

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ANA CAROLINA SILVÉRIO CERQUEIRA MENDES

**EFEITO DA LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA NA
PARACOCCIDIOIDOMICOSE EXPERIMENTAL MURINA:
CARACTERIZAÇÃO DO EXSUDATO CELULAR E DO PERFIL DE
CITOCINAS**

Alfenas/MG

2017

ANA CAROLINA SILVÉRIO CERQUEIRA MENDES

**EFEITO DA LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA NA
PARACOCCIDIOIDOMICOSE EXPERIMENTAL MURINA:
CARACTERIZAÇÃO DO EXSUDATO CELULAR E DO PERFIL DE
CITOCINAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alfenas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro.

Orientadora: Profa. Dra. Eva Burger

Alfenas/MG

2017

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

Mendes, Ana Carolina Silvério Cerqueira

Efeito da laserterapia de baixa potência na paracoccidiodomicose experimental murina: caracterização do exsudato celular e do perfil de citocinas / Ana Carolina Silvério Cerqueira Mendes. -- Alfenas/MG, 2017.

90 f.

Orientadora: Eva Burger.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, 2017.

Bibliografia.

1. Neutrófilos. 2. Terapia com Luz de Baixa Intensidade. 3. Paracoccidiodoides. I. Burger, Eva. II. Título.

CDD-571.995



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. UNIFAL-MG
Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas, MG.
CEP: 37130-001



Ana Carolina Silvério Cerqueira Mendes

“Efeito da laserterapia de baixa potência na paracoccidiodomicose experimental murina:
caracterização do exsudato celular e do perfil de citocinas”

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas
pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Interação Patógeno Hospedeiro

Aprovado em: 28 de abril de 2017.

Profª. Dra. Eva Burger
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Rinaldo Poncio Mendes
Instituição: UNESP-FMB

Assinatura: 

Profª. Dra. Amanda Latércia Tranches Dias
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Dedico este trabalho ao Deus que habita em mim, pela força para realização desta pesquisa, à minha família pelo apoio e amor incondicional, à memória do meu irmão Júnior, aos meus professores por todo conhecimento transmitido e aos meus amigos por fazerem essa jornada mais doce e alegre.

AGRADECIMENTOS

“Aqueles que passam por nós não vão sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.” Antoine de Saint-Exupéry

Estes dois últimos anos em que cursei meu segundo mestrado foram de um amadurecimento de décadas para mim. Sinto que foi uma emancipação em todos os níveis, onde questioneei valores, aprendizados, meus talentos, e até a ciência, e percebi o quanto a colocação profissional assumiu um papel muito importante na minha vida.

Muitas pessoas me questionam o motivo pelo qual resolvi fazer um segundo mestrado ao invés de ter feito logo de cara um doutorado, e agora nos finalmentes é que eu consigo realmente compreender como foi transformador ter feito essa escolha que nem eu mesma entendia muito bem. Sinto que agora estou madura o suficiente para elaborar um projeto maior, mais articulado, e agradeço imensamente a todos que contribuíram de alguma forma para esse crescimento pessoal e profissional.

Agradeço à amiga e orientadora Eva Burger pela parceria e confiança depositada para a realização deste trabalho. Te admiro imensamente e sei do carinho que tem por mim. Você é minha grande incentivadora nesse longo caminho que estou percorrendo.

Ao Prof. e amigo Luiz Cosme Cotta Malaquias que foi de extrema importância durante o desenvolvimento dessa dissertação. Saiba que tenho você como exemplo de ser humano e profissional a ser seguido.

Aos meus pais, Paulo e Cleuza, agradeço por estar aqui hoje.

Sei que abriram mão de muitas coisas para que eu pudesse chegar até aqui e do fundo do meu coração sou muito grata a vocês. Admiro imensamente tudo que fizeram e fazem por mim e amo muito vocês.

A minha irmã Ana Paula, que mesmo longe sempre acreditou em mim e me dá força nos momentos de dificuldade. Minha grande confidente e conselheira, minha melhor amiga.

Ao meu namorado Marcelo pelo amor e carinho, por fazer meus dias mais leves e felizes e por me mostrar que com dedicação se pode chegar longe. Obrigada por dividir comigo a casa e a vida.

Aos meus sobrinhos, Pedro e Lucas, que apesar de tão pequenos enchem minha vida de alegria.

As amigas e parceiras de laboratório Giulia, Ana Cristina, Julianne e Lauana, sem as quais esse trabalho não poderia ter sido realizado.

Aos meus amigos de longe e de perto, que fazem minha vida mais alegre, meus risos mais fáceis e meus finais de semana incríveis, especialmente meu amigo Pablo por dividir comigo tantos momentos durante esse curso de pós-graduação.

As queridas funcionárias Tetê, Val, Fran e Janice pela amizade, carinho e bons momentos.

Aos professores do curso de pós, aos técnicos e funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste projeto meus sinceros agradecimentos.

À CAPES, a FAPEMIG e ao CNPQ por terem financiado essa pesquisa.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(ARTHUR SCHOPENHAUER)

RESUMO

A imunidade inata mostra-se importante na defesa do hospedeiro contra a infecção por fungos, e dentro desse contexto macrófagos e neutrófilos (PMN) desempenham papel central na paracoccidiodomicose. O tratamento desta doença inclui o uso de antifúngicos que, além do prolongado tempo de administração, podem ter diversos efeitos colaterais. A laserterapia de baixa potência (LLLT- low level laser therapy) vem sendo utilizada como tratamento adjuvante para muitas enfermidades, e já foi demonstrado seu efeito ativador em neutrófilos, se fazendo necessário compreender melhor os mecanismos imunológicos envolvidos nesse processo. Neste trabalho avaliamos os efeitos da LLLT aplicada *in vivo* nas patas traseiras de camundongos, infectados pela via “air pouch” subcutânea com a cepa virulenta do *P. brasiliensis* Pb18 ou a cepa de baixa virulência Pb265, visando atingir células em formação na medula. Grupos de animais não irradiados foram utilizados como controle. Após 8 dias de infecção as células da “air pouch” foram coletadas e analisadas quanto ao número, concentração proteica, liberação de espécies reativas de oxigênio (ERO), atividade mitocondrial de PMN e perfil de migração e secreção das citocinas (GM-CSF, IFN- γ , IL-12, IL-4, IL-10 e IL-17) pelo exsudato celular. O tratamento de animais com LLLT aumentou a atividade mitocondrial, o conteúdo de proteínas e a liberação de ERO por parte dos PMN e diminuiu a secreção da IL-10 pelas células do exsudato na infecção com a cepa virulenta Pb18. Por sua vez, a infecção com a cepa de baixa virulência Pb265 também levou a um aumento na atividade mitocondrial, mas houve diminuição no conteúdo de proteínas e a liberação de ERO foi semelhante ao controle não irradiado. Não foi observada diferença na secreção das citocinas GM-CSF, IFN- γ , IL-12, IL-4 e IL-17 pelas células do exsudato estimuladas por ambas às cepas. Quanto à migração celular, os PMN constituem o principal tipo celular encontrado no local do inóculo, seguido pelos linfócitos e monócitos. O número de PMN foi diminuído no tratamento com LLLT quando o estímulo foi o Pb18 e aumentado quando foi o Pb265. Para os linfócitos ocorreu o inverso, no grupo estimulado com Pb18 o laser atuou aumentando esse tipo celular, e diminuindo quando o estímulo foi o Pb265. Já para os monócitos não houve alteração quando o estímulo foi o Pb18 e houve uma diminuição quando o estímulo foi o Pb265 no grupo tratado com LLLT. Os resultados sugerem que o tratamento com LLLT confere um potencial fungicida aos neutrófilos e uma maior resolução da infecção causada pela cepa virulenta Pb18.

Palavras chave: Neutrófilos. Laserterapia de baixa potência. *P. brasiliensis*

ABSTRACT

Innate immunity is an important component of host defense against fungi, and in this context macrophages and neutrophils (PMN) play a central role in paracoccidioidomycosis. The treatment of this disease includes the use of antifungals, which in addition to the prolonged administration time needed may cause many side effects. Low level laser therapy (LLLT) has been used as an adjuvant treatment for many ailments and its modulating effect on neutrophils has already been demonstrated; however it is necessary to better understand the mechanisms involved in this process. In this work, we evaluated the effects of LLLT applied “in vivo” at the hind paws in mice, aiming the bone marrow. These mice were infected in the subcutaneous air pouch with Pb18 or Pb265 *P. brasiliensis* isolates. Unirradiated animals were used as controls. After 8 days of infection the cells of air pouch were collected and analyzed for the number, protein concentration and release of ROS, mitochondrial activity of PMN and migration profile and secretion of cytokines (GM-CSF, IFN- γ , IL-12, IL-4, IL-10 and IL-17) by the cells present in the exudate. LLLT-treated animals showed increased mitochondrial activity, protein content and release of ROS by PMN and in the number of cells and decreased the secretion of IL-10 exudate cells obtained after inoculation with the virulent strain Pb18. In turn, the infection with the low virulence strain Pb265 also led to an increase in mitochondrial activity, but there was a decrease in protein concentration and the release of ROS was similar to that of the unirradiated controls.. No differences were observed in the secretion of the GM-CSF, IFN- γ , IL-12, IL-4 and IL-17 cytokines by exudate cells stimulated by any of the strains. Regarding cell migration, PMN are the main cell type found at the inoculum site, followed by lymphocytes and monocytes. The number of PMN was decreased in the treatment with LLLT when the stimulus was Pb18 and increased when it was Pb265. For the lymphocytes the reverse occurred, in the group stimulated with Pb18 the laser acted increasing this cellular type, and decreasing when the stimulus was the Pb265. For monocytes, there was no change when the stimulus was Pb18 and there was a decrease when the stimulus was Pb265 in the group treated with LLLT. The results suggest that treatment with LLLT elicits a fungicidal activity to the PMN and higher resolution of the infection caused by the virulent Pb18 strain.

Key words: Neutrophils. Low level laser therapy. *P. brasiliensis*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Forma leveduriforme da cepa 18 do <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	21
Figura 2-	Cultivo de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> . À direita cepa Pb265 e à esquerda cepa Pb18.....	34
Figura 3-	“Air pouch” subcutânea em camundongo Swiss fêmea após 8 dias de inoculação com salina... ..	40
Figura 4-	Aspecto de uma “air pouch” subcutânea de camundongo Swiss fêmea que não recebeu tratamento sacrificado após 8 dias de inoculação com Zymosan.....	41
Figura 5-	Aspecto de uma “air pouch” subcutânea de camundongo Swiss fêmea que recebeu tratamento com LLLT sacrificado após 8 dias de inoculação com Zymosan	41
Figura 6-	Aspecto de “air pouches” subcutâneas em camundongos Swiss fêmeas após 8 dias de inoculação com Zymosan.....	42
Figura 7-	Número absoluto de PMN obtidos de camundongos inoculados com Zymosan.....	43
Figura 8-	Viabilidade de PMN obtidos de camundongos inoculados com Zymosan... ..	43
Figura 9-	Expressão da atividade mitocondrial de PMN obtidos de camundongos inoculados com Zymosan em densidade óptica.....	44
Figura 10-	Quantificação dos metabólitos do oxigênio emitidos por PMN obtidos de camundongos inoculados com Zymosan.....	45
Figura 11-	Conteúdo de proteínas de PMN obtidos de camundongos inoculados com	

Zymosan.....	45
Figura 12- Quantificação de GM-CSF produzido por células da “air pouch” subcutânea após estímulo com Zymosan.....	46
Figura 13- Quantificação de IFN- γ produzido por células da “air pouch” subcutânea após estímulo com Zymosan.....	47
Figura 14- Quantificação de IL-12 produzida por células da “air pouch” subcutânea após estímulo com Zymosan.....	47
Figura 15- Quantificação de IL-4 produzida por células da “air pouch” subcutânea após estímulo com Zymosan.....	48
Figura 16- Quantificação de IL-10 produzida por células da “air pouch” subcutânea após estímulo com Zymosan.....	48
Figura 17- Quantificação de IL-17 produzida por células da “air pouch” subcutânea após estímulo com Zymosan.....	49
Figura 18- Perfil de migração celular encontrado no exsudato da “air pouch” subcutânea após estímulo com Zymosan.....	50
Figura 19- Aspecto de uma “air pouch” subcutânea de camundongo Swiss fêmea que não recebeu tratamento sacrificado após 8 dias de infecção com Pb265.....	51
Figura 20- Aspecto de uma “air pouch” subcutânea de camundongo Swiss fêmea que recebeu tratamento com LLLT sacrificado após 8 dias de infecção com Pb265.....	51
Figura 21- Aspecto de “air pouches” subcutâneas em camundongos Swiss fêmeas após 8 dias de infecção com Pb265.....	52

Figura 22-	Número absoluto de PMN obtidos de camundongos infectados com Pb265.....	53
Figura 23-	Viabilidade de PMN obtidos de camundongos infectados com Pb265.....	53
Figura 24-	Expressão da atividade mitocondrial de PMN obtidos de camundongos infectados com Pb265 em densidade óptica.....	54
Figura 25-	Quantificação dos metabólitos do oxigênio emitidos por PMN obtidos de camundongos infectados com Pb265.....	55
Figura 26-	Conteúdo de proteínas de PMN obtidos de camundongos infectados com Pb265.....	56
Figura 27-	Quantificação de GM-CSF produzido por células da “air pouch” subcutânea após estímulo com Pb265.....	57
Figura 28-	Quantificação de IFN- γ produzido por células da “air pouch” subcutânea após estímulo com Pb265.....	57
Figura 29-	Quantificação de IL-12 produzida por células da “air pouch” subcutânea após estímulo com Pb265.....	58
Figura 30-	Quantificação de IL-4 produzida por células da “air pouch” subcutânea após estímulo com Pb265.....	58
Figura 31-	Quantificação de IL-10 produzida por células da “air pouch” subcutânea após estímulo com Pb265.....	59
Figura 32-	Quantificação de IL-17 produzida por células da “air pouch” subcutânea após estímulo com Pb265.....	59
Figura 33-	Perfil de migração celular encontrado no exsudato da “air pouch”	

	subcutânea após estímulo com Pb265.....	60
Figura 34-	Aspecto de uma “air pouch” subcutânea de camundongo Swiss fêmea que não recebeu tratamento sacrificado após 8 dias de infecção com Pb18.....	61
Figura 35-	Aspecto de uma “air pouch” subcutânea de camundongo Swiss fêmea que recebeu tratamento com LLLT sacrificado após 8 dias de infecção com Pb18.....	61
Figura 36-	Aspecto de “air pouches” subcutâneas em camundongos Swiss fêmeas após 8 dias de infecção com Pb18.....	62
Figura 37-	Número absoluto de PMN obtidos de camundongos infectados com Pb18.....	63
Figura 38-	Viabilidade de PMN obtidos de camundongos infecção com Pb18.....	63
Figura 39-	Expressão da atividade mitocondrial de PMN obtidos de camundongos infectados com Pb18 em densidade óptica.....	64
Figura 40-	Quantificação dos metabólitos do oxigênio emitidos por PMN obtidos de camundongos infectados com Pb18.....	65
Figura 41-	Conteúdo de proteínas de PMN obtidos de camundongos infectados com Pb18.....	65
Figura 42-	Quantificação de GM-CSF produzido por células da “air pouch” subcutânea após estímulo com Pb18.....	66
Figura 43-	Quantificação de IFN- γ produzido por células da “air pouch” subcutânea após estímulo com Pb18.....	67
Figura 44-	Quantificação de IL-12 produzida por células da “air pouch” subcutânea	

	após estímulo com Pb18.....	67
Figura 45-	Quantificação de IL-4 produzida por células da “air pouch” subcutânea após estímulo com Pb18.....	68
Figura 46-	Expressão de IL-10 por células da “air pouch” subcutânea após estímulo com Pb18.....	68
Figura 47-	Expressão de IL-17 por células da “air pouch” subcutânea após estímulo com Pb18.....	69
Figura 48-	Perfil de migração celular encontrado no exsudato da “air pouch” subcutânea após estímulo com Pb18.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS

AmB	- Anfotericina B
ATP	- Adenosina trifosfato
BCA	- Ácido bicinconínico
cél/mL	- Células leveduriforme viáveis/mililitro
CO ₂	- Gás carbônico
Cu	- Cobre
ELISA	- Ensaio imunoenzimático ligado à enzima
ERO	- Espécies reativas de oxigênio
G	- Força gravitacional
GM-CSF	- Fator estimulador de crescimento de colônias de granulócitos macrófagos
H ₂ O ₂	- Peróxido de hidrogênio
IFN- γ	- Interferon gama
IL	- Interleucina
J/cm ³	- Joule por centímetro cúbico (medida de densidade de energia)
LASER	- Amplificação da luz por emissão estimulada de radiação
LLLT	- Laserterapia de baixa potência
LPS	- Lipopolissacarídeos
mL	- Mililitros
MPO	- Mieloperoxidase
mW	- Miliwatt
NADPH	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
nm	- Nanômetro
NK	- Células natural killer
NO	- Óxido nítrico
PAMPS	- Padrões moleculares associados a patógenos
Pb	- <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PCM	- Paracoccidioidomicose
PMN	- Polimorfonucleares neutrófilos
rpm	- Rotações por minuto
UFC	- Unidades formadoras de colônias
Th	- Linfócito helper ou auxiliar
TLR	- Receptores tipo <i>toll</i>

TNF- α	- Fator de necrose tumoral alfa
Treg	- Linfócito T regulatório
QL	- Quimioluminescência
v:v	- Volume:volume
μ L	- Microlitro
μ g	- Micrograma

LISTA DE SÍMBOLOS

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

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (Pb) E PARACOCCIDIOIDOMICOSE (PCM).....	21
1.2	PARACOCCIDIOIDOMICOSE EXPERIMENTAL.....	23
1.3	RESPOSTA IMUNE CONTRA O <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	24
1.4	EMPREGO DE LASER INFRAVERMELHO DE BAIXA POTÊNCIA.....	29
2	JUSTIFICATIVA.....	32
3	OBJETIVOS.....	33
3.1	OBJETIVO GERAL.....	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4	MATERIAL E MÉTODO.....	34
4.1	ANIMAIS.....	34
4.2	FUNGOS.....	34
4.2.1	Manutenção do isolado de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb18 e Pb265.....	34
4.2.2	Zymosan.....	35
4.2.3	Preparação de suspensões de Pb ou Zymosan para infecção ou inoculação dos animais via “air pouch” subcutânea.....	35
4.3	GRUPOS DE INFECÇÃO/INOCULAÇÃO DE CAMUNDONGOS VIA “AIR POUCH” SUBCUTÂNEA.....	35
4.4	OBTENÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS DE “AIR POUCH” SUBCUTÂNEA.....	36
4.5	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE METABÓLICA DOS PMN USANDO O MÉTODO DO ÁCIDO BICINCONÍNICO.....	36
4.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL PELO MÉTODO DO MTT.....	37
4.7	QUANTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS DO OXIGÊNIO PELO MÉTODO DA QUIMIOLUMINESCÊNCIA.....	37
4.8	AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS OBTIDAS DE “AIR POUCH” SUBCUTÂNEA POR CONTAGEM DIFERENCIAL.....	38
4.9	AVALIAÇÃO DO PERFIL DAS CITOCINAS PRODUZIDAS POR	

	CÉLULAS DE “AIR POUCH” SUBCUTÂNEA.....	38
4.10	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	39
5	RESULTADOS.....	40
5.1	EFEITO DO TRATAMENTO COM LLLT EM PMN OBTIDOS POR INOCULAÇÃO COM SALINA A 0,9%.....	40
5.1.1	Visualização macroscópica da “air pouch” subcutânea e avaliação de exsudato celular obtida após inoculação com salina a 0,9%.....	40
5.2	EFEITO DO TRATAMENTO COM LLLT EM PMN OBTIDOS POR INOCULAÇÃO COM ZYMOBAN.....	40
5.2.1	Visualização macroscópica da “air pouch” subcutânea obtida após inoculação com Zymosan.....	40
5.2.2	Número total de neutrófilos obtidos da “air pouch” subcutânea após inoculação com Zymosan.....	42
5.2.3	Viabilidade dos neutrófilos obtidos da “air pouch” subcutânea após inoculação com Zymosan.....	43
5.2.4	Avaliação da atividade mitocondrial de neutrófilos obtidos da “air pouch” subcutânea após inoculação com Zymosan.....	44
5.2.5	Quantificação dos metabólitos do oxigênio emitidos por neutrófilos obtidos da “air pouch” subcutânea após inoculação com Zymosan.....	44
5.2.6	Avaliação do conteúdo de proteínas de neutrófilos obtidos da “air pouch” subcutânea após inoculação com Zymosan.....	45
5.2.7	Avaliação da produção de citocinas pelo exsudato obtido da “air pouch” subcutânea após inoculação com Zymosan.....	46
5.2.8	Avaliação do perfil celular encontrado no exsudato obtido da “air pouch” subcutânea após inoculação com Zymosan.....	49
5.3	EFEITO DO TRATAMENTO COM LLLT EM PMN OBTIDOS POR ESTÍMULO COM <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> DE BAIXA VIRULÊNCIA (Pb265).....	50
5.3.1	Visualização macroscópica da “air pouch” subcutânea obtida após infecção com Pb265.....	50
5.3.2	Número total de neutrófilos obtidos da “air pouch” subcutânea após infecção com Pb265.....	52
5.3.3	Viabilidade dos neutrófilos obtidos da “air pouch” subcutânea após	

	infecção com Pb265.....	53
5.3.4	Avaliação da atividade mitocondrial de neutrófilos obtidos da ‘air pouch’ subcutânea após infecção com Pb265.....	54
5.3.5	Quantificação dos metabólitos do oxigênio emitidos por neutrófilos obtidos da “air pouch” subcutânea após infecção com Pb265.....	54
5.3.6	Avaliação do conteúdo de proteínas de neutrófilos obtidos da “air pouch” subcutânea após infecção com Pb265.....	55
5.3.7	Avaliação da produção de citocinas pelo exsudato obtido da “air pouch” subcutânea após infecção com Pb265.....	56
5.3.8	Avaliação do perfil celular encontrado no exsudato obtido da “air pouch” subcutânea após infecção com Pb265.....	60
5.4	EFEITO DO TRATAMENTO COM LLLT EM PMN OBTIDOS POR ESTÍMULO COM <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> DE ALTA VIRULÊNCIA (Pb18).....	61
5.4.1	Visualização macroscópica da “air pouch” subcutânea obtida após infecção com Pb18.....	61
5.4.2	Número total de neutrófilos obtidos da “air pouch” subcutânea após infecção com Pb18.....	62
5.4.3	Viabilidade dos neutrófilos obtidos da “air pouch” subcutânea após infecção com Pb18.....	63
5.4.4	Avaliação da atividade mitocondrial de neutrófilos obtidos da “air pouch” subcutânea após infecção com Pb18.....	64
5.4.5	Quantificação dos metabólitos do oxigênio emitidos por neutrófilos obtidos da “air pouch” subcutânea após infecção com Pb18.....	64
5.4.6	Avaliação do conteúdo de proteínas de neutrófilos obtidos da “air pouch” subcutânea após infecção com Pb18.....	65
5.4.7	Avaliação da produção de citocinas pelo exsudato obtido da “air pouch” subcutânea após infecção com Pb18.....	66
5.4.8	Avaliação do perfil celular encontrado no exsudato obtido da “air pouch” subcutânea após infecção com Pb18.....	69
6	DISCUSSÃO.....	71
7	CONCLUSÃO.....	78
	REFERÊNCIAS.....	79

1 INTRODUÇÃO

O trabalho apresentado a seguir tem como tema o estudo da laserterapia de baixa potência como forma de ativar neutrófilos, células especialmente importantes durante nas fases iniciais de infecções fúngicas. Serão apresentados em forma de texto e figura os itens que introduzem este trabalho.

