, os PMN conferem resistência ao hospedeiro contra diversas infecções, além de contribuir para o desenvolvimento de uma resposta imune efetiva inicial a infecção de Pb, através da produção de metabólitos do oxigênio, como o H₂O₂ e ânion superóxido, quando essas células são estimuladas com IFN- γ , TNF- α , GM-CSF e IL-15 (TAVIAN et al., 2008). Além de influenciar a resposta de outras células na imunidade, o IFN- γ aumenta, tanto *in vitro* como *in vivo*, o efeito antifúngico de PMN (BRUMMER et al., 1993). Em uma pesquisa realizada por Kurita et al., (1999), neutrófilos humanos tratados com

IFN- γ *in vitro* apresentam ação fungicida contra leveduras de Pb, diferente de células não tratadas.

Na resposta de PMN desenvolvida por pacientes, além de produzir substâncias derivadas de oxigênio, estas células produzem também grandes quantidades de leucotrienos, E2 e prostaglandinas, desencadeando edema e processo inflamatório no local de ação. Porém, tais substâncias são capazes de minimizar a capacidade de dano celular causada pelos monócitos. *In vitro*, quando co-cultivados com Pb, os PMN produzem altos níveis de IL-8, o que desencadeia um processo anti-apoptótico por parte dos mesmos, favorecendo a multiplicação e a sobrevivência do fungo no interior da célula fagocitária (ACORCI et al., 2009).

Segundo Meloni–Bruneri et al. (1996) quando os PMN são estimulados *in vitro* com Pb proveniente de camundongos resistentes à infecção pelo método de infecção que consiste na formação de bolsa de ar subcutânea “*air pouch*”, essas células produzem mais metabólitos derivados do oxigênio em relação as células dos camundongos susceptíveis, indicando que os PMN destes, durante uma infecção, diminuem a habilidade de produzir ERO.

Quanto à participação dessas células na imunidade contra o Pb, são apresentados dois pilares: leveduras de Pb não são mortas por PMN humanos ou provenientes de modelos animais, ou PMN são capazes de fagocitar e matar o fungo por meio da produção de metabólitos derivados de oxigênio (KURITA et al., 1999; DIAS; FILGUEIRA; SOUZA, 2004). Foi demonstrado que os PMN possuem um papel fundamental no controle e multiplicação de diversos agentes patogênicos, como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* (CONLAN, 1977), fungos como *Candida albicans* (FULURIJA et al., 1966) e o *P. brasiliensis* (MELONI-BRUNERI et al., 1996). Na infecção por conídios de Pb, a reação inflamatória 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).

Portanto, os neutrófilos podem eliminar patógenos através de diversos mecanismos, incluindo fagocitose, a produção de peptídeos e proteínas antimicrobianas (BORREGAARD, 2010) e a liberação de ERO durante o burst respiratório e, através do reconhecimento dos PAMPs pelos receptores TLR4, TLR2 e TLR9 presente na membrana dos neutrófilos, o metabolismo oxidativo destas células podem ser rapidamente induzido (TRINCHIERI; SHER, 2007). Camundongos deficientes em MPO apresentam atividade citotóxica reduzida frente alguns microrganismos como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus*

neoformans, demonstrando a importância do metabolismo oxidativo dependente de MPO na defesa do hospedeiros contra fungos (ARATAMI et al., 2012).

1.4 VIAS DE ATIVAÇÃO IMUNOLÓGICA POR FUNGOS

Fatores inerentes ao próprio fungo influenciam diretamente na imunopatogenia da PCM, tais como: virulência, composição antigênica, condições ambientais em que o fungo se encontra, que influencia diretamente na sua morfologia, além dos fatores ligados ao hospedeiro que norteiam a capacidade de desenvolver uma resposta eficaz. O Pb em relação à resposta apresentada pelo hospedeiro, sintetiza antígenos metabólicos que interagem com o sistema imonológico, provocando uma resposta imune (BENARD et al, 2001).

Há pequenas porções antigênicas (epítomos) na superfície do Pb relacionados com sua patogenicidade, como a gp43, uma glicoproteína presente na superfície do fungo reconhecida como seu principal componente antigênico, por estar associada ao fator de virulência e/ou escape que o Pb utiliza para evadir os mecanismos de defesa do hospedeiro e se instalar nos tecidos, uma vez que esta glicoproteína apresenta efeitos proteolíticos sobre proteínas estruturais, como colágeno, caseína e elastina (VICENTINI et al.; 1994; MENDES-GIANNINI et al., 1990).

A via de ativação imunológica para o Pb em relação à imunidade inata se dá através da interação entre moléculas de superfície do fungo (como reconhecimento da gp43) com receptores homólogos semelhantes aos TLRs e receptores de lecitina tipo C- Like (CLR), que são proteínas transmembrânicas presentes nas células fagocíticas. Além desse reconhecimento, capaz de ativar a célula fagocitária, os TRLs são capazes de reconhecer PAMPs, induzindo sinais que resultam na ativação de genes da resposta imune inata e estimulam, conseqüentemente, a produção de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias, regulando a resposta adaptativa (McINTURFF et al., 2005; CALICH et al., 2008). Na infecção por conídios de Pb, a reação inflamatória é caracterizada por recrutamento abundante de PMN e aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-1 β e MIP-2 (RESTREPO et al., 1992).

O trabalho desenvolvido pelos autores Bonfin et al., (2009) demonstrou que alguns receptores do tipo Toll, tais como TRL2 e TRL4 e dectin-1 participam diretamente do reconhecimento e internalização do Pb pelas células fagocitárias após serem atraídas pela

formação de quimiocinas pelo sistema complemento, que resulta na consequente ativação dos PMN e produção de citocinas pró-inflamatórias via molécula adaptadora MyD88. A partir deste reconhecimento há produção de TNF- α e IL-10, citocinas anti-inflamatórias que regulam a resposta imune adaptativa. Porém, cepas de Pb mais virulentas induzem somente a produção de TNF- α .

O Pb possui em sua parede celular um repertório de carboidratos compostos por resíduos de manose, que são potenciais candidatos à ativação da via das lectinas do sistema complemento. Esse sistema é composto pelas vias clássica, alternativa e das lectinas. Cada uma delas é iniciada por ativadores distintos, mas acabam por convergir para um ponto em comum da cascata, levando à formação do complexo de ataque a membrana, que constitui num poro proteico lítico para patógenos (TOLEDO et al., 2010). No trabalho de Calich et al., (1979) foi demonstrado que em cultura o Pb é mal fagocitado por macrófagos, no entanto a presença de anticorpos aumenta substancialmente a fagocitose por essas células devido a capacidade dos anticorpos produzidos pelos linfócitos B opsonizarem o fungo. O mesmo efeito foi observado quando o Pb foi previamente tratado com soro normal fresco, demonstrando que o fungo ativa a via alternativa do sistema complemento, que também está envolvida no processo de formação de substâncias quimiotáticas para atrair as células de defesa para o local da infecção *in vivo*.

Assim como o Pb é reconhecido por dectina-1, o mesmo ocorre com o Zymosan, um extrato solúvel presente na parede celular do *Saccharomyces cerevisiae*, uma levedura empregada nos processos industriais de fermentação. Após sua descoberta, este foi utilizado em muitas pesquisas científicas como modificador da resposta biológica, sendo capaz de ativar a via alternativa do sistema complemento e células fagocitárias (HIDA et al., 2006). Sua composição inclui quitina, lipídeos, proteínas e β -glucana, sendo este último o constituinte biologicamente ativo e, após sua descoberta, foram realizados diversos estudos de suas funções imunes, tanto *in vitro* como *in vivo*. (BROWN; GORDON, 2003).

A β -glucana é considerada como um modificador da resposta biológica pela capacidade de desencadear uma série de eventos na resposta imune a partir do seu reconhecimento como PAMPs por células imunológicas (BOHN; BeMILLER, 2001). Seu reconhecimento pelo sistema imune foi primeiramente descrito em estudos envolvendo patógenos fúngicos (ADEREM; ULEVITCH, 2000).

Segundo Suda et al., (1996), após o reconhecimento da β -glucana pelas células inflamatórias, há um grande estímulo para produção de citocinas e geração de anafilatoxina C5a através da ativação da via alternativa do sistema complemento. Além disso, a β -glucana

também pode ser reconhecida por outros receptores dos vertebrados, como receptores do Sistema Complemento 3 (CR3), lactosilceramida e receptores *scavenger*, além de possuir ligante para receptor de célula T (TCR) (BATTLE et al., 1998; BROWN; GORDON, 2003). Além desses polímeros ativarem a resposta imune via sistema complemento diretamente ou com auxílio de anticorpos, produzem fatores quimiotáticos que induzem a migração de leucócitos, especialmente células fagocíticas, como PMN e macrófagos que se acumulam no sítio da infecção com conseqüente ativação (SZABÓ et al., 1995; NICHOLAS; SHAUN, 2001).

Dentre estes receptores, o mais esclarecido é o dectin -1, expresso predominantemente em monócitos, macrófagos, linhagens de neutrófilos e células dendríticas, sendo significativamente influenciado por citocinas e produtos microbianos. Embora seja expresso de forma heterogênea nos tecidos, dectina-1 é um receptor que tem distribuição consistente com a tarefa de vigilância contra patógenos (REID et al., 2004). Esta glicoproteína reconhece Zymosan solúveis e particulado, incluindo partículas fúngicas intactas (ARIIZUMO et al., 2000).

1.5 TRATAMENTO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE

O tratamento da PCM pode ser realizado através da administração de drogas anti-fúngica, como anfotericina B (AmB) da classe dos polienos; Sulfadiazinas, um anti-fúngico derivados de sulfamídicos, ou medicamentos como Cetoconazol, fluconazol e itraconazol, derivados dos azólicos. A anfotericina, apesar de ter sido descoberta por volta dos anos de 1950, até o presente momento é considerada como padrão ouro para o tratamento da PCM por sua excelente capacidade fungicida (VALLE et al., 1993). Porém, este medicamento pode ser fungistático ou fungicida dependendo da biodisponibilidade encontrada nos fluidos corporais e a sensibilidade do Pb. Essa droga age ligando-se aos esteróis da membrana celular fúngica, desfazendo sua integridade e provocando extravasamento dos componentes intracelulares, resultando na morte do fungo e por mecanismos de ação, as drogas anti-fúngicas como AmB, exercem efeitos moduladores em células imunológicas inatas, auxiliando positivamente no mecanismo de eliminação do fungo (MENDES, 1994). Apesar de sua grande aplicabilidade e pela sua potente propriedade antifúngica, seu uso é inviabilizado devido aos graves efeitos colaterais, como a nefrotoxicidade (VIVIANI et al., 1998).

Além da administração da AmB, é extremamente importante relatar que, inicialmente, a continuidade do tratamento acontece até o desaparecimento dos sintomas apresentados pelo paciente, decorrente da infecção, além da detecção na diminuição dos níveis de anticorpos anti-*P. brasiliensis* por testes laboratoriais, sendo que este último parâmetro só ocorre após 2 a 6 meses de terapia contínua (MENDES et al., 1994).

As sulfadiazinas, apesar de mostrarem-se eficazes no tratamento da PCM e serem obtidas gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS), devem ser administradas várias vezes ao dia, o que é uma desvantagem no seu uso, por possuírem diversos efeitos colaterais como a reação de hipersensibilidade, além da terapia com esses medicamentos serem mais longas quando comparada a outros fármacos (MARTINEZ, 2004).

Os azólicos são a opção terapêutica mais indicada para as formas leves e moderadas da doença. No entanto, a maioria dos medicamentos não está disponível na rede pública de saúde na maioria dos estados brasileiros. Além disso, a duração do tratamento está relacionada com a gravidade da doença, e a associação de sulfametazol/trimetropim são os medicamentos mais utilizados para o tratamento dos pacientes no ambulatório. Além de gerar diversos efeitos colaterais, o tratamento é longo e demorado. Após a fase inicial do tratamento, torna-se necessário uma fase de manutenção, pois este deve ser de uso contínuo por mais 12 meses, independentemente dos resultados dos testes sorológicos para detecção de anticorpos sejam reportados como negativos. Durante o tratamento, os pacientes deverão ser acompanhados periodicamente até apresentarem os critérios de cura (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006), pois diferente de outros fungos patogênicos, o Pb é resistente à maioria das drogas antifúngicas, inclusive aos sulfamídicos, o que complica ainda mais o tratamento (MENDES, 1994).

Diante da realidade dos graves efeitos colaterais resultantes da utilização destes medicamentos e pela PCM ser uma doença negligenciada, torna-se relevante estudar um novo mecanismo de ativação das células imunológicas para combater a infecção fúngica sem causar graves efeitos ao portador submetido ao tratamento.

1.6 APLICAÇÃO DE LASER INFRAVERMELHO DE BAIXA POTÊNCIA EM PROCESSOS TERAPÊUTICOS

A palavra *laser* corresponde à sigla de *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, ou seja, amplificação de luz por emissão estimulada de radiação. Esta radiação, quando operada em comprimentos de onda visíveis e específicos, possui características não-ionizantes, ou seja, não possui capacidade de ionizar átomos ou causar mutações (TUNÉR; HODE, 1996).

Albert Einstein, em 1917 implantou as bases teóricas do *laser* no artigo *Zur Quantentheorie der Strahluns*. A partir dessas teorias, a emissão do *laser* foi dividida em alta potência (potencial destrutivo) e 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 de laser de baixa potência, monocromático (produzida por apenas uma cor – apenas um comprimento de onda) e de coerente feixe de luz – formados por ondas de mesma frequência e direção, com efeitos de fotobioestimulação, utilizado para terapêutica na analgesia (insensibilidade à dor, diminuição da inflamação) e como estimulante do biotrofismo (MESTER et al., 1985).

Dentre os aspectos mais relevantes e divergentes da aplicação da LLLT, pode-se citar a dose, que é definida como a quantidade de radiação oferecida ao tecido (Joules por centímetro cúbico) e em intervalos baixos de potência, sendo possível obter efeitos anti-inflamatórios, regenerativos e circulatórios. (BRUGNERA; PINHEIRO, 1998).

O laser de baixa potência vem sendo utilizado para tratamento de diversos efeitos colaterais causados por quimioterapia ou radioterapia, e também como auxiliador de reparo tecidual. Mester (1996), que demonstrou efeitos dessa terapia na cicatrização de feridas em dorso de rato. Diversos estudos têm sido realizados, tanto em células em cultura, como em animais e humanos, para avaliar os possíveis efeitos desta radiação *laser*. O LLLT, dependendo do comprimento de onda utilizado, atua em processos intracelulares em células eucariontes e procariontes, sendo a luz absorvida por componentes da cadeia respiratória mitocondrial (GAVISH et al., 2004), podendo resultar em aumento da produção de ERO (OREN et al., 2001; LAVI et al., 2003), devido à mudança de potencial elétrico das membranas celulares e, conseqüentemente, sua permeabilidade seletiva para íons e aumento da atividade de certas enzimas, como citocromo-c oxidase, adenosina trifosfato (ATP) (KOUTNÁ et al., 2003) e aumento de adenosina monofosfato cíclico, processos estes relacionados com a promoção de proliferação celular (CASTANO et al., 2007).

Em artigo de revisão da literatura, Posten et al. (2005), demonstraram vários aspectos da utilização experimental e clínica do laser de baixa potência, o que evidenciou a

recomendação para tratamento de feridas indolores e úlceras tróficas para promover uma cicatrização rápida, uma vez que a radiação visível de baixa potência pode agir na estimulação ou aceleração celular. Porém, os benefícios da terapia com laser na cicatrização de feridas ainda são controversos, uma vez que podem ser utilizados diferentes tipos de laser compostos por vários gases, como: CO₂, Diodo, Hélio-Neônio (HeNe), Neodímio (Nd), além da radiação não ionizante com raios infravermelhos, com a utilização de diferentes comprimentos de onda e potência, o que explica achados experimentais contraditórios (LOWE et al., 1998).

A aplicação da LLLT tem sido evidenciada em diversas áreas da medicina que necessitam de prevenção de morte celular e reparo tecidual, como no caso de doenças neurodegenerativas (Alzheimer e Esclerose Múltipla) (TABOADA et al., 2011) e lesões de medula espinhal (WU et al., 2009). Além disso, esta terapia vem sendo utilizado para tratamento de diversos efeitos colaterais causados por quimioterapia ou radioterapia. Após irradiação com LLLT, foi possível observar diferentes efeitos biológicos, como estimulação da proliferação celular, especialmente em fibroblastos e na síntese do colágeno (ABERGEL; LYONS; CASTEL, 1987).

Segundo o autor Bjordal et al. (2011), a LLLT tem demonstrado uma excelente capacidade de modular o processo inflamatório originado por alguma doença e a resposta imunológica desencadeada no processo pelas células do sistema imune.

É importante considerar que, em estudos com animais, há grande influência da irradiação proporcionada por laser na resposta imunológica que, em conjunto com a resposta inflamatória, atuam diretamente na resolução de processos patológicos. Algumas pesquisas com este tipo de experimento fornecem evidências convincentes que a baixa potência da irradiação causa efeitos estimulantes nas células imunológicas (BENSADOUN et al.; 1999; ROCHKIND et al.; 1989).

O mecanismo exato que a LLLT desempenha quando é inserido em algum sistema ainda não está claro, mas é sabido que sua presença melhora e acelera a força de tração 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), enquanto outros acreditam que esta terapia pode agravá-lo (WOODRUFF et al., 2004; VIEGAS et al., 2007), o que poderia resultar em maior ou menor formação de edema. Provavelmente, o tipo de resposta pode ser relacionada com a fase do processo inflamatório e a formação de edema presente no tecido,

quando a irradiação com laser é realizada. Nesse contexto, a LLLT pode ter um papel importante na terapia imunobiológica para as doenças do sistema imune, e pode ativar e aumentar a reação normal dos componentes do sistema imunológico (TADAKUMA, 1993).

Não há relatos científicos de que o laser infravermelho poderia ser aplicado no tratamento da PCM, mas há relatos de que a aplicabilidade do laser na pata de camundongos foi suficiente para tratar e prevenir edemas, quando o *laser* foi inserido na região dos linfonodos (MENEGUZZO et al.; 2013).

Em estudo realizado por Nagib et al., (2010) mostrou diminuição dos níveis de interleucina pró-inflamatórias IL-17, TNF- α e IL-10 em lesões causadas na PCM quando expostas a irradiação com laser HeNe, detectando portanto uma diminuição da densidade de fibronectina e laminina nas lesões tratadas, resultando na diminuição em seus níveis, sugerindo portanto a laser terapia como uma alternativa no tratamento da PCM.

A radiação infravermelha apresenta grande poder de penetração nos tecidos. Os componentes dos tecidos biológicos possuem a capacidade de absorver a energia emitida pela radiação, transformando-a em energia útil para a célula (KARU, 1999; KOUTNÁ et al., 2003).

A irradiação com laser se mostrou ter um efeito anti-inflamatório e um efeito pró-inflamatório de acordo com o local e o momento da irradiação. A terapia com laser infravermelho mostrou-se eficiente na prevenção e tratamento de edema de pata, quando aplicada nos linfonodos ou na própria pata, confirmando que o laser infravermelho de baixa potência pode ser uma alternativa potencial para as drogas anti-inflamatórias no tratamento e prevenção do edema (MENEGUZZO et al; 2013). Nesse contexto, a LLLT pode ter um papel na terapia imunobiológica para as doenças do sistema imune e pode ativar e aumentar a reação normal dos componentes do sistema imunológico (TADAKUMA, 1993).