1.1 *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) E PARACOCCIDIOIDOMICOSE (PCM)

O gênero *Paracoccidioides* inclui duas espécies de fungos assexuados termodimórficos, *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, que são os agentes etiológicos da PCM. O *P. brasiliensis* (utilizado nesse trabalho) pode ser encontrado nas formas miceliana a 25°C no solo ou leveduriforme a 37°C no hospedeiro. Vive em solos férteis e úmidos com vegetação abundante, saprofitamente. A infecção do indivíduo se dá pela inalação de pequenos conídios que chegam aos alvéolos pulmonares, e ali se transformam na forma leveduriforme parasitária (Figura 1). A instalação da doença dependerá do tempo de exposição, da quantidade de conídios inalados e das condições imunológicas do indivíduo (WANKE e AIDÉ, 2009; (TEIXEIRA et al., 2009).



Figura 1- Forma leveduriforme da cepa 18 do *Paracoccidioides brasiliensis*.
Fonte: O Autor.

A paracoccidioidomicose foi descrita pela primeira vez por Adolfo Lutz (1908), e caracteriza-se por uma infecção que primariamente envolve os pulmões e pode disseminar-se para vários órgãos, o que origina lesões secundárias nas mucosas, linfonodos, glândulas adrenais e pele (BISSINELLI e FERREIRA, 2002). É a micose sistêmica de maior prevalência na América Latina. No Brasil, a maior incidência ocorre nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e Mato Grosso do Sul (BICALHO et al., 2001).

A paracoccidiodomicose doença atinge principalmente trabalhadores rurais adultos, do sexo masculino (RAMOS e SARAIVA, 2008). Geralmente indivíduos com esse perfil estão inseridos num menor nível socioeconômico, com condições higiênicas precárias e maior grau de desnutrição. Além disso, o tabagismo e o consumo de álcool frequentemente estão associados aos hábitos de vida dessa população e esses fatores, em conjunto, contribuem para a debilitação do sistema imunológico, favorecendo o aparecimento da doença (MARQUES et al., 2007). Foi demonstrado que os hormônios femininos, especialmente o estrógeno, 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).

Os sintomas da doença são variáveis e dependem dos sítios comprometidos. As crianças, quando acometidas, quase não apresentam sintomas respiratórios, predominando lesões cutâneas, linfonodais nas cadeias cervicais, torácicas e abdominais e alterações intestinais. Os adultos, frequentemente, apresentam sintomas gerais como febre, emagrecimento, lesões na boca e vias aéreas superiores, dor local, perda de dentes, dor ao deglutir e rouquidão. Há também alterações respiratórias como tosse com expectoração de muco e dispneia e o envolvimento pulmonar pode ser extensivo (WANKE e AIDÉ, 2009; MARTINEZ, 1997).

O estabelecimento da doença depende de diversos fatores associados ao fungo, como sua virulência e composição de antígenos, associados aos fatores ligados ao hospedeiro no desenvolvimento de uma resposta imune eficaz. Dentre os fatores do hospedeiro destacam-se a susceptibilidade genética e a integridade do sistema imunológico (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). O principal componente antigênico do fungo é uma glicoproteína de superfície da parede celular denominada gp43, identificada como fração E por Yarzabal et al. (1977) e caracterizada por Puccia et al. (1986). Esta fração é associada à virulência do fungo e/ou aos mecanismos de escape do sistema imune apresentando efeitos proteolíticos em elastina e caseína, característica fundamental para a instalação do fungo nos tecidos (MENDES-GIANNINI et al., 1990). A virulência do fungo é um evento multifacetado que envolve a expressão de múltiplos genes em diferentes estágios de infecção, que culminam na expressão de diversas adesinas responsáveis pelo sucesso da colonização do tecido hospedeiro pelo fungo (DA SILVA et al., 2013).

O tratamento da PCM pode ser feito utilizando-se polienos, como a anfotericina B (AmB), derivados sulfamídicos, como sulfadiazina ou derivados azólicos, como cetoconazol, fluconazol e itraconazol.

As sulfas, apesar de mostrarem-se eficazes no tratamento da PCM e sejam obtidas gratuitamente no Sistema Único de Saúde, devem ser administradas várias vezes ao dia, o que é uma desvantagem no seu uso. Além disso, possuem efeitos colaterais como reação de hipersensibilidade, e a terapia com esses medicamentos é mais longa quando comparada a outros fármacos (MARTINEZ, 2004).

Os azólicos são a opção terapêutica mais indicada para as formas leves e moderadas da doença, porém esses medicamentos não são disponibilizados pelas redes públicas de saúde da maioria dos estados brasileiros. A associação de sulfametazol/trimetropim são os medicamentos mais utilizados para o tratamento dos pacientes no ambulatório (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

A anfotericina B é utilizada no tratamento da PCM somente em condições onde paciente encontra-se hospitalizado. Esse medicamento pode ser fungistático ou fungicida dependendo da concentração obtida nos fluidos corporais e da sensibilidade dos fungos. Essa droga age ligando-se aos esteróis da membrana celular fúngica, desfazendo sua integridade e provocando extravasamento dos componentes intracelulares, o que resulta na morte do fungo (MENDES et al., 1994). Caracteriza-se por ser um antifúngico potente, porém seus efeitos colaterais, como febre, calafrios, tremores e especialmente a nefrotoxicidade limitam seu uso (VIVIANI et al., 1998).

1.2 PARACOCCIDIOIDOMICOSE EXPERIMENTAL

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

Singer-Vermes et al. (1989) estudaram sete diferentes isolados de Pb: Pb265, IVICPb267, Pb192, IVICPb9, PbSN, Pb2052 e Pb18, quanto aos aspectos de patogenicidade e imunogenicidade, e verificaram que estes possuíam virulência alta, média e baixa. O isolado Pb265 foi considerado como sendo de baixa virulência, enquanto o Pb18 foi considerado de alta virulência quando inoculados em camundongos da linhagem B10A. O isolado Pb18 disseminou-se em órgãos como fígado, baço, pulmões, nódulos linfáticos e coração, enquanto que o isolado Pb265 atingiu fracamente os nódulos linfáticos. Essa

variação na virulência pode auxiliar a explicação quanto à existência de diferentes manifestações clínicas da doença (FRANCO et al., 1989).

1.3 RESPOSTE IMUNE CONTRA O *Paracoccidioides brasiliensis*

A imunidade inata desempenha um papel importante na defesa do hospedeiro contra a infecção por fungos, como ativação do sistema complemento e atividade microbicida de células Natural Killer (NK) e dos fagócitos. O estudo de Musatti et al. (1976) revelou que o grau de comprometimento da resposta imune celular na PCM é agravado com o progresso da doença, mostrando que esse padrão de resposta possui um papel protetor contra a disseminação do fungo. O Pb instala-se nos tecidos, causando lesão tecidual, com consequente afluxo de macrófagos e neutrófilos para aumentar as defesas locais. Se isso não for suficiente para conter a multiplicação dos fungos, os macrófagos se organizam em granulomas. O estabelecimento da resposta imune celular anti-Pb auxilia a organização e a atividade fungicida do granuloma, que contribui para o bloqueio da multiplicação do fungo e sua disseminação.

As células NK, polimorfonucleares neutrófilos (PMN), monócitos e macrófagos desempenham um papel central na resposta inata ao Pb (PERACOLI et al., 1995; BONFIM et al., 2009; SOARES et al., 2001; MOTA et al., 1985; PAGLIARI et al., 2010).

Na infecção por conídios de *P. brasiliensis*, 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, possuindo um importante papel no início da infecção. Tanto em camundongos como em humanos, os PMN estão presentes em grandes quantidades nos tecidos parasitados e apresentam um papel importante na atividade fungicida contra o 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 (RESTREPO et al., 1992; TAVIAN et al., 2008). Os PMN produzem grandes quantidades de prostaglandinas E2 e leucotrienos, prolongando o edema e o processo inflamatório, porém minimizando a capacidade de dano celular causado pelos monócitos. *In vitro*, quando co-cultivados com Pb, os PMN produzem altos níveis de IL-8, o que desencadeia um processo antiapoptótico dessas células, favorecendo a multiplicação e a sobrevivência do fungo no interior da célula fagocitária (ACORCI et al., 2009). Neutrófilos de camundongos resistentes à infecção por via subcutânea “*air pouch*” encontram-se ativados e apresentam maior atividade contra o fungo, quando comparados com células de animais suscetíveis. Um intenso infiltrado neutrofílico

“air pouch” esteve associado com resposta de hipersensibilidade tardia em ambas as linhagens (MELONI-BRUNERI et al., 1996). Estudos utilizando animais com neutrófilos depletados durante as primeiras fases da infecção mostraram que essas células são extremamente importantes para os mecanismos de defesa do hospedeiro (KERR et al., 1988). O estudo de Pina et al. (2006) revelou que a depleção de neutrófilos diminui o tempo de sobrevivência de animais susceptíveis, porém não houve alteração no grupo dos animais resistentes, o que demonstra que essas células possuem um papel essencial em situação onde há deficiência de imunidade mediada por células. A ativação de células Th17 e a inflamação pulmonar na PCM estão associadas com um alto de PMN e diminuição da presença de células Treg nas lesões (LOURES et al., 2009). O estudo de Puertas-Arias et al. (2016) em camundongos demonstrou que a depleção de neutrófilos é associada com significativa diminuição no número de eosinófilos, células dendríticas, células TCD4 e células Treg, carga fúngica e das citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias IL-17, TNF-alfa e TGF-beta1, promovendo resolução da inflamação pulmonar em estágios crônicos. Na fase aguda os PMN são capazes de produzir IFN- γ e IL-17, que exercem importantes efeitos na ativação de macrófagos, e a depleção dessas células causa subsequente diminuição dos níveis dessas citocinas causando uma resposta imune descontrolada caracterizada por aumento da carga fúngica, o que reflete numa deficiência para eliminar o fungo. Esses achados fortalecem a hipótese de que o IFN- γ e a IL-17 produzida pelos PMN, além de outros fatores, fazem um link entre a imunidade inata e a adaptativa (PINO-TAMAYO et al., 2016).

Uma infecção via intraperitoneal de Pb em camundongos foi capaz de se disseminar para a medula óssea e causar alteração em animais susceptíveis, com uma maior queda na produção e maturação de PMN do que a observada em camundongos resistentes infectados pela mesma via (SPERANDIO et. al, 2015).

Os macrófagos são excelentes células apresentadoras de antígenos, além de produzirem e liberarem mediadores inflamatórios quimiotáticos. Dessa forma participam da fagocitose de microrganismos, carregando-os até os linfonodos onde as respostas imunes específicas são geradas. Podemos considerar que os macrófagos estão envolvidos tanto na imunidade inata quanto na adquirida em resposta ao Pb. Estudos em pacientes com PCM demonstraram que a resistência ao fungo é dependente das atividades de macrófagos/monócitos e das células T helper, mediadas por IFN- γ e TNF- α . O efeito conjunto dessas duas citocinas é essencial para a resistência e atividade fungicida do hospedeiro contra o Pb (CALVI et al., 2003). Macrófagos alveolares de camundongos resistentes e susceptíveis ao Pb foram analisados após infecção pulmonar e observou-se a ausência da produção de

H₂O₂ por partes das células provenientes de animais susceptíveis, enquanto que os de animais resistentes produziram altos níveis deste metabólito (CANO et al., 1995).

Nas experiências relatadas no trabalho de Gonzales et al. (2000) tornou-se evidente, pela primeira vez, que a produção de NO induzido por IFN- γ torna os macrófagos murinos capazes de restringir o crescimento intracelular do Pb, indicando que este é um importante mecanismo exibido por essas células. A produção de NO pelos macrófagos inibem o processo de transformação do conídeo em levedura, exercendo uma importante atividade fungicida contra Pb. A interleucina IL-17 induz macrófagos a liberarem IL-1 β e TNF- α e consequentemente regulam a expressão de moléculas endoteliais de adesão (JOVANOVIC et al., 1998). Na PCM experimental murina a expressão de moléculas de adesão celular é correlacionada com a intensidade da resposta inflamatória (GONZALES et al., 2005).

A interação entre moléculas de superfície do parasita e receptores homólogos presentes na membrana celular das células fagocíticas, incluindo os neutrófilos, modula a fagocitose e a ativação dessas células. Entre esses receptores destacam-se os receptores semelhantes à Toll (TLRs, Toll-like receptors) e receptores de lectina tipo C (CLR), que são proteínas transmembrânicas que interagem com estruturas moleculares de patógenos, ativando as células fagocitárias. Os TLRs são capazes de reconhecer padrões moleculares associadas a patógenos (PAMPs) e induzir sinais que resultam na expressão de genes da resposta imune inata e produção de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias que regulam a resposta imune adaptativa (McINTURFF; MODLIN; KIM, 2005). Apesar dos TLRs promoverem resposta imunológica contra agentes infecciosos, modelos experimentais sugerem que leveduras do fungo penetram em macrófagos do hospedeiro através dos receptores TLR2 e TLR4, o que desencadeia a produção de citocinas pró-inflamatórias via molécula adaptadora MyD88. A interação entre o TLR e o *P. brasiliensis* é considerada um mecanismo de escape desenvolvido pelo fungo para garantir sua sobrevivência dentro das células fagocitárias (CALICH et al., 2008). Foi demonstrada a participação de TLR2, TLR4 e dectina-1 no reconhecimento e internalização do *P. brasiliensis* com consequente ativação de neutrófilos (BOMFIM et al; 2009). Como já visto, fungos são reconhecidos por dectina-1, o que ocorre também com o Zymosan, um polissacarídeo rico em manana amplamente utilizado como um ativador celular para inúmeras respostas efetuadas por fagócitos. A expressão da dectina-1 é predominante em monócitos, macrófagos, linhagens de neutrófilos e células dendríticas, sendo significativamente influenciada por citocinas e produtos microbianos (BROW e GORDON, 1998). Embora seja expressa 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 celular reconhece Zymosan solúvel e particulado, bem como partículas fúngicas intactas e também possui um ligante para células T (ARIIZUMO et al., 2000). Após seu reconhecimento pelas células inflamatórias, é estimulado a produção de citocinas, além de provocar a geração de anafilatoxina C5a, através da ativação da via alternativa do sistema complemento, com subsequente acúmulo de neutrófilos e macrófagos, bem como a ativação destas células (SZABÓ et al., 1995).

O Pb possui em sua parede celular um repertório de carboidratos composto por resíduos de manose, candidatos potenciais à ativação da via das lectinas do sistema complemento, 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, culminando na formação de um poro proteico lítico para patógenos (TOLEDO et al., 2010).

O papel dos anticorpos específicos anti-Pb ocorre da seguinte forma: anticorpos se ligam aos fungos, bloqueando dessa forma a difusão antigênica. São encontrados IgG e C₃ na parede dos fungos presentes nos granulomas desde as fases iniciais da infecção. 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 sua fagocitose por essas células. O mesmo efeito foi observado quando o fungo foi previamente tratado com soro normal fresco, demonstrando que a via alternativa do sistema complemento também está envolvida no processo de formação de substâncias quimiotáticas para atrair as células para o local da infecção *in vivo*.

Durante a evolução da infecção, os linfócitos Th1 sintetizam citocinas, como IFN- γ , TNF- α e IL-12, que conferem proteção ao hospedeiro, evitando a disseminação do fungo (BIAGIONI et al., 1987). A resolução da infecção envolve a produção de citocinas do padrão T helper (Th)1, como IL-12, IL-18 e IFN- γ , enquanto que o predomínio da resposta Th2, contribui para a forma disseminada da doença (CALICH et al., 1998).

A imunorregulação na PCM está associada a padrões de resposta regulados por células T helper do tipo Th1, Th2 e células Treg. A defesa efetiva contra Pb depende principalmente das células Th1, e a resistência adquirida é governada por citocinas que ativam células T e macrófagos. Nesse contexto, o TNF- α e o IFN- γ possuem um papel particularmente proeminente em camundongos (CALICH et al., 1998). Em camundongos resistentes inoculados com Pb verificou-se uma infecção caracterizada por ativação de macrófagos e neutrófilos 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 IL-2 e produção relativamente alta de IL-5 e IL-10 (KASHINO et al., 2000). Animais resistentes produzem IL-5 tardiamente, enquanto camundongos susceptíveis produzem picos de IL-5 (CALICH e KASHINO, 1998).

Células produtoras de IL-17, com funções distintas das subpopulações Th1 e Th2, também possuem importante participação na regulação da inflamação tecidual em camundongos (PARK et al., 2005). Em humanos, 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; SOTTO; DE BRITO, 1996). Quando há uma incapacidade no desenvolvimento dessa resposta, há um desvio para outros padrões de resposta imune, como a Th2, que resulta em ineficiente contenção da propagação da infecção (PAGLIARI e SOTTO, 2003).

Pacientes com a doença em atividade apresentam diminuição da resposta imune celular, o que caracteriza uma depressão da síntese de citocinas de padrão Th1, como IL-2, IFN- γ e IL-12, e aumento dos níveis de IL-4, IL-5 e IL-10, características do padrão Th2 não protetor ao hospedeiro (BENARD et al., 2001). *In vivo*, demonstrou-se a importância da resposta Th1 na PCM. Indivíduos portadores de deficiência congênita da subunidade b1 do receptor de IL-12/IL-23 desenvolvem doença disseminada. Essa deficiência resulta em prejuízo na síntese de IFN- γ , e susceptibilidade às infecções intracelulares por micobactérias e salmonelas (MORAES-VASCONCELOS et al., 2005). Apesar de infecções por *Candida albicans*, há um aumento de lesões cutâneas, mucosas e urogenitais em crianças com deficiência da resposta Th1 (LILIC, 2002).

Essas características demonstram que a resposta imunológica de susceptibilidade ou resistência à paracoccidiodomicose é em grande parte regulada por um balanço entre as respostas Th1 e Th2. Contudo, algumas características, como o fato de haver uma grande produção de mediadores inflamatórios e IFN- γ , e da presença de infiltrado inflamatório, tanto no pulmão como em outros tecidos com um grande número de neutrófilos com atividade fungicida diminuída, não são explicadas por esse balanço. Essas características podem ser indícios da participação de células produtoras de IL-17 (Th17), uma subpopulação de linfócitos descrita que auxiliam a remoção de patógenos que não são eficientemente destruídos pelas linhagens Th1 e Th2. Seu desenvolvimento necessita de TNF- γ , o que estabelece uma ligação com os linfócitos Treg. Sabe-se que as células TCD4 produtoras de IL-17 apresentam reatividade cruzada contra fungos antigênicos, sugerindo que essas células

desempenham um importante papel contra infecções fúngicas (ACOSTA-RODRIGUEZ et al., 2007).

1.4 EMPREGO DE LASER INFRAVERMELHO DE BAIXA POTÊNCIA

As radiações do tipo laser de baixa potência (LLLT – low level laser therapy), com espectros de ondas eletromagnéticas situadas entre 690 e 940 nm, se tornaram objeto de inúmeros estudos, com foco especial em sua ação cicatrizante. Nesta faixa obtém-se um poder de penetração em torno de 1,4 mm o que justifica seu uso em diferentes tecidos para o reparo cicatricial, incluindo o tecido cutâneo, onde se observa um número expressivo de pesquisas (TAVARES, 2002). A LLLT vem sendo utilizado para tratamento de diversos efeitos colaterais causados por quimioterapia ou radioterapia, e também como auxiliador de reparo tecidual. Endre Mester (1966) demonstrou efeitos dessa terapia na cicatrização de feridas em dorso de ratos.

A terapia a laser de baixa potência possui efeitos fisiológicos que são divididos em primários, secundários e terapêuticos. Entre os efeitos primários (ou diretos) merecem destaque os bioquímicos (liberação de histamina, serotonina e bradicinina, produção de ATP, inibição de prostaglandinas e lise de fibrina), bioelétrico (potencialização da bomba de sódio/potássio) e bioenergéticos (normalização do contingente energético e físico de cada indivíduo). Dentre os secundários (ou indiretos) encontra-se o estímulo à microcirculação com conseqüente aumento do fluxo sanguíneo, e o estímulo ao trofismo celular, aumentando a velocidade de cicatrização. Como relação aos terapêuticos há o efeito analgésico, antiinflamatório, anti edematoso e cicatricial. Dentre os efeitos terapêuticos propostos pelo laser, a cicatrização tem uma posição de destaque, sugerindo que seus efeitos se devam ao aumento da produção de ATP, que proporciona um aumento da atividade mitótica e a síntese protéica, tendo como conseqüência o aumento da regeneração tecidual no processo de reparação e o estímulo à microcirculação e a formação de novos vasos a partir dos preexistentes, sendo que estes aumentariam o aporte nutricional e a velocidade mitótica, e por fim a estimulação a formação das fibras de colágeno (TAVARES, 2002).

Diversos estudos tem sido realizados, tanto em células em cultura, como em animais e humanos para avaliar os possíveis efeitos desta radiação LASER. O LASER de baixa potência, 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, podendo resultar em aumento da produção de ERO, adenosina trifosfato (ATP)

e adenosina monofosfato cíclico, processos estes relacionados com a promoção de proliferação celular (GAVISH et al., 2004; OREN et al., 2001; LAVI et al., 2003; CASTANO et al., 2007).

Em processos inflamatórios e em respostas imunológicas, a LLLT tem sido demonstrada como moduladora, normalizando ou reduzindo respostas inflamatórias, tais como edema e migração de células para o local da inflamação e tem sido utilizado para o tratamento de linfedema pós-mastectomia. A aplicação de LLLT na região da axila auxilia na resolução de linfedema pós-mastectomia por redução da fibrose causadas por intervenção no câncer de mama (BJORDAL et al., 2011; CORREA et al., 2007; CARATI et al., 2003; KAVIANI et al., 2006). Além disso, pode também estimular a geração de vias de drenagem linfática e ativação da resposta imune localizada (LAU e CHEING, 2009). A irradiação LASER diretamente sobre os linfonodos pode promover efeitos benéficos no controle do edema, pois o sistema linfático está diretamente envolvido na resolução deste problema. Como se sabe, os gânglios linfáticos são os locais mais importantes para as células imunes trocarem informações, residirem, expandirem, e iniciarem respostas imunes adaptativas. No entanto, existe 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, enquanto outros acreditam que esta terapia pode agravá-las, 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. (MEDRADO et al., 2003; WOODRUFF et al., 2004; VIEGAS et al., 2007).

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 desses componentes (TADAKUMA, 1993). O estudo de Meneguzzo et al. (2013) demonstrou que a irradiação com LASER 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.

A irradiação a LASER de baixa potência hélio e neônio já foi demonstrada por diminuir a produção de interleucinas pró-inflamatórias em lesões paracoccidiodomicóticas expostas a essa irradiação (NAGIB et al., 2010). A irradiação com LLLT nas patas de camundongos infectados com Pb favoreceu redução do processo inflamatório, cicatrização

mais rápida e eliminação do fungo no local, enquanto que o grupo controle apresentou múltiplos fungos viáveis no local da infecção (FERREIRA et al., 2006).

O laser de baixa potência com densidade de energia na faixa de 3 a 6 J/ cm² (inclui o utilizado no trabalho) é considerado adequado por possuir melhores efeitos cicatrizantes, reparativos e regenerativos em diversos tecidos, tanto em humanos quanto em animais. Valores inferiores ou superiores de dosagem ao intervalo citado anteriormente, não demonstraram resultados satisfatórios, sendo que doses mais altas demonstraram inibição da biomodulação celular e doses mais baixas não demonstraram ação efetiva no processo cicatricial (VIEIRA, 2006). Em relação à frequência de aplicação do laser existem variações. Vários esquemas posológicos já foram testados, como por exemplo; 3 aplicações, sendo essas realizadas no pós operatório imediato, 24 horas e 7 dias após; aplicações diárias por 3 dias consecutivos; e apenas uma única aplicação (RODRIGUES, 2006; BRAVERMAN et. al, 1989). Essa entre outras pesquisas sugerem que apenas uma aplicação não seria suficiente para alcançar algum efeito celular benéfico, e que um maior número de aplicações é necessário para atingir tal benefício, não havendo limite para o número de aplicações, uma vez que a LLLT não é capaz de causar mutação nas células (VIEIRA, 2006).

2 JUSTIFICATIVA

No Brasil, a PCM é a doença com maior impacto na saúde dentre as micoses sistêmicas que afetam o organismo. A resposta imune celular bem estabelecida e mantida possui caráter protetor contra a doença, o que pode ser observado na maioria dos indivíduos infectados visto que estes não apresentam quadro clínico. Com a diminuição da resposta imune a PCM doença se estabelece, sendo necessário um tratamento de longa duração que pode deixar sequelas nos pacientes. O papel dos neutrófilos na fase inicial é muito importante, atuando como célula fagocítica e direcionando, juntamente com outras células, a resposta imune adaptativa contra o fungo. A terapia com LLLT mostra-se eficiente para o tratamento de diversas patologias e possui baixo custo, podendo ser utilizada como terapia adjuvante para esta doença. Assim, conhecendo-se o modelo de experimentação estabelecido para o estudo da PCM, os aspectos relacionados ao fungo e o potencial ativador da LLLT sobre neutrófilos, se faz necessário compreender melhor o papel desta terapia nos mecanismos imunológicos envolvidos nesse processo.

3 OBJETIVOS

Serão apresentados os objetivos geral e específicos do trabalho.

3.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar o efeito da aplicação de laserterapia de baixa potência (LLLT) *in vivo* sobre a atividade de neutrófilos (PMN) presentes na “air pouch” subcutânea de camundongos infectados com as cepas de *Paracoccidioides brasiliensis* Pb18 e Pb265, observando também o papel da virulência do fungo na resposta imune.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a) Avaliar o efeito da LLLT sobre os seguintes parâmetros em neutrófilos:
 - Número de células obtidas
 - Viabilidade celular
 - Atividade mitocondrial
 - Conteúdo de proteínas
 - Liberação de espécies reativas de oxigênio;
- b) Avaliar a composição do exsudato celular por microscopia;
- c) Avaliar a produção das citocinas pelas células do exsudato que estimulam (GM-CSF, INF- γ , IL-12 e IL-17) e inibem (IL-4 e IL-10) as funções dos PMN após terapia com LLLT.

4 MATERIAL E MÉTODO

Serão apresentados a seguir os materiais e métodos que foram empregados para a realização deste trabalho.

4.1 ANIMAIS

Os animais utilizados nesse projeto foram camundongos fêmeas da linhagem Swiss “outbred”, obtidos do Biotério da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). Os animais foram mantidos em salas com controle de temperatura, alimentados com comida esterilizada e água destilada à vontade na UNIFAL-MG. Todos os protocolos do experimento foram submetidos à aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da UNIFAL- MG.

4.2 FUNGOS

Serão apresentados a seguir os materiais e métodos referentes aos fungos.

4.2.1 Manutenção dos isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* de alta virulência Pb18 e baixa virulência Pb265

Os isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* Pb18 e Pb265 (figura 2) empregados nesse projeto foram cedido pelo prof. Dr. Zoilo Pires de Camargo, da Universidade Federal de São Paulo, e são mantidos no Laboratório de Imunopatologia das Micoses da UNIFAL-MG. Os Pb18 e Pb265 são cultivados em meio de cultura semi-sólido de Fava Netto (FAVA NETTO, 1955) a 35⁰C e sofrem repique rotineiramente a cada 7 e 10 dias respectivamente.



Figura 2 – Cultivo de *Paracoccidioides brasiliensis*.

À direita cepa Pb265 e à esquerda cepa Pb18.

Fonte: O autor.

4.2.2 Zymosan

O Zymosan é constituído por formas leveduriformes do fungo *Saccharomyces cerevisiae* e foi adquirido comercialmente. Já foi demonstrada que a inoculação dessa substância induz reação inflamatória (DOHERTHY et al., 1985).

4.2.3 Preparação de suspensões de Pb ou Zymosan para infecção ou inoculação dos animais via “air pouch” subcutânea

As células fúngicas foram lavadas com solução salina estéril a 0,9% e centrifugadas (Eppendorf Centrifuge 5810R) a 1300 G por três vezes, e foi preparada uma suspensão com concentração de 50×10^6 células leveduriformes viáveis/mL baseadas na contagem em hemocitrômetro. A viabilidade das células foi determinada por coloração empregando o corante *Janus Green B* (BERLINER; RECA, 1966).

Para o Zymosan foi preparada uma solução autoclavada em salina na mesma concentração do Pb.

4.3 GRUPOS DE INFECÇÃO/INOCULAÇÃO DE CAMUNDONGOS VIA “AIR POUCH” SUBCUTÂNEA

Animais com a idade de 6 semanas e peso de aproximadamente 25g foram infetados com Pb18 ou Pb265 ou inoculados com Zymosan pela técnica de “air pouch” subcutânea, conforme proposto por Meloni-Bruneri et al., (1996). A bolsa de ar é produzida na região dorsal do animal por injeção subcutânea de 2 mL de ar, seguida de injeção de 0,1 mL das suspensões fúngicas. Os animais foram divididos em oito grupos experimentais, a saber:

Grupo 1: animais não irradiados inoculados com salina;

Grupo 2: animais irradiados inoculados com salina;

Grupo 3: animais não irradiados inoculados com Zymosan;

Grupo 4: animais irradiados inoculados com Zymosan;

Grupo 5: animais não irradiados infectados com Pb265;

Grupo 6: animais irradiados infectados com Pb265;

Grupo 7: animais não irradiados infectados com Pb18 ;

Grupo 8: animais irradiados infectados com Pb18.

Os animais dos grupos 2, 4, 6 e 8 receberam tratamento em dois pontos de cada pata traseira com laser infravermelho (Therapy XT NS4116) a uma fluência de $35,7 \text{ J/cm}^2$ em um módulo de frequência contínua com comprimento de onda equivalente a 808 nm, energia de 4J e potência de 100 mW. Em cada ponto a irradiação teve uma duração de 10 segundos e o seu objetivo foi o de atingir a medula óssea, local onde ocorre o processo de formação das células sanguíneas incluindo os neutrófilos, localizada no osso fêmur. As irradiações foram feitas em dias alternados e os animais receberam a primeira irradiação no dia da infecção/inoculação e a última no dia da coleta. Em cada coleta foram utilizados 15 animais para cada grupo, subdivididos em 5 subgrupos de 3 animais cada. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.4 OBTENÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS DE “AIR POUCH” SUBCUTÂNEA

Após 8 dias de infecção/inoculação os animais foram anestesiados com uma dose de 0,5 mL da solução de cloridrato de cetamina a 10% (Agener União) e cloridrato de xilasina a 2% (nome comercial: Calmium, Agener União) preparadas na proporção de 1:1 (v:v), considerada como excessiva, o que os levou a óbito. O conteúdo da “air pouch” de três animais foi coletado após a incisão da pele, com o auxílio de uma pipeta Pauster estéril de vidro e transferidos para um homogeneizador de vidro estéril, onde foram masserados. As células foram então transferidas e armazenadas em tubos Falcon contendo uma concentração conhecida de RPMI e mantidas refrigeradas, em seguida foram quantificadas em hemocítmetro e tiveram a viabilidade analisada com o corante Trypan blue a 0,05%. A composição celular é caracterizada por uma rica população de neutrófilos (superior a 90%).

Após a quantificação, a suspensão de células foi ajustada para 1×10^6 neutrófilos/mL, e o material foi centrifugado a 1780 G e 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi armazenado a -70°C no criofreezer para a dosagem das citocinas e o sedimento mantido no freezer a -20°C para a quantificação de proteínas.

4.5 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE METABÓLICA DOS PMN 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, 1985). Os sedimentos obtidos como descrito anteriormente foram deixados por 30 minutos em um aparelho de ultrassom (Ultra Cleaner 1600 A) para o rompimento das células e liberação das proteínas. Para todas as amostras obteve-se uma incidência superior a 90% de neutrófilos inviáveis, o que confirmou que os procedimentos de ruptura foram suficientes. Em uma placa de 96 poços de fundo plano foram pipetados $50\mu\text{L}$ de cada amostra, e em seguida foi adicionado $200\mu\text{L}$ do BCA. Os ensaios foram realizados em triplicata e a leitura das densidades ópticas foram medidas em micro leitor de ELISA (Anthos Zenyth 200 rt) em comprimento de onda de 560 nm. Os resultados foram expressos em μg de proteína/mL, comparando-se a densidade ótica com uma curva padrão contendo concentrações conhecidas de proteína sérica bovina (BSA). Os resultados correspondem às médias dos valores obtidos.

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL PELO MÉTODO DO MTT

O princípio deste método é a avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais, quantificadas pela redução do MTT (um sal de coloração amarela solúvel em água) à formazan (cristais de coloração púrpura, insolúveis em água) (NIKES; OTTO, 1990). Em uma placa de 96 poços de fundo plano foram pipetados $100\mu\text{L}$ da suspensão de PMN na concentração de 1×10^6 cél/mL acrescido de $100\mu\text{L}$ de RPMI. Todas as amostras foram pipetadas em triplicata. A seguir foi adicionado a cada um dos poços $20\mu\text{L}$ do reagente MTT a 5 mg/mL , e a placa foi incubada por 4 horas em estufa com 5% de CO_2 e temperatura de 37°C . Após este período, todo o sobrenadante foi retirado e foram pipetados, $200\mu\text{L}$ de DMSO (Vetec) em cada poço. Após 10 minutos foi realizada a leitura da placa em leitor de ELISA (Labsystems Multiskan EX) a 540 nm .

4.7 QUANTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS DO OXIGÊNIO PELO MÉTODO DA QUIMIOLUMINESCÊNCIA

A quantificação das ERO pelos PMN foi realizada através do método da quimioluminescência (QL). A quantificação das ERO ocorre pela determinação da emissão de luz integrada por segundos (BABIOR, 1984). Em uma cubeta foram pipetados $135\mu\text{L}$ da suspensão de PMN, $135\mu\text{L}$ de RPMI e $30\mu\text{L}$ de luminol. A leitura foi realizada em luminômetro (Promega-Glomax 20/20 Luminometer) e a intensidade de QL foi medida durante 30 minutos.

4.8 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS OBTIDAS DE “AIR POUCH” SUBCUTÂNEA POR CONTAGEM DIFERENCIAL

As células obtidas como descrito no item 4.4 foram analisadas morfológicamente utilizando o método de coloração Panótipo rápido.

Em uma lâmina foi dispensada 1 gota da suspensão de células obtida como descrito no item 4.4 e com o uso de uma lâmina extensora foi realizado o esfregaço. Após secarem a temperatura ambiente, cada lâmina foi colocada por 5 minutos em metanol e após esse tempo foi colocada por 5 segundos no frasco número 1, número 2 e número 3. Na mudança de um frasco para o outro foi retirado o excesso de corante do verso da lâmina. As lâminas foram secas ao ambiente e lavadas ao microscópio para contagem.

4.9 AVALIAÇÃO DO PERFIL DAS CITOCINAS PRODUZIDAS POR CÉLULAS DE “AIR POUCH” SUBCUTÂNEA

As concentrações das citocinas GM-CSF, IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-12 e IL-17 foram determinadas por testes de ELISA de captura, baseados na utilização de pares de anticorpos monoclonais específicos para cada citocina, um dos quais marcados por biotina. O uso dos complexos biotina-avidina e H₂O₂-peroxidase permite a determinação da concentração da citocina presente através de medidas de densidade óptica utilizando kit específico (Peprotech). Resumidamente: A sensibilização das placas de 96 poços foi feita com anticorpo de captura e as placas foram incubadas por no mínimo 18 horas a temperatura ambiente. Após esse tempo, as placas foram lavadas por quatro vezes com PBS acrescido de 0,05% Tween 20 e os sítios livres foram bloqueados com solução de bloqueio por 1 hora. Após lavagem, foram adicionados os padrões com concentrações conhecidas de cada citocina, e também os sobrenadantes da cultura celular em triplicata por 2 horas. Após nova lavagem, foram adicionados os conjugados avidina-peroxidase e as placas incubadas por 30 minutos. Após lavagem, foi adicionado o substrato cromogênico, o ABTS. As placas foram mantidas ao abrigo da luz e o desenvolvimento da cor foi monitorado até que a curva padrão fosse visualizada (aproximadamente 10 minutos). A leitura das densidades ópticas foi realizada em leitor automático, a 405 nm de comprimento de onda. As concentrações de cada citocina foram determinadas tendo como base a reta de regressão linear contínua obtida com os dados referentes às curvas-padrão. Os resultados foram expressos em picogramas por mL.

4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk a 5% de significância, e analisados pelo programa R. Essa análise permitiu a comparação entre os grupos experimentais através do teste t de Student, também a 5% de significância, pelo software GraphPad Prism® 4.0, comparando o controle e o tratamento com laser.

5 RESULTADOS

Este capítulo apresenta em forma de texto e ilustrativos os resultados obtidos neste trabalho.

5.1 EFEITO DO TRATAMENTO COM LLLT EM PMN OBTIDOS POR INOCULAÇÃO COM SALINA A 0,9%

Serão apresentados a seguir os resultados referentes à inoculação com salina.

5.1.1 Visualização macroscópica da “air pouch” subcutânea e avaliação de exsudato celular obtida após inoculação com salina a 0,9%

A figura 3 apresenta o aspecto de uma “air pouch” subcutânea obtida após inoculação do animal com salina. Observa-se que nenhum processo inflamatório pode ser identificado no local onde os procedimentos foram aplicados.



Figura 3– “Air pouch” subcutânea em camundongo Swiss fêmea após 8 dias de inoculação com salina.
Fonte: O autor.

5.2 EFEITO DO TRATAMENTO COM LLLT EM PMN OBTIDOS POR INOCULAÇÃO COM ZYMOBAN

Serão apresentados a seguir os resultados referentes à inoculação com Zymosan.

5.2.1 Visualização macroscópica da “air pouch” subcutânea obtida após inoculação com Zymosan

As figuras 4 a 6 apresentam aspectos da “air pouch” subcutânea formada a partir da inoculação com Zymosan. A figura 4 ilustra o aspecto externo da “air pouch” subcutânea de animais que não receberam o tratamento com LASER e a figura 5 ilustra o aspecto externo da “air pouch” subcutânea de animais que foram tratados com LLLT. Não se observa nenhuma diferença no aspecto macroscópico externo entre os grupos tratados ou não com a LLLT após inoculação com Zymosan.

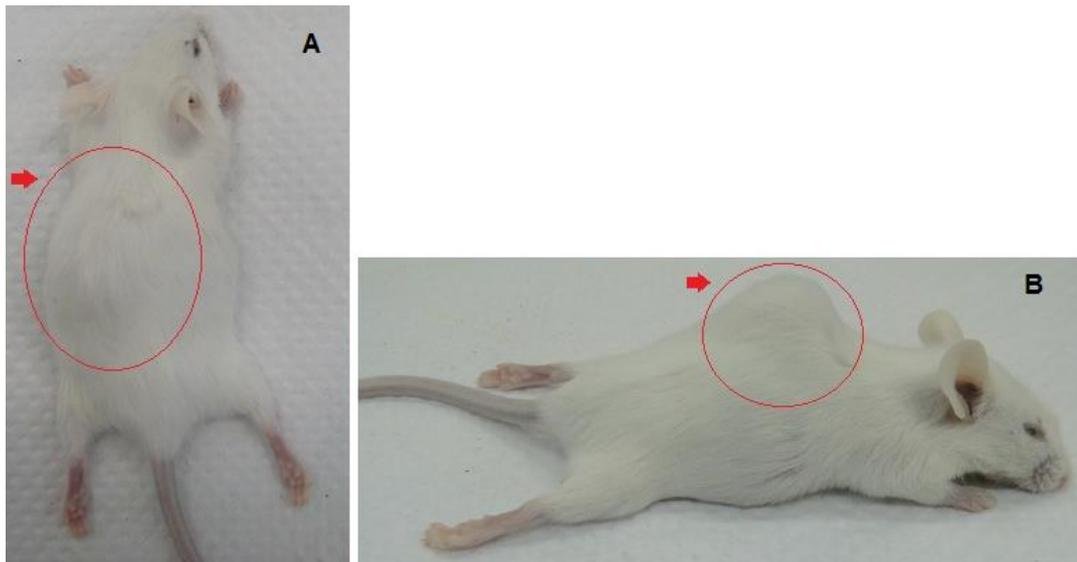


Figura 4- Aspecto de uma “air pouch” subcutânea de camundongo Swiss fêmea que não recebeu tratamento sacrificado após 8 dias de inoculação com Zymosan (A) vista superior (B) vista lateral.

Fonte: O autor.

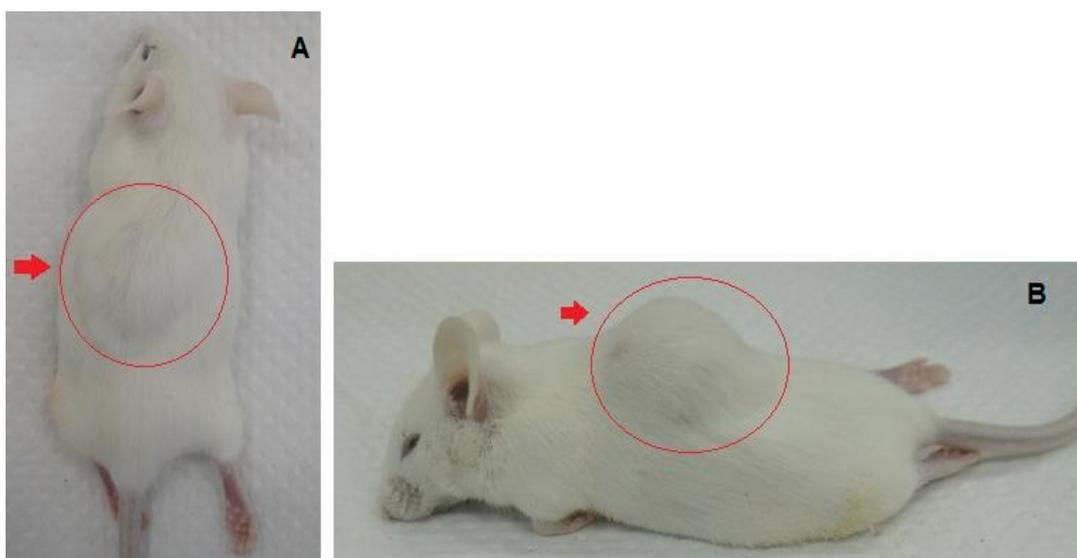


Figura 5- Aspecto de uma “air pouch” subcutânea de camundongo Swiss fêmea que recebeu tratamento com LLLT sacrificado após 8 dias de inoculação com Zymosan (A) vista superior (B) vista lateral.

Fonte: O autor.

A figura 6 apresenta o aspecto do exsudato celular obtido após inoculação dos animais com Zymosan. Observando a figura nota-se um aumento do processo inflamatório nos animais que receberam tratamento com LLLT quando comparados aos animais que não receberam irradiação após inoculação com Zymosan. O exsudato celular dos animais irradiados se apresenta com aspecto mais denso, com maior quantidade de exsudato, o que pode refletir em um maior número de células.