A paracoccidiodomicose é uma doença não contagiosa, mas causa graves sequelas aos portadores se não for diagnosticada precocemente, o que acontece na maioria dos casos, pois a resposta imune celular mediada por linfócitos Th1 mantém o caráter protetor da doença, o que prejudica o diagnóstico nas fases iniciais. Além da atuação das células da imunidade adaptativa, há efetiva participação conjunta de macrófagos e PMN. Os PMN são eficientes nas fases iniciais da doença, pois promovem a lise do fungo *Pb*, localizados na região dos granulomas que ocorrem em resposta a infecção pelo *Pb* e, juntamente com os macrófagos, os PMN contribuem para desenvolvimento efetivo da resposta imune. O tratamento convencional da PCM é baseado em drogas antifúngicas que causam graves efeitos colaterais, além de ser um tratamento de longa duração. Além disso, medicamentos testados para a

doença não são efetivos e os convencionais apresentam graves efeitos secundários. Portanto, conhecendo-se o modelo experimental utilizado para estudo da PCM, bem como a patogenicidade do fungo e os mecanismos de respostas imunes relacionadas à doença, torna-se relevante estudar uma alternativa capaz de estimular os PMN, por serem células que atuam na fase inicial da doença e ajudam no direcionamento efetivo da resposta imune celular.

Portanto utilizamos a laser-terapia de baixa potência, que tem sido descrita como uma alternativa capaz de estimular as células imunológicas e vem sendo utilizada como uma opção de baixo custo para tratar diversas morbidades e maximizar a cura de pacientes, além de não causar efeitos colaterais, o que favorece sua utilização.

2 OBJETIVOS

A seguir serão citados os objetivos geral e específico do trabalho.

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito *in vivo* da laser-terapia de baixa frequência sobre o metabolismo e atividade fungicida de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) obtidos de camundongos Swiss infectados com Pb18 ou inoculados com Zymosan pelo método infecção por bolsa subcutânea.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Padronizar o tempo de obtenção de PMN pelo método de infecção pela formação de bolsa subcutânea;
- b) Avaliar a susceptibilidade ou resistência de camundongos Swiss infectados intraperitonealmente com fungo virulento Pb18;
- c) Avaliar o efeito da LLLT em PMN obtidos de bolsa subcutânea em animais irradiados e não irradiados infectados com Pb ou inoculados com Zymosan frente aos seguintes parâmetros: número total de células obtidas, viabilidade celular e atividade metabólica de neutrófilos por sua produção de proteínas totais e dosagem de espécies reativas de oxigênio;
- d) Avaliar o efeito da LLLT sobre a atividade fungicida de PMN através da quantificação das Unidades Formadoras de Colônias.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir serão descritos os materiais e métodos.

3.1 COMITÊ DE ÉTICA

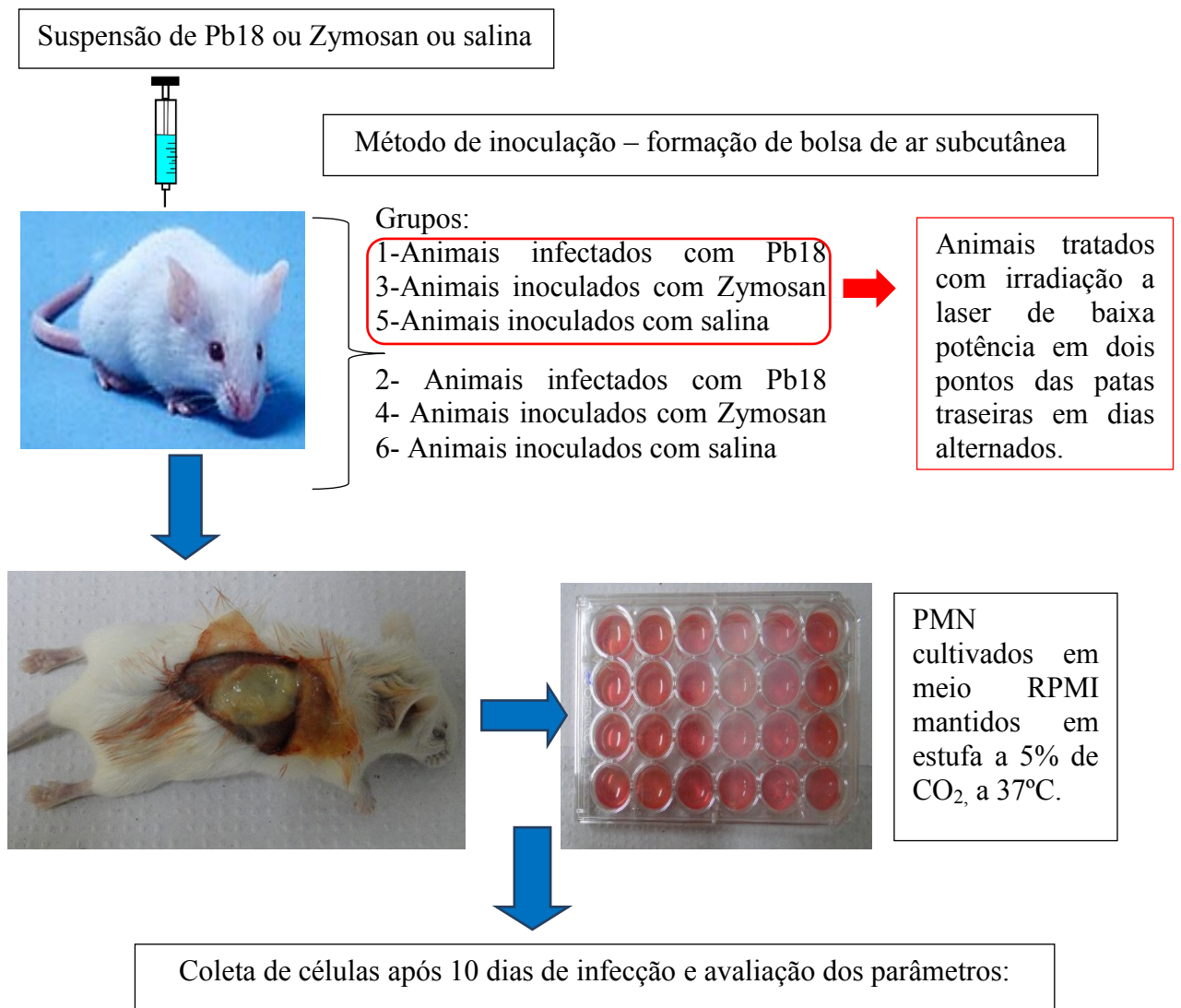
Esta pesquisa está em conformidade com os princípios éticos exigidos na experimentação animal, tendo sido apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa com animais da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL – MG), em dezembro de 2012, sob o registro de nº 477/2012 (ANEXO I).

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos fêmeas Swiss “outbreed” com idade de 6 semanas e com peso de aproximadamente 25g, adquiridos do Biotério de animais da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). Os animais foram mantidos em salas com controle de temperatura, alimentados com ração específica para roedores e água destilada *ad libitum*. Foram constituídos 6 grupos experimentais, com três animais cada, a saber:

- Grupo 1: animais infectados com Pb18 e irradiados;
- Grupo 2: animais infectados com Pb18 e não irradiados;
- Grupo 3: animais inoculados com Zymosan e irradiados;
- Grupo 4: animais inoculados com Zymosan e não irradiados;
- Grupo 5: animais inoculados com salina estéril a 0,9% e irradiados;
- Grupo 6: animais inoculados com salina estéril a 0,9% e não irradiados.

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



| | | | |
|--|--|--|--|
| 1-Quantificação do número total e viabilidade celular com <i>Trypan blue</i> de PMN obtidos de animais irradiados ou não irradiados – infectados com Pb18 ou inoculados com Zymosan. | 2-Análise morfológica das células colhidas após 10 dias de infecção com bolsa de ar subcutânea e avaliação da produção de proteínas por PMN pelo método do BCA após 2, 6 e 18 horas. | 3-Avaliação da produção de metabólitos do oxigênio de PMN obtidos de animais irradiados ou não irradiados – infectados com Pb18 ou inoculados com Zymosan. | 4-Avaliação da atividade fungicida de PMN obtidos de animais irradiados ou não irradiados – infectados com Pb18 ou inoculados com Zymosan, pela quantificação dos fungos viáveis contados por 12 dias me placa de cultivo. |
|--|--|--|--|

Esquema 01- Delineameto experimental dos materiais e métodos.

Fonte: Do autor

3.4 FUNGOS

Este item apresenta dados sobre o *Paracoccidioides brasiliensis* e sobre o Zymosan, ambos utilizados para atrair neutrófilos *in vivo*.

3.4.1. Manutenção do isolado de *Paracoccidioides brasiliensis* Pb18

Foi empregado o isolado de *Paracoccidioides brasiliensis* Pb18 de alta virulência (SINGER-VERMES et al., 1989), mantido no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal de Alfenas. Os fungos foram cultivados em meio de cultura semi-sólido de Fava Netto disperso em tubo, sendo mantidos em estufa a 35⁰C, repicados a cada 7 dias (FAVA NETTO, 1955).

3.4.2 Zymosan

O fungo *Saccharomyces cerevisiae*, contendo β -D- glucana também foi utilizado para inocular os animais, conhecido comercialmente por Zymosan. A inoculação deste induz reação inflamatória (DOHERTHY et al, 1985) e seus efeitos em camundongos inoculados irradiados ou não irradiados foram comparados com aqueles obtidos de camundongos infectados com Pb 18, na atividade dos PMN.

3.4.3 Preparação de suspensões de Pb ou Zymosan para infecção ou inoculação dos animais pelo método de bolsa de ar subcutâneo

As células de Pb foram lavadas com solução salina estéril a 0,9% e centrifugadas (Eppendorf Centrifuge 5810R) a 1300G por três vezes, e uma suspensão fúngica com concentração de 50×10^6 células leveduriformes/mL viáveis, baseadas na contagem em

hemocitrômetro, foi preparada. A viabilidade das células foi determinada pela coloração de *Janus Green B vital dye* pelo método de contagem por exclusão de células coradas. (BERLINER; RECA, 1966). Para o Zymosan, não foi necessário quantificar a viabilidade celular, uma vez que após o ajuste da concentração para 50×10^6 células leveduriformes/mL, a suspensão de células foi autoclavada para posterior inoculação nos animais.

3.4.4. Preparação de suspensões para infecção intraperitoneal dos animais

As células de Pb foram lavadas com solução salina estéril a 0,9% e centrifugadas a $1300 \times g$ por três vezes em tubos Falcon e foi preparada uma suspensão com concentração de 10×10^6 células/mL viáveis baseadas na contagem em hemocitrômetro. A viabilidade das células de Pb foi determinada pela coloração de *Janus Green B vital dye* (BERLINER; RECA, 1966).

3.5 INFEÇÃO OU INOCULAÇÃO DOS CAMUNDONGOS PELO MÉTODO DE FORMAÇÃO DE BOLSA SUBCUTÂNEA

Os animais foram infectados com Pb18 ou inoculados com Zymosan pela técnica de formação de bolsa de ar subcutânea na região dorsal, que consiste na inoculação de 2 ml de ar seguida da injeção de 0,1 mL da suspensão fúngica previamente preparada, conforme proposto por Meloni-Bruneri et al. (1996).

3.6 APLICAÇÃO DA LASER-TERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA

A radiação submetida aos animais dos grupos 1, 3 e 5 foi realizada em dois pontos de cada pata traseira com laser infravermelho (Twin flex-MMO) a $35,5 \text{ J/cm}^3$, em um módulo de frequência contínua com comprimento de onda equivalente a 780 nm e com potência de 50 mW. Em cada ponto, a radiação tinha uma duração de 30 segundos e o seu objetivo foi o de

atingir a medula óssea, local onde ocorre o processo de formação das células sanguíneas, conhecido como hematopoese, incluindo os neutrófilos, localizada no osso fêmur.

As radiações foram feitas em dias alternados, sendo que no dia da infecção e no dia da coleta, os animais sofrem irradiação, conforme tabela abaixo:

Tabela 1- Demonstração do estabelecimento do modelo experimental com laser terapia de baixa potência utilizando raios infravermelhos.

| Eventos | | | |
|---------|---|------------|------------------------|
| Dia | Inoculação com Zymosan ou infecção com Pb | Irradiação | Sacrifício dos animais |
| 0 | + | + | ----- |
| 1 | ----- | ----- | ----- |
| 2 | ----- | + | ----- |
| 3 | ----- | ----- | ----- |
| 4 | ----- | + | ----- |
| 5 | ----- | ----- | ----- |
| 6 | ----- | + | ----- |
| 7 | ----- | ----- | ----- |
| 8 | ----- | + | ----- |
| 9 | ----- | ----- | ----- |
| 10 | ----- | + | + |

Legenda: +: presença; -----: ausência.

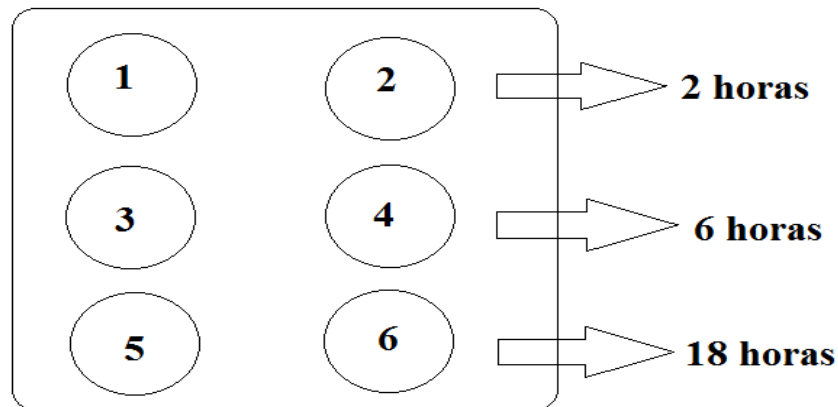
Fonte: Do autor.

3.7 COLETA DOS PMN

Os PMN foram coletados 10 dias após a infecção ou inoculação dos camundongos. Os animais foram antestesiados com uma dose de 0,5 mL da solução antestésica de Cloridrato de Cetamina a 10% (Agner União) e Cloridrato de Xilasina a 2% (nome comercial: Calmium, Agner União) preparadas na proporção de 1:1 (v:v), considerada como excessiva, o que levou os animais ao óbito. Após a insição da pele, com o auxílio de uma pipeta Pauster estéril de vidro, as células foram coletas, e colocadas em masserador de vidro estéril, onde foram dispersas. As células foram transferidas e armazenadas em Tubos Falcon contendo RPMI (Himedia) suplemento com 10% de Soro Fetal Bovino (SBF) (Sigma) e mantidas

refrigeradas até a coleta de todos os grupos experimentais. Posteriormente, as células foram lavadas e centrifugadas a 1780 x g uma vez, ressuspensas em volume conhecido de RPMI, quantificadas em hemocítomos e tiveram sua viabilidade analisada com o corante *Trypan blue* a 0,2%.

Após a quantificação do número total de células, foi realizado um esfregaço em lâmina de vidro, o material foi submetido a uma coloração diferencial com corante Giemsa (Sigma) e observado ao microscópio óptico em objetiva de imersão. A lâmina foi analisada em mais de 10 campos, onde foi observado um predomínio de fagócitos multilobulados, os polimorfocitares neutrófilos, que a partir de agora serão denominados somente de PMN. Os PMN colhidos a partir de camundongos infectados ou inoculados com Zymosan, tiveram sua concentração ajustada para 1×10^6 células/mL e cultivados em placa de 6 poços, conforme esquematizado abaixo:



| Montagem das placas | | | | | | |
|---------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Amostra | Poço 1 | Poço 2 | Poço 3 | Poço 4 | Poço 5 | Poço 6 |
| PMN | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL | - |
| Pb18 | - | - | - | - | - | 1 mL |
| RPMI | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL |
| Vol. Total | 2 mL | 2 mL | 2 mL | 2 mL | 2 mL | 2 mL |

Esquema 2- Ilustração da placa de 12 poços utilizada para cultivo de PMN e montagem das placas com o volume em mL pipetados nos poços.

Fonte: Do autor.

As placas foram incubadas em estufa a 5% de CO₂ (VWR S/P by Sheldon MFG, INC) a 37°C nos tempos de incubação de 2, 6 e 18 horas. Após os tempos de incubação descritos, as células foram centrifugadas a 1780 x g e os sedimentos (compostos por células) tiveram sua viabilidade avaliada por coloração com *Trypan Blue* 0,2% quando se tratava de fagócitos e

Janus Green B vital dye para viabilidade de Pb. Os sedimentos foram semeados em placas para contagem de UFC e também armazenados para determinação da concentração de proteínas totais.

3.8 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE METABÓLICA DOS FAGÓCITOS USANDO O MÉTODO DO ÁCIDO BICINCONÍNICO

O método do Ácido Bicinconínico (BCA) (Sigma) permite a detecção colorimétrica e a quantificação de proteínas. Este método combina a redução de Cu^{2+} a Cu^+ por proteínas em meio alcalino (reação do biureto) com a detecção colorimétrica, muito sensível e seletiva, do íon Cu^+ usando um reagente contendo ácido bicinconínico (SMITH et al., 1985). Os ensaios foram realizados em triplicata e a leitura das densidades ópticas foram medidas em leitor de ELISA (Anthos Zenyth 200rt) 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).

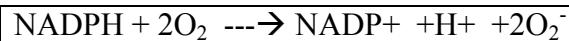
A curva de calibração foi feita com uma solução de BSA a $10\mu\text{g/mL}$ em 6 pontos de concentração proteica diferentes, sendo estes 10; 5; 2,5; 1,25; 0,67 e $0,33\mu\text{g/mL}$.

Para o cálculo da concentração proteica total de cada amostra, pipetou-se nos poços $50\mu\text{L}$ da amostra previamente rompida por ultrassom (Ultra Cleaner 1600 A) e $200\mu\text{L}$ do BCA. Todas as amostras foram pipetadas em triplicata e os resultados correspondem as médias dos valores obtidos subtraídos do branco, que neste ensaio foi o RPMI, meio no qual as células foram mantidas.

3.9 QUANTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO PELO MÉTODO DE QUIMILUMINESCÊNCIA

Os neutrófilos possuem atividade microbicida contra microrganismos catalase positiva e, esta atividade depende de intermediários reativos de oxigênio (IRO), tais como ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2), liberados a partir da

ativação da enzima NADPH oxidase e, esta reação é conhecida como metabolismo oxidativo de neutrófilo, que depende do uso de O₂ (ARDATI et al., 1997). A redução parcial de O₂ de ERO que são espécies químicas presentes nas membranas biológicas das células eucariontes gera IRO, portanto, o metabolismo oxidativo ou *burst oxidativo* é caracterizado pelo aumento no consumo de O₂ com consequente redução parcial a O₂⁻. A enzima NADPH é doador específico de elétrons para o oxigênio, conforme demonstrado na reação abaixo:



O ânion superóxido, por agir como um oxidante, é reduzido para H₂O₂, (CONDINO-NETO e al, 1996) um composto extremamente tóxico para os microrganismos (SCHIFF; HARVILLE, 1996).

A atividade do metabolismo oxidativo dos fagócitos pode ser avaliada por diversos métodos bioquímicos e citoquímicos. A quantificação de ERO usando substrato Luminol foi determinada a partir de ensaios de quimiluminescência (QL), que visa a quantificação da produção de ERO pelos PMN. Essa captação do ERO ocorre pela determinação da emissão de luz integrada por segundos (BABIOR, 1984).

No ensaio de QL, as células foram ajustadas para a concentração de 1x10⁶ PMN/mL. O luminol foi utilizado como substrato neste ensaio. Foram pipetados em uma cubeta 135 uL da suspensão de PMN e 30 µL de luminol e, em seguida, adicionado 135 µL da suspensão de RPMI. A leitura foi realizada em luminômetro (Promega-Glomag 20/20 Luminometer) e a intensidade de QL foi medida durante 30 minutos. Controles positivos e negativos foram utilizados para avaliar a ativação dos PMN. Foi utilizado como controle positivo o forbol miristato acetado (PMA) (EMMENDORFFER et al., 1994) e como controle negativo o difeniliodonio (DPI) (BABIOR, 1984).