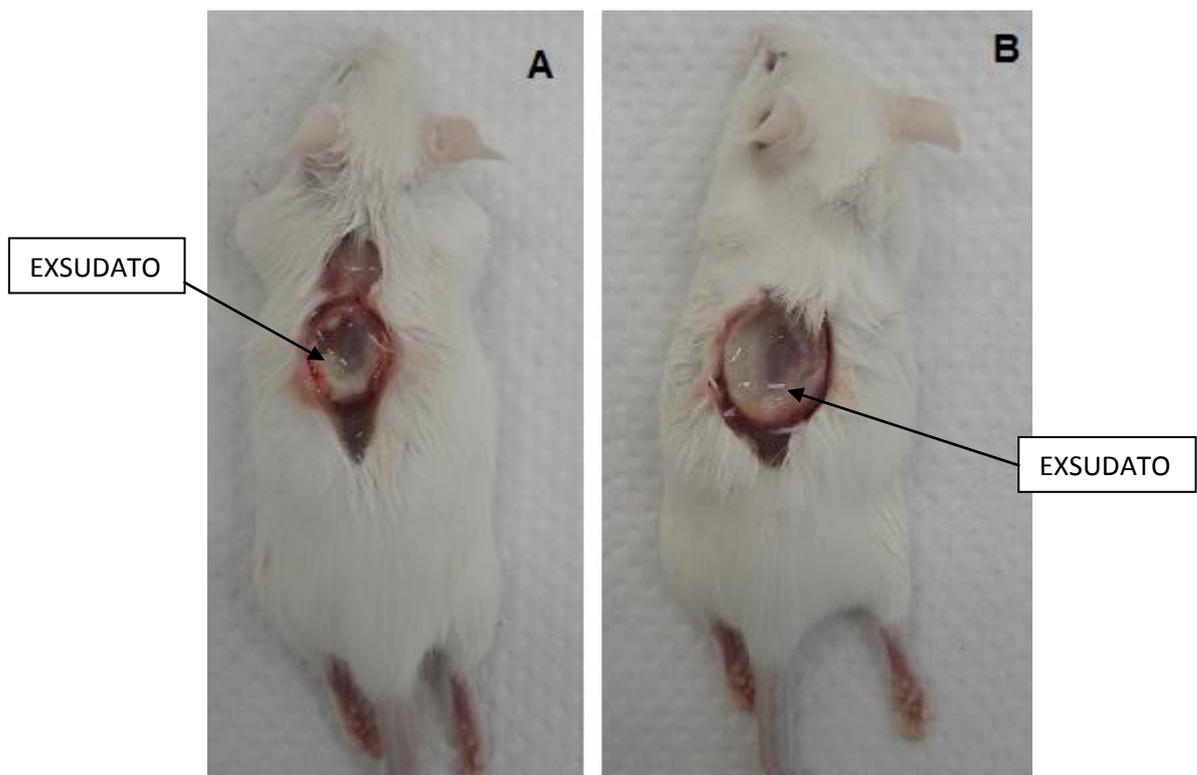


Figura 6- Aspecto de “air pouches” subcutâneas em camundongos Swiss fêmeas após 8 dias de inoculação com Zymosan (A) Animal sem tratamento (B) Animal tratado com LLLT.

Fonte: O autor.

5.2.2 Número total de neutrófilos obtidos da “air pouch” subcutânea após inoculação com Zymosan

A figura 7 apresenta o número total de PMN quantificados através da contagem em hemocítmetro de animais que receberam o tratamento com LLLT e o controle sem tratamento. O número absoluto de PMN obtido dos animais que receberam LLLT foi significativamente maior quando comparado aos animais controle sem irradiação ($p < 0,05$). Este resultado confirma o observado quanto ao aspecto do exsudato no grupo de animais irradiados mostrados anteriormente.

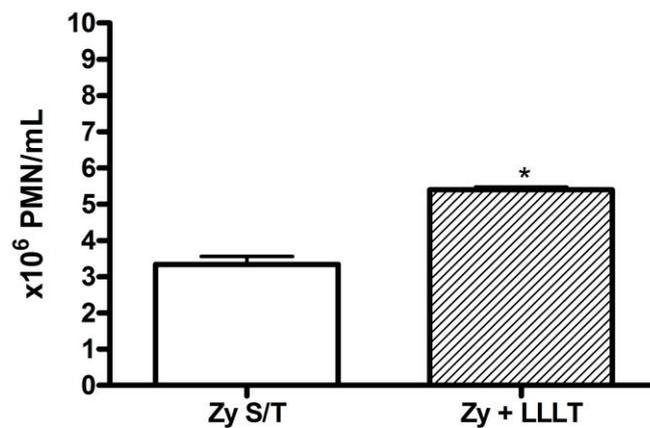


Figura 7- Número absoluto de PMN obtidos de camundongos inoculados com Zymosan.

Notas: Os PMN foram obtidos de animais que não receberam o tratamento (Zy S/T) ou que receberam irradiação (Zy + LLLT) *in vivo* após estímulo via “air pouch” subcutânea com Zymosan.

* $p < 0,05$ - Zy S/T em relação à Zy + LLLT.

Fonte: O autor.

5.2.3 Viabilidade dos neutrófilos obtidos da “air pouch” subcutânea após inoculação com Zymosan

A figura 8 apresenta a viabilidade celular expressa em porcentagem de PMN obtidos de animais que receberam ou não o tratamento com LLLT. A viabilidade dos PMN provenientes inoculação com Zymosan foi aproximadamente 70%, e não houve diferença significativa quando comparados o tratamento com LLLT ao controle não irradiado.

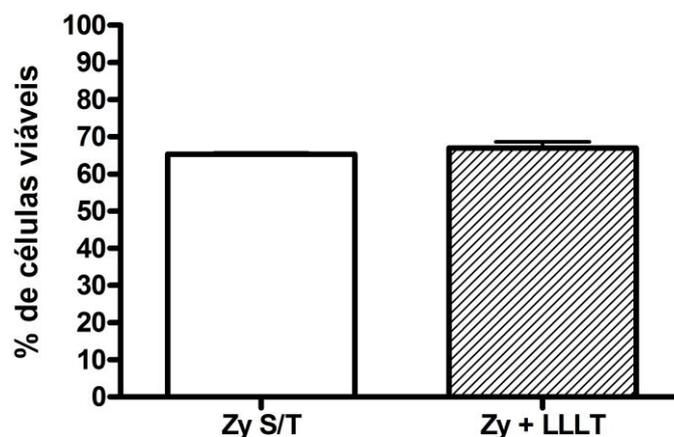


Figura 8- Viabilidade de PMN obtidos de camundongos inoculados com Zymosan.

Notas: Os PMN foram obtidos de animais que não receberam o tratamento (Zy S/T) ou que receberam irradiação (Zy + LLLT) *in vivo* após estímulo via “air pouch” subcutânea com Zymosan.

Fonte: O autor.

5.2.4 Avaliação da atividade mitocondrial de neutrófilos obtidos da “air pouch” subcutânea após inoculação com Zymosan

A figura 9 expressa a atividade mitocondrial de PMN obtidos de animais que receberam o tratamento com LLLT e o controle sem tratamento após inoculação com Zymosan. A figura mostra claramente que os PMN coletados de animais que receberam tratamento com LLLT possuem uma ativação mitocondrial significativamente maior ($p < 0,05$) do que o grupo controle não irradiado.

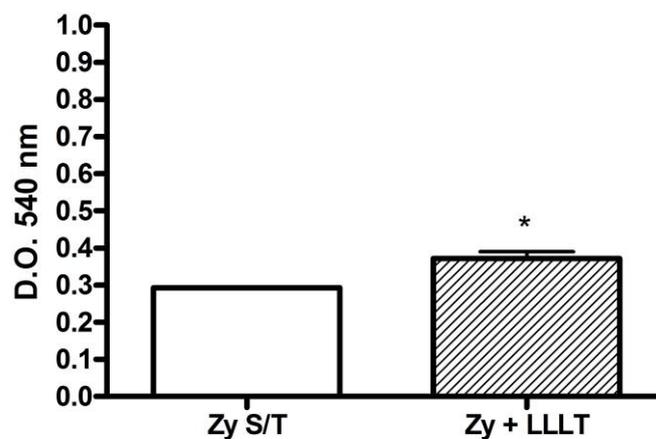


Figura 9- Expressão da atividade mitocondrial de PMN obtidos de camundongos inoculados com Zymosan em densidade óptica.

Notas: Os PMN foram obtidos de animais que não receberam o tratamento (Zy S/T) ou que receberam irradiação (Zy + LLLT) *in vivo* após estímulo via “air pouch” subcutânea com Zymosan. * $p < 0,05$ - Zy S/T em relação à Zy + LLLT.

Fonte: O autor.

5.2.5 Quantificação dos metabólitos do oxigênio emitidos por neutrófilos obtidos da “air pouch” subcutânea após inoculação com Zymosan

A figura 10 expressa a quantificação dos metabólitos do O_2 emitidos por PMN obtidos de animais que receberam ou não o tratamento com LLLT após inoculação com Zymosan. Conforme demonstrado pela figura, os PMN obtidos de animais que receberam o tratamento com LLLT liberaram significativamente maiores quantidades de ERO quando comparados ao controle sem irradiação ($p < 0,05$).

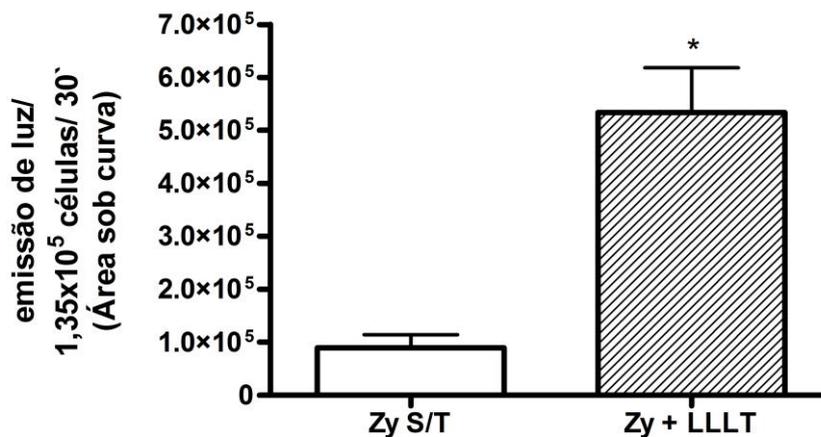


Figura 10- Quantificação dos metabólitos do oxigênio emitidos por PMN obtidos de camundongos inoculados com Zymosan.

Notas: Os PMN foram obtidos de animais que não receberam o tratamento (Zy S/T) ou que receberam irradiação (Zy + LLLT) *in vivo* após estímulo via “air pouch” subcutânea com Zymosan. * $p < 0,05$ - Zy S/T em relação à Zy + LLLT.

Fonte: O autor.

5.2.6 Avaliação do conteúdo de proteínas de neutrófilos obtidos da “air pouch” subcutânea após inoculação com Zymosan

A figura 11 avalia o conteúdo de proteínas de PMN obtidos de animais que receberam ou não o tratamento com LLLT após inoculação com Zymosan. A análise da figura mostra que os PMN obtidos de animais tratados com a LLLT após estímulo com Zymosan possuem conteúdo menor de proteínas quando comparados ao controle sem irradiação.

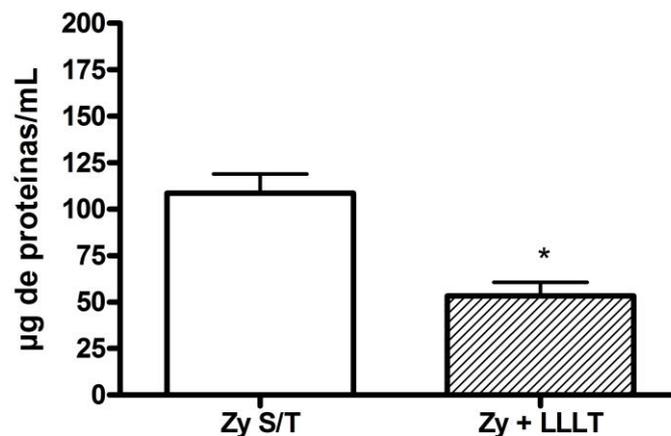


Figura 11- Conteúdo de proteínas de PMN obtidos de camundongos inoculados com Zymosan.

Notas: Os PMN foram obtidos de animais que não receberam o tratamento (Zy S/T) ou que receberam irradiação (Zy + LLLT) *in vivo* após estímulo via “air pouch” subcutânea com Zymosan. * $p < 0,05$ - Zy S/T em relação à Zy + LLLT.

Fonte: O autor.

5.2.7 Avaliação da produção de citocinas pelo exsudato obtido da “air pouch” subcutânea após inoculação com Zymosan

As figuras 12 a 17 expressam as concentrações de citocinas produzidas por células obtidas da “air pouch” subcutânea de animais tratados ou não com LLLT após inoculação com Zymosan.

A figura 12 apresenta a quantificação do GM-CSF. Observando a figura nota-se que as células obtidas do grupo controle sem irradiação secretaram maior concentração de GM-CSF do que as provenientes de animais que foram tratados com LLLT.

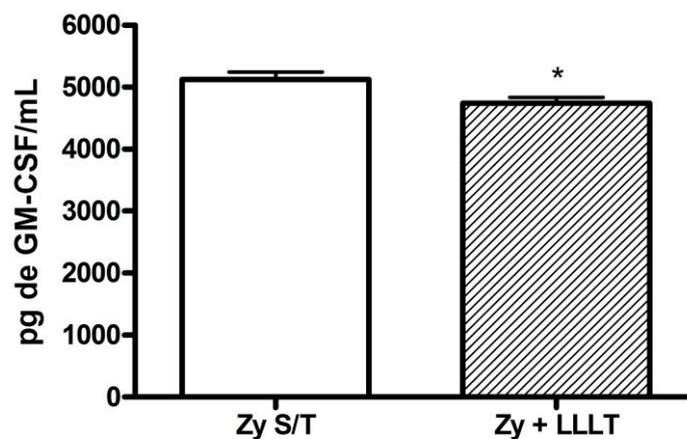


Figura 12- Quantificação de GM-CSF produzido por células da “air pouch” subcutânea após estímulo com Zymosan.

Notas: As células foram obtidas de animais que não receberam o tratamento (Zy S/T) ou que receberam irradiação (Zy + LLLT) *in vivo* após estímulo via “air pouch” subcutânea com Zymosan. * $p < 0,05$ - Zy S/T em relação a Zy + LLLT.

Fonte: O autor.

A figura 13 apresenta a quantificação do IFN- γ . Não houve diferença significativa quanto à produção desta citocina quando comparamos o grupo tratado com LLLT e o grupo controle sem irradiação.

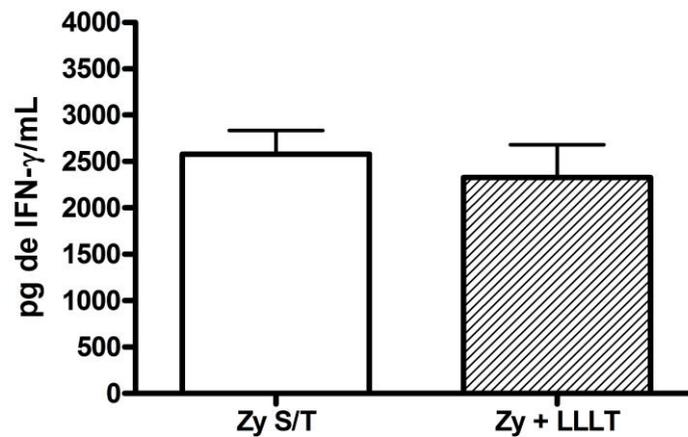


Figura 13- Quantificação de IFN- γ produzido por células da “air pouch” subcutânea após estímulo com Zymosan.

Notas: As células foram obtidas de animais que não receberam o tratamento (Zy S/T) ou que receberam irradiação (Zy + LLLT) *in vivo* após estímulo via “air pouch” subcutânea com Zymosan.

Fonte: O autor.

A figura 14 apresenta a quantificação da IL-12. A análise da figura demonstra que não houve diferença significativa quanto à produção desta citocina quando comparamos o grupo tratado com LLLT e o grupo controle sem irradiação.

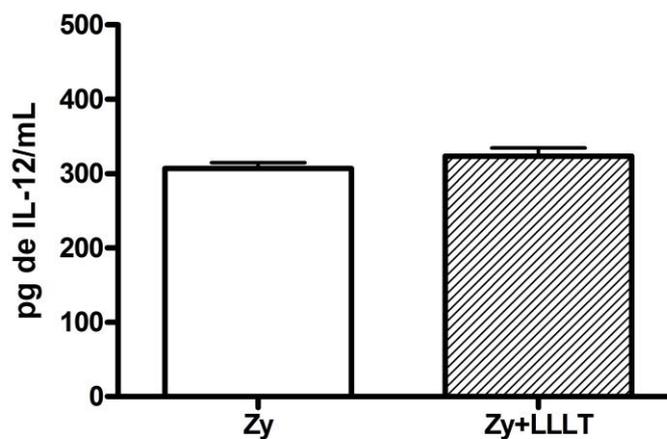


Figura 14- Quantificação de IL-12 produzida por células da “air pouch” subcutânea após estímulo com Zymosan.

Notas: As células foram obtidas de animais que não receberam o tratamento (Zy S/T) ou que receberam irradiação (Zy + LLLT) *in vivo* após estímulo via “air pouch” subcutânea com Zymosan.

Fonte: O autor.

A figura 15 expressa a quantificação da IL-4. Como observado na figura às células obtidas do grupo controle sem irradiação expressaram maior concentração de IL-4 do que as provenientes de animais que foram tratados com LLLT.

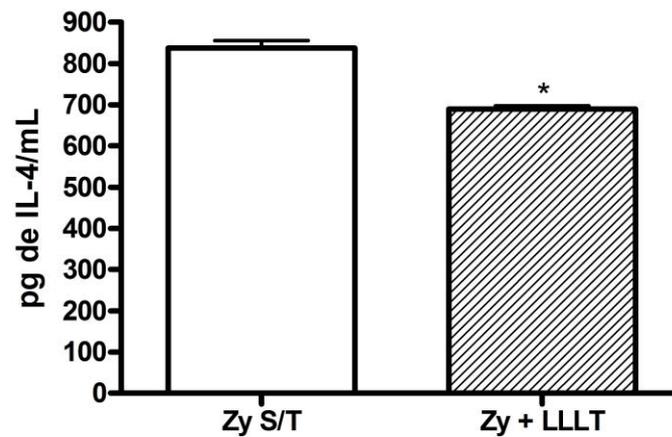


Figura 15- Quantificação de IL-4 produzida por células da “air pouch” subcutânea após estímulo com Zymosan.

Notas: As células foram obtidas de animais que não receberam o tratamento (Zy S/T) ou que receberam irradiação (Zy + LLLT) *in vivo* após estímulo via “air pouch” subcutânea com Zymosan. * $p < 0,05$ - Zy S/T em relação a Zy + LLLT.

Fonte: O autor.

A figura 16 expressa a quantificação da IL-10. O exsudato celular dos animais que receberam tratamento com LLLT se comportou de forma similar ao dos animais mantidos sem irradiação quanto à secreção desta citocina, não havendo diferença significativa entre os grupos.

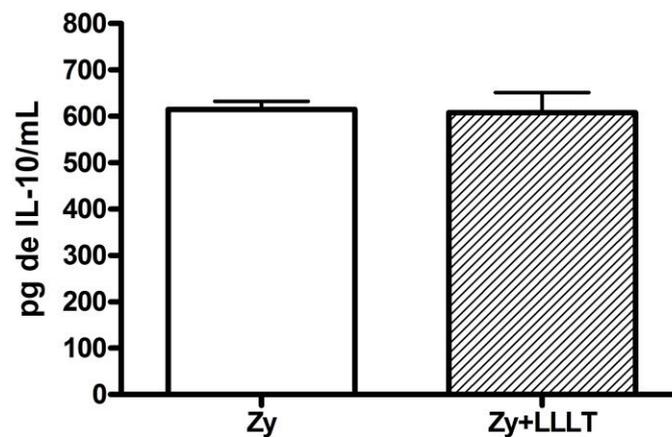


Figura 16- Quantificação de IL-10 produzida por células da “air pouch” subcutânea após estímulo com Zymosan.

Notas: As células foram obtidas de animais que não receberam o tratamento (Zy S/T) ou que receberam irradiação (Zy + LLLT) *in vivo* após estímulo via “air pouch” subcutânea com Zymosan.

Fonte: O autor.

A figura 17 expressa a quantificação da IL-17. O exsudato celular dos animais que receberam tratamento com LLLT se comportou de forma similar ao dos animais mantidos

sem irradiação quanto à secreção desta citocina, não havendo diferença significativa entre os grupos.

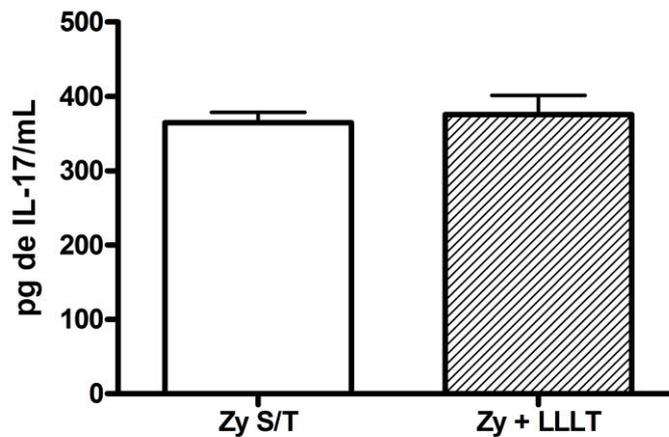


Figura 17- Quantificação de IL-17 produzida por células da “air pouch” subcutânea após estímulo com Zymosan.

Notas: As células foram obtidas de animais que não receberam o tratamento (Zy S/T) ou que receberam irradiação (Zy + LLLT) *in vivo* após estímulo via “air pouch” subcutânea com Zymosan.

Fonte: O autor.

5.2.8 Avaliação do perfil celular encontrado no exsudato obtido da “air pouch” subcutânea após inoculação com Zymosan

A figura 18 apresenta o perfil de migração celular encontrado no exsudato de animais inoculados com Zymosan e que receberam ou não o tratamento com LLLT. Os neutrófilos são o principal tipo celular encontrado na bolsa, independentemente do tratamento com LLLT, seguido pelos linfócitos e depois pelos monócitos. Não se observa nenhuma diferença no perfil de migração quando comparamos os grupos tratados e o controle com relação a qualquer um dos tipos celulares.

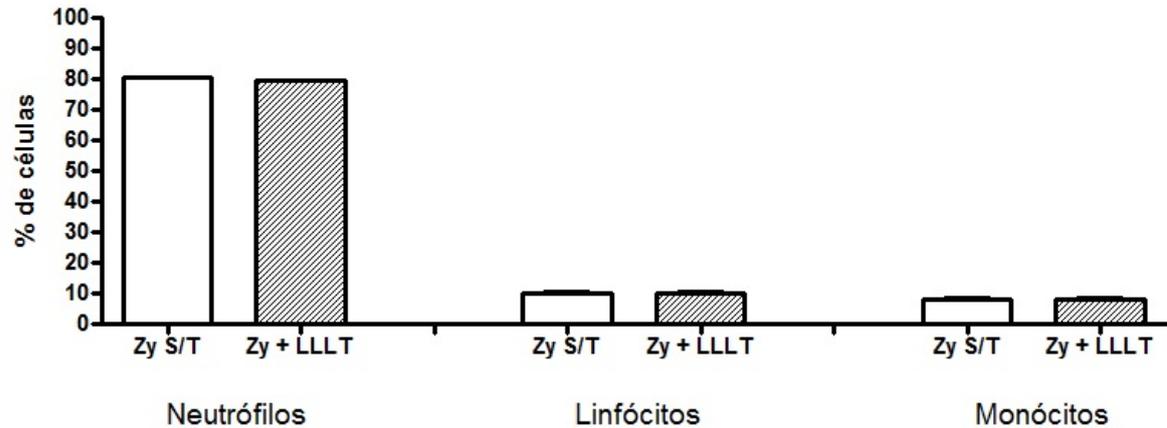


Figura 18- Perfil de migração celular encontrado no exsudato da “air pouch” subcutânea após estímulo com Zymosan.

Notas: As células foram obtidas de animais que não receberam o tratamento (Zy S/T) ou que receberam irradiação (Zy + LLLT) *in vivo* após estímulo via “air pouch” subcutânea com Zymosan.

Fonte: O autor.

5.3 EFEITO DO TRATAMENTO COM LLLT EM PMN OBTIDOS POR ESTÍMULO COM *Paracoccidioides brasiliensis* DE BAIXA VIRULÊNCIA (Pb265)

Serão apresentados a seguir os resultados referentes à infecção com Pb265.

5.3.1 Visualização macroscópica da “air pouch” subcutânea obtida após infecção com Pb265.

As figuras 19 a 21 apresentam aspectos da “air pouch” subcutânea formada a partir da infecção com Pb265. A figura 19 ilustra o aspecto externo da “air pouch” subcutânea de animais que não receberam o tratamento e a figura 20 ilustra o aspecto externo da “air pouch” subcutânea de animais que foram tratados com LLLT. Não se observa nenhuma diferença no aspecto macroscópico externo entre os grupos tratados ou não com a LLLT após infecção com Pb265.

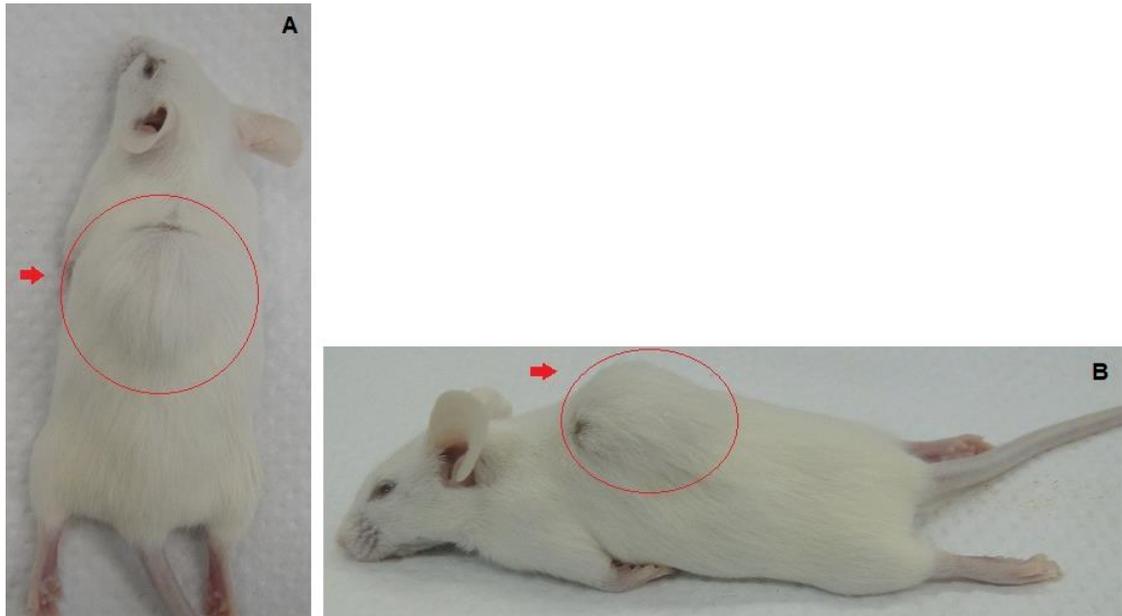


Figura 19- Aspecto de uma “air pouch” subcutânea de camundongo Swiss fêmea que não recebeu tratamento sacrificado após 8 dias de infecção com Pb265 (A) vista superior (B) vista lateral.

Fonte: O autor.

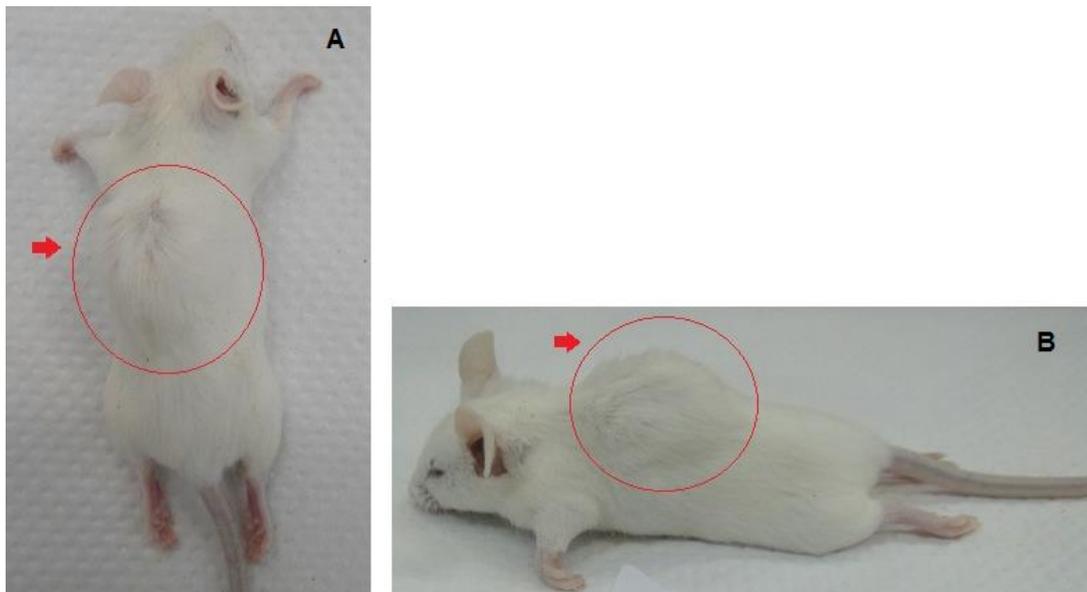


Figura 20- Aspecto de uma “air pouch” subcutânea de camundongo Swiss fêmea que recebeu tratamento com LLLT sacrificado após 8 dias de infecção com Pb265 (A) vista superior (B) vista lateral.

Fonte: O autor.

A figura 19 apresenta o aspecto do exsudato celular obtido após infecção dos animais com Pb265. A análise da figura mostra um aumento do processo inflamatório nos animais que receberam tratamento com LLLT quando comparados aos animais que não sofreram irradiação após infecção com Pb265. O exsudato celular dos animais irradiados se apresenta

com aspecto mais denso, com maior quantidade de exsudato, o que pode refletir em um maior número de células.

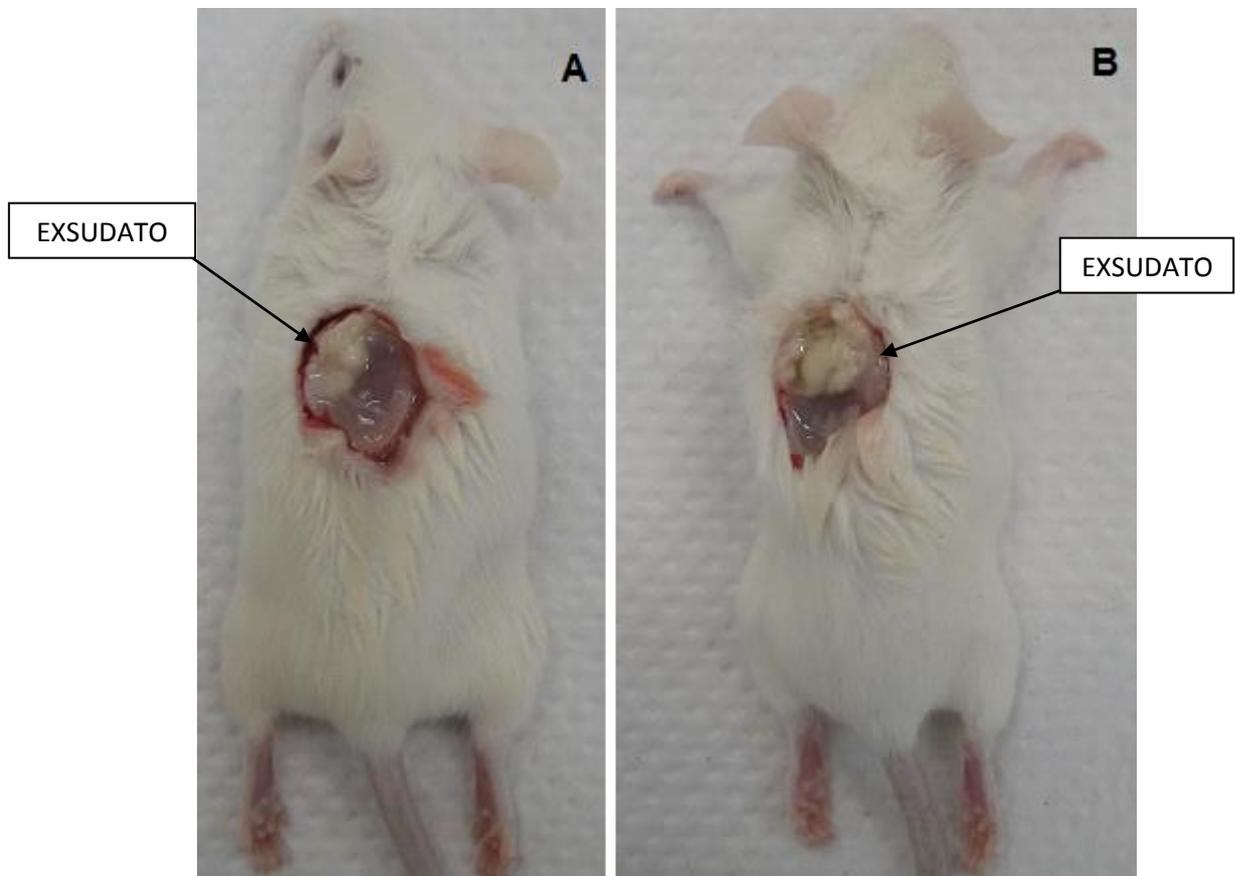


Figura 21- Aspecto de “air pouches” subcutâneas em camundongos Swiss fêmeas após 8 dias de infecção com Pb265 (A) Animal sem tratamento (B) Animal tratado com LLLT. Fonte: O autor.

5.3.2 Número total de neutrófilos obtidos da “air pouch” subcutânea após infecção com Pb265

A figura 22 apresenta o número total de PMN quantificados através da contagem em hemocítômetro de animais que receberam o tratamento com LLLT e o controle sem tratamento. O número absoluto de PMN obtido dos animais que receberam LLLT foi significativamente maior quando comparado aos animais controle sem irradiação, o que confirma o observado quanto ao aspecto do exsudato no grupo de animais irradiados mostrados anteriormente.

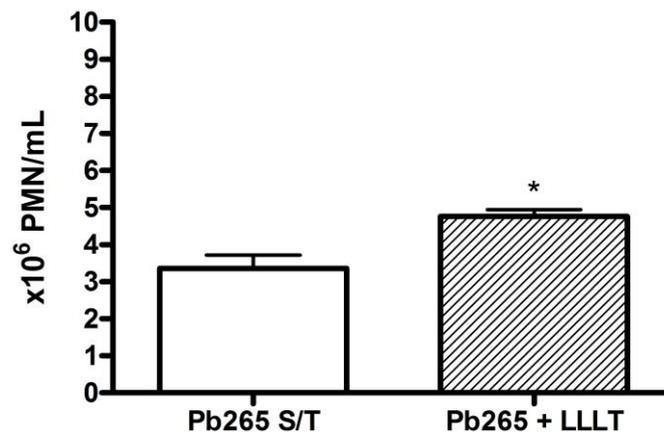


Figura 22- Número absoluto de PMN obtidos de camundongos infectados com Pb265.

Notas: Os PMN foram obtidos de animais que não receberam o tratamento (Pb265 S/T) ou que receberam irradiação (Pb265 + LLLT) *in vivo* após estímulo via “air pouch” subcutânea com Pb265. * $p < 0,05$ – Pb265 S/T em relação à Pb265 + LLLT.

Fonte: O autor.

5.3.3 Viabilidade dos neutrófilos obtidos da “air pouch” subcutânea após infecção com Pb265

A figura 23 apresenta a viabilidade celular expressa em porcentagem de PMN obtidos de animais que receberam ou não o tratamento com LLLT. A viabilidade dos PMN provenientes inoculação com Zymosan foi aproximadamente 70%, e não houve diferença significativa quando comparados o tratamento com LLLT ao controle não irradiado.

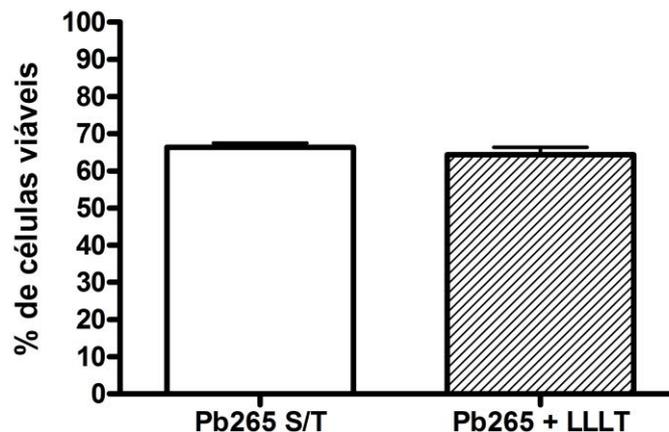


Figura 23- Viabilidade de PMN obtidos de camundongos infectados com Pb265.

Notas: Os PMN foram obtidos de animais que não receberam o tratamento (Pb265 S/T) ou que receberam irradiação (Pb265 + LLLT) *in vivo* após estímulo via “air pouch” subcutânea com Pb265.

Fonte: O autor.

5.3.4 Avaliação da atividade mitocondrial de neutrófilos obtidos da ‘air pouch’ subcutânea após infecção com Pb265

A figura 24 expressa a atividade mitocondrial de PMN obtidos de animais que receberam o tratamento com LLLT e o controle sem tratamento após infecção com Pb265. A análise da figura mostra que PMN obtidos de animais que receberam tratamento com a LLLT apresentam maior atividade mitocondrial quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$).

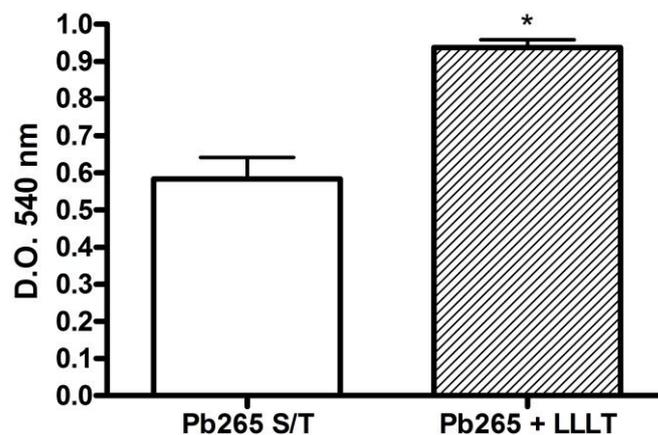


Figura 24- Expressão da atividade mitocondrial de PMN obtidos de camundongos infectados com Pb265 em densidade óptica.

Notas: Os PMN foram obtidos de animais que não receberam o tratamento (Pb265 S/T) ou que receberam irradiação (Pb265 + LLLT) *in vivo* após estímulo via ‘air pouch’ subcutânea com Pb265. * $p < 0,05$ – Pb265 S/T em relação a Pb265 + LLLT.

Fonte: O autor.

5.3.5 Quantificação dos metabólitos do oxigênio emitidos por neutrófilos obtidos da ‘air pouch’ subcutânea após infecção com Pb265

A figura 25 expressa a quantificação dos metabólitos do O_2 emitidos por PMN obtidos de animais que receberam o tratamento com LLLT e o controle sem tratamento após infecção com Pb265. A análise da figura demonstra que os PMN obtidos de animais que receberam tratamento com LLLT se comportaram de forma similar quanto à liberação de ERO quando comparados ao controle, não havendo diferença significativa entre os grupos.

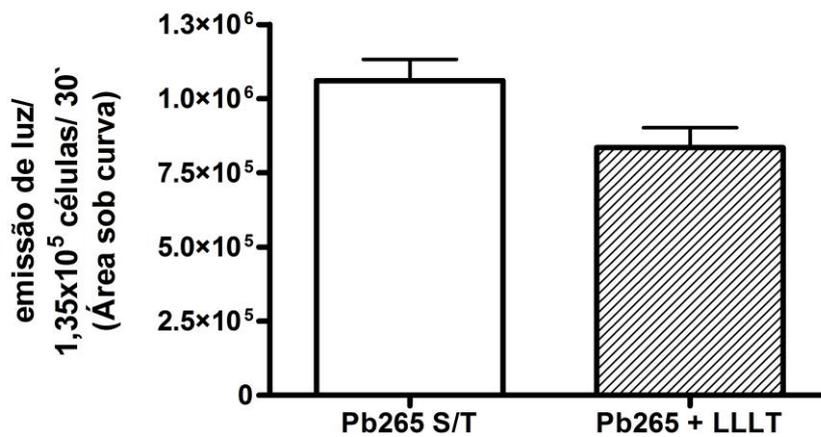


Figura 25- Quantificação dos metabólitos do oxigênio emitidos por PMN obtidos de camundongos infectados com Pb265.

Notas: Os PMN foram obtidos de animais que não receberam o tratamento (Pb265 S/T) ou que receberam irradiação (Pb265 + LLLT) *in vivo* após estímulo via “air pouch” subcutânea com Pb265.

Fonte: O autor.

5.3.6 Avaliação do conteúdo de proteínas de neutrófilos obtidos da “air pouch” subcutânea após infecção com Pb265

A figura 26 avalia o conteúdo de proteínas de PMN obtidos de animais que receberam o tratamento com LLLT e o controle sem tratamento após infecção com Pb265. Observando a figura nota-se que os PMN obtidos de animais que receberam o tratamento com LLLT produzem uma quantidade significativamente menor de proteínas quando comparados ao controle sem tratamento.

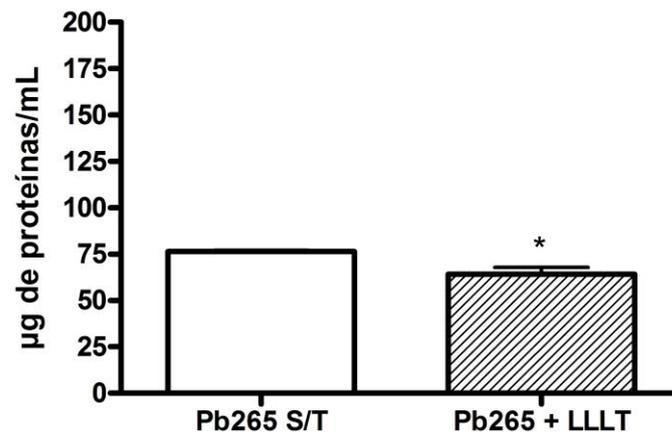


Figura 26- Conteúdo de proteínas de PMN obtidos de camundongos infectados com Pb265.

Notas: Os PMN foram obtidos de animais que não receberam o tratamento (Pb265 S/T) ou que receberam irradiação (Pb265 + LLLT) *in vivo* após estímulo via “air pouch” subcutânea com Pb265. * $p < 0,05$ – Pb265 S/T em relação a Pb265 + LLLT.

Fonte: O autor.

5.3.7 Avaliação da produção de citocinas pelo exsudato obtido da “air pouch” subcutânea após infecção com Pb265

As figuras 27 a 32 expressam as concentrações de citocinas produzidas por células obtidas da “air pouch” subcutânea de animais tratados ou não com LLLT após infecção com Pb265.

A figura 27 apresenta a quantificação do GM-CSF. Ao observar a figura nota-se que não houve diferença na secreção de GM-CSF quando comparado o tratamento com LLLT e o controle sem irradiação.

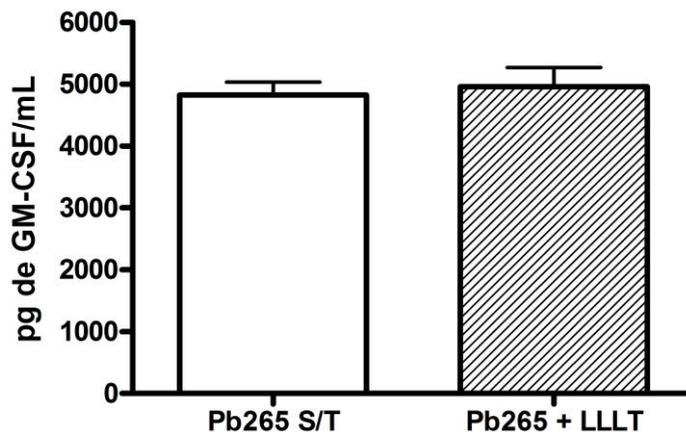


Figura 27- Quantificação de GM-CSF produzido por células da “air pouch” subcutânea após estímulo com Pb265.

Notas: As células foram obtidas de animais que não receberam o tratamento (Pb265 S/T) ou que receberam irradiação (Pb265 + LLLT) *in vivo* após estímulo via “air pouch” subcutânea com Pb265.

Fonte: O autor.

A figura 28 apresenta a quantificação do IFN- γ . O exsudato celular dos animais que receberam tratamento com LLLT se comportou de forma similar ao dos animais mantidos sem irradiação quanto à secreção desta citocina, não havendo diferença significativa entre os grupos.

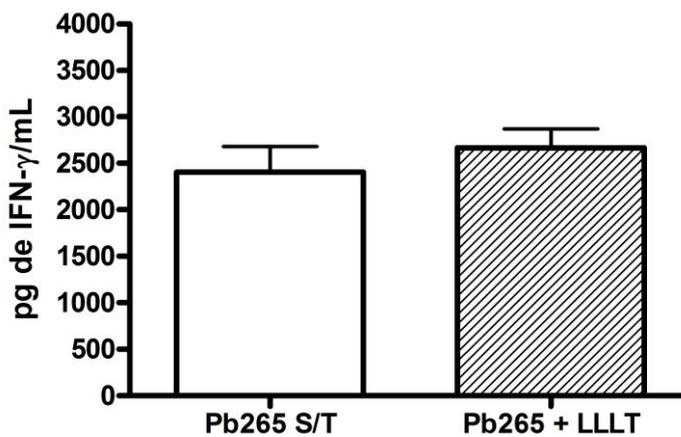


Figura 28- Quantificação de IFN- γ produzido por células da “air pouch” subcutânea após estímulo com Pb265.