3.10 QUANTIFICAÇÃO DE DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS

Seguem as informações relacionadas a quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC).

3.10.1 Preparação de meios de cultura

Foram preparados meios de cultura em placas de Petri médias para quantificação das UFC. O meio de cultura empregado para este procedimento foi BHI (Brain Heart Infusion – marca Kasvi) enriquecido com 1% de glicose, 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 30 % de fator de crescimento (FC) produzido pelo próprio fungo, pois já foi demonstrado que a adição de FC no meio de cultura aumenta a eficiência do crescimento do fungo (CASTANEDA et al, 1988; SINGER-VERMES et al, 1992; KURITA et al, 1992).

Durante a execução deste trabalho criamos um método eficiente de produção de FC. Esse método consistiu na semeadura de Pb18 em meio Fava Netto (FN) semi-sólido em Erlenmeyer e, após 4 dias de crescimento em estufa à 35° C (considerada ótima para o crescimento do fungo na fase leveduriforme), caldos de FN foram adicionados aos frascos por cima da colônia em crescimento (cerca de 35 mL). Os Erlenmeyer na qual os Pb estavam crescendo foram colocados em incubadora shaker (Marconi MA- 420) a 35° C com uma frequência de 115 rpm. Após uma semana no shaker, o caldo, já com um aspecto mais turvo, foi filtrado em membrana de micropore 0,45mm, obtendo-se desta forma o fator de crescimento.

3.10.2 Semeadura de Pb em placas de Petri por espalhamento e contagem de UFC

Os sedimentos obtidos, conforme descrito anteriormente foram semeados nas placas em alíquotas de 0,1mL e espalhados com o auxílio da alça de Drigalski estéril. Esse experimento foi realizado em triplicata. O crescimento das colônias foi observado por um período de 15 dias e a contagem foi realizada diariamente utilizando um marcador pincel para destacar as colônias que haviam crescido. Previamente foram feitas análises da concentração ideal de células de Pb18 que deveriam ser semeadas para que fossem quantificadas pelo método de UFC, bem como a placa que apresentou maior eficiência para o seu crescimento. Foi definido que o meio de cultura mais eficiente para o crescimento do Pb é o ágar BHI (Kasvi) suplementado com 1% de glicose, 30% de FC de 10% de SFB, que passou então a ser empregado nas análises referentes ao potencial fungicida de neutrófilos (dados não

apresentados no trabalho, mas que foi realizado em conjunto com a discente Ana Carolina Silvério Cerqueira Mendes).

3.11 INFECÇÃO INTRAPERITONEAL DOS CAMUNDONGOS SWISS COM PB18 PARA ANÁLISE DA SUSCEPTIBILIDADE VERSUS RESISTÊNCIA

Animais com a idade de 6 semanas e peso de 25g foram divididos em grupos de 10 animais, e infectados intraperitonealmente com Pb 18 na concentração de 5×10^6 células/mL viáveis, quantificadas em hemocítômetro. Os animais infectados foram mantidos no Biotério do Departamento de Ciências Biomédicas e monitorados semanalmente para observar o comportamento destes frente à infecção com o fungo virulento.

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados do número total de PMN, cinética da viabilidade celular, produção de proteínas, quantificação de espécies reativas de oxigênio e capacidade fungicida foram expressos como média e desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando análise multivariada de Kruskal-Wallis, seguida pelo pós-teste de Tukey através do programa GraphPad Prism® considerando 5% de significância ($p < 0,05$). Os gráficos apresentados também foram feitos pelo mesmo software.

4 RESULTADOS

Abaixo são apresentados em forma de texto e ilustrativos os resultados obtidos no trabalho.

4.1 PADRONIZAÇÃO DA BOLSA DE AR SUBCUTÂNEA

No método de obtenção de PMN pela formação de bolsa de ar subcutânea proposto por Meloni-Bruneri et al., (1996), os autores coletaram os PMNs após 24 horas e 15 dias de infecção. Porém, seguindo este parâmetro, observamos que após 24 horas não havia muitos PMN e ao esperarmos 15 dias para colhermos essas células, as bolsas já estavam rompidas. Portanto, padronizamos o tempo de infecção e observamos o rompimento das bolsas, pois para colher um número satisfatório de PMN, as bolsas de ar não poderiam estar rompidas, pois as células se perderiam através do extravasamento de todo o exsudado da bolsa.

A padronização do tempo de maturação das bolsas foi realizada em triplicata através de três experimentos diferentes. A tabela 2 apresenta a média dos resultados obtidos nesta padronização:

Tabela 2: Tempo de maturação das bolsas de ar subcutâneas após inoculação de Pb18.

| Tempo/dias | Número de animais | Quantidade de bolsas rompidas | % de bolsas rompidas |
|------------|-------------------|-------------------------------|----------------------|
| 10 dias | 30 | 0 | 0 |
| 12 dias | 30 | 8 | 26,67 |
| 15 dias | 30 | 17 | 56,67 |

Fonte: Do autor.

No nosso modelo, os PMN foram colhidos com 10 dias após a infecção e não 15 dias, conforme proposto por Meloni-Bruneri et al.(1996), devido ao rompimento das bolsas neste intervalo de tempo.

As figuras 2 e 3 demonstram a integridade da bolsa no décimo dia de inoculação e a figura 4 demonstra a bolsa rompida após o décimo dia de inoculação.



Figura 02-Visualização da bolsa de ar subcutânea, região látero-lateral dorsal do camundongo Swiss, no décimo primeiro dia de infecção com Pb18.

Fonte: Do autor.



Figura 03-Visualização da bolsa de ar subcutânea na região dorsal do camundongo Swiss, no décimo primeiro dia de infecção com Pb18.

Fonte: Do autor.



Figura 04- Visualização da bolsa de ar subcutânea rompida após décimo primeiro dia de infecção com Pb18.
Fonte: O autor.

4.2 VISUALIZAÇÃO DA BOLSA DE AR SUBCUTÂNEA OBTIDA APÓS INFECÇÃO COM PB18, INOCULAÇÃO COM ZYMOSAN OU SALINA

Na bolsa de ar subcutânea foi inoculada a cepa virulenta Pb18 ou a levedura Zymosan. Após esse procedimento foram observadas as características da bolsa subcutânea diariamente, até o décimo primeiro dia de maturação, conforme resultado anteriormente apresentado. Os PMN utilizados neste trabalho são provenientes das bolsas subcutâneas obtidas através de infecção com Pb18 ou inoculação com Zymosan. Não foram detectados PMN nos animais inoculados com salina a 0,9%, independente se esses fossem irradiados ou não.

As figuras 5 e 6 apresentam a característica externa da bolsa formada a partir da infecção com Pb18 ou inoculação com Zymosan, respectivamente. A figura 7 apresenta o aspecto interno de uma bolsa de ar subcutânea de camundongo inoculado com salina a 0,9%.



Figura 05- Visualização do aspecto externo de uma bolsa de ar subcutânea de camundongo Swiss no décimo dia de infecção com Pb18.

Fonte: Do autor.



Figura 06- Visualização do aspecto externo de uma bolsa de ar subcutânea de camundongo Swiss no décimo dia de infecção com Zymosan.

Fonte: Do autor.



Figura 07- Visualização do aspecto interno de uma bolsa de ar subcutânea de camundongo Swiss sacrificado após 10 dias de inoculação com salina.

Fonte: Do autor.

Conforme apresentado nas figuras 5 e 6, a inoculação tanto com Pb 18 ou com Zymosan não alteraram o aspecto da bolsa de ar após 10 dias de maturação. O mesmo não foi observado na inoculação com salina, pois não houve processo inflamatório local (figura 7). A formação de bolsas a partir do inoculo (Pb ou Zymosan) foram formadas no mesmo instante e o tempo ideal para a coleta de PMN ficou padronizado no décimo primeiro dia após a inoculação, tanto para Pb, como para Zymosan, conforme ilustrado pelas figuras 5 e 6.

4.3 ESTABELECIMENTO DO MODELO PARA APLICAÇÃO DA LASER-TERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA

Nos experimentos foi avaliada a influência da LLLT sobre a viabilidade celular, número total de PMN, produção de ERO e atividade fungicida *in vivo* pela quantificação das UFC dos PMN obtidos de camundongos infectados com Pb18 ou inoculados com Zymosan, comparando-os com o grupo controle.

Conforme descrito no item 3.6 em materiais e métodos, os camundongos foram irradiados em ambas as patas traseiras, em duas porções: região superior e inferior. A

frequência da radiação proposta por Meneguzzo et al, (2013) foi adaptada para 35,5 J/cm³ em um módulo de frequência contínua com comprimento de onda equivalente a 780 nm, com potência de 50 mW por 30 segundos, mantendo os padrões do processo terapêutico utilizando a LLLT que como comprovado, é capaz de estimular as células imunológicas (BENSADOUN et al.; 1999).

Ao irradiar a medula óssea, local pelo qual as células imunológicas são formadas, o processo de formação e amadurecimento dos PMNs nestes órgãos seria estimulado potencialmente pela irradiação.

A figura 8 apresenta a posição pela qual o camundongo é irradiado e o aparelho utilizado neste procedimento.



Figura 08- Aparelho de Irradiação. Marca Twim flex e camundongo irradiado na região superior da pata traseira direita.

Fonte: Do autor.

Após a aplicação da LLLT nos animais em dias alternados, conforme demonstrado na tabela 1, foi observado que as bolsas mantiveram-se íntegras, sem sinal de rompimento pela ausência de extravasamento do exsudado inflamatório gerado a partir da infecção com Pb18 ou Zymosan.

4.4 VISUALIZAÇÃO MACROSCÓPICA DO ASPECTO INTERNO DA BOLSA DE AR SUBCUTÂNEA OBTIDA APÓS INFECÇÃO COM Pb18 OU INOCULAÇÃO COM ZYMOSAN

As figuras 9 e 10 ilustram o aspecto interno da bolsa de ar subcutânea após 10 dias de infecção com Pb18 ou inoculação com Zymosan em camundongos de ambos os grupos: irradiados ou não irradiados. Na comparação entre as figuras 9A e 9B, nota-se que na figura 9A ocorreu uma diminuição no aspecto da bolsa subcutânea quando os camundongos foram infectados com Pb18 e irradiados com LLLT. A figura 10A apresenta um aspecto maior da bolsa de ar subcutânea de animais inoculados com Zymosan e irradiados, em comparação com a figura 10B em que os animais não foram irradiados.



Figura 9A- Aspecto da bolsa de ar subcutânea de camundongo Swiss sacrificado após 10 dias de infecção com Pb18. O animal foi irradiado.

Fonte: Do autor.



Figura 9B- Aspecto da bolsa de ar subcutânea de camundongo Swiss sacrificado após 10 dias de infecção com Pb18. O animal não foi irradiado.

Fonte: Do autor.



Figura 10A- Aspecto de bolsa ar subcutânea de camundongo Swiss sacrificado após 10 dias de inoculação com Zymosan. O animal foi irradiado.

Fonte: Do autor.



Figura 10B- Aspecto da bolsa de ar subcutânea de camundongo Swiss sacrificado após 10 dias de inoculação com Zymosan. O animal não foi irradiado.

Fonte: Do autor.

4.5 NÚMERO TOTAL DE PMN OBTIDOS DA BOLSA DE AR SUBCUTÂNEA

A figura 11 apresenta o número total de PMN quantificados através de hemocítmetro. Os PMN foram obtidos dos camundongos irradiados e não irradiados, infectados com Pb18 ou inoculados com Zymosan.

O número de PMN contidos na bolsa de todos os grupos experimentais confirma o aspecto da bolsa visualizado, uma vez que o número de PMN obtidos de animais irradiados infectados com Pb18 é menor do que PMN obtidos de animais não irradiados também infectados com Pb 18. O número de PMN obtidos de animais inoculados com Zymosan pode ser observado de maneira diferente em relação aos PMN obtidos de animais infectados com Pb18 irradiados: número total de PMN maior em animais irradiados em relação aos animais não irradiados (figuras 10A e 10B), mostrando um efeito contrário da LLLT em animais com inóculos diferentes: uma cepa virulenta de Pb e uma partícula não virulenta, mas ambas capazes de atrair PMN para o local da lesão. Já nos animais inoculados com salina, não houve

atração dos PMN para local da bolsa de ar subcutânea, tanto em animais irradiados como nos animais não irradiados.

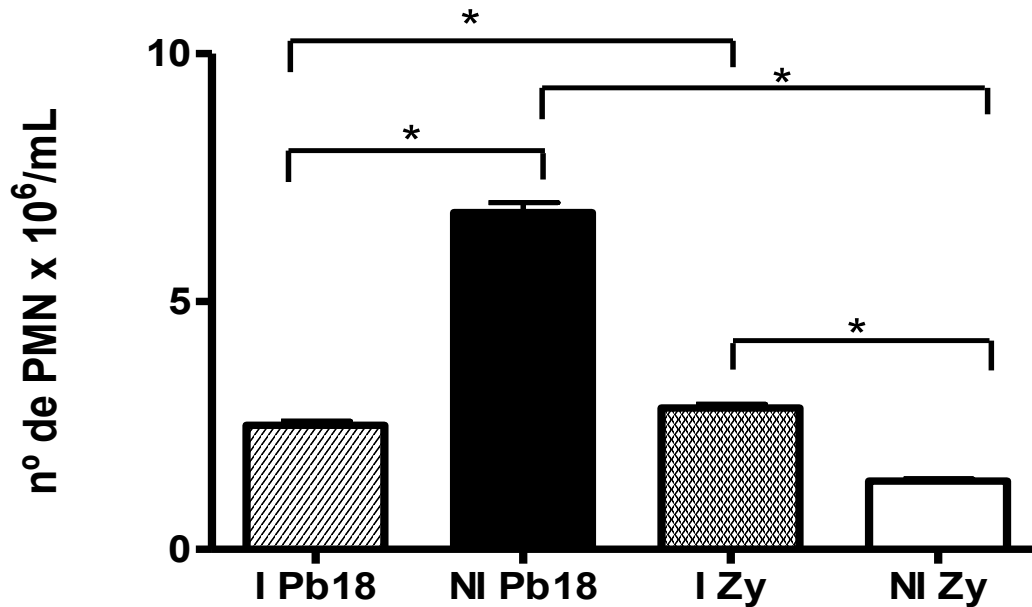


Figura 11- Número absoluto de PMN obtidos de camundongos infectados com Pb18 irradiados (I Pb18) ou não irradiados (NI Pb18) ou inoculados com Zymosan irradiados (I Zy) ou não irradiados (NI Zy) pelo método de bolsa de ar subcutânea. A barra indica os grupos analisados e comparados e os (*) denotam valores estatisticamente significativos, $p < 0,05$.

Fonte: Do autor.

4.6 CINÉTICA DA VIABILIDADE DOS PMN ISOLADOS DE BOLSA DE AR SUBCUTÂNEA APÓS DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO EM CULTURA

A viabilidade dos PMN provenientes da infecção com Pb18 ou da inoculação com Zymosan foi quantificada pelo método de exclusão de corante com *Trypan blue* nos tempos de incubação de 2, 6 e 18 horas.

4.6.1 Cinética da viabilidade dos PMN isolados de bolsa subcutânea obtida após infecção com Pb18 nos diferentes tempos de incubação.

A figura 12 apresenta a cinética da viabilidade dos PMN obtidos após infecção com Pb18 nos diferentes tempos de incubação. Os números de células viáveis de PMN se mantiveram acima de 70% e não se alteraram nos diferentes tempos de crescimento.

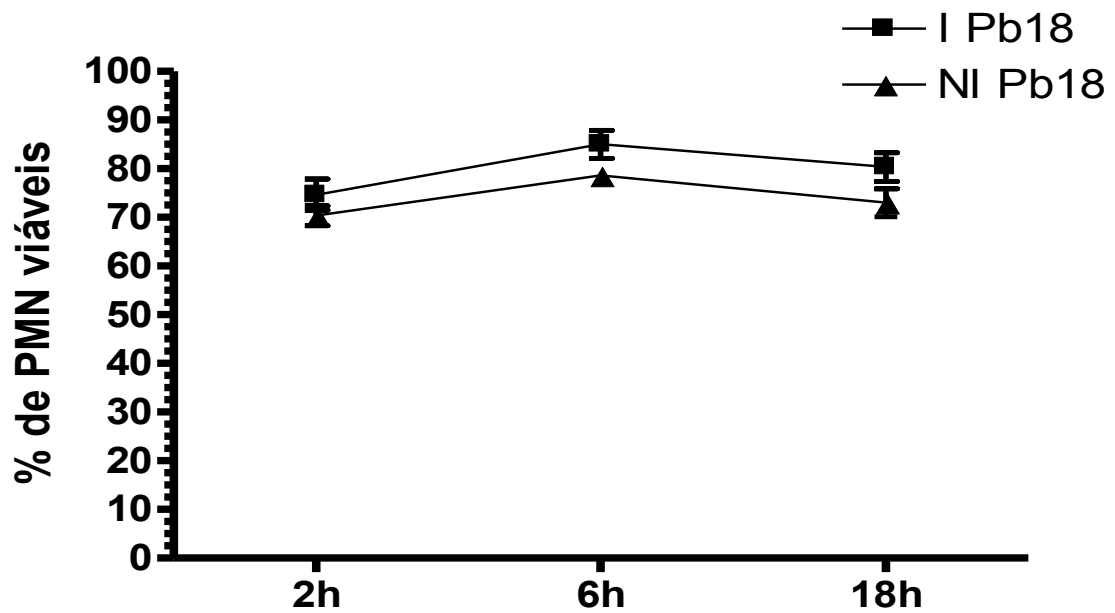


Figura 12- Cinética da viabilidade dos PMN isolados obtidos após infecção com Pb18 pelo método de bolsa de ar subcutânea de camundongos Swiss irradiados (I Pb18) ou não irradiados (NI Pb18), nos tempos de incubação em cultura de 2, 6 e 18 horas.

Fonte: Do autor.

4.6.2 Cinética da viabilidade dos PMN isolados de bolsa subcutânea obtida após inoculação com Zymosan nos diferentes tempos de incubação.

Quanto à cinética da viabilidade de PMN coletados de animais inoculados com Zymosan, não houve alteração, conforme demonstrado na figura 13.

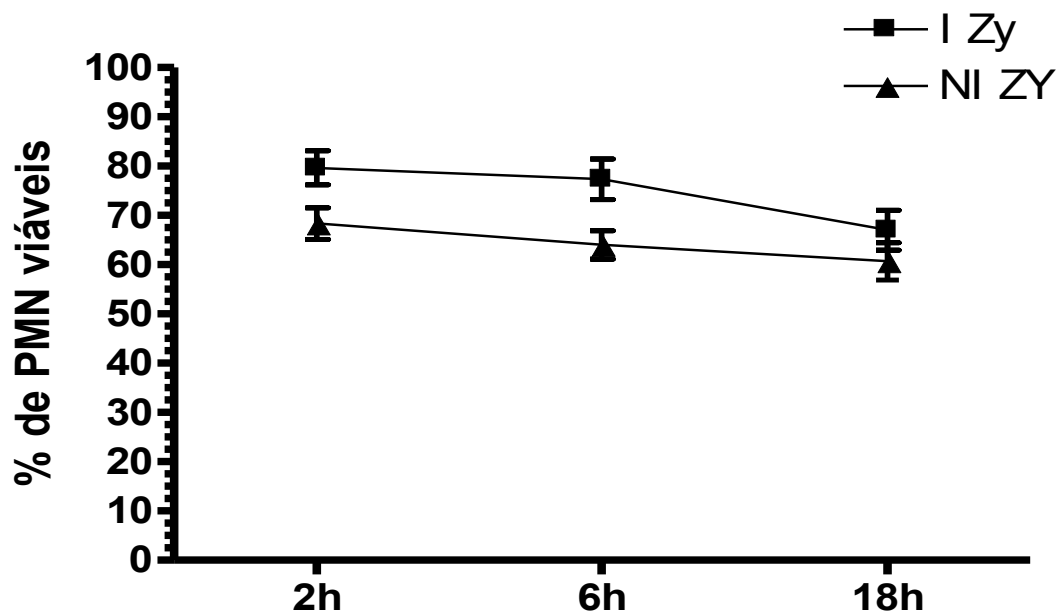


Figura 13- Cinética da viabilidade dos PMN isolados obtidos após inoculação com Zymosan pelo método de bolsa de ar subcutânea de camundongos Swiss irradiados (I Zy) ou não irradiados (NI Zy), nos tempos de incubação em cultura de 2, 6 e 18 horas.