Notas: As células foram obtidas de animais que não receberam o tratamento (Pb265 S/T) ou que receberam irradiação (Pb265 + LLLT) *in vivo* após estímulo via “air pouch” subcutânea com Pb265.

Fonte: O autor.

A figura 29 apresenta a quantificação da IL-12. A figura mostra que não houve

diferença significativa quanto à produção desta citocina quando comparamos o grupo tratado com LLLT e o grupo controle sem irradiação.

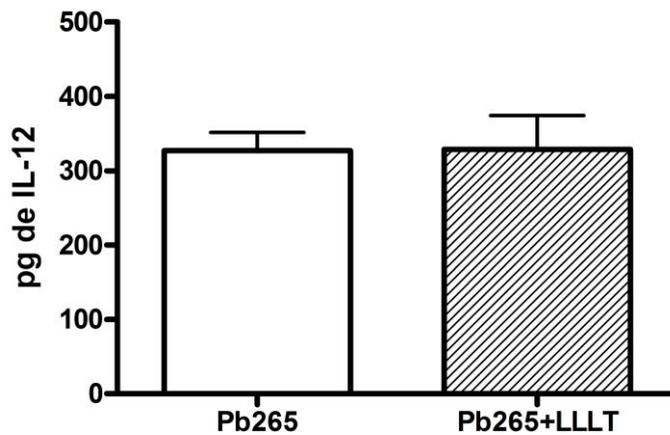


Figura 29- Quantificação de IL-12 produzida por células da “air pouch” subcutânea após estímulo com Pb265.

Notas: As células foram obtidas de animais que não receberam o tratamento (Pb265 S/T) ou que receberam irradiação (Pb265 + LLLT) *in vivo* após estímulo via “air pouch” subcutânea com Pb265

Fonte: O autor.

A figura 30 expressa a quantificação da IL-4. Na análise da figura fica evidente que não houve diferença na produção desta citocina, independentemente das células terem sido obtidas de animais que receberam o tratamento com LLLT ou de animais mantidos sem irradiação.

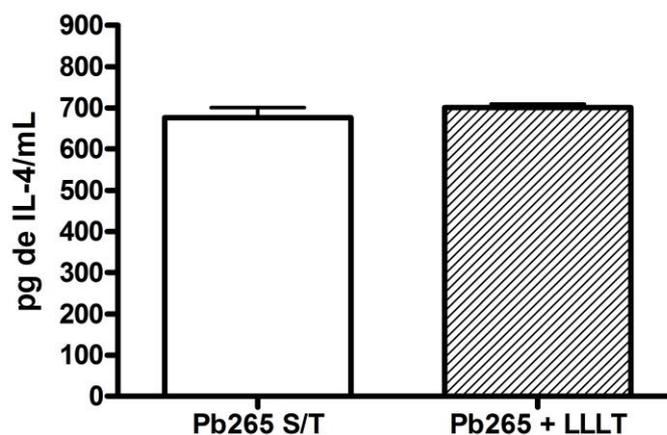


Figura 30- Quantificação de IL-4 produzida por células da “air pouch” subcutânea após estímulo com Pb265.

Notas: As células foram obtidas de animais que não receberam o tratamento (Pb265 S/T) ou que receberam irradiação (Pb265 + LLLT) *in vivo* após estímulo via “air pouch” subcutânea com Pb265.

Fonte: O autor.

A figura 31 expressa a quantificação da IL-10. Não houve diferença significativa quanto à produção desta citocina quando comparamos o grupo tratado com LLLT e o grupo controle sem irradiação.

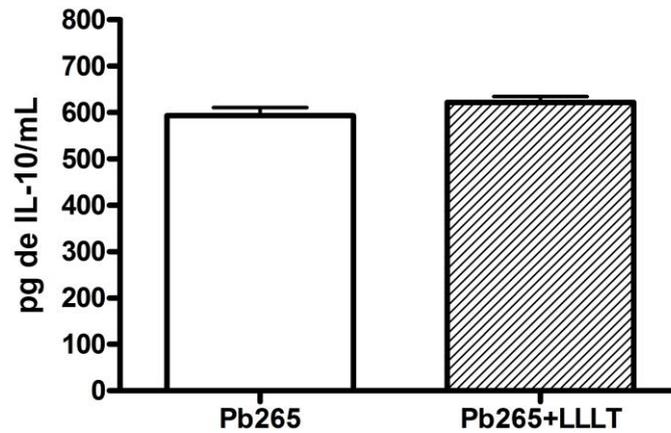


Figura 31- Quantificação de IL-10 produzida por células da “air pouch” subcutânea após estímulo com Pb265.

Notas: As células foram obtidas de animais que não receberam o tratamento (Pb265 S/T) ou que receberam irradiação (Pb265 + LLLT) *in vivo* após estímulo via “air pouch” subcutânea com Pb265.

Fonte: O autor.

A figura 32 expressa a quantificação da IL-17. Não houve diferença significativa quanto à produção desta citocina quando comparamos o grupo tratado com LLLT e o grupo controle sem irradiação.

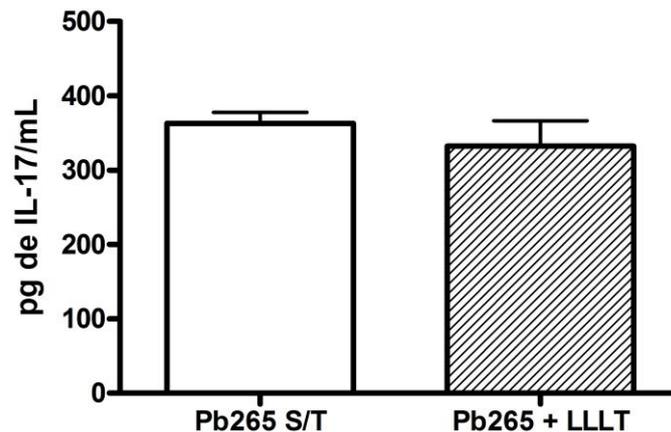


Figura 32- Quantificação de IL-17 produzida por células da “air pouch” subcutânea após estímulo com Pb265.

Notas: As células foram obtidas de animais que não receberam o tratamento (Pb265 S/T) ou que receberam irradiação (Pb265 + LLLT) *in vivo* após estímulo via “air pouch” subcutânea com Pb265.

Fonte: O autor.

5.3.8 Avaliação do perfil celular encontrado no exsudato obtido da “air pouch” subcutânea após infecção com Pb265

A figura 33 apresenta o perfil de migração celular encontrado no exsudato de animais infectados com Pb265 e que receberam ou não o tratamento com LLLT. Os neutrófilos são o principal tipo celular encontrado na bolsa, independentemente do tratamento com LLLT, seguido pelos linfócitos, depois pelos monócitos e por fim pelos basófilos. Com relação aos neutrófilos nota-se que o grupo de animais que recebeu tratamento com LLLT apresentou um maior número desse tipo celular, o que ocorreu inversamente quando observamos a população de linfócitos, monócitos e basófilos, onde o grupo controle apresentou esses tipos celulares em maior número.

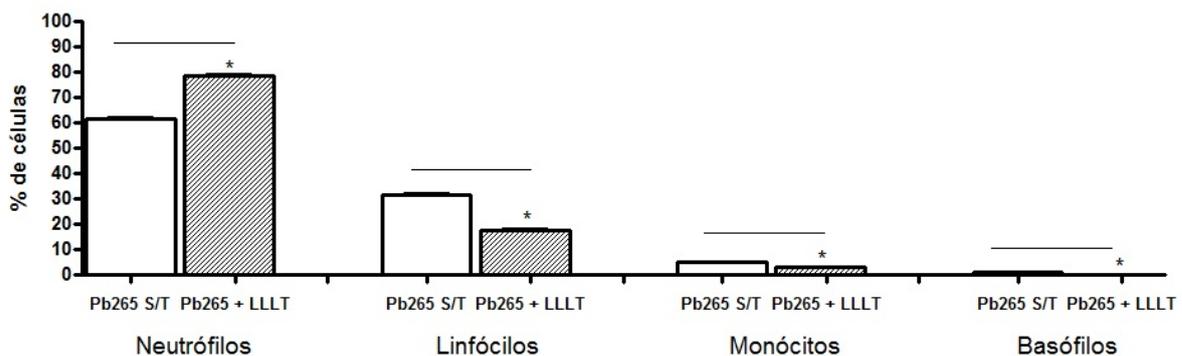


Figura 33- Perfil de migração celular encontrado no exsudato da “air pouch” subcutânea após estímulo com Pb265.

Notas: As células foram obtidas de animais que não receberam o tratamento (Pb265 S/T) ou que receberam irradiação (Pb265 + LLLT) *in vivo* após estímulo via “air pouch” subcutânea com Zymosan. . * $p < 0,05$ – Pb265 S/T em relação a Pb265 + LLLT.

Fonte: O autor.

5.4 EFEITO DO TRATAMENTO COM LLLT EM PMN OBTIDOS POR ESTÍMULO COM *Paracoccidioides brasiliensis* DE ALTA VIRULÊNCIA (Pb18)

Serão apresentados a seguir os resultados referentes à infecção com Pb18.

5.4.1 Visualização macroscópica da “air pouch” subcutânea obtida após infecção com Pb18.

As figuras 34 a 36 apresentam aspectos da “air pouch” subcutânea formada a partir da infecção com Pb18. A figura 34 ilustra o aspecto externo da “air pouch” subcutânea após de

animais que não receberam o tratamento e a figura 35 ilustra o aspecto externo da “air pouch” subcutânea de animais que foram tratados com LLLT. Não se observa nenhuma diferença no aspecto macroscópico externo entre os grupos tratados ou não com a LLLT após infecção com Pb18.

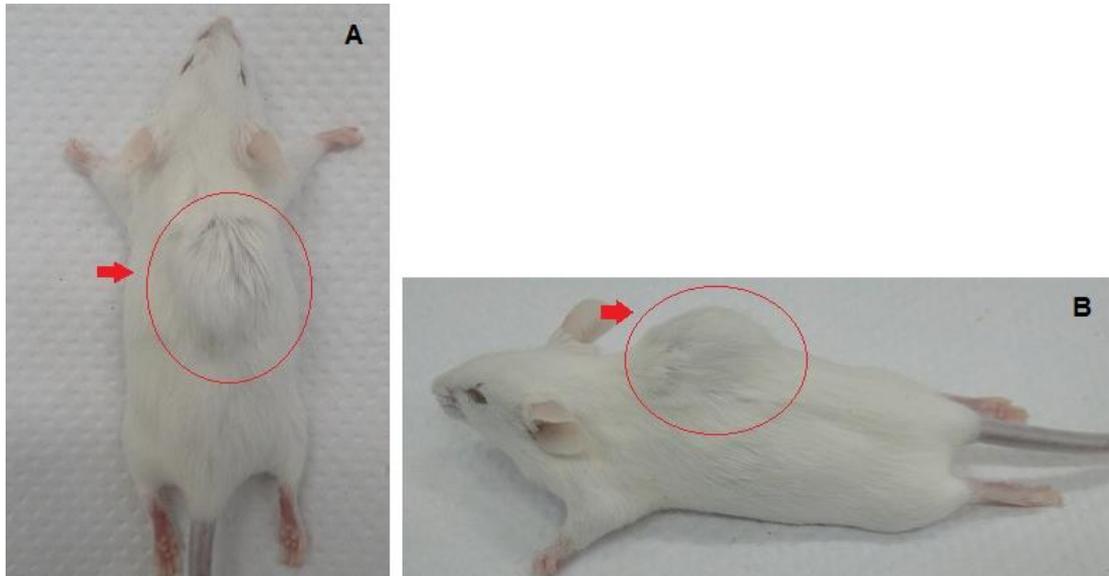


Figura 34- Aspecto de uma “air pouch” subcutânea de camundongo Swiss fêmea que não recebeu tratamento sacrificado após 8 dias de infecção com Pb18 (A) vista superior (B) vista lateral.

Fonte: O autor.

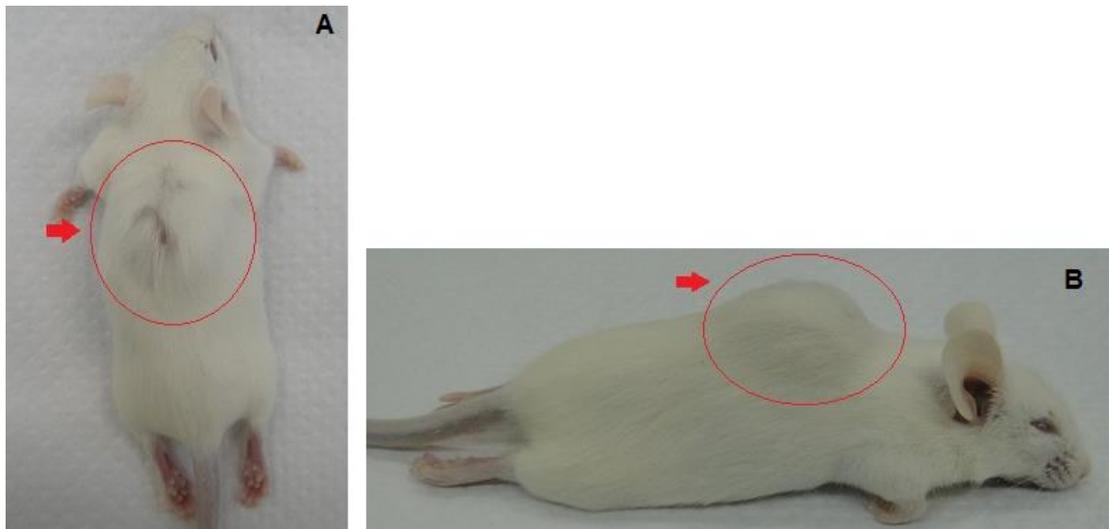


Figura 35- Aspecto de uma “air pouch” subcutânea de camundongo Swiss fêmea que recebeu tratamento com LLLT sacrificado após 8 dias de infecção com Pb18 (A) vista superior (B) vista lateral.

Fonte: O autor.

A figura 36 apresenta o aspecto do exsudato celular obtido após infecção dos animais com Pb18. A análise da figura mostra uma diminuição do processo inflamatório nos animais

que receberam tratamento com LLLT quando comparados aos animais que não sofreram irradiação após infecção com Pb18. O exsudato celular dos animais irradiados se apresenta com aspecto menos denso, com menor quantidade de exsudato, o que pode refletir em um menor número de células.



Figura 36- Aspecto de “air pouches” subcutâneas em camundongos Swiss fêmeas após 8 dias de infecção com Pb18 (A) Animal sem tratamento (B) Animal tratado com LLLT.

Fonte: O autor

5.4.2 Número total de neutrófilos obtidos da “air pouch” subcutânea após infecção com Pb18

A figura 37 apresenta o número total de PMN quantificados através da contagem em hemocítmetro de animais que receberam o tratamento com LLLT e o controle sem tratamento. Observando a figura fica evidente que o tratamento com LLLT diminuiu significativamente o número de células no local do inóculo, confirmando o observado no aspecto do exsudato no grupo de animais irradiados mostrados anteriormente.

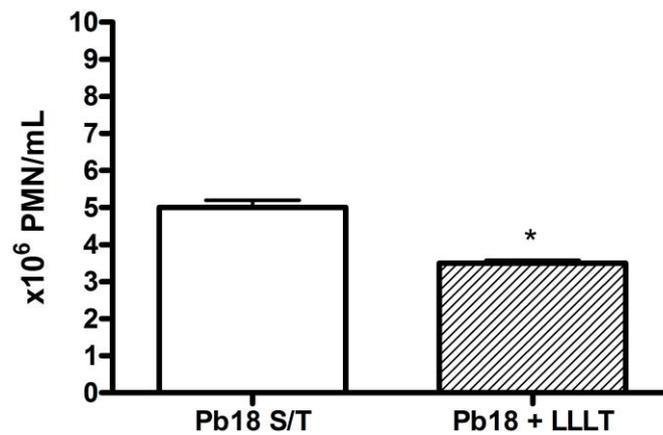


Figura 37- Número absoluto de PMN obtidos de camundongos infectados com Pb18.

Notas: Os PMN foram obtidos de animais que não receberam o tratamento (Pb18 S/T) ou que receberam irradiação (Pb18 + LLLT) *in vivo* após estímulo via “air pouch” subcutânea com Pb18. * $p < 0,05$ – Pb18 S/T em relação a Pb18 + LLLT.

Fonte: O autor.

5.4.3 Viabilidade dos neutrófilos obtidos da “air pouch” subcutânea após infecção com Pb18

A figura 38 apresenta a viabilidade celular expressa em porcentagem de PMN obtidos de animais que receberam ou não o tratamento com LLLT após infecção com Pb18. A análise da figura demonstra que ambos os grupos se comportam de maneira similar quanto a esse parâmetro, não havendo diferença significativa entre eles.

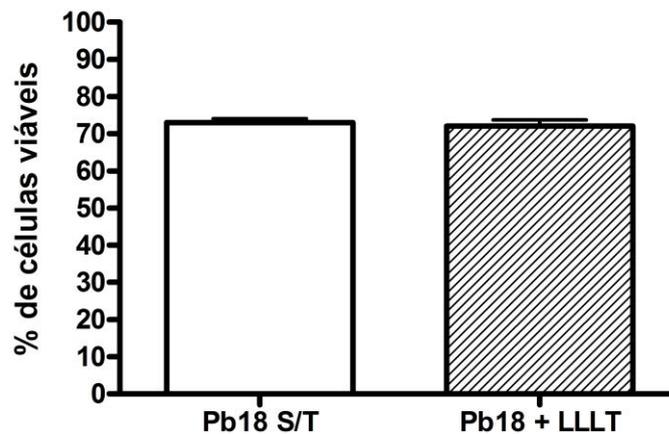


Figura 38- Viabilidade de PMN obtidos de camundongos infecção com Pb18.

Notas: Os PMN foram obtidos de animais que não receberam o tratamento (Pb18 S/T) ou que receberam irradiação (Pb18 + LLLT) *in vivo* após estímulo via “air pouch” subcutânea com Pb18.

Fonte: O autor.

5.4.4 Avaliação da atividade mitocondrial de neutrófilos obtidos da “air pouch” subcutânea após infecção com Pb18

A figura 39 apresenta a atividade mitocondrial de PMN obtidos de animais que receberam ou não o tratamento com LLLT após infecção com Pb18. A figura demonstra que os PMN obtidos de animais que receberam o tratamento com LLLT possuem atividade mitocondrial significativamente maior ($p < 0,05$) do que os PMN coletados de animais que não receberam tratamento.

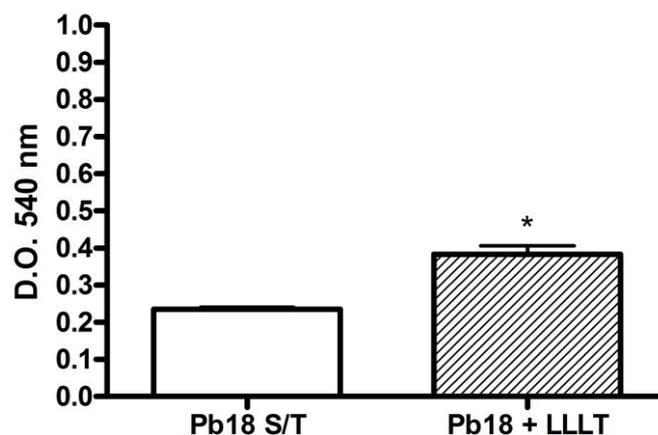


Figura 39- Expressão da atividade mitocondrial de PMN obtidos de camundongos infectados com Pb18 em densidade óptica.

Notas: Os PMN foram obtidos de animais que não receberam o tratamento (Pb18 S/T) ou que receberam irradiação (Expressão da atividade mitocondrial de PMN obtidos de camundongos infectados com Pb18 em densidade óptica. Pb18 + LLLT) *in vivo* após estímulo via “air pouch” subcutânea com Pb18. * $p < 0,05$ – Pb18 S/T em relação a Pb18 + LLLT.

Fonte: O autor.

5.4.5 Quantificação dos metabólitos do oxigênio emitidos por neutrófilos obtidos da “air pouch” subcutânea após infecção com Pb18

A figura 40 apresenta a quantificação dos metabólitos do O_2 emitidos por PMN obtidos de animais que receberam o tratamento com LLLT e o controle sem tratamento após infecção com Pb18. Analisando figura é possível observar que os PMN obtidos de animais que receberam tratamento com LLLT liberam significativamente maior quantidade de ERO quando comparados ao controle não irradiado.

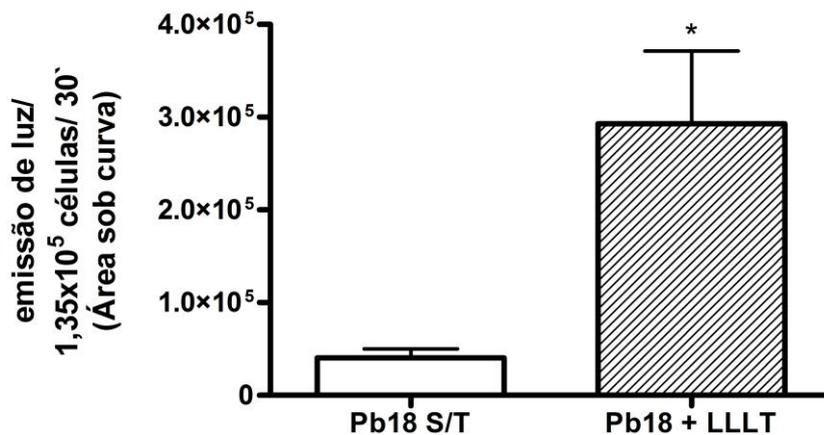


Figura 40- Quantificação dos metabólitos do oxigênio emitidos por PMN obtidos de camundongos infectados com Pb18.

Notas: Os PMN foram obtidos de animais que não receberam o tratamento (Pb18 S/T) ou que receberam irradiação (Pb18 + LLLT) *in vivo* após estímulo via “air pouch” subcutânea com Pb18. * $p < 0,05$ – Pb18 S/T em relação a Pb18 + LLLT.

Fonte: O autor.

5.4.6 Avaliação do conteúdo de proteínas de neutrófilos obtidos da “air pouch” subcutânea após infecção com Pb18

A figura 41 avalia o conteúdo de proteínas de PMN obtidos de animais que receberam ou não o tratamento com LLLT após infecção com Pb18. Observando a figura nota-se que os PMN obtidos de animais que receberam o tratamento com LLLT produzem significativamente maior quantidade de proteínas quando comparados ao controle sem tratamento ($p < 0,05$).

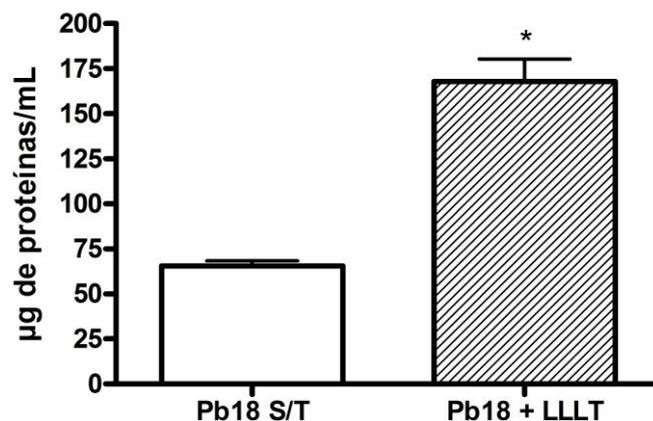


Figura 41- Conteúdo de proteínas de PMN obtidos de camundongos infectados com Pb18.

Notas: Os PMN foram obtidos de animais que não receberam o tratamento (Pb18 S/T) ou que receberam irradiação (Pb18 + LLLT) *in vivo* após estímulo via “air pouch” subcutânea com Pb18. * $p < 0,05$ – Pb18 S/T em relação a Pb18 + LLLT.

Fonte: O autor.

5.4.7 Avaliação da produção de citocinas pelo exsudato obtido da “air pouch” subcutânea após infecção com Pb18

As figuras 42 a 47 expressam as concentrações de citocinas produzidas por células obtidas da “air pouch” subcutânea de animais tratados ou não com LLLT após infecção com Pb18.

A figura 42 apresenta a quantificação do GM-CSF. Analisando a figura podemos observar os animais que receberam o tratamento com LLLT se comportaram de forma similar aos animais controle não irradiados.

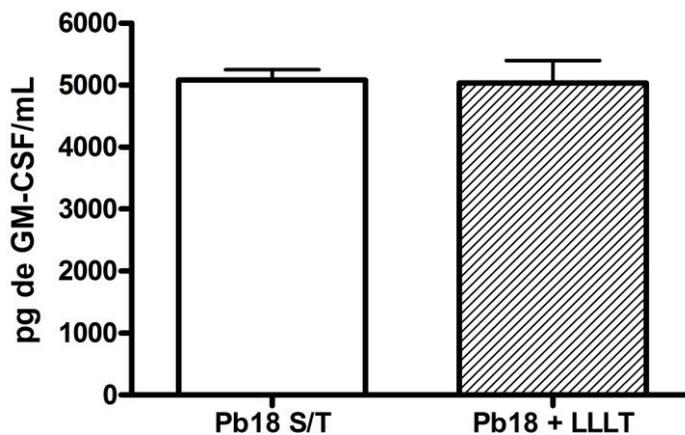


Figura 42- Quantificação de GM-CSF produzido por células da “air pouch” subcutânea após estímulo com Pb18.

Notas: As células foram obtidas de animais que não receberam o tratamento (Pb18 S/T) ou que receberam irradiação (Pb18 + LLLT) *in vivo* após estímulo via “air pouch” subcutânea com Pb18.

Fonte: O autor.

A figura 43 apresenta a quantificação do IFN- γ . Ao observar a figura nota-se que não houve diferença na secreção desta citocina quando comparado o tratamento com LLLT e o controle sem irradiação.

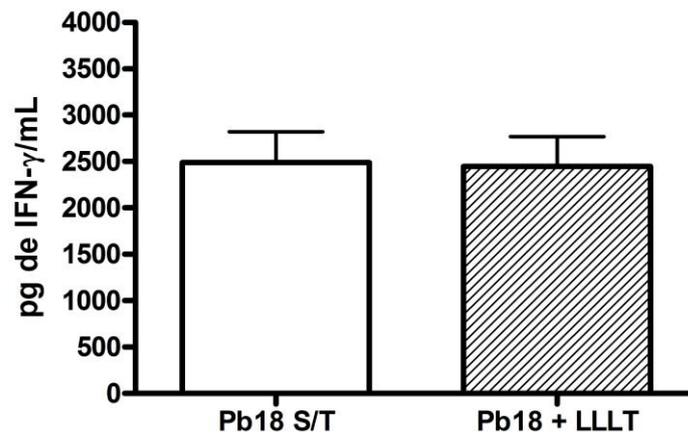


Figura 43- Quantificação de IFN- γ produzido por células da “air pouch” subcutânea após estímulo com Pb18.

Notas: As células foram obtidas de animais que não receberam o tratamento (Pb18 S/T) ou que receberam irradiação (Pb18 + LLLT) *in vivo* após estímulo via “air pouch” subcutânea com Pb18.

Fonte: O autor.

A figura 44 apresenta a quantificação da IL-12. O exsudato celular dos animais que receberam tratamento com LLLT se comportou de forma similar ao dos animais mantidos sem irradiação quanto à secreção desta citocina, não havendo diferença significativa entre os grupos.

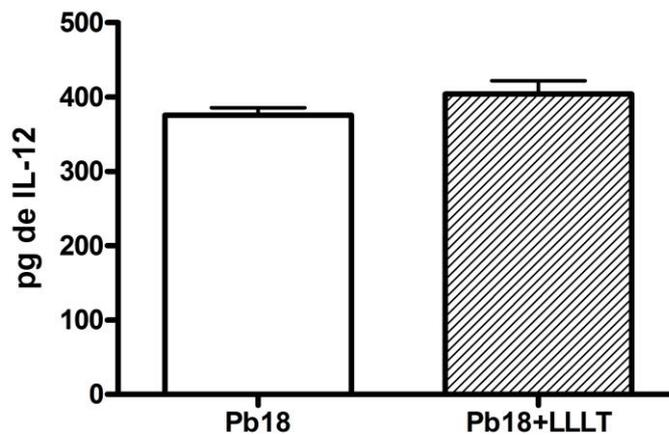


Figura 44- Quantificação de IL-12 produzida por células da “air pouch” subcutânea após estímulo com Pb18.

Notas: As células foram obtidas de animais que não receberam o tratamento (Pb18 S/T) ou que receberam irradiação (Pb18 + LLLT) *in vivo* após estímulo via “air pouch” subcutânea com Pb18.

Fonte: O autor.

A figura 45 expressa a quantificação da IL-4. Observando a figura nota-se que não houve diferença na produção desta citocina, independentemente das células terem sido obtidas de animais que receberam o tratamento com LLLT ou de animais mantidos sem irradiação.

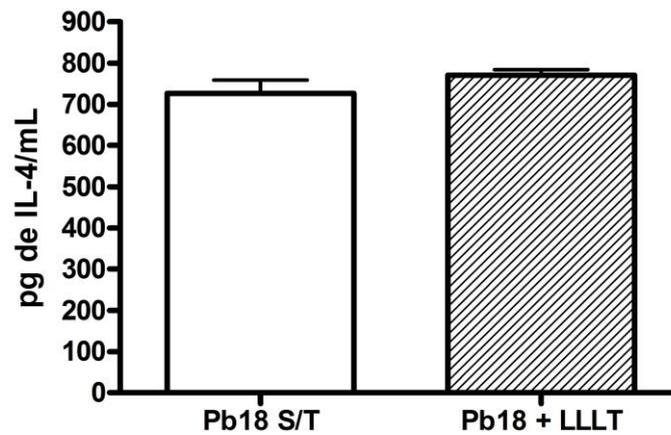


Figura 45- Quantificação de IL-4 produzida por células da “air pouch” subcutânea após estímulo com Pb18.

Notas: As células foram obtidas de animais que não receberam o tratamento (Pb18 S/T) ou que receberam irradiação (Pb18 + LLLT) *in vivo* após estímulo via “air pouch” subcutânea com Pb18.

Fonte: O autor.

A figura 46 expressa a quantificação da IL-10. A análise da figura demonstra que a LLLT diminuiu significativamente a expressão desta citocina pelas células obtidas dos animais que receberam o tratamento quando comparado ao grupo controle não irradiado.

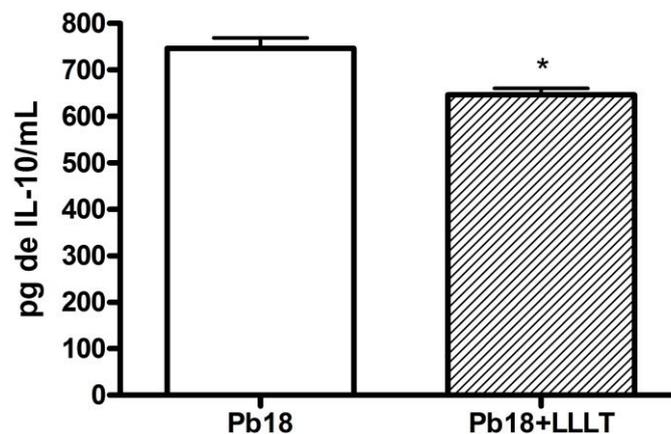


Figura 46- Expressão de IL-10 por células da “air pouch” subcutânea após estímulo com Pb18.

Notas: As células foram obtidas de animais que não receberam o tratamento (Pb18 S/T) ou que receberam irradiação (Pb18 + LLLT) *in vivo* após estímulo via “air pouch” subcutânea com Pb18.

Fonte: O autor.

A figura 47 expressa a quantificação da IL-17. Não houve diferença significativa quanto à produção desta citocina quando comparamos o grupo tratado com LLLT e o grupo controle sem irradiação.

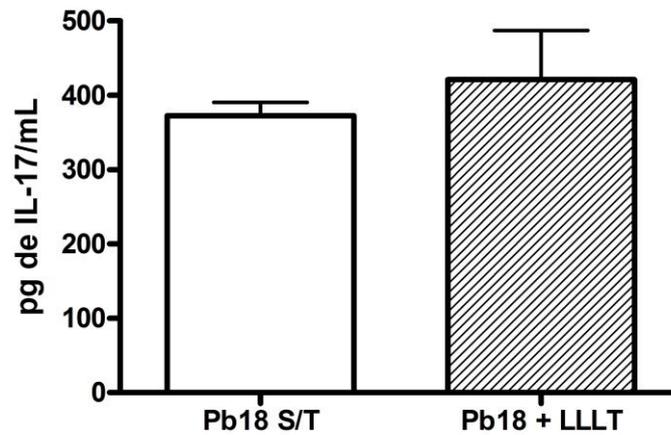


Figura 47- Expressão de IL-17 por células da “air pouch” subcutânea após estímulo com Pb18.

Notas: As células foram obtidas de animais que não receberam o tratamento (Pb18 S/T) ou que receberam irradiação (Pb18 + LLLT) *in vivo* após estímulo via “air pouch” subcutânea com Pb18.

Fonte: O autor.

5.4.8 Avaliação do perfil celular encontrado no exsudato obtido da “air pouch” subcutânea após infecção com Pb18

A figura 48 apresenta o perfil de migração celular encontrado no exsudato de animais infectados com Pb18 e que receberam ou não o tratamento com LLLT. Os neutrófilos são o principal tipo celular encontrado na bolsa, independentemente do tratamento com LLLT, seguido pelos linfócitos, depois pelos monócitos e por fim pelos eosinófilos. Com relação aos neutrófilos nota-se que o grupo de animais que recebeu tratamento com LLLT apresentou um menor número desse tipo celular, o que ocorreu inversamente quando observamos a população de linfócitos e eosinófilos, onde o grupo controle apresentou esses tipos celulares em menor número. Não houve diferença quanto a migração de monócitos, independentemente do tratamento com LLLT.

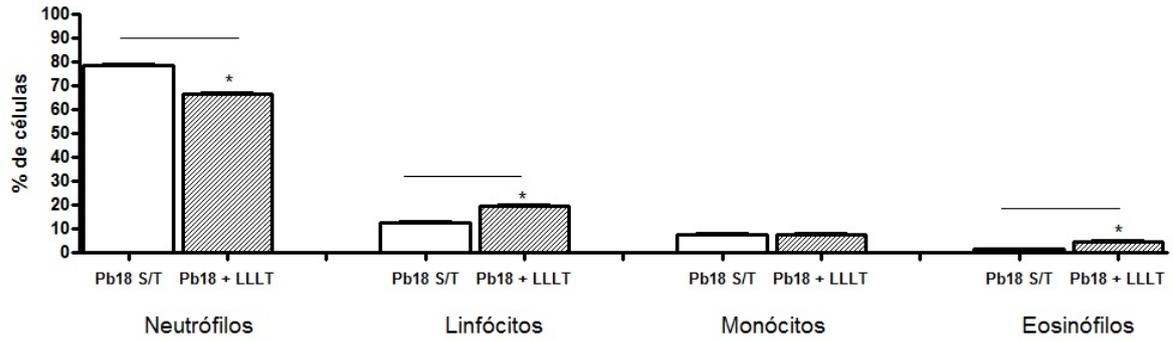


Figura 48- Perfil de migração celular encontrado no exsudato da “air pouch” subcutânea após estímulo com Pb18.

Notas: As células foram obtidas de animais que não receberam o tratamento (Pb18 S/T) ou que receberam irradiação (Pb18 + LLLT) *in vivo* após estímulo via “air pouch” subcutânea com Zymosan. . * $p < 0,05$ – Pb18 S/T em relação a Pb18 + LLLT.

Fonte: O autor.

6 DISCUSSÃO

Os PMN são considerados importantes células do sistema imune e contribuem para respostas do hospedeiro contra infecções fúngicas, entre outras, especialmente nos estágios iniciais da PCM (ACORCI-VALERIO et al., 2010).

A laserterapia de baixa potencia é frequentemente utilizada para reduzir uma resposta inflamatória (GUPTA et al., 2013). Estudos utilizando diversos modelos de inflamação aguda apresentam uma diminuição na formação de edema e um declínio na migração de PMN após tratamento com LLLT (OLIVEIRA et al., 2014; DE LIMA et al., 2011).

No presente trabalho, ao se observar o aspecto de uma “air pouch” subcutânea obtida após inoculação do animal com salina nota-se que não ocorreu nenhum processo inflamatório nesse local. Esse dado nos sugere que não é o método “air pouch” que induz a migração de células para o local da infecção, independentemente da irradiação a LASER de baixa potência, sugerindo que também não é o LASER que estimula a migração, uma vez que o grupo mantido sem tratamento com LLLT também não apresentou células no local onde o estímulo foi injetado, o que respalda a informação apresentada com relação à inoculação de salina não ser suficiente para atrair células para o local do inóculo.

Com relação ao aspecto interno do exsudato celular e a contagem do número absoluto de PMN em animais inoculados com Zymosan ou infectados com Pb265 sugere-se que a LLLT possui um efeito ativador na migração de PMN para o local do inóculo. Por sua vez, para a infecção com Pb18, o tratamento levou a uma diminuição do número de PMN. O perfil de migração celular apresentado nesse trabalho foi semelhante ao mostrado por Burger et al. (2015), onde a terapia atua estimulando a migração celular quando o estímulo é um agente não infeccioso (Zymosan), e diminuindo quando se usou uma cepa virulenta do fungo (Pb18). O que pode explicar a diferença na migração celular ter ocorrido de forma distinta para os grupos é a composição química de cada um dos estímulos. O Zymosan consiste de uma mistura de componentes intracelulares e da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, onde as beta-glucanas existentes em sua composição provocam respostas inflamatórias com produção de ERO e citocinas, e estão envolvidas em processos de fagocitose por PMN e macrófagos (VETVICKA, 2014). São reconhecidas por receptores TLR-2 e dectina-1, levando a uma produção de IL-10 (BONFIM; MAMONI; BLOTTA, 2009). Por sua vez, o Pb, em sua fase leveduriforme, possui como os principais componentes da parede celular as alfa-1,3-glucanas (KANETSUNA, 1972). Glucanas são reconhecidas

pelos receptores de lectina tipo- C e de dectina-1, e também pelo receptor do complemento CR3 e lactosilceramida (VETVICKA, 2014).

A diminuição na migração celular quando se utilizou o tratamento com LLLT nos animais infectados com Pb18 pode estar relacionada à presença da glicoproteína gp43, principal antígeno do Pb, relacionada a mecanismos de escape apresentado pelo fungo. Em modelo experimental, quando se utilizou um inibidor de gp43 in vitro foi observado um aumento significativo na produção de TNF- α e redução na recuperação de leveduras quando o Pb foi exposto a macrófagos estimulados com IFN- γ , sugerindo redução da ligação ou aumento da morte dos fungos (TORRES et al., 2013). A utilização de células dendríticas transfectadas com um plasmídeo que codifica uma proteína semelhante a gp43 conferiu proteção a camundongos BALB/c, e induziu a produção de IgG específica contra gp43 e citocinas IFN- γ , IL-12 e IL-4 (JANNUZZI et al., 2015). Esse fator de virulência, juntamente com a molécula 14-3-3, além de participarem da adesão do fungo, também contribuem para outros mecanismos celulares importantes como a apoptose de pneumócitos humanos (SILVA et al., 2015). A imunização de camundongos contra a PCM utilizando *S. cerevisiae* expressando gp43 mostrou um perfil protetor, onde os animais tiveram o parênquima pulmonar preservado e granulomas menores e com menor carga fúngica do que os animais não imunizados. Os níveis das citocinas IL-12 e IFN- γ foi maior nos camundongos imunizados do que nos não vacinados, sugerindo um perfil de resposta Th1 (ASSIS-MARQUES et al., 2015). A gp43 também participa da formação do biofilme do Pb, juntamente com enolase, GAPDH e aspartilproteinases, juntamente com regulação negativa dos genes responsáveis pela formação de fosfolipases (SARDI et al., 2015). O trabalho de Konno et al. (2012) sugere que peptídeos derivados da gp43 são potentes moduladores de respostas inflamatórias locais e sistêmicas em camundongos, e sugerem que o efeito anti-inflamatório é dependente de alterações na produção de citocinas da imunidade inata como TNF- α , IL-6 e IL-10. A sugestão aqui é que a cepa Pb18, considerada mais virulenta, possui o antígeno gp43 em maior quantidade, sendo este responsável por um efeito anti-inflamatório no local do inóculo, e como os PMN dos animais que receberam tratamento com LLLT estimulados por essa cepa tiveram uma maior atividade mitocondrial, maior produção de proteínas e de ERO não foi necessário um recrutamento adicional desse tipo celular, por isso o menor número encontrado no exudato.

Os neutrófilos maduros contém três tipos de grânulos distintos, formados em alguma das fases de maturação. Os grânulos azurófilos ou primários são formados na fase de pró-mielócito, os específicos ou secundários são formados na fase de mielócito e os grânulos

terciários ou de gelatinase 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. Após a internalização de partículas estranhas ao organismo, os grânulos de armazenamento presentes no citoplasma do neutrófilo 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 (PARSLOW et. al., 2004).

O estudo de HU et al. (2007) demonstrou que a terapia com LLLT levou a um aumento na atividade mitocondrial, o que sugere uma maior produção de ATP, que proporciona um aumento da atividade mitótica e da síntese protéica (TAVARES, 2002). Gao e Xing (2009) relacionaram a LLLT com aumento da proliferação celular, que pode ser regulado por ativação ou expressão elevada de proteínas específicas do ciclo celular, que são reguladas por sinalização mitocondrial. Essa terapia pode induzir a síntese e liberação de muitas moléculas como fatores de crescimento, citocinas inflamatórias e outras. Resultados semelhantes foram mostrados por Burger et al. (2015), no qual neutrófilos obtidos após inoculação com Zymosan ou infecção com Pb18, expostos a cepa de alta virulência do *P. brasiliensis*, apresentaram atividade mitocondrial aumentada quando provenientes de animais que receberam tratamento com LLLT. Nesse trabalho a LLLT levou uma maior atividade mitocondrial em todos os grupos tratados quando comparados ao controle não irradiado. Esse resultado está corroborado pela avaliação do conteúdo proteico dessas células provenientes de animais tratados com LLLT após infecção com Pb18, porém essa produção esteve diminuída nos grupos onde o estímulo foi o Zymosan e o Pb265.

Uma apropriada ativação de células fagocíticas e particularmente a produção de ERO pela nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase (NADPH) são importantes para controlar infecções por fungos (ROMANI, 2004). Outros estudos mostraram que os PMN, quando em contato com agentes infecciosos, iniciam o processo de fagocitose, fato que ocorre com 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, o que torna os PMN capazes de eliminar agentes patogênicos. Além do Nox2, existem outras fontes de liberação de ERO, como uma ERO

mitocondrial, capaz de regular a ativação dessas células (BABIOR, 2000). O trabalho de Vorobjeva et al. (2017) demonstrou, utilizando um inibidor de ERO mitocondrial, que esta é necessária para ativar Nox2, bem como exocitose de grânulos primários e secundários de neutrófilos.

Neutrófilos de pacientes com PCM são funcionalmente deficientes contra o Pb e degeneram durante o processo de fagocitose (GOIHMAN-YAHR et al., 1992; GOIHMAN-YAHR et al., 1980; McEWEN et al., 1987; DIAS et al., 2008). A estimulação *in vitro* de neutrófilos de camundongos resistentes ao Pb mostrou que essas células produzem mais ERO do que os camundongos susceptíveis, indicando que durante a infecção os camundongos susceptíveis perdem sua habilidade de produzir oxigênio, importante para impedir a disseminação do fungo (MELONI-BRUNERI et al, 1996). Cabe ressaltar que o próprio fungo possui artificios para escapar dos mecanismos microbicidas das células efetoras, como a produção de catalases que fornecem proteção contra ERO (TAMAYO et al., 2017). O estudo de Cerdeira et al. (2016) mostrou que a LLLT é capaz de estimular o busrt respiratório em neutrófilos humanos, aumentando sua capacidade fungicida contra *C. albicans*. No trabalho de Burger et al. (2015) houve maior produção de ERO pelos PMN obtidos de camundongos Swiss irradiados, independentemente se as células utilizadas para co-cultivo com Pb18 eram provenientes de estímulo com Zymosan ou de infecção pelo mesmo fungo (no caso o co-cultivo foi uma segunda exposição ao Pb18). Nesse trabalho houve maior liberação de ERO por parte dos PMN de animais que receberam tratamento após inoculação com Zymosan ou infecção com Pb18. Por sua vez, na infecção com Pb265, não houve diferença significativa quanto a essa produção.