Fonte: Do autor.

4.7 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS POR PMN ISOLADOS DE BOLSA DE AR SUBCUTÂNEA

A produção de proteínas por PMN obtidos após infecção com Pb18 ou inoculação com Zymosan foram quantificadas nos tempos de 2, 6 e 18 horas.

4.7.1 Avaliação da cinética da produção de proteínas por PMN isolados obtidos após infecção com Pb18

Na dosagem de proteínas foi utilizado o mesmo número de células e, em todas as amostras, obtivemos cerca de 80 a 90% de neutrófilos inviáveis após o procedimento de ruptura da membrana celular em ultrassom.

Na figura 14 pode-se observar uma maior produção de proteínas no tempo de incubação de 2 horas, com queda nos tempos de 6 e 18 horas, havendo uma diferença significativa entre o tempo de 2 e 18 horas para PMN obtidos de animais irradiados ($p < 0,05$). Por sua vez, os PMN dos animais não irradiados apresentaram um aumento na produção de proteínas totais com 18h de incubação.

Na dosagem de duas horas para ambos os grupos de PMN (animais irradiados ou não irradiados) quando comparados, houve uma diferença estatística demonstrando uma maior produção de proteínas por PMN de animais irradiados. No tempo de incubação de 18 horas, os PMN de animais não irradiados apresentaram maior produção de proteínas totais significativamente maior do que de PMN colhidos de animais irradiados, e isso se deve ao fato do PMN de camundongos irradiados chegarem mais ativos ao local de inoculação, perdendo gradativamente esse estado de ativação celular, diminuindo a produção de proteínas.

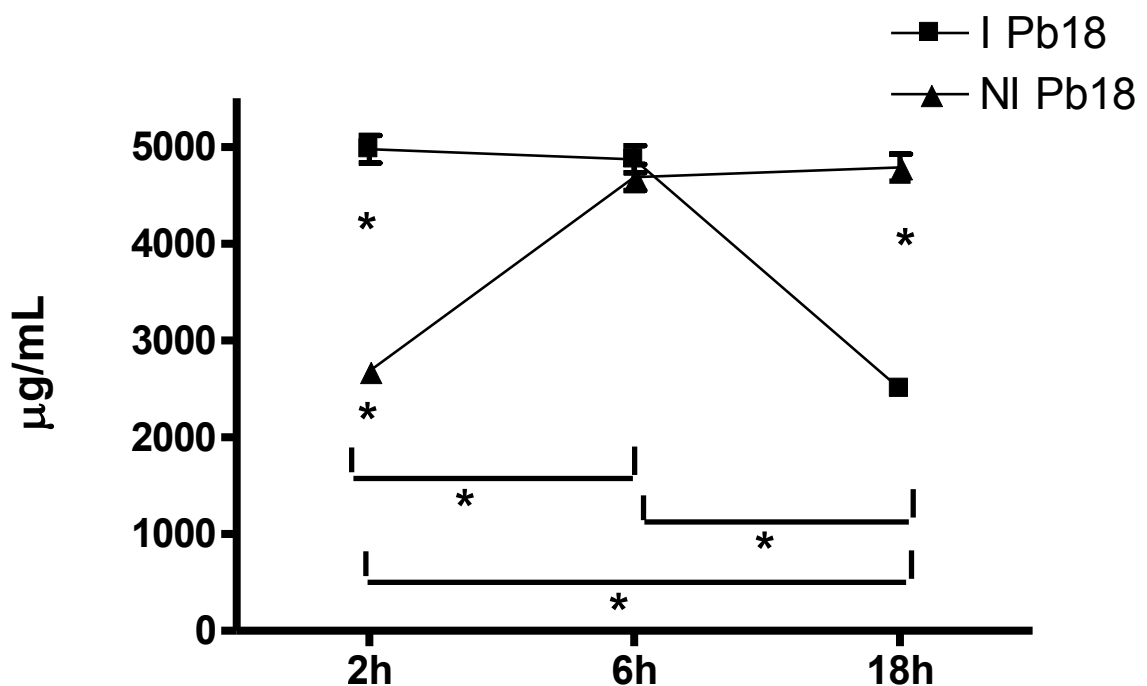


Figura 14- Cinética da produção de proteínas por PMN isolados nos tempos de incubação de 2, 6 e 18 horas. Os PMN foram obtidos de camundongos Swiss infectados com Pb18 pelo método de bolsa de ar subcutânea, Legenda: camundongos irradiados(I) ou não irradiados (NI). A barra indica os grupos analisados e comparados e os (*) denotam valores estatisticamente significativos, $p < 0,05$.

Fonte: Do autor.

4.7.2 Avaliação da cinética da produção de proteínas por PMN isolados obtidos após inoculação com Zymosan

Na figura 15, a produção de proteínas pelos PMN colhidos de animais irradiados apresentaram-se maior no tempo de incubação de 2 e 6 horas. Nos ensaios de cinética da produção de proteínas por PMN obtidos após inoculação com Zymosan foi possível observar que os PMN provenientes dos animais irradiados possuem uma maior produção de proteínas em comparação com PMN provenientes do grupo controle em todos tempos de incubação, havendo uma diferença estatística nos tempos de 2 e 6 horas entre os grupos, com queda nos tempos seguintes.

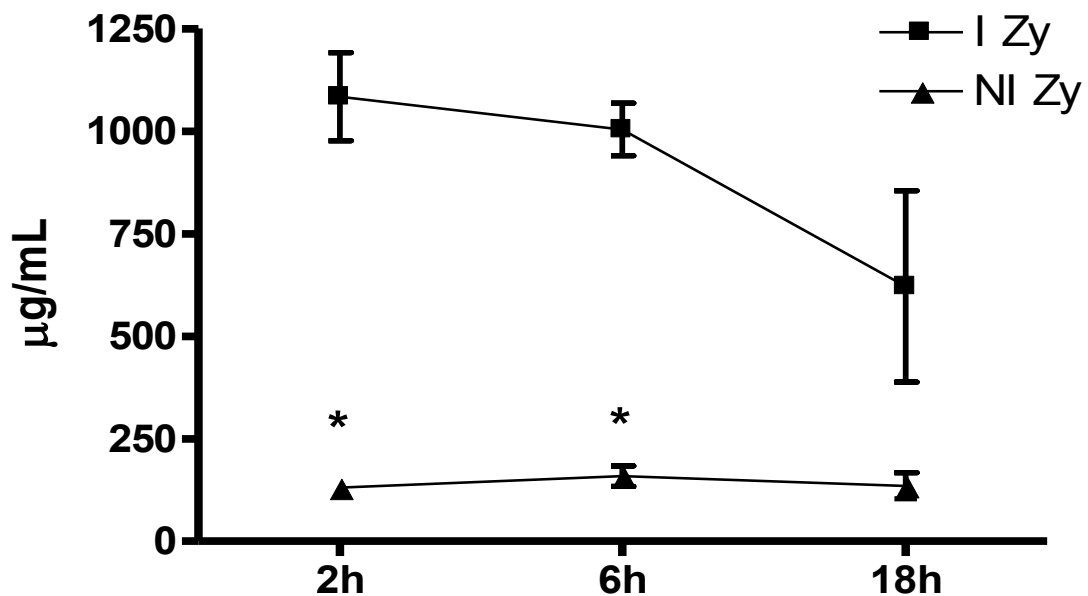


Figura 15- Cinética da produção de proteínas por PMN isolados nos tempos de incubação de 2, 6 e 18 horas. Os PMN foram obtidos de camundongos Swiss inoculados com Zymosan pelo método de bolsa de ar subcutânea.

Legenda: camundongos irradiados (I Zy) ou não irradiados (NI Zy). (*) denotam valores estatisticamente significativos, $p < 0,05$.

Fonte: Do autor.

4.8 QUANTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS DO OXIGÊNIO EMITIDOS POR PMN OBTIDOS APÓS INFECÇÃO COM PB18 OU INOCULAÇÃO COM ZYMOSAN

Para os experimentos de quantificação de metabólitos do oxigênio foi utilizada a metodologia de transformação do luminol em lucigenina na presença de ERO. Em todos os experimentos foram feitas leituras de um controle positivo, PMA e um controle negativo, DPI.

Foram quantificadas a produção de ERO tanto de PMN provenientes de camundongos irradiados ou não irradiados, recém isolados da bolsa de ar subcutânea infectados com Pb18 ou inoculados com Zymosan, conforme mostrado na figura 16. Nos resultados, observou-se uma maior produção de ERO pelos PMN obtidos de camundongos irradiados, em comparação com o grupo de animais não irradiados ($p < 0,05$), sugerindo que a LLLT possui a capacidade de estimular células imunológicas.

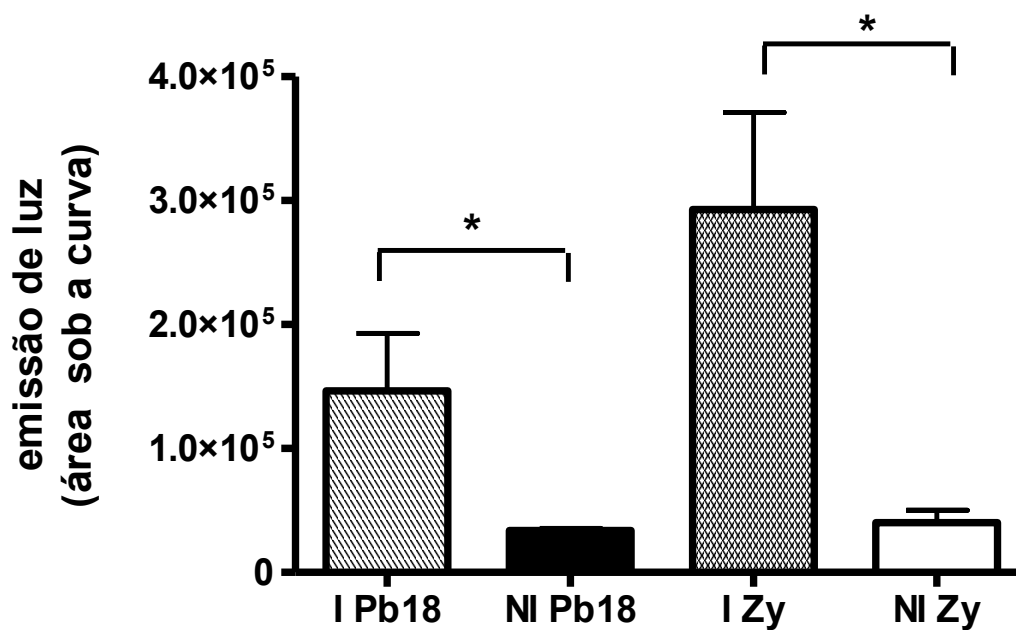


Figura 16- Quantificação dos metabólitos do oxigênio Grupos: PMN obtidos após infecção com Pb18 pelo método de bolsa de ar subcutâneo, irradiados (I Pb18) ou não irradiados (NI Pb18) ou PMN obtidos após inoculação com Zymosan de camundongos irradiados (I Zy) e mantidos sem irradiação (NI Zy). A barra indica os grupos analisados e comparados e os (*) denotam valores estatisticamente significativos, $p < 0,05$.

Fonte: Do autor.

4.9 CAPACIDADE FUNGICIDA DE PMN OBTIDOS APÓS INFECCÃO COM Pb18

Para os experimentos de quantificação de unidade formadoras de colônias (UFC), os PMN obtidos da coleta foram colocados em placa de cultura com meio RPMI incubados por 2 horas em estufa da 37°C com 5% de CO₂. Após esse período, os PMN foram cultivados em placas contendo o meio de cultura BHI, conforme descrito em materiais e métodos (ítem 3.10.2, página 48) para contagem das colônias crescidas por um período de 15 dias.

A figura 17 mostra o número de colônias de Pb quantificadas após 7 e 12 dias de crescimento em placa com resultados significativos quando os grupos de animais irradiados e não irradiados foram comparados, com valor para $p < 0,05$. Os fungos quantificados nas placas de cultivo são provenientes da bolsa de ar subcutâneo de camundongos infectados com Pb18. Portanto, os PMN isolados obtidos da coleta entraram em contato com o Pb18 apenas no processo de infecção dos camundongos.

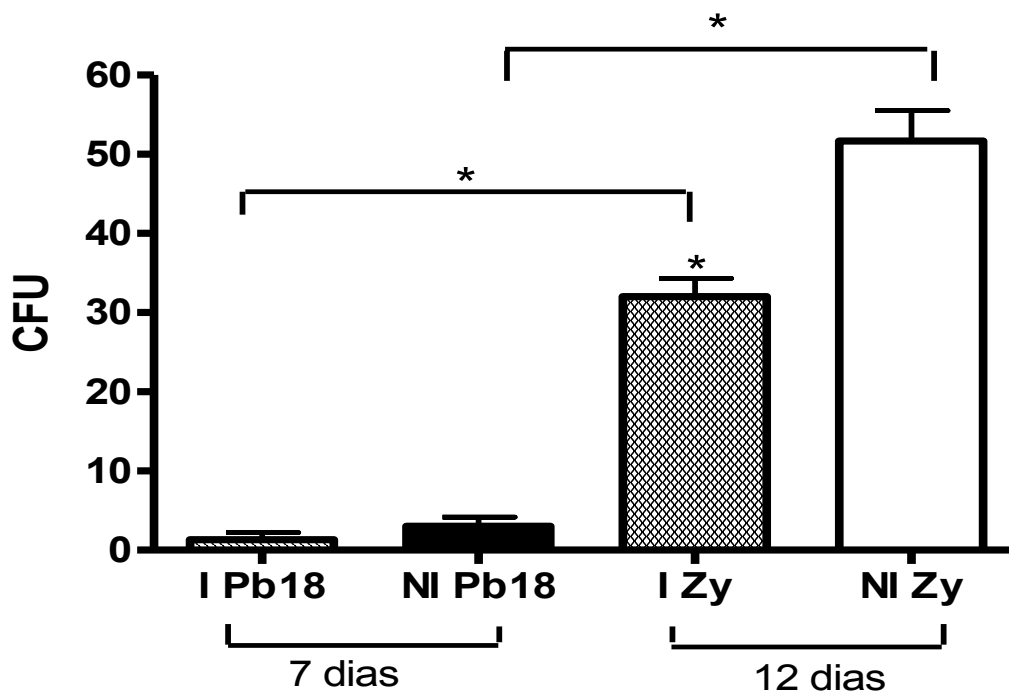


Figura 17-Capacidade fungicida de PMN obtidos após infecção com Pb18 pelo método de bolsa de ar subcutâneo, em ambos os grupos: PMN obtidos de camundongos Swiss irradiados (I Pb18) ou grupo controle (NI Pb18) por um período de 7 e 12 dias de contagem em placa. A barra indica os grupos analisados e comparados e os (*) denotam valores estatisticamente significativos, $p < 0,05$.

Fonte: Do autor.

As figuras 18 e 19 apresentam as placas contendo as colônias de Pb18 quantificadas após sementeira do exsudato colhido da bolsa de ar subcutânea de animais irradiados e não irradiados, respectivamente.

O número de UFC de Pb18 é menor no grupo dos animais não irradiados, o que demonstra que a LLLT torna os PMN mais eficientes na eliminação do Pb18.



Figura 18- Placa de petri contendo meio BHI suplementado com colônias de Pb18 provenientes do exsudato da bolsa de ar subcutânea de animais irradiados, por um período de 7 dias em crescimento.

Fonte: Do autor.

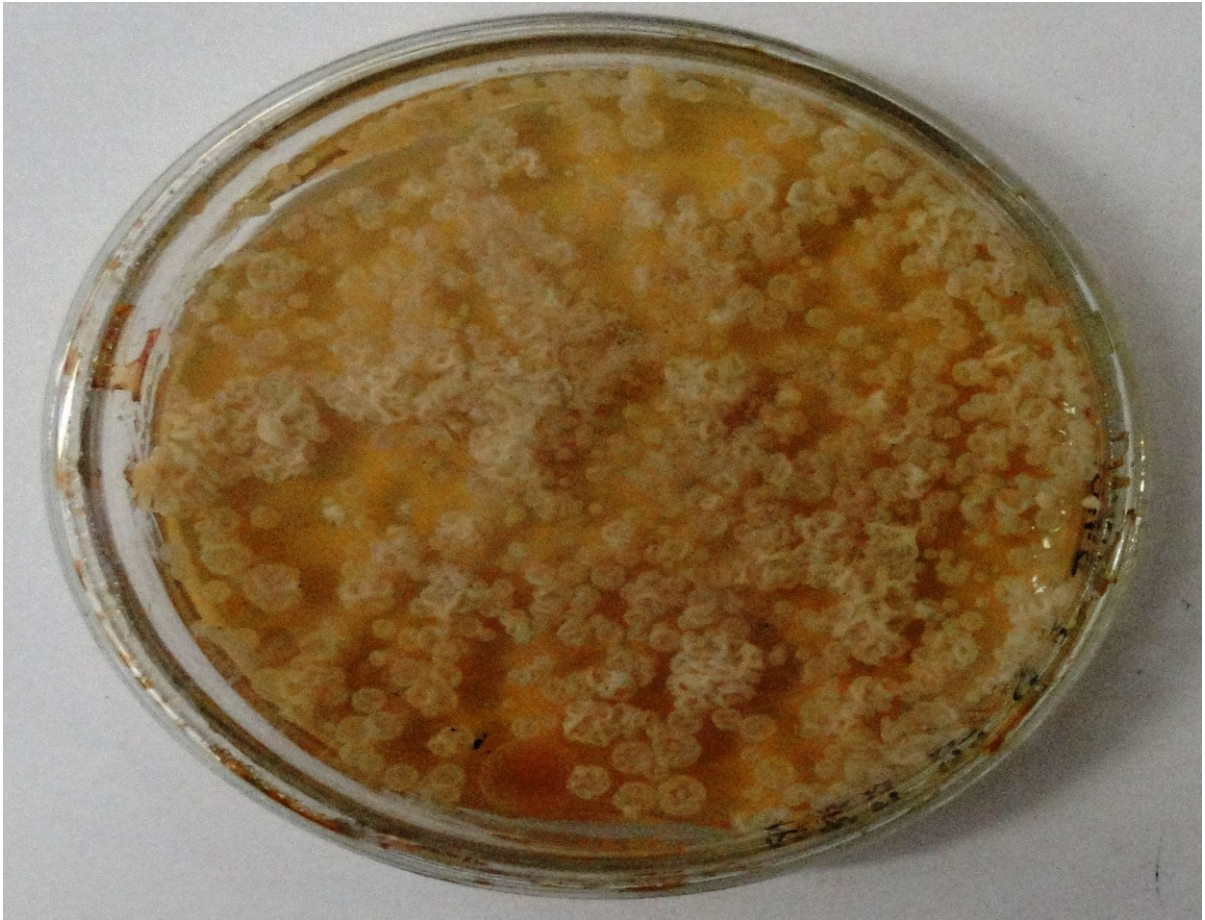


Figura 19- Placa de petri contendo meio BHI suplementado com colônias de Pb18 provenientes do exsudato da bolsa de ar subcutânea de animais não irradiados, por um período de 12 dias em crescimento.
Fonte: Do autor.

4.10 SOBREVIDA DOS CAMUNDONGOS SWISS INFECTADOS COM PB18

Com a finalidade de observar o comportamento dos camundongos Swiss quanto à susceptibilidade e resistência ao Pb18, foram infectados intraperitonealmente três grupos de camundongos fêmeas com o isolado virulento Pb18. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressam a média e desvio padrão.

A tabela 3 mostra que os camundongos sobreviveram com uma média de tempo de sobrevivida superior aos animais suseptíveis a infecção com Pb18, mesmo a cepa estando muito virulenta.

As figuras 20 e 21 mostram um camundongo sobrevivente a este tempo de infecção com Pb18.

Tabela 3: Sobrevida dos camundongos fêmeas Swiss infectados com Pb18 via intraperitoneal.

| Número de camundongos infectados | Média e desvio padrão do tempo de sobrevida (dias) | Tempo de infecção (dias) | Camundongos sobreviventes |
|----------------------------------|--|--------------------------|---------------------------|
| 10 | 278±28,2 | 292 | 7 |
| 20 | 167 ±40 | 178 | 18 |
| 20 | 224± 82 | 269 | 13 |

Fonte: Do autor.



Figura 20-Visualização externa da região lateral-esquerdo de uma lesão epitelial em camundongos Swiss infectados intraperitonealmente com Pb18. Presença de pápulas eritematosas e queda de pêlos.

Fonte: Do autor.

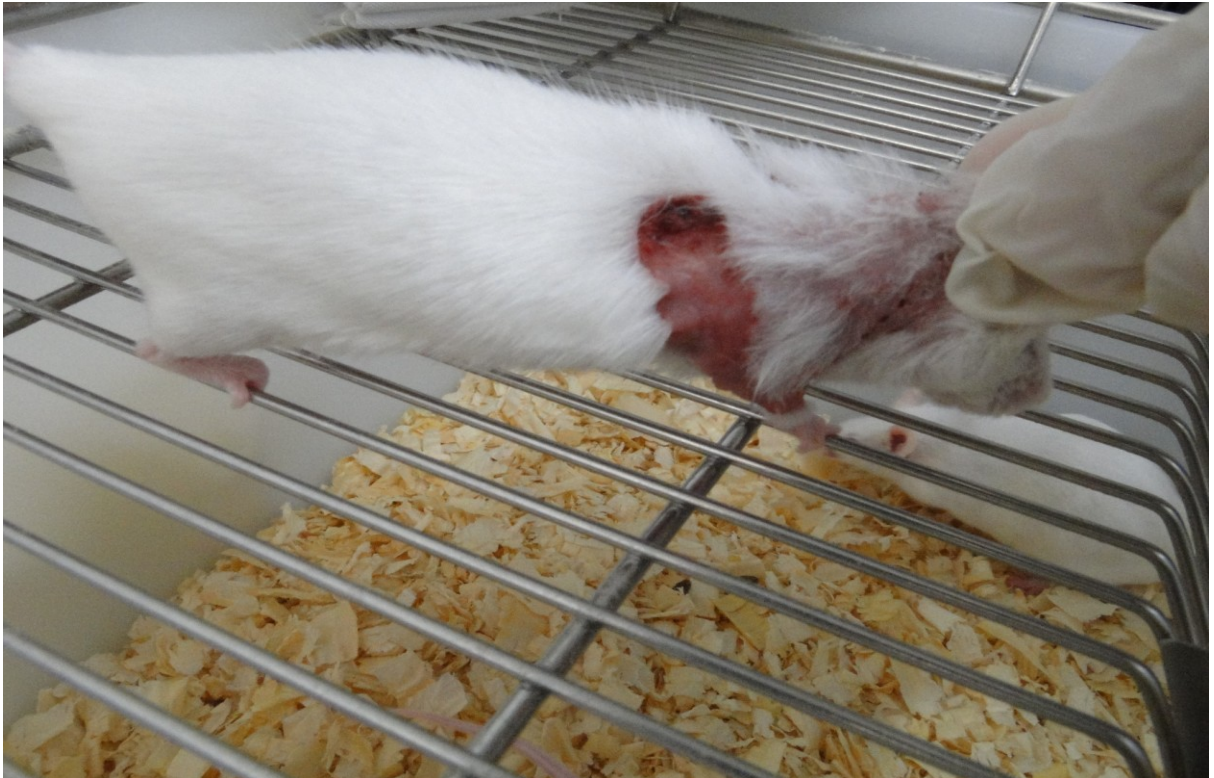


Figura 21- Visualização externa da região lateral-direito de uma lesão epitelial em camundongos Swiss infectados intraperitonealmente com Pb18, com queda de pêlos.
Fonte: Do autor.

5 DISCUSSÃO

Este capítulo apresenta a discussão sobre os resultados obtidos neste trabalho.

5.1 PADRONIZAÇÃO DA BOLSA DE AR SUBCUTÂNEA

Neste trabalho realizamos a repadronização da técnica de obtenção de PMN pela técnica de bolsa de ar subcutânea. A partir da padronização do tempo de infecção e maturação da bolsa de ar subcutânea, conseguimos estabelecer um modelo que mantivesse a integridade das mesmas, sem extravassar o conteúdo celular e prejudicar a colheita dos PMN, além de obter uma amostra praticamente pura de PMN, comprovado pela coloração diferencial com corante Giemsa. Portanto, os PMN passaram a ser colhidos com 10 dias após a infecção e não 15 dias conforme proposto por Meloni-Bruneri et al., (1996), pois quando as bolsas de ar foram mantidas por 15 dias de infecção, observamos um extravasamento de exsudado do interior da bolsa, inviabilizando a coleta de PMN. Podemos atribuir este fato a variação da virulência do isolado Pb18 empregado neste processo de inoculação, devido aos repiques e manutenção da amostra fungica que se mantiveram virulenta, comprovada pela visualização das figuras 20 e 21. Mesmo que esta representação seja por via intraperitoneal, o mesmo isolado de Pb18 foi empregado para realização do método de inoculação de bolsa de ar subcutâneo.

5.2 MODELO DA LLLT

A laser-terapia de baixa potência exerce efeitos moduladores sobre os PMN, pois, conforme descrito por Tadakuma (1993), a LLLT pode ter um papel importante na terapia imunobiológica pela capacidade de ativar e aumentar a reação normal dos componentes do sistema imune, o que pode ser comprovado pelos dados obtidos neste trabalho.

O estabelecimento do modelo a ser aplicado a laser terapia de baixa potência, de acordo com a frequência de irradiação que utilizamos, mostrou-ser bastante eficaz, a partir

dos resultados que obtivemos da viabilidade celular, conforme demonstrado nas figuras 12 e 13, pois a viabilidade de PMN obtidos de camundongos irradiados, independente da infecção com Pb18 ou inoculação com Zymosan não foi alterada, mantendo-se constante nos diferentes tempos de incubação da célula em cultura (2, 6 e 18 horas). Portanto, o laser não alterou a viabilidade das células, o que confirma a sua capacidade de causar efeitos estimulantes em células imunológicas (BENSADOUN et al., 1999) sem afetar diretamente a ação dos PMN recrutados para o local da lesão.

Outro aspecto importante do estabelecimento deste modelo é o local em que o tratamento de LLLT foi aplicado: nas duas patas traseiras dos camundongos, local onde se localiza a medula óssea, tecido responsável pela geração e maturação dos neutrófilos (MARY, 1985). Portanto, no modelo empregado no presente trabalho, a LLLT não atinge o Pb ou Zymosan que são inoculados no dorso dos camundongos, longe da medula óssea. Assim, o Pb não é atingido pela radiação que poderia eventualmente afetá-lo.

Nosso objetivo para ativar o PMN para que esta célula desempenhe melhor seu papel contra a infecção causada pelo Pb permitiu estabelecer um novo método nunca realizado antes com esta finalidade: LLLT aplicada na medula óssea presente nos fêmures dos camundongos, local onde ocorre formação e maturação dos PMN. Esta técnica deve ser completamente segura, já que não há contra-indicações conhecidas, além de ser rápida e fácil de executar. A LLLT é uma radiação não ionizante e não-térmico que é conhecida por melhorar a regeneração do tecido (SPERANDIO et al., 2014; RODRIGUES ET al, 2013), ativando várias vias de sinalização relacionadas com proliferação celular, reparo e regeneração do tecido (AVCI et al., 2013; GUPTA et al., 2013).

Os PMN utilizados neste trabalho são provenientes das bolsas subcutâneas obtidos através de infecção com Pb18 ou inoculação com Zymosan, pois não foram detectados por este método PMN no local da inoculação com salina a 0,9% (figura 7). Tanto a infecção subcutânea com Pb e a inoculação com Zymosan foi marcada pela resposta dos neutrófilos (DOHERTY et al., 1985).

Apesar do número total de PMN quantificados na bolsa de ar dos camundongos irradiados serem menor em animais infectados com Pb18, estas células encontram-se metabolicamente mais ativas. Estes dados indicam que os PMN chegam mais ativos ao local da infecção quando os camundongos foram irradiados. A irradiação a *laser*, quando empregada em comprimentos de ondas visíveis e infravermelhos, é caracterizada como não ionizante, o que a torna incapaz de causar danos ao DNA celular (LILJENDAHL et al., 2012) o que comprova que, apesar de ser em menor quantidade (figura 11), os PMN chegaram ao

local mais ativos. Estudos demonstram que a LLLT possui a capacidade de interagir com as células, induzindo repostas que podem ser moduladas pelo comprimento de onda, potência e parâmetros da irradiação (ALMEIDA-LOPES et al., 2001), bem como do tecido que foi irradiado (FRIGO et al., 2009), uma vez que estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que o tratamento com *laser* altera positivamente o local irradiado, acelerando reações bioquímicas, ativação fibroblástica, síntese de colágeno além de aumentar a atividade fagocitária de leucócitos (COUTINHO et al 2007; OLIVEIRA et al., 2008).

Os neutrófilos são atraídos para o local da inoculação com Pb através do reconhecimento de moléculas de superfície do fungo (gp43) pelos TLRs e CLR presentes na membrana dos PMN (McINTURFF et al., 2005), além de serem atraídos pela presença do próprio Pb, que estimula liberação de fatores quimiotático atraindo os PMN para o local da lesão (CALICH; VAZ; BURGER, 1985), podendo também ser ativados pelo reconhecimento de fragmentos de proteínas da via alternativa do sistema complemento. A partir desse reconhecimento do fungo, os PMN produzem proteínas pró-inflamatórias via molécula adaptadora MyD88 que atrai mais células para o local da lesão (BONFIN et al., 2009).

Por sua vez, o reconhecimento do Zymosan se dá através de proteínas biologicamente ativas presentes na sua constituição, principalmente β -glucana, que é reconhecida pelos receptores de dectin-1 e CR3 presente na membrana dos PMN (BATTLE et al., 1999; Brown; Gordon, 2003) e após seu reconhecimento ocorre muitas respostas inflamatórias, tais como a produção de ERO e citocinas que são envolvido na fagocitose de microrganismos por neutrófilos e macrófagos (VETVICKA, 2014). A inflamação que ocorre na ausência de microrganismos é denominada inflamação estéril, e possui como característica um acentuado recrutamento de neutrófilos (CHEN et al.; 2011). Tanto Pb como Zymosan são capazes de modificar a resposta imunológica no processo de inoculação, influenciando diretamente na resposta desempenhada pelos PMN, que, além de produzir substâncias derivadas do oxigênio, os PMN produzem também, *in vivo*, grande quantidades de leucotrienos e prostaglandinas, desencadeando edema e processo inflamatório local (ACORCI et al., 2009), principalmente quando estas células são estimuladas com INF- γ , TNF- α , GM-CSF e IL-15 (TAVIN et al., 2008). Os PMN de pacientes infectados com Pb (RESTREPO; VELEZ, 1975) desempenham um papel importante na resposta imunológica, por contribuírem com a proteção do hospedeiro contra infecção causada por fungos, especialmente nas fases iniciais da PCM (ACORCI-VALERIO et al., 2010). Além disso, defeitos na ativação de PMN também se correlacionam com a ausência da atividade fungicida destas células, uma vez que

para uma erradicação do Pb, é necessária a ativação das células Th1, com consequente produção de IFN- γ e a ativação de células fagocíticas.

Durante a maturação dos neutrófilos na medula óssea, ocorre a síntese de diversas proteínas e muitas destas são armazenadas em diferentes grânulos, tais como grânulos azurófilos ou primários, secundários ou específicos e terciários. Os grânulos azurófilos contêm uma enzima importante para o metabolismo oxidativo, a MPO (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003). Os grânulos específicos contêm lactoferrinas e são formados após a geração dos grânulos azurófilos e os grânulos de gelatinase contêm poucos agentes antimicrobianos. Esses grânulos são indispensáveis para as atividades dos PMN durante a inflamação (BORREGAARD et al, 2007).

As figuras 14 e 15 mostram a cinética da produção de proteínas totais por PMN. Apesar do número total de PMN ser menor em animais irradiados, observa-se que estas células produziram maiores quantidades de proteínas em comparação com PMN obtidos de animais inoculados com Zymosan ou infectados com Pb18 não irradiados. Na figura 14, nota-se que nos tempos de 2 horas ocorreu uma produção de proteínas totais em grande escala, permanecendo constante no tempo de 6 horas, mas diminuindo significativamente a produção no tempo de 18h. Efeito contrário é observado em PMN obtidos de animais não irradiados, onde a produção passou a aumentar no tempo de incubação de 6h. O aumento da produção de proteínas totais sugere aumento da atividade dos PMN, o que pode significar apoptose destas células durante a infecção, porém nossos dados de viabilidade celular durante os diferentes tempos de incubação mostraram que independente do estímulo para obtenção, os PMN mantiveram sua viabilidade alta, mostrando dessa forma que a produção de proteínas relaciona-se com atividade metabólica frente ao Pb18 e pelo Zymosan. Há relatos que a radiação infravermelha promove apoptose celular (SILVA, 2009), o que sugere que a LLLT com infravermelho estimula ainda mais a produção de proteínas pelos PMN, apesar de não causar danos ao DNA destas células pela baixa potência utilizada no experimento.

Meloni-Bruneri et al., (1996) apresentou que a estimulação *in vitro* de neutrófilos de camundongos resistentes com Pb resulta na produção de maiores quantidades de ERO do que em camundongos susceptíveis, indicando que durante a infecção, os camundongos susceptíveis perdem sua habilidade de produzir oxigênio. Apesar do tempo de maturação das bolsas serem de 10 dias a partir da inoculação, os PMN produziram grandes quantidades de ERO, mantendo o mesmo padrão de produção quando comparados com linhagens resistentes de camundongos frente à infecção com Pb, como os camundongos A/J (utilizados no desenvolvimento do trabalho de Meloni-Bruneri et al, 1996). Além da produção de grandes

quantidades de ERO, no percurso da infecção causada por Pb, os PMN também produzem numerosas citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (MANTOVANI et al., 2011), que direcionam a resposta imune adaptativa por comunicar-se com vários tipos celulares, incluindo linfócitos B (PUGA et al., 2012), células dendríticas (BENNOUNA; DENKERS, 2005) e células T (BEAUVILLAIN, 2007) auxiliando na erradicação do fungo.

Estudos já mostraram que os PMN, quando em contato com agentes infecciosos, iniciam o processo de fagocitose, evento este que promove intensa atividade metabólica e grande consumo de oxigênio, conhecido como *burst* respiratório (HENDERSON; CHAPPELL, 1996). Durante esse processo ocorre a ativação do complexo enzimático Nox2, que culmina na formação de diferentes espécies reativas de oxigênio, como O^{2-} , H_2O_2 e seus derivados (BABIOR, 2000), o que torna os PMN capazes de eliminar o Pb, uma vez que a maior produção de ERO está relacionado com o mecanismo de atuação da LLLT (KARU et al., 2001; PYATIBRAT; AFANASYEVA, 2004).

Independentemente do modo de obtenção dos PMN, seja por infecção com Pb18 ou inoculação com Zymosan, houve maior produção de ERO quanto estas células foram obtidas de camundongos irradiados em comparação com o grupo controle, havendo uma diferença significativa entre os grupos. O mecanismo de atuação da LLLT, em níveis celulares, baseia-se no aumento do metabolismo oxidativo mitocondrial, devido a excitação dos componentes da cadeia respiratória (KARU; PYATIBRAT; AFANASYEVA, 2004). Portanto, os PMN de animais irradiados são capazes de produzir maiores quantidades de ERO, importante para a disseminação do fungo.

No estudo de Kurita et al., (2000) foi observado que $INF-\gamma$, GM-CSF e $IL-1\beta$ possuem um importante papel na defesa do hospedeiro nas fases iniciais de infecção com Pb, aumentando sua atividade fungicida e atraindo PMN para o local da infecção que, a partir do reconhecimento de proteínas antigênicas do Pb, utilizaram mecanismos dependentes de oxigênio para lisar o fungo, após o processo de fagocitose realizado pelos PMN, que resulta na produção de muitas ERO, como H_2O_2 , que atua como um fungicida, diretamente tóxico para o Pb (RODRIGUES et al., 2007; TAVIN et al., 2008), o que resulta na diminuição das colônias quantificadas no meio de cultura.

Essa capacidade dos PMN provenientes de animais irradiados eliminarem melhor o Pb foi comprovado pela quantificação das UFC em 7 e 12 dias de contagem em placa, respectivamente. Os fungos provenientes da bolsa de ar subcutânea de animais não irradiados cresceram de maneira exacerbada, impedindo a contagem das colônias em dias posteriores, o

que indica que a LLLT aumentou a capacidade dos PMN serem mais eficientes na eliminação do Pb18, pois foi observado um menor crescimento de colônias fungicas nestas placas.

Calich et al., (1985) correlacionou o patrimônio genético de diversas linhagens de camundongos com a infecção pelo fungo estabelecendo o perfil de susceptibilidade e resistência. Dentre os resultados apresentados pelos autores, nota-se que a linhagem de camundongos Swiss assemelham-se, de acordo com o tempo médio de sobrevivência de linhagens murinas isogênicas resistentes ao fungo, uma vez que camundongos da linhagem A/J, apresentaram um tempo médio de sobrevivência de 377, sendo considerada uma linhagem resistente, diferente da linhagem susceptível, que apresentaram um tempo médio de sobrevivência de 132 dias, que são os camundongos B10.A.

Ao analisarmos os resultados que obtivemos no trabalho, nota-se que o tempo médio de sobrevivência dos camundongos da linhagem Swiss assemelham-se ao da linhagem resistente ao Pb, camundongos A/J. Porém, o perfil de sobrevivência dos animais A/J e B10.A foram traçados após a morte total de ambas as linhagens infectadas, diferente de nosso resultado, uma vez que, conforme demonstrado na tabela 3, ainda existam animais sobreviventes. Observando a tabela 3, a primeira infecção está ocorrendo à 292 dias, e ainda existem sete camundongos Swiss sobreviventes, o que confirma a tendência do camundongo ser resistente à infecção causada por Pb.

No presente estudo, a LLLT pareceu ser uma abordagem (terapêutica) viável, uma vez que levou ao aumento da capacidade de fungicida de PMN, além de não induzir resistência devido a sua aplicação e não levar a efeitos adversos no organismo. O efeito do LLLT permitiu recrutar PMN mais ativos, capazes de combater a cepa altamente virulenta Pb18 (SINGER-VERMES et al., 1989) *in vivo*. Novos estudos ainda são necessários para melhor caracterização deste modelo.

6 CONCLUSÃO

No presente trabalho, conseguimos estabelecer e padronizar um modelo ideal para estudar a influência da LLLT em camundongos infectados com Pb pelo método de bolsa de ar subcutâneo e traçar o perfil dos camundongos Swiss quanto a susceptibilidade ou resistência a infecção por Pb, na qual estes mostraram um perfil de resistência ao fungo.