As funções fungicidas de neutrófilos requerem ativação por citocinas do sistema imune (ACORCI-VALERIO et al., 2010). IFN- γ , TNF- α , GM-CSF and IL-15 são alguns exemplos de fatores que podem ativar neutrófilos humanos e aumentar sua habilidade fungicida por um mecanismo dependente da produção de ERO, H₂O₂ e de ânion superóxido (RODRIGUES et al., 2007; TAVIAN et al., 2008). Em neutrófilos maduros, GM-CSF regula positivamente a expressão da integrina CD11b, que aumenta a adesão celular e entrada no tecido, e também funções antimicrobianas, como fagocitose e produção de ERO (SAKAGAMI et al., 2009; UCHIDA et al., 2007). O estudo de Nascimento et al. (2011) revelou que a presença de GM-CSF modula positivamente a geração de células gigantes multinucleadas, presentes em inflamação granulomatosa característica, e estimulam a atividade fungicida contra Pb18, principalmente em combinação com IFN- γ . Já quando IL-10 ou TGF- β foi adicionado as culturas houve um efeito supressivo na geração dessas células.

Na PCM as formas clínicas estão associadas a uma deficiência de desenvolvimento de resposta efetiva Th1, caracterizada por incapacidade de formação de granulomas densos. Há, nesses casos, possibilidade de desvio para outros padrões de respostas imunológicas, como a Th2, que resulta ser ineficiente para conter a propagação da infecção (PAGLIARI; SOTTO, 2003). Pacientes com a doença em atividade apresentam depressão da resposta imune celular, caracterizada por diminuição da síntese de citocinas de padrão Th1 como IL-2, IFN- γ e IL-12, e aumento dos níveis de IL-4, IL-5 e IL-10, que corresponde à resposta de padrão Th2 não protetora ao hospedeiro (BENARD et al., 2001). Indivíduos que apresentam infecção paracoccidiodomicótica produzem níveis mais elevados de IFN- γ , TNF- α e IL-2 quando comparados com pacientes que desenvolveram as formas adulta ou juvenil da doença (MAMONI; BLOTTA, 2006). Em um modelo experimental, Loures et al. (2009) demonstraram que após infecção intratraqueal com Pb, os camundongos competentes em TLR4 produziram elevados níveis de IL-12 e TNF- α , além de citocinas do padrão Th17, indicando um papel pró-inflamatório para a sinalização do TLR4. Já os camundongos com depleção do TLR4 apresentaram diminuição dos níveis de NO pulmonar, citocinas pró-inflamatórias e anticorpos.

Neutrófilos humanos expostos ao Pb18 produzem IFN- γ , provavelmente por ligação a receptores TLR4 e dectina-1 expressos por essas células, e os níveis de expressão dessa citocina aumentaram quando os PMN foram previamente estimulados com IL-12, IL-15 e IL-18 (RODRIGUES et al., 2014). Neutrófilos humanos expostos ao Pb produzem IL-12, IL-10, PGE2 e LTB4 envolvendo o receptor de manose, dectina-1 e TLR2 (SOARES et al., 2014).

O trabalho de Soares et al., (2014) demonstrou que a produção de IL-12 por PMN humanos ocorre principalmente em resposta ao Pb265, com participação de TLR2 e dectina-1. Essas células também produzem IL-10 com níveis maiores quando o estímulo foi o Pb18, com envolvimento de TLR2 e receptor de manose, e somente TLR2 para o Pb265. Em camundongos com deficiência aguda no pulmão foi demonstrado que a LLLT tem efeitos benéficos, diminuindo a atividade da MPO e permeabilidade vascular, reduzindo a hemorragia alveolar e o edema, e diminuindo o infiltrado neutrofílico. Foi notada uma regulação negativa da IL-8 e positiva da IL-10 nesses animais, sugerindo que os efeitos benéficos do laser na deficiência aguda são dependentes da secreção de IL-10, uma vez que na ausência dessa citocina o laser possui um efeito reverso (CARVALHO et al., 2017).

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 (KORN et al, 2009). O trabalho de Nagib et al. (2010) mostrou que a irradiação a LASER de baixa potência hélio e neônio diminui a expressão de interleucina pró-inflamatória IL-17, TNF- α e interleucina anti-inflamatória IL-10 em lesões paracoccidiodomicóticas expostas a essa irradiação, promovendo a eliminação do fungo e favorecendo o desenvolvimento do perfil Th1 (THOMPSON-SNIPES et al., 1991).

Nesse trabalho, o tratamento dos animais com LLLT não provocou alteração na secreção das citocinas que estimulam e são produzidas por PMN e que favorecem o perfil Th1, IL-12 e IFN- γ , independentemente da virulência da cepa. Também não houve alteração na produção de IL-17 e a produção de GM-CSF só foi significativamente menor quando o estímulo para obtenção das células foi o Zymosan no grupo tratado com LLLT. Quanto à secreção de citocinas inibitórias para as funções dos PMN, houve diminuição significativa da produção de IL-10 pelas as células obtidas após a infecção com Pb18 no grupo tratado com LLLT quando comparado ao controle não tratado, sugerindo que essa terapia module o processo inflamatório. A produção de IL-4 foi significativamente menor quando o estímulo para obtenção das células foi o Zymosan no grupo tratado com LLLT.

A migração celular, independentemente de o estímulo ter sido o Zymosan ou o Pb, apresentou como principal tipo de célula os neutrófilos, seguidos dos linfócitos e monócitos. Os outros tipos celulares que migraram para o local do inóculo nos experimentos desse trabalho (basófilos e eosinófilos) provavelmente foram devido a um escape do vaso sanguíneo, não sendo necessárias para a resolução do processo inflamatório/infeccioso. Como já visto, os neutrófilos formam a primeira linha de defesa contra microorganismos, incluindo fungos e bactérias.

Os PMN têm um papel fundamental no controle da multiplicação de bactérias patogênicas como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella tiphymurium*, *Yersinia enterocolitica* (CONLAN, 1977), fungos como *Candida albicans* e o *P. brasiliensis* (FULURIJA et al.,

1966; MELONI-BRUNERI et al., 1996). O trabalho de Chairatana e Nolan (2017) mostrou a importância da α -defensina 6, encontrada nos grânulos dos neutrófilos, que bloqueiam a invasão bacteriana em células gastrointestinais do hospedeiro e suprimem traços de virulência do microrganismo oportunisto *C. albicans*. Neutrófilos guiados por C5a migram até o local onde se encontram as células leveduriforme de *C. neoformans*, e na presença desse fragmento do sistema complemento há um aumento da expressão de CD11b, essencial para a fagocitose, resultando em morte dos microrganismos (SUN et al., 2015). A IL-17 produzida por PMN faz parte de uma resposta imune protetora durante a infecção pulmonar por *C. neoformans*, impedindo a disseminação do fungo para o cérebro em camundongos (WOZNIAK et al., 2011).

Nesse trabalho percebemos que dependendo da cepa utilizada houveram diferenças em certos parâmetros da resposta imune e o tratamento com LLLT induziu um caráter ativador, estimulando os PMN presentes no exsudato, principalmente após estímulo com a cepa virulenta Pb18, favorecendo assim um potencial fungicida por parte das mesmas. Ferreira et al. (2006) reforçaram essa ideia sugerindo que camundongos infectados com Pb nas patas e tratados com irradiação a LASER de baixa potência neste local tiveram redução do edema de pata, granuloma confluyente, cicatrização mais rápida das feridas e nenhuma forma de Pb detectada no local, enquanto que o grupo controle apresentou múltiplos fungos viáveis no local da infecção.

7 CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que o tratamento com laserterapia de baixa potência (LLLT) confere um potencial fungicida aos neutrófilos (PMN) e uma maior resolução da infecção causada pela cepa virulenta Pb18, corroborado pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), do metabolismo celular (atividade mitocondrial), da produção de proteínas e diminuição da secreção da citocina inibitória IL-10.

REFERÊNCIAS

- Acorci MJ, et al. Inhibition of human neutrophil apoptosis by *Paracoccidioides brasiliensis*: role of interleukin-8. **Scand J Immunol.**, Oxford, v. 69, p. 73-79. 2009
- Acorci-Valerio MJ, et al. Role of TLR2 and TLR4 in human neutrophil functions against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Scand J Immunol.**, Oxford, v.71,p. 99–108. 2010
- Acosta-Rodriguez EV, et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. **Nat Immunol.**, London, v. 8, p. 639-646. 2007
- Ariizumo K, et al. Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 275, n. 26, p. 20157-20167. 2000
- Assis-Marques MA, et al. *Saccharomyces cerevisiae* expressing Gp43 protects mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **PloS one**, San Francisco, v.10, n.3, p.e0120201. 2015
- Babior BM. The respiratory burst of phagocytes. **J Clin Invest.**, Atlantic City, v. 73, n. 3, p. 599-601. 1984
- Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. **American Journal of Medicine**, New York, v. 109, p. 33-44. 2000
- Berliner MD, Reca ME. Vital staining of *Histoplasma capsulatum* with Janus Green B. **Sabouraudia.**, Oxford, v. 5, p. 25-29. 1966
- Benard G, et al. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human *Paracoccidioidomycosis*. **Cytokine**, Amsterdã, v. 13, p. 248-252. 2001
- Bicalho RN, et al. Oral paracoccidioidomycosis: A retrospective study of 62 Brazilian patients. **Oral Dis.**, México City, v. 7, p. 56-60. 2001
- Biagioni LMV, Orsi S, Chama LG, Sadatsune T, Franco M. Imunoglobulinas e C₃ no granuloma paracoccidiódico. **Rev Ist Med Trop.**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 97-103. 1987

Bisinelli JC, Ferreira MLS. Doenças infecciosas: paracoccidioidomicose (blastomicose sul-americana). In: Tommasi AF. **Diagnóstico em patologia bucal.**, Rio de Janeiro, v. 3, p. 202-209. 2002

Bjordal JM, 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.**, Switzerland, v. 19, p. 1069–1077. 2011

Bonfim CV, Mamoni RL, Souza MH, Blotta L. TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol.**, Oxford, v. 47, n. 7, p. 722-733. 2009

Braverman B, et al. Effect of helium-neon and infrared laser irradiation on wound healing in rabbits. **Lasers Surg Med.**, Wausau, v.9, n.1, p.50-58. 1989

Brown GD, Gordon S. A new receptor for β -glucans. **Nature**, London, v. 413, p. 36-37. 2001

Calich VL, Vaz CA, Burger E. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Res Immunol.**, Amsterdã, v. 149, p. 407–417, 499–500. 1998

Carvalho JL, et al. Beneficial effect of low-level laser therapy in acute lung injury after iI/R is dependent on the secretion of IL-10 and independent of the TLR/MyD88 signaling. **Lasers in Medical Science**, Berlim, p.1-11. 2016

Cerdeira CD, et al. Low-level laser therapy stimulates the oxidative burst in human neutrophils and increases their fungicidal capacity. **Journal of biophotonics**, Weinheim, v.9, n.11-12, p.1180-1188. 2016

Burger E, et al. Low-level laser therapy to the mouse femur enhances the fungicidal response of neutrophils against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Plos Negl Trop Dis.**, San Francisco, v. 9, n. 2, p. 35-41. 2015

Calich VLG, et al. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Br J Exp Pathol.**, Oxford, v. 66, n. 5, p. 585-594. 1985

Calich VLG, Kashino SS. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **J Med Biol Res.**, São Paulo, v. 31, p. 615-623. 1998

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

Calich VLG, 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.**, Amsterdã, v. 12, p. 20-30. 1979

Calvi SA, et al. Effect of cytokines on the *in vitro* fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. **Microbes Infect.**, Oxford, v. 5, p. 107-113. 2003

Cano LE, et al. Pulmonary Paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. **Infect Immun.**, Rockville, v. 63, p. 1777-1778. 1995

Carati CJ, et al. Treatment of postmastectomy lymphedema with low-level laser therapy: a double blind, placebo-controlled trial. **Cancer.**, London, v. 98, p. 1114-1122. 2003

Castano AP, et al. Low-level laser therapy for Zymosan-induced arthritis in rats: Importance of illumination time. **Lasers Surg Med.**, Wausau, v. 39, p. 543-550. 2007

Conlan JW. Critical roles of neutrophils in host defense against experimental infections of mice by *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Yersinia enterocolitica*. **Infect. Immun.**, Washington, v. 65, p. 630-635. 1977

Correa F, et al. Low-level laser therapy (GaAs lambda0 904 nm) reduces inflammatory cell migration in mice with lipopolysaccharide-induced peritonitis. **Photomed Laser Surg.**, New York, v. 25, p. 245-249. 2007

da Silva JF., et al. Paracoccidioides brasiliensis 30 kDa Adhesin: identification as a 14-3-3 Protein, Cloning and Subcellular Localization in Infection Models. **PLoS ONE**, San Francisco, v.8, n.4, e62533. 2013

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

Dias MF, et al. Human neutrophils susceptibility to *Paracoccidioides brasiliensis*: an ultrastructural and cytochemical assay. **Med Mycol.**, Oxford, v. 46, p. 241-249. 2008

Doherty NS, et al. Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E2. **Prostaglandins.**, Rockville, v. 30, n. 5, p. 769-789. 1985

Fava Netto C. Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na blastomicose sul-americana, com antígeno polissacarídico. **Arq Cir Clin Exp S Paulo.**, São Paulo, v. 18, p. 1997-2254. 1955

Ferreira MC, et al. Effects of HeNe laser irradiation on experimental paracoccidioidomycotic lesions. **J Photoche Photobio B: Biology.**, Amsterdã, v. 84, p. 141-149. 2006

Franco MF, et al. London, Bailliere's Clinical Tropical medicine and Communicable Disease. **Paracoccidioidomycosis**, London, p. 18-196. 1989

Fulurija A, Ashman RB, Papadimitriou JM. Neutrophil depletion increases susceptibility to systemic and vaginal candidiasis in mice, and reveals differences between brain and kidney in mechanisms of host resistance. **Microbiology**, Seattle, v. 142, p. 3487–3496. 1966

Gavish L, et al. Low level laser irradiation stimulates mitochondrial membrane potential and disperses subnuclear promyelocytic leukemia protein. **Lasers Surg Med.**, Wausau, v. 35, p. 369-376. 2004

Gao X, Xing D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. **J Biomed Sci.**, Nova Deli, v.16, p.4. 2009

Goihman-Yahr M, et al. Defect of in vitro digestive ability of polymorphonuclear leukocytes in paracoccidioidomycosis. **Infect Immun.**, Washington, v.28, p. 557–566. 1980

Goihman-Yahr M, et al. Relationship between digestive and killing abilities of neutrophils against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycoses**, New York, v. 35, p. 269–274. 1992

Gonzales A, et al. Expression of adhesion molecules in lungs of mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Microbes Infect.**, Amsterdã, v. 7, p. 666-673. 2005

Gonzales A, et al. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *P. brasiliensis* conidia. **Infect Immun.**, Washington, v. 68, n. 5, p. 2546-2552. 2000

Gupta A, et al. Shining light on nanotechnology to help repair and regeneration. **Biotechnol Adv.**, Amsterdã, v.31, p. 607–631. 2013

Henderson LM, Chappell JB. NADH oxidase of neutrophils. **Biochimica et Biophysica Acta.**, Amsterdã, v. 1273, p. 87-107. 1996

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

Jannuzzi GP, et al. scFv from Antibody That Mimics gp43 Modulates the Cellular and Humoral Immune Responses during Experimental Paracoccidioidomycosis. **PLoS one.**, San Francisco, v.10, n.6, p.e0129401. 2015

Jovanovic DV, et al. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines. IL-1- β and TNF- α by human macrophages. **J Immunol.**, Rockville, v. 160, p. 3513-3521. 1998

Kanetsuna F, et al. Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Bacteriol.**, Washington, v.97, p.1036-1041. 1969

Kashino SS, et al. Resistence to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN- γ production. **J Interferon Cytokine Res.**, New York, v. 20, p. 89-97. 2000

Kaviani A, et al. Low-level laser therapy in management of postmastectomy lymphedema. **Lasers Med Sci.**, Berlim, v. 21, p. 90–94. 2006

Kerr IB, Araripe PCO, Lenz HL. Paracoccidioidomycosis in experimentally-infected rats. **Rev Inst Med Trop São Paulo.**, São Paulo, v. 30, p. 336-350. 1988

Konno, FTC et al. *Paracoccidioides brasiliensis* GP43-derived peptides are potent modulators of local and systemic inflammatory response. **Microbes and infection.**, Amsterdã, v.14, n.6, p.517-527. 2012

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

Lau RWL, Cheing GLY. Managing postmastectomy lymphedema with low-level laser therapy. **Photomed Laser Surg.**, New York, v. 27, p. 763–769. 2009

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.**, Rockville, v. 278, p. 40917-40922. 2003

Lilic D. New perspectives on the immunology of chronic muco-cutaneous candidiasis. **Curr Opin Infect Dis.**, Rockville, v. 15, p. 143-147. 2002

Loures FV, et al. TLR2 is a negative regulator of Th17 cells and tissue pathology in a pulmonary model of fungal infection. **J Immunol.**, Rockville, v. 183, p. 1279-1290. 2009

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

Mamoni RL, Blotta MH. Flow-cytometric analysis of cytokine production in human paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, Amsterdã, v. 35, p. 207–216. 2006

Marques SA, et al. Paracoccidioidomicose: Frequência, morfologia e patogênese de lesões tegumentares. **An Bras Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 82, p. 411-417. 2007

Martinez R. Blastomicose sul-americana (Paracoccidioidomicose). Etioepidemiologia e ecologia. In: Veronesi R, Focaccia R, editors. **Tratado de Infectologia**, Rio de Janeiro, p. 1081-1083. 1997

Martinez R. Paracoccidioidomicose. In: Sidrim JJC, Rocha MFG. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**, São Paulo, p. 204-221. 2004

McEwen JG, et al. Effect of murine polymorphonuclear leukocytes on the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Am J Trop Med Hyg.**, Oakbrook Terrace, v. 36, p. 603–608. 1987

McInturff JE, Modlin RL, Kim J. The role of toll-like receptors in the pathogenesis and treatment of dermatological disease. **J Invest Dermatol.**, London, v. 125, p. 1-8. 2005

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

Meloni-Bruneri LH, et al. Neutrophil oxidative metabolism and killing of *P. brasiliensis* after

air pouch infection of susceptible and resistance mice. **J Leuk Biol.**, Rockville, v. 59, n. 4, p. 526-533. 1996

Mendes-Giannini MJ, Moraes RA, Ricci TA. Proteolytic activity of the 43,000 molecular weight antigen secreted by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.**, São Paulo, v. 32, p. 384-385. 1990

Mendes RP, Negroni R, Arechavala A. Treatment and control of cure. **Paracoccidioidomycosis.**, London, p. 373-91. 1994

Meneguzzo DT, et al. Prevention and treatment of mice paw edema by near-infrared low-level laser therapy on lymph nodes. **Lasers Med Sci.**, Berlim, v. 28, p. 973-980. 2013

Mester E. The use of laser beam in therapy. **Orv Hetil.**, Rockville, v. 107, p. 1012-1016. 1996

Moraes-Vasconcelos D, et al. *Paracoccidioides brasiliensis* disseminated disease in a patient with inherited deficiency in the beta1 subunit of the interleukin (IL)-12/IL-23 receptor. **Clin Infect Dis.**, Oxford, v. 41, p. 31-37. 2005

Mota NG, et al. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, Oxford, v. 79, p. 765-772. 1985

Musatti CC, et al. *In vivo* and *in vitro* evaluation of cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. **Cel Immunol.**, Amsterdã, v. 24, n. 2, p. 365-368. 1976

Nagib PRA, et al. Effect of HeNe irradiation on extracellular matrix of deposition and expression of cytokines and chemokines in paracoccidioidomycotic lesions. **Photochem Photobiol.**, New York, v. 86, p. 920-924. 2010

Nascimento, MPP et al. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor enhances the modulatory effect of cytokines on monocyte-derived multinucleated giant cell formation and fungicidal activity against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.106, n.6, p.735-741. 2011

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

Nikes M, Otto M. Towards an optimized MTT assay. **J Immunol Methods**, Amsterdã, v. 130, p. 149–151. 1990

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

Oren DA, et al. Stimulation of reactive oxygen species production by an antidepressant visible light source. **Biol Psychiatry**, Amsterdã, v. 49, p. 464-477. 2001

Pagliari C, et al. Characterization of cytotoxic immune response in skin and mucosal lesions of paracoccidioidomycosis. **J Cutan Pathol**, New York, v. 37, p. 565-570. 2010

Pagliari C, Sotto MN. Dendritic cells and pattern of cytokines in paracoccidioidomycosis skin lesions. **Am J Dermatopathol**, San Francisco, v. 25, p. 107-112. 2003

Pallotta RC, et al. Infrared (810-nm) low-level laser therapy on rat experimental knee inflammation. **Lasers Med Sci**, Berlim, v. 7, n. 1, p. 71-78. 2012

Park H, et al. A distinct lineage of CD4T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nat Immunol**, London, v. 6, p. 1133-1141. 2005

Parslow, T.G.; Terr, A.I.; Stites, D.; Imboden, J.B. *Imunologia Médica*; Décima edição. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2004

Peracoli MT, et al. Natural killer cell activity in experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, São Paulo, v. 37, p. 129-136. 1995

Pino-Tamayo PA, et al. Depletion of Neutrophils Exacerbates the Early Inflammatory Immune Response in Lungs of Mice Infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mediators of Inflammation**, San Francisco, v.2016. 2016

Puccia R, et al. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. **Infect Immun**, Washington, v. 53, p. 199-206. 1986

Puerta-Arias JD, et al. Depletion of Neutrophils Promotes the Resolution of Pulmonary Inflammation and Fibrosis in Mice Infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **PloS one**, San Francisco, v.11, n.9, p. e0163985. 2016

Pina A, et al. Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of hosts. **J Leukoc Biol.**, San Francisco, v. 79, p. 1202-1213. 2006

Ramos ESM, Saraiva Ldo E. Paracoccidioidomycosis. **Dermatol Clin.**, Amsterdã, v. 26, p. 257-269. 2008

Reid DM, 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**, San Francisco, v. 76, n. 1, p. 86–94. 2004

Restrepo AM, et al. Estrogens inhibit mycelium to yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of female paracoccidioidomycosis. **Infect Immun.**, Washington, v. 46, p. 346-53. 1984

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

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

Rodrigues DR, et al. Interferon-gamma production by human neutrophils upon stimulation by IL-12, IL-15 and IL-18 and challenge with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Cytokine**, Amsterdã, v.69, n.1, p.102-109. 2014

Romani L. Immunity to fungal infections. **Nat Rev Immunol.**, London, v. 4, p. 1–23. 2004

Sakagami, T et al. Human GM-CSF autoantibodies and reproduction of pulmonary alveolar proteinosis