Os PMN de animais irradiados, apesar do menor número absoluto total em comparação com PMN coletados de camundongos não irradiados, são mais ativos, uma vez que a laser-terapia de baixa potência inserido nas patas traseiras dos camundongos, foi capaz de influenciar positivamente no efeito modulador da fase de formação e maturação dos neutrófilos, pois independente do estímulo para a sua obtenção (Pb18 ou Zymosan), esse tratamento rendeu aos neutrófilos maior atividade metabólica pela quantificação de produção de proteínas totais e pelo aumento na produção de ERO, bem como maior capacidade fungicida frente à cepa virulenta de *P. brasiliensis*.

Para os camundongos irradiados inoculados com Zymosan, o número absoluto total de PMN é maior que o número de PMN obtidos de camundongos não irradiados, porém, os PMNs obtidos de animais que sofreram irradiação mantiveram-se mais ativos pelos mesmos parâmetros anteriormente citados.

Portanto, independentemente da natureza do estímulo para atrair PMNs, a LLLT estimula o metabolismo do PMN, tornando estas células mais competentes na sua atividade fungicida, o que confirma a capacidade desta irradiação atrair para o local de infecção, células imunologicamente mais ativas.

REFERÊNCIAS

ABERGEL, R.; LYONS, R.; CASTEL, J. Biostimulation of wound healing by lasers experimental approaches in animal models and in fibroblast cultures. **J. Dermatol. Surg. Oncol.**, v. 13, p. 127-133, 1987.

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.

ACORCI-VALERIO, M. J. et al. Role of TLR2 and TLR4 in human neutrophil functions against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Scand J Immunol.**, v. 7, p. 99-108, 2010.

ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 782-787, 2000.

ARATAMI, Y.; MIURA, N.; SUZUKI, K. Role of neutrophil-derived reactive oxygen species in host defense and inflammation. **Med Mycol J.**, v. 53, n. 2, p. 123-128, 2012.

ALMEIDA-LOPES, L. et al. Comparation of the low power laser therapy effects on culture human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. **Lasers Surg Med.**, v. 36, p.881-7, 2001.

ARDATI, K. O.; BAJAKIAN, K. M.; TABBARA, K. S. Effect of Glucose 6- phosphate Dehydrogenase on Neutrophil Function. **Acta Haematol.**, v. 97, p. 211-216, 1997.

ARIIZUMO, K. et al. Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. **The Journal of Biological Chemistry.**, v. 275, n. 26, p.20157-20167, 2000.

AVCI, P. et al. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. **Semin Cutan Med Surg.**, v. 32, p. 41-52, 2013.

BABIOR, B. M. The respiratory burst of phagocytes. **J Clin Invest.**, v. 73, n.3, p.599-601, 1984.

BALDERRAMAS, H. A. et al. Human neutrophils produce IL-12, IL-10, PGE2 and LTB4 in response to *Paracoccidioides brasiliensis*. Involvement of TLR2, mannose receptor and dectin-1. **Cytokine**, v. 67, p. 36-43, 2014.

BATTLE, J.; et al. Ligand binding to the (1-3)- β -D-glucan receptor stimulates NF κ B activation, but not apoptosis in U937 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 249, n. 2, p. 499-504, 1998.

BEAUVILLAIN, C. et al. Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells in vivo. **Blood.**, v. 110, p. 2965-2973, 2007.

BENARD, G. et al. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, v. 13, p.248-52, 2001.

BENSADOUN, R. J. et al. Low Energy He-Ne Laser in the prevention of Radiation-Induced Mucositis. **Supp. Care in Cancer: Off. Jour. Multi. Assoc. Support. Care in Canc.**, v. 7, n. 4, p.244-252, 1999.

BENNOUNA, S.; DENKERS, E. Y. Microbial antigen triggers rapid mobilization of TNF-alpha to the surface of mouse neutrophils transforming them into inducers of high-level dendritic cell TNF-alpha production. **J Immunol.**, v. 174, p. 4845-4851, 2005.

BERLINER, M. D.; RECA, M. E. Vital staining of *Histoplasma capsulatum* with Janus Green B. **Sabouraudia**, v. 5, p.25-29, 1966.

BERNARD, G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 165, p.209-221, 2008.

BETHLEM, E. P. et al. Paracoccidioidomycosis. **Pulmonary Division**, v. 5, n. 5, p. 319–325, 1999.

BJORDAL, J. M. et al. A systematic review with meta-analysis of the effect of low-level laser therapy (LLLT) in cancer therapy-induced oral mucositis. **Support Care Cancer**, v. 19, p.069–77, 2011.

BIOGIONI, L. M. V. et al. Imunoglobulinas e C3 no granuloma paracoccidióidico. **Revista Instituto Med. Tropical**, v. 29, n.2, p. 97-103, 1987.

BOHN, J. A.; BeMILLER, J. M. (1-3)-B-D-Glucans as biological response modifiers: a review os structure-functional activity relationships. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 28, n. 1, p. 36, 2001.

BONFIM, C. V. et al. TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol.**, p.1-12, 2009.

BORREGAARD, N. et al. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. **Trends Immunol.**, v. 28, p.340–345, .2010.

BRINKMANN, V. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v. 303, p.1532-1535, 2004.

BROWN, G. D.; GORDON, S. Fungal β -glucans and mammalian immunity. **Immunity**, v.19, n. 3, p. 311-315, 2003.

BRUGNERA, J. A.; PINHEIRO, A. L. **Lasers na odontologia moderna**. São Paulo: Pancast, 1998.

BRUMMER, E. et al. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin Microbiol Rev.**, v. 6, n. 2, p. 89 – 117, 1993.

CADAVID, D.; RESTREPO, A. Factors associated with *Paracoccidioides brasiliensis* infection among permanent residents of three endemic areas in Colombia. **Epidemiol. Infect.**, v. 111, p. 121-133, 1993.

CHEN, A. C. et al. Effects of 810-nm laser on murine bone-marrow-derived dendritic cells. **Photomed Laser Surg.**, v.29, p. 383-389, 2011.

CALICH, V. L. G.; KASHINO, S. S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **J Med Biol Res.**, v. 31, p. 615-623, 1998.

CALICH, V. L.G. et al. The activation complement system by *Paracoccidioides brasiliensis in vitro*: Its opsonic effect and possible significance for an *in vivo* model of infection. **Clin Immunol Immunopathol.**, v. 12, p.20-30, 1979.

CALICH, V. L. et al. V. Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis. **FEMS Immunol Med Microbiol.**, v. 53, p. 1-7, 2008.

CALICH, V. L. G. et al. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Braz J Exp Pathol.**, v. 66, n. 5, p. 585-94, 1985.

CALICH, V. L.; KASHINO S. S. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Res. Immunol.**, v. 149, p. 407 – 417, 1998.

CANO, L. E. et al. Protective role of gamma interferon in experimental murine paracoccidioidomycosis. **Infect Immun.**, v. 66, n. 2, p. 800 – 6, 1998.

CASTANEDA, E. et al. A culture medium of *Paracoccidioides brasiliensis* with high plating efficiency, and the effect of siderophores. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 26, p. 351-358, 1988.

CASTANO, A. P. et al. Low-level laser therapy for Zymosan-induced arthritis in rats: Importance of illumination time. **Lasers Surg Med.**, v. 39, p. 543-50, 2007.

CASTRO, L. F. et al. Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. **Journal of infect.**, v. 5, n. 67, p. 470-85, 2013.

CONLAN, J. W. Critical roles of neutrophils in host defense against experimental infections of mice by *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Yersinia enterocolitica*. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 630–35, 1977.

CONDINO NETO, A. et al. Effect of therapy with recombinant human interferon-g on the release of nitric oxide by neutrophils and mononuclear cells from patients with chronic granulomatous disease. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 16, p. 357-64, 1996.

COUTINHO, Z. F. et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 18, n. 5, Rio de Janeiro, p. 1441-1454, set./out. 2002.

DIAS, M. F. R. G.; FILGUEIRA, A. L.; SOUZA, W. A morphological and cytochemical study of the interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and neutrophils. **Microsc. Microanal.**, v. 10, p. 215-223, 2004.

DOHERTHY, N. S. et al. Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E2. **Prostaglandins**, v. 30, n. 5, p. 769-89, 1985.

EMMENDORFFER, A. et al. Evaluation of flow cytometric methods for diagnosis of chronic granulomatous disease variants under routine laboratory conditions. **Cytometry**, v.18, p. 147-155, 1994.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes Infect.**, v.5, p.1317–27, 2003.

FAVA NETTO, C. Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na blastomicose sul-americana, com antígeno polissacarídico. **Arq Cir Clin Exp S Paulo**, v. 18, p.1997-254, 1955.

FAVA NETO, C.; CASTRO, R. M.; GOLÇALVES, A. P. Ocorrência familiar de Blastomicose Sul Americana: a propósito de 14 casos. **Ver. Inst. Med. Trop.**, v. 7, p. 332 -6, 1965.

FRANCO, M. Host parasitic relationship in: Paracoccidioidomycosis. **Sabouraudia**, n. 24, p. 5-18, 1987.

FRANCO, M. F. et al. Paracoccidioidomycosis. In: **Clinical tropical medicine and communicate diseases**. London: Bailliére,1989. v. 4, p. 1-36.

FRANCO, M. F. et al. Natural history os Paracoccidioidomycosis: correlation with a recently proposed classification of its clinical forms. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 20, p. 129-132, 1987.

FRIGO, L. et al. The effect of low-level laser irradiation (In-Ga-Al-AsP-660 nm) on melanoma in vitro and in vivo. **BMC Cancer**, v. 9, p.404, 2009.

FULURIJA, A.; ASHMAN, R. B.; PAPADIMITRIOU, J. M. Neutrophil depletion increases susceptibility to systemic and vaginal candidiasis in mice, and reveals differences between brain and kidney in mechanisms of host resistance. **Microbiology**, v. 142, p. 3487–96, 1966.

GAVISH, L. et al. Low level laser irradiation stimulates mitochondrial membrane potential and disperses subnuclear promyelocytic leukemia protein. **Lasers Surg Med.**, v. 35, p. 369-76, 2004.

GUPTA, A. et al. Shining light on nanotechnology to help repair and regeneration. **Biotechnol Adv.**, v. 31, p. 607-38, 2013.

HIDA, S. et al. N. β -glucan derived from zymosan acts as an adjuvant for collagen-induced arthritis. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 50, n. 6, p. 453-461, 2006.

HENDERSON, L. M.; CHAPPELL, J. B. NADH oxidase od neutrophils. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 1273, p. 87-107, 1996.

KASHINO, S. S. et al. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN – γ production. **J Interferon Cytokine Res.**, v. 20, n. 1, p. 89 – 97, 2000.

KARU, T. I. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **J Photochem Photobiol B.**, v. 49, p. 1-17, 1999.

KARU, T. I. et al. Helium-Neon Laser-induced respiratory burst of phagocyte cells. **Lasers Surg Med.**, v.9, p.585-88, 1989.

KARU, T. I.; PYATIBRAT. L. V.; AFANASYEVA, L. I. **Photochem. Photobiol.**, v. 30, p. 366, 2004.

KEER,I. B.; ARAPIBE, P. C. O., LENZL, H. L. Paracoccidioidomycosis in experimentally-infected rats. **Inst Med Trop São Paulo**, v. 30, p. 336-50, 1988.

KORN, T. et al. IL-17 and Th17 cells. **Annu rev. Immunol**, v. 27, p. 485-517, 2009.

KURITA, N. et al. Influence of liposomal amphotericin B on CD8 T–cell of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol.**, v. 37, n. 2, p. 261 – 7, 1999.

KURITA, N. A. S. et al. Na improved culture médium for detective live yeast phase cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 31, p. 201-205, 1992.

KOUTNÁ, M.; JANISCH, R.; VESELSKÁ, R. Effects of low-power laser irradiation on cell proliferation. **Scripta Medica**, v.76, n.3, p.163-72, 2003.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. Paracoccidioidomicose, p. 248-92. **In: Micologia Médica**, 8 ed.; Sarvier Ed.; São Paulo, 1991.

LAVI, R. et al. Low energy visible light induces reactive oxygen species generation and stimulates an increase of intracellular calcium concentration in cardiac cells. **J Biol Chem.** v. 278, p.40917-40922, 2003.

LILJENDAHL, T. S.; KOTOVA, N.; SEGERBACK, D. Quantification of ultravioleta radiation- induced DNA damage in the urine of Swedish adults and children following exposure to sunlight. **Biomarkers, London.**, v. 17, n. 7, p.634-41, 2012.

LONDERO, A. T.; MELO, I. S. Paracoccidioidomycosis in childhood. A critical review. **Mycopathologia**, v. 82, p. 49 – 55, 1983.

LOURES, F. V. et al. TLR2 is a negative regulator of Th17 cells and tissue pathology in a pulmonary model of fungal infection. **J Immunol.**, v. 78, p.1078-1088, 2009.

LOWE, A. S.; WALKER, M. D.; O'BYRNE, M. Effect of low intensity monochromatic light therapy on a radiation-impaired, wound-healing model in murine skin. **Lasers Surg.Med.**, New York, v.23, n. 7, p. 291-298, 1998.

LUTZ, A. Uma mycose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das *huphoblastomycoses americanas*. **Bras. Med.**, v. 22, p. 121-124, 1908.

MAMONI, R. L. et al. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. **Med Mycol.**, v.40, p. 153-162, 2002.

MANTOVANI, A. et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nat Rev Immunol.**, v. 11, p. 519-531, 2011.

MARKERT, M.; GLASS, G. A.; BABIOR, B. M. Respiratory burst oxidative from human neutrophils: purification and some properties. **Journal Lis.**, v. 82, n.10, p.3144-3148, 1985.

MARQUES, S. A. et al. Paracoccidioidomicose: Frequência, morfologia e patogênese de lesões tegumentares. **An Bras Dermatol.**, v. 84, p. 411-417, 2007.

MARTINEZ R. Paracoccidioidomicose. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.204-221.

MARY, J. Y. Normal human granulopoiesis revisited. II. Bone marrow data. **Biomed. Pharmacother.**, v. 39, p. 66–77, 1985.

McINTURFF, J. E.; MODLIN, R. L.; KIM, J. The role of toll-like receptors in the pathogenesis and treatment of dermatological disease. **J Invest Dermatol.**, v. 125, p.1-8, 2005.

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.

MELONI-BRUNERI, L. H. et al. Neutrophil oxidative metabolism and killing of *P. brasiliensis* after air pouch infection of susceptibility and resistance mice. **J Leuk Biol.**, v. 59, n. 4, p. 526-33, 1996.

MENDES-GIANNINI, M. J.; MORAES, R. A.; RICCI, T. A. Proteolytic activity of the 43,000 molecular weight antigen secreted by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 32, p.384-5, 1990.

MENDES, R. P. The gamut of clinical manifestations. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO-MORENO, A. **Paracoccidioidomycosis**. Bora Raton: CRC, 1994. p. 233-258.

MENDES, R. P.; NEGRONI, R.; ARECHAVALA, A. Treatment and controlo of cure. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO-MORENO, A. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC, 1994. p. 373-391.

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.

MESTER, E. The use of laser beam in therapy. **Orv Hetil.**, v. 107, p.1012-6, 1996.

MESTER, E.; MESTER, A. F.; MESTER, A. The biomedical effects of laser application. **Laser Surg. Medical**, v.5, n.8, p. 31-39, 1985.

MOTTA, N. G. S. et al. Correlation btween cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. **Trans. R. Soc. Med. Hyg.**, v. 79, p. 765-72, 1985.

MUSATTI, C. C. C. et al. In vivo and in vitro evolution of cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. **Cel. Immunol.**, v. 24, n. 2, p. 365-68, 1976.

NAGIB, P. R. A. et al. Effect of HeNe irradiation on estracellulat matrix of deposition and expression of cytokines and chemokines in paracoccicioidomycotic lesions. **Photoche Photobiol**, v. 86, p.920-24, 2010.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature.**, v. 6, p. 173-182, 2006.

NETEA, M. G. et al. The role of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR 4 in the host defense against disseminated candidiasis. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 185, n. 10, p. 1483-1489, 2004.

NICHOLAS, J. C.; SHAUN, R. M. C. Production of chemokines in vivo in response to microbial stimulation. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 166, n. 8, p. 5176-82, 2001.

OLIVEIRA, S. J. et al. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. **Microbes Infect.**, v. 4, p. 129-144, 2002.

OLIVEIRA, M. C. et al. Low level laser therapy reduces acute lung inflammation in a model of pulmonary and extrapulmonary LPS-induced ARDS. **J Photochem Photobiol B.**, v. 134, p. 57-63, 2014.

OREN, D. A. et al. Stimulation of reactive oxygen species production by an antidepressant visible light source. **Biol Psychiatry.**, v. 49, p.464-77, 2001.

PAGLIARI, C. et al. Characterization of cytotoxic immune response in skin and mucosal lesions of paracoccidioidomycosis. **J Cutan Pathol**, v. 25, p. 107-112, 2012.

PAGLIARI, C.; SOTTO, M. N. Dendritic cells and pattern of cytokines in paracoccidioidomycosis skin lesions. **Am J Dermatopathol**, v. 25, p. 107 – 112, 2003.

PALMEIRO, M.; CHERUBINI, K.; YURGEL, L. S. Paracoccidioidomicose – revisão da literatura. **Scientia Medica**, v.15, n. 4, p. 274-278, out./dez. 2005.

PANIAGO, A.M. et al. Paracoccidioidomicose: estudo clínico e epidemiológico de 422 casos observados no Estado do Mato Grosso do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.36, n., p. 455-459, 2003.

PERACOLI, M. T. et al. Natural killer cell activity experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 37, p. 129-36, 1995.

PINA, A. et al. Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of hosts. **J Leukoc Biol**, v. 79, p. 1202-13, 2006.

PINA, A.; BERNARDINO, S.; CALICH, V. L. G. Alveolar macrophages from susceptible mice are more competent than those of resistant mice to control initial *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **L Leuk. Biol.**, v. 5, n.83, p.1088-99, 2008.

PARSLOW, T.G. et al. **Imunologia médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

POSTEN, W. et al. Low-Level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. **Dermatol. Surg.**, v. 31, n. 3, p. 334-340, 2005.

PUGA, I. et al. B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. **Nat Immunol.**, v. 13, p. 170-180, 2012.

RAMOS, E. S. M.; SARAIVA, L. E. Paracoccidioidomycosis. **Dermatol. Clin.**, v. 26, p.257– 269, 2008.

RESTREPO, A. et al. The gamut of paracoccidioidomycosis. **Am. J. Med.**, v. 61, p. 33-41, 1976.

RESTREPO, S. et al. Development of pulmonary fibrosis in mice during infection with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Journal Med Vet Mycol.**, v. 30, p. 173-84, 1992.

RESTREPO, A.; VELEZ, H. Effect of phagocytosis in vitro on *Paracoccidioides brasiliensis*. **Sabouraudia**, v.13, p. 10-21, 1975.

REID, D. M. et al. Expression of the β -glucan receptor, Dectin-1, on murine leukocytes in situ correlates with its function in pathogen recognition and reveals potential roles in leukocyte interactions. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 76, n. 1, p.86–94, 2004.

RIGBY K.M.; FRANK, R.. Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections. **Sem. Immunopathol.**, v. 34, p.237-259, 2012.

ROCHKIND, S. et al. Systemic effects of Low-Power Laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds, and burns. **Lasers Surg Med**, v. 9, p. 174-182, 1989.

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

RODRIGUES, N. C. et al. Low level laser therapy (LLLT) (660nm) alters gene expression during muscle healing in rats. **J Photochem Photobiol.**, v. 120, p. 29-35, 2013.

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

SANDOVAL, M. B.T.; SOTTO, M. N.; de BRITO, T. Antigen distribution in mucocutaneous biopsies of human paracoccidioidomycosis. **Int. J. Surg Pathol.**, v. 3, p. 181-189, 1996.

SCHIFF, R. I.; HARVILLE, T. O. Primary and secondary immunodeficiency disease. **Allergy, asthma, and Imm. From infancy to adulthood**: WB Saunders, p.20-54, 1996.

SHIKANA-YASUDA, M. A.; et al. Consenso em Paracoccidioidomicose. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 279-310, 2006.

SILVA, V. S. **Avaliação da frequência de necrose e apoptose celular em doses de laser LED na região espectral do infravermelho – estudo *in vitro***. 2009. 80f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2009.

SINGER-VERMES, L. M. et al. Evaluation of 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. The source of the growth-promoting factor (s) affects the plating efficiency of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 30, p. 261-264, 1992.

SINGER-VERMES, L. M. et al. Evaluation of pathogenicity and imunogenicity of seven Paracoccidioides brasiliensis isolates in susceptible inbred mice. **Journal Med Vet Mycol.**, v. 27, n. 2, p. 71-82, 1989.

SMITH, P.K. et al. Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. **Anal. Biochem.**, v.150, p.76-6, 1985.

SOARES, A. M. et al. Modulatory effect of prostaglandins on human monocyte activation for killing of high- and low-virulence strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Immunology**, v. 102, p. 480-85, 2001.

SPERANDIO, F. F. et al. Low level laser irradiation promotes the proliferation and maturation of keratinocytes during epithelial wound repair. **J Biophotonics**, 2014.

SUDA, M. et al. Kupffer cells play important roles in the metabolic degradation of a soluble anti-tumor (1-3)- β -D-glucan, SSG, in mice. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 15, n. 2-3, p. 93-100, 1996.

SZABÓ, T. et al. Biochemical properties of the ligand-binding 20-Kda subunit of the β -glucan receptors on human mononuclear phagocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n.5, p.2145-2151, 1995.

TABOADA, L. et al. Transcranial laser therapy attenuates amyloid-beta peptide neuropathology in amyloid-beta protein precursor transgenic mice. **J Alzheimers Dis.**, v. 23, p. 521-535, 2011.

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

TAVIAN, E. G. et al. M.Interleukin – 15: *Paracoccidioides brasiliensis* killing bu human neutrophilis. **Cytokine**, v. 41, p. 48 – 53, 2008.

TOLEDO, M. S. et al. Mannose-binding lectin complemente pathways plays a key role in complemente activation by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mol Immunol.**, v. 48, p.26-36, 2010.

TRINCHIERI, G.; SHER, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. **Nat Rev Immunol.**, v. 7, p.179–190, 2007.

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

VALLE, A. C. F. et al. Tratamento da paracoccidioidomicose. Estudo retrospectivo de 500 casos. Avaliação dos resultados terapêuticos com sulfanilamídicos, anfotericina B, associação sulfametoxazol, trimetoprima, cetoconazol e miconazol. **Anais Brasileiros Dermatologia**, v. 66, p.65-70, 1993.

VETVICKA, V. N, M. **Beta Glucans - mechanisms of action**. Sharjah: Bentham Science, 2014.

VICENTINI, A. P. et al.. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infect Immun.**, v. 62, p.1465-9, 1994.

VICENTINI, A. P. et al. Laminin-binding epitope on gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* is recognized by a monoclonal antibody raised against *Staphylococcus aureus* laminin receptor. **J Med Vet Mycol.**, v. 1, n. 35, p. 37-43, 1997.

VIEGAS, V.N. et al. Effect of low-level laser therapy on inflammatory reactions during wound healing: comparison with meloxicam. **Photomed Laser Surg.**, v. 25, p.467–473, 2007.

VIVIANI, M. A. et al. New approaches to antifungal chemotherapy. **Med. Mycol.**, v. 36, p. 194-206, 1998.

WANKE, B.; AIDÉ, M. A. Curso de Atualização. Micoses. Paracoccidioidomicoses. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 9, p. 1245–1249, 2009.

WOODRUFF, L.D. et al. The efficacy of laser therapy in wound repair: a meta-analysis of the literature. **Photomed Laser Surg.**, v. 22, p.241–247, 2004.

WU, X.; DMITRIEV A.E.; et al. Wavelength light: an effective therapy for transected or contused rat spinal cord. **Lasera Surg Med.**, v. 41, p. 36-41, 2009.

ZHU, J; YAMANE, H; PAUL, W. E. Differentiation of effector CD4T Cell populations. **Annual Review of Immunology**, v. 28, p.445-489, 2010.

ANEXO I



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas . UNIFAL-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 . Alfenas/MG . CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000 . Fax: (35) 3299-1053



Alfenas, 19 de dezembro de 2012.

Prof. Eva Burger

Prezada Professora;

O projeto sob sua coordenação, registro nº 477/2012, intitulado "Interação de macrófagos e de neutrófilos com anfotericina b em paracoccidioidomicose experimental murina: efeito da formulação do antifúngico e do patrimônio genético do hospedeiro" está em conformidade com os princípios éticos exigidos na experimentação animal, tendo sido apreciado e aprovado por essa Comissão.

Por ser verdade, firmo o presente.

Prof Dr Carlos Giovani de Oliveira Nascimento
Presidente do CEUA – Unifal-MG

APENDICE

I- Congresso Internacional Neutrophil 2014

Pôster I: Low-power laser irradiation enhances the metabolism and fungicidal capacity of neutrophils



Low-power laser irradiation enhances the metabolism and fungicidal capacity of neutrophils

BÜRGER, E.; BRIGAGAO, M.R.P.L.; MENDES, A.C.S.C.; BANI, G.M.C.; REZENDE, D.B.; CHAVASCO, J.K.; MALAQUIAS, L.C.C.; SPERANDIO, F.F.

Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Alfenas, UNIFAL-Mg, Alfenas, Brazil.

ABSTRACT

Introduction: Paracoccidioidomycosis (PCM), caused by the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) is the most prevalent systemic mycosis in Brazil; it is known that neutrophils (PMNs) play a central role in the protective immune response to this fungus even in advanced stages of the disease. In addition, PMNs from resistant mice to PCM are more efficient at lysing Pb than PMNs from susceptible mice.
Objectives: So, the aim of this work was to develop a novel way to activate PMNs by increasing their fungicidal efficiency against Pb; we inoculated viable virulent Pb or Zymosan (Z) in air pouches of mice, a procedure that yields a highly pure population of PMNs, and then we submitted the animals to irradiation as two points in each hind paw with infrared laser on alternate days.
Material and Methods: The number and viability (Trypan blue exclusion) of the PMNs that migrate to the inoculation site were assessed, as well as their ability to synthesize proteins (BCA) and their fungicidal activity (CFU).
Results and Conclusion: Laser radiation increased the influx of PMNs in Z-stimulated mice but decreased the influx of PMNs in Pb-stimulated mice, although the cell viability was not affected. Inoculation of Pb also attracted higher numbers of PMNs than Z inoculation in both irradiated and control groups, which was expected since live Pb constitute a constant stimulus. Moreover, PMNs of irradiated mice produced higher levels of total protein and were more fungicidal than non-irradiated controls, although control or irradiated PMNs were unable to fully eliminate all Pb. In that way, laser radiation incites PMNs metabolism and fungicidal capacity.

INTRODUCTION



The disease affects mainly adult men associated to agricultural activity.

Paracoccidioidomycosis is a systemic disease caused by the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb). In Brazil, this is one of the most important for a country that has more endemic areas for this disease worldwide.

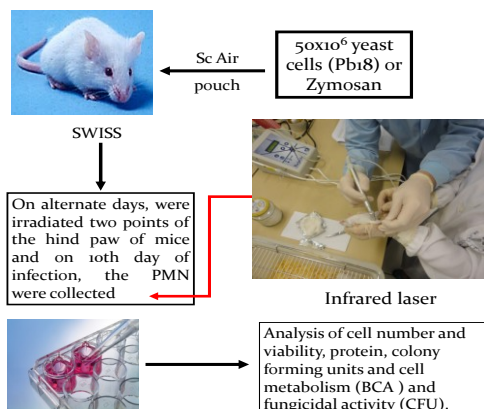
In paracoccidioidomycosis (PCM), the spread can occur throughout the body of the host, compromising various organs such as the liver, lymph nodes, lungs, bone marrow and even the skin and buccal region



OBJECTIVES

The aim of this work was to develop a novel way to activate PMNs, increasing their fungicidal efficiency against Pb, by applying low power laser radiation on the mice Swiss infected with Pb.

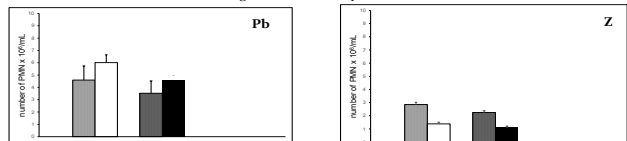
MATERIAL AND METHODS



RESULTS

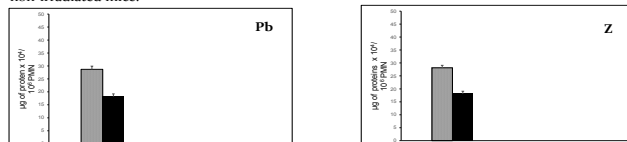
Absolute number and cell viable

Laser radiation increased the influx of PMNs in Z-stimulated mice but decreased the influx of PMNs in Pb-stimulated mice, although the cell viability was not affected.



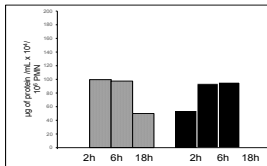
Production of proteins (BCA)

Laser radiation increased the production of proteins for PMN in Pb-stimulated mice and in Z-stimulated mice, which increases metabolic activity of these cells, different of harvested PMN of non-irradiated mice.



Production of protein for PMN. Irradiated Swiss mice (hatched bars) or non-irradiated (solid bars).

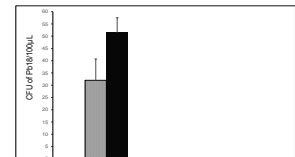
Regarding the kinetics of protein production by PMN isolates obtained from irradiated mice, we note that production is higher in the incubation time of 2 hours, decreasing to the other long time. As for the PMN isolated from non-irradiated mice, we observed that the production time is shorter than 2 hours of incubation, increasing with time.



Kinetics of protein production by PMN isolated Pb-stimulated at different incubation times, 2, 6 and 18 hours. Irradiated Swiss mice (hatched bars) or non-irradiated (solid bars).

Fungicidal activity (CFU)

Although the absolute number of cells from irradiated mice are smaller than the absolute number of PMN obtained from non-irradiated mice are lower, it can be seen that there are a large number of fungi present in the sample of non-irradiated mice, which suggests the possibility of irradiation become more active PMN, which leaves them with a greater capacity fungicide "in vivo".



CFU of Pb18 counted after 12 days of growth on agar plates. Irradiated Swiss mice (hatched bar) or non-irradiated (black bar with white balls) The culture medium : Fava Netto plus 10% Fetal Bvine Serum and 30% Growth Factor.

CONCLUSIONS

It can be concluded that, independently from the nature of the stimulus for attracting PMNs, infrared laser radiation stimulates their metabolism, rendering them more competent fungicidal cells.

Supported by Grants CNPq 486135/2012-8 and 304827/2012-6

Pôster II – Low-power laser treatment of neutrophil results in preserved enhances of their fungicidal activity



LOW-POWER LASER TREATMENT OF NEUTROPHIL RESULTS IN PRESERVED ENHANCEMENT OF THEIR FUNGICIDAL ACTIVITY

SPERANDIO, F.F.; BRIGAGÃO, M.R.P.L.; BANI, G.M.C.; MENDES, A.C.S.C.; REZENDE, D.B.; MALAQUIAS, L.C.C.; CHAVASCO, J.K.; VERINAUD, L.M.C.; BÜRGER, E.
Biomedical Science Institute, Federal University of Alfenas, UNIFAL-MG, Alfenas, Brazil

ABSTRACT

In paracoccidioidomycosis (PCM), neutrophils (PMNs) of resistant mice seem more activated and fungicidal than those of susceptible mice. In that way, we studied the effect of in vivo low-level laser radiation upon neutrophils activation; by so an either virulent isolate of Paracoccidioides brasiliensis (Pb) or Zymozan (Z) was inoculated in air pouches of mice obtaining, 10 days later, a very pure population of PMNs. The hind paws of the mice were irradiated with low-level infrared laser and the total and viable number of newly harvested PMNs and PMNs co-cultivated in vitro with Pb were assessed, as well as PMNs metabolic rate (BCA and MTT assays) and PMNs fungicidal capacity (CFU assays). In the Z-treated group, low-power laser activated recently collected PMNs, which remained activated after 2 hours (hs) of co-cultivation with Pb. Also, in Pb-stimulated mice the PMNs of the irradiated group, that were more fungicidal on arrival at the lesion site, remained so after 2 hours of co-cultivation. The metabolism of PMNs from irradiated mice, either primarily isolated or co-cultivated was higher at 2 hs and decreased gradually at 6 and 18 hs of incubation. Alternatively, the metabolism of PMNs from non-irradiated controls isolated or co-cultivated was low at 2 hours and increased throughout the incubation. Our results suggest a different kinetic behavior of PMNs when light irradiated, suggesting a relatively long-termed enhancement of PMNs fungicidal ability by light, independently of an early in vivo exposure to the fungus (Pb group), or not (Z group).

INTRODUCTION

PARACOCCIDIOIDOMICOSE
Prevalence in the world and affected individuals



Clinical manifestations

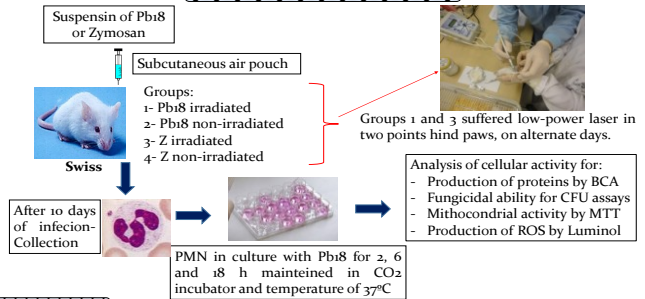


Lungs Skin Oral Mucosa
Images courtesy of João Adolfo Costa Hanemann

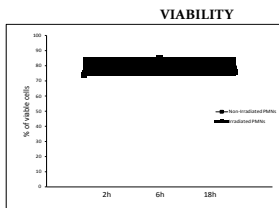
OBJECTIVES

The aim this work was establish the effect of in vivo laser radiation on neutrophils in culture, to determine if the laser radiation increasing or not the activation of neutrophils against *Paracoccidioides brasiliensis* 18

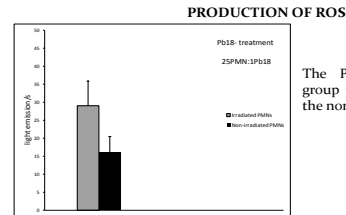
MATERIALS AND METHODS



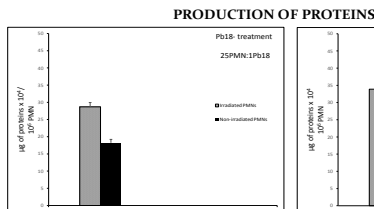
RESULTS



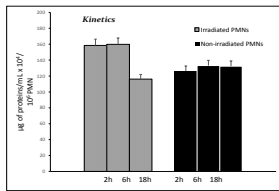
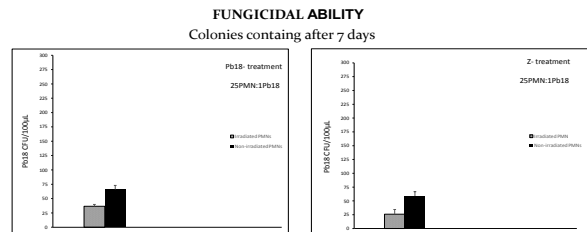
During different times of culture, cells from both irradiated group or non-irradiated group to remain high viability.



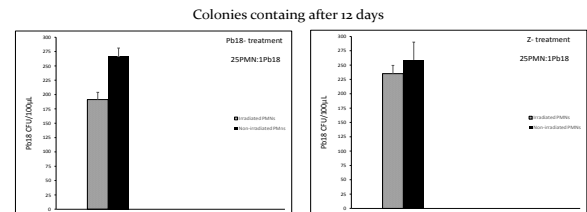
The PMNs of the irradiated group produced more ROS than the non-irradiated group.



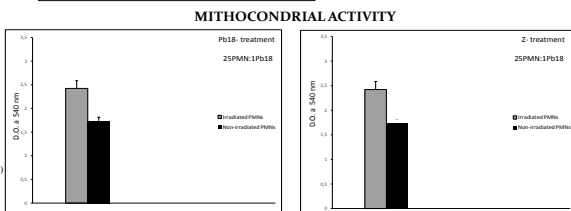
In both groups, Z-treated group and Pb-stimulated group, the laser irradiation active PMNs after 2 hours of co-cultivation with Pb



The metabolism of PMNs from irradiated mice decreased gradually at 6 and 18 hours of incubation and non-irradiated mice increase throughout the incubation.



In both groups, Z-treated group and Pb-stimulated group, the laser irradiation (hatched bars), the PMNs of the irradiated group were more fungicidal.



In both groups, Z-treated group and Pb-stimulated group, the laser irradiation increasing mitochondrial activity of PMNs after 6 hours of co-cultivation with Pb.

CONCLUSIONS

Our results suggest that low-power laser treatment can render neutrophils more activated, independently of having been exposed earlier, in vivo, to the fungus (Pb group), or not (Z group), resulting in:

- Bigger production of proteins
- Increasing mitochondrial activity
- Elevation of ROS production
- Enhancement of their fungicidal ability

I- Congresso Internacional - PCM 2014

Pôster I: "IN VIVO" ACTIVATION OF NEUTROPHILS AGAINST *Paracoccidioides brasiliensis* BY LASER THERAPY IN AN EXPERIMENTAL MODEL



"IN VIVO" ACTIVATION OF NEUTROPHILS AGAINST *Paracoccidioides brasiliensis* BY LASER THERAPY IN AN EXPERIMENTAL MODEL

¹BANI, G.M.A.C.; ²MENDES, A.C.S.C.; ³SPERANDIO, F.F.; ⁴BRIGAGÃO, M.R.P.L.; ⁵SANTOS, G.B.; ⁶MALAQUIAS, L.C.C.; ⁷CHAVASCO, J.K.; ⁸VERINAUD, L.M.; ⁹BURGER, E.

¹Biomedical Science Institute, Federal University of Alfenas, UNIFAL-MG, Brazil.
²Biology Institute, State University of Campinas – UNICAMP – SP, Brazil.

ABSTRACT

Introduction: In the innate immunity developed in paracoccidioidomycosis (PCM), polymorphonuclear neutrophils (PMN) are effective in the fungal lesion and are restricted to the site of injury caused by *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb).
Objectives: So, the aim of this study was to develop a treatment capable of stimulating PMN. Low-level laser therapy (LLLT) was shown to be an effective attractant and activator of neutrophils to the site of injury.
Material and Methods: 50 mW of power and λ of 780 nm applied "in vivo" at two points in each hind paw of mice on alternate days, 7m mice either infected with the highly virulent Pb isolate or inoculated with Zysozan in the subcutaneous air pouch. Four experimental groups were formed for the experiments: 1- irradiated animals infected with Pb; 2- non-irradiated animals infected with Pb; 3- irradiated animals inoculated with Zysozan and 4- non-irradiated animals inoculated with Zysozan. Newly isolated PMN from the air pouch were analyzed after 30 days of infection or inoculation and the effects of LLLT on the absolute number of PMN cells, cell viability, protein production (by method BCA), ability to produce reactive oxygen species (ROS) and fungicidal capacity by quantification of colony forming units (CFU) were assessed.
Results and Conclusion: LLLT increased the production of ROS and total proteins in both groups of irradiated PMN regardless of the stimulus for inflammation as well as the fungicidal activity as compared with the non-irradiated group. LLLT however, decreased the total number of PMN in animals infected with Pb, but not in animals inoculated with Zysozan, and in both groups PMN remained highly viable. These results show that LLLT irradiation activates PMN and increases the fungicidal activity of these cells, suggesting that this treatment may be used as a complementary therapy for the treatment of PCM.

INTRODUCTION

Low power laser irradiation

The principle of LLLT therapy is the use of infrared rays with a low potency to act as an adjuvant in the treatment of chemotherapy side effects, or to repair damaged tissues, as well as a modulator of immune responses in inflammatory processes.

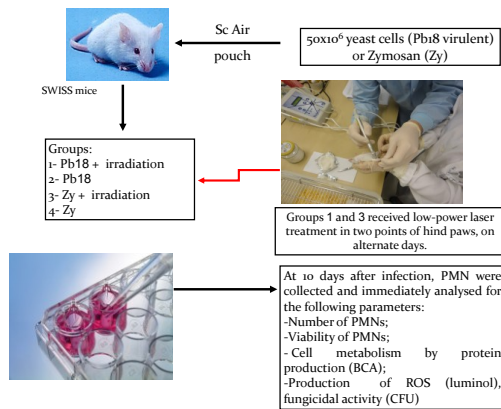
Role of PMN in paracoccidioidomycosis

PMNs play an important role in host defense against Pb once these cells are found in large numbers in the lesion caused by Pb. PMN are the first cells at onset of infection, along with other cells such as macrophages and also execute an important role in linking innate and acquired immunity.

OBJECTIVES

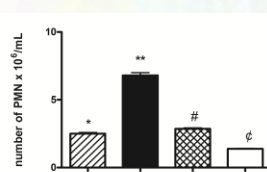
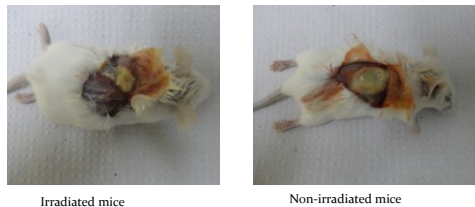
The aim of this work was to establish the effect of "in vivo" low-power laser on neutrophils isolated, to determine if this treatment activates PMNs as assayed by various parameters and increases the fungicidal efficiency of these cells neutrophils against Pb.

MATERIAL AND METHODS



RESULTS

Macroscopic aspect of a subcutaneous air pouch 10 days after infection with Pb 18



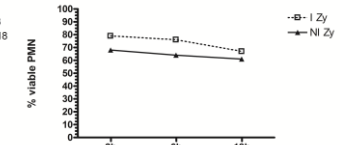
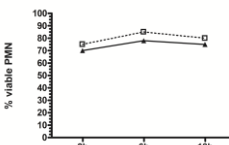
PMN absolute number

Laser radiation increased the influx of PMNs in Z-stimulated mice but decreased the influx of PMNs in Pb-stimulated mice.

*p < 0.05; 1Pb18 - NI Pb18; **p < 0.05; 1Zy - NI Zy; #p < 0.05; 1Pb18 - 1Zy; c p < 0.05; NI Pb18 - NI Zy.

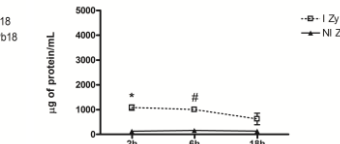
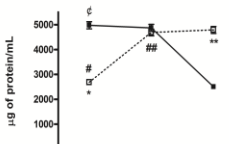
PMN viability

The viability of PMN in the irradiated and non-irradiated groups was not affected different times of incubation.



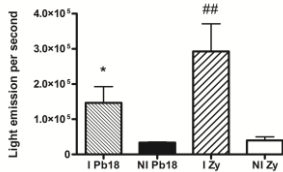
Production of proteins (BCA)

Production of proteins by PMN isolated from non-irradiated mice, was lower at 2 hours of incubation, increasing with time. So, laser radiation increased the production of protein by PMN in Pb-stimulated mice and in Zy-stimulated mice.



*p < 0.05; 1 Pb18 2h - NI Pb18 2h; **p < 0.05; 1 Pb18 6h - NI Pb18 6h; #p < 0.05; 1Pb18 2h - 1Pb18 6h; ##p < 0.05; 1Pb18 6h - 1Pb18 18h; c p < 0.05; NI Pb18 2h - NI Pb18 6h.

*p < 0.05; 1 Zy 2h - NI Zy 2h and #p < 0.05; 1 Zy 6h - NI Zy 6h.

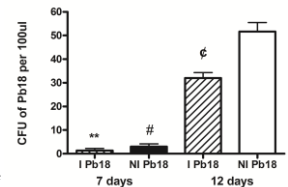


Production of Reactive oxygen species

LLLT increased the production of ROS in both groups of irradiated PMN regardless of the stimulus for inflammation (Pb or Zy) as compared with the non-irradiated groups.

Fungicidal activity

The absolute number of PMN from irradiated mice was lower than that of PMN obtained from non-irradiated mice. A large number of fungi were present in the sample of non-irradiated animals, which suggests that irradiation renders PMN more active, with a higher fungicidal capacity in vivo. However, in both groups live Pb were still found.



CONCLUSIONS

It can be concluded that, independently from the nature of the stimulus for attracting PMNs, infrared laser radiation stimulates the metabolism of this cell population, rendering them more competent fungicidal cells, although unable to totally eliminating all Pb.

*p < 0.05; 1 Pb18 7 and 12 days; #p < 0.05; NI Pb18 - NI Pb18 7 and 12 days; c p < 0.05; 1 Pb18 - NI Pb18 12 days.

Pôster II: NEUTROPHIL ACTIVATION WITH LOW POWER LASER INCREASES THEIR FUNGICIDAL ACTIVITY AGAINST A VIRULENT STRAIN OF *Paracoccidioides brasiliensis* ON RECHALLENGE

UNIFAL **NEUTROPHIL ACTIVATION WITH LOW POWER LASER INCREASES THEIR FUNGICIDAL ACTIVITY AGAINST A VIRULENT STRAIN OF *Paracoccidioides brasiliensis* ON RECHALLENGE**

MENDES, A.C.S.C.; BANI, G.M.; CUNHA, S.P.; SPERANDIO, J.F.F.; BRIGAGAO, M.R.P.L.; SANTOS, G.B.; MALAQUIAS, L.G.C.; CHAVASCO, J.K.; VERINAUD, L.M.C.; BURGER, E.

Biomedical Science Institute, Federal University of Alfenas, UNIFAL-MG, Alfenas, Brazil
Biology Institute, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

ABSTRACT
Inoculation with *Pb* is an important component of host defense against this fungus. In this context, macrophages and neutrophils (PMN) play a central role in paracoccidioidomycosis. The treatment of experimental animals with the use of antimicrobials, in addition to the prolonged administration time, produces many side effects, such as resistance, dependence on drugs or secondary infections. Low-level laser therapy (LLLT) has been an alternative treatment for many diseases and its modulation, based on culture cells has also been demonstrated. In this work, we evaluated the effects of LLLT (670 nm, 50 mW) applied in alternate days and points (third and fourth hind paw) in Swiss mice inoculated subcutaneously with virulent *Pb* isolate or *Zy* (non-infective) or *Ni* (uninfected animals) and challenged as follows: After *Zy* inoculation, *Pb* was inoculated in the same position of PMN (infective rechallenge) here maintained in culture in presence of *Pb*18 for trials of protein production (2, 6 and 18 hours), evaluation of mitochondrial activity (6 hours), production of reactive oxygen species (ROS) (2 hours) and quantification of viable fungi (2 hours). The results showed that PMN from irradiated animals, regardless of the *in vivo* stimulus for their location presented higher production of ROS, elevated mitochondrial activity and increased fungicidal capacity. Regarding protein production, PMN from uninfected animals showed increased production, which decreased with the *in vivo* inoculation. We conclude that *in vivo* LLLT treatment renders PMN in culture more active metabolically, resulting in higher fungicidal activity against *Pb*18 in culture, probably due to increased production of ROS, independently of the primary or secondary exposure to the fungus.

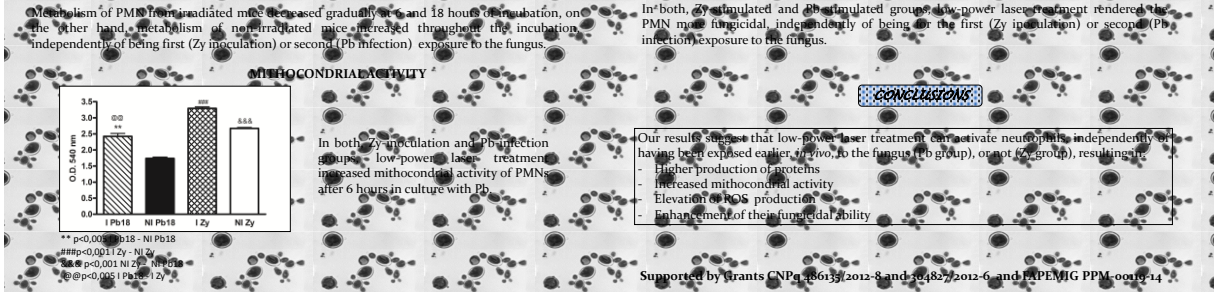
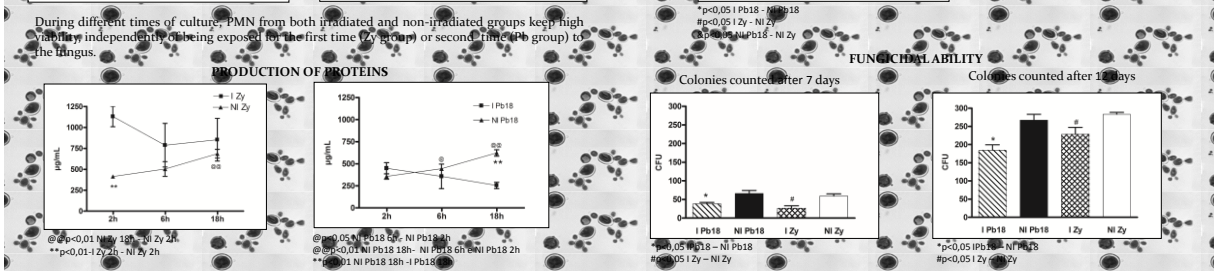
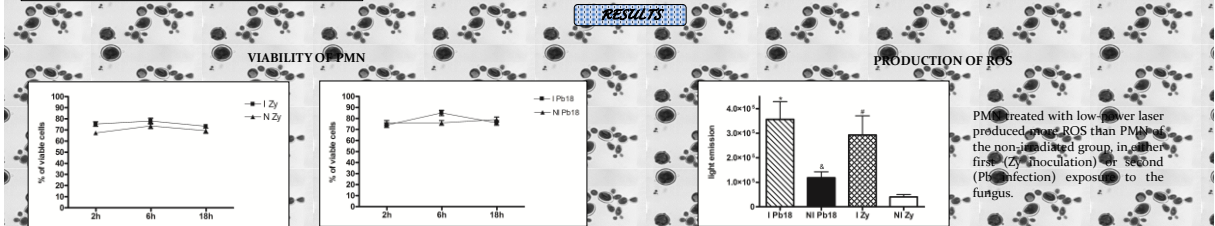
INTRODUCTION

Role of PMN in Paracoccidioidomycose
Contact of *Pb* with host tissue initially triggers a congestive-exudative inflammatory reaction with a predominant influx of neutrophils, that has protective effect against the spread of the fungus.
PMN coordinate the first responses of other cell types including monocytes, macrophages, dendritic cells, and lymphocytes, performing an important link between innate and acquired immunity.

Low power laser irradiation
It is used to treat collateral effects of chemotherapy and radiation and for tissue repair;
Acts modulating immune responses and inflammatory processes;
Action on intracellular processes, increasing the production of ROS and activation of the mitochondrial respiratory chain.

OBJECTIVES
The aim of this work was to establish the effect of *in vivo* low-power laser on neutrophils in culture, to determine if this treatment increases or not the activation of neutrophils against *Pb*.

MATERIALS AND METHODS
Suspension of *Pb* (the virulent *Pb*18 isolate) and *Zy* in sterile inflammation.
Subcutaneous air pouch
Groups:
1- *Pb*18 + irradiation
2- *Pb*18
3- *Zy* + irradiation
4- *Zy*
Groups 1 and 3 received low-power laser treatment in two points of hind paws, on alternate days.
Analysis of cellular activity, for:
- Production of proteins by BCA method (25PMN: *Pb*18)
- Fungicidal ability by CFU counts (25PMN: *Pb*18)
- Mitochondrial activity by MTT method (1PMN: *Pb*18)
- Production of ROS by chemical method (25PMN: *Pb*18)



Supported by grants CNPq 306133/2012-8 and 304827/2012-6, and FAPESP PPM-0018-14

II- Congresso Nacional Sociedade Brasileira de Imunologia 2014

Pôster: LOW-POWER LASER “in vivo” IRRADIATION ENHANCES THE METABOLISM AND FUNGICIDAL CAPACITY OF NEUTROPHILS



LOW-POWER LASER “in vivo” IRRADIATION ENHANCES THE METABOLISM AND FUNGICIDAL CAPACITY OF NEUTROPHILS

¹MENDES, A.C.S.C.; ¹BANI, G.M. A.C.; ¹SPERANDIO, F.F.; ¹BRIGAGÃO, M.R.P.L.; ¹SANTOS, GB; ¹MALQUIAS, L.C.C.; ¹CHAVASCO, J.K.; ²VERINAUD, L.M.; ¹BURGER, E.

¹Federal University of Alfenas, UNIFAL-MG, Alfenas, MG, Brazil ²State University of Campinas, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil; ³Ms. Bani and Ms. Mendes had equal participation on the present work.

ABSTRACT

Introduction: Paracoccidioidomycosis (PCM) is a fungal infection caused by *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb). PCM triggers a typical granulomatous inflammatory reaction highly permeated by neutrophils (PMNs) that are crucial in the initial stages of PCM, participating in the innate immunity and directing the acquired immune response towards an effective response. The treatment of this disease includes the use of antifungals which, in addition to the prolonged administration time needed, have many side effects; so research for more efficient drugs or adjuvant treatments is needed. Low-power laser (LLLT) was shown to be an effective activator of immune cells. The aim of this study was to develop a treatment capable of stimulating PMN in PCM.

Methods and Results: We evaluated the effects of LLLT (1-10 mW/cm² applied “in vivo” at alternate days at two points of hind paws of Swiss mice inoculated in the subcutaneous air pouch with the virulent *P. brasiliensis* Pb8 isolate or with Zymosan, with the aim of reach the bone marrow. Unirradiated animals were used as controls. Newly isolated PMN from the air pouch or co-cultured with Pb8 were analyzed after 30 days of inoculation and the effects of LLLT on the absolute number of PMN cells, cell viability, protein production, mitochondrial activity, production of reactive oxygen species (ROS) and fungicidal capacity by quantification of colony forming units were assessed. LLLT decreased the total number of PMN in animals infected with Pb, but not in animals inoculated with Zymosan, and in both groups PMN remained highly viable. The production of ROS and total proteins in both groups of irradiated newly isolated PMN as well as the fungicidal activity was higher as compared with the control group. PMNs co-cultured with Pb8, regardless if they were being exposed to Pb8 for the first or second time also showed higher activity in the parameters mentioned, and also higher mitochondrial activity. Regarding protein production, PMN from irradiated animals gradually decreased their production, while the unirradiated group increased protein synthesis with the time of incubation.

Conclusions: We conclude that *in vivo* LLLT treatment renders PMN more active metabolically, resulting in higher fungicidal activity against Pb8, probably due to increased production of ROS, independently of the primary or secondary exposure to the fungus, suggesting that this treatment may be used as an adjuvant therapy in PCM.

INTRODUCTION

PCM is a systemic disease caused by the fungus Pb. In Brazil, this is one of the most important mycosis, as this country has the highest number of endemic areas for this disease worldwide. The disease affects mainly adult men associated to agricultural activity.

Role of PMN in PCM

Contact of Pb with host tissue initially triggers a congestive-exudative inflammatory reaction with a predominant influx of neutrophils, that has protective character against the spread of the fungus. Neutrophils also coordinate the first responses of other cell types including monocytes, macrophages, dendritic cells and lymphocytes, performing an important link between innate and acquired immunity.

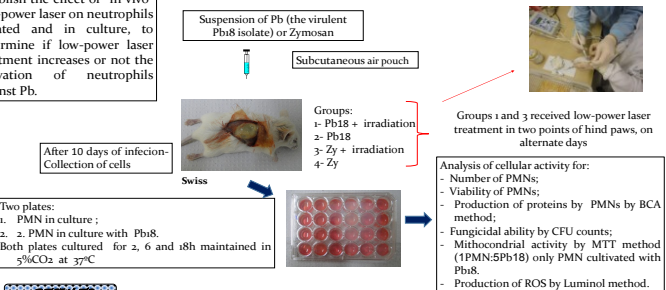
Low power laser irradiation

- Employed to treat collateral effects of chemotherapy and radiation and tissue repair.
- Acts modulating immune responses and inflammatory processes.
- Acts on intracellular processes, increasing the production of ROS and activation of the mitochondrial respiratory chain.

OBJECTIVE

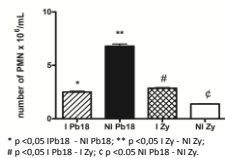
The aim of this work was to establish the effect of “in vivo” low-power laser on neutrophils isolated and in culture, to determine if low-power laser treatment increases or not the activation of neutrophils against Pb.

MATERIALS AND METHODS

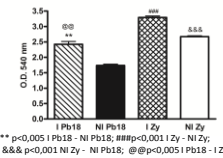


RESULTS

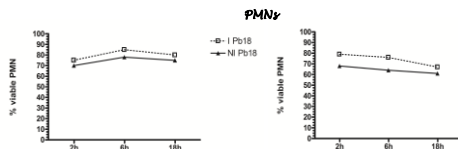
PMN absolute number



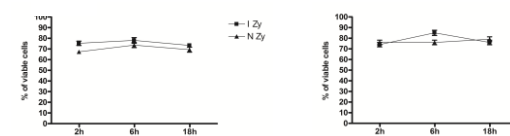
Mitochondrial activity - PMN in culture with Pb18



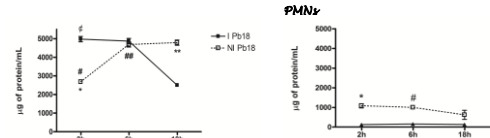
Viability of PMNs



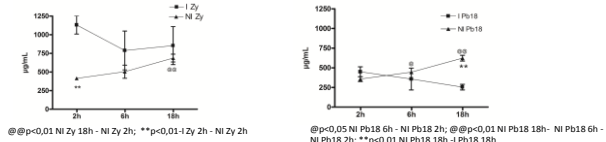
PMNs in culture with Pb18



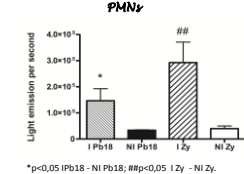
Production of proteins by PMN



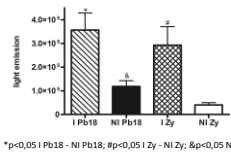
PMN in culture with Pb18



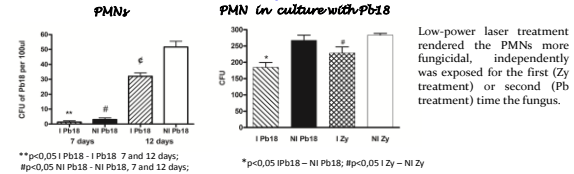
Production of Reactive oxygen species



PMN in culture with Pb18



Fungicidal ability



CONCLUSIONS

Our results suggest that low-power laser treatment can activate neutrophils, independently of having been exposed earlier, *in vivo*, to the fungus (Pb group), or not (Zy group).

Supported by Grants CNPq 466135/2012-8 and 304877/2012-6 and FAPEMIG CBB PMN-0019-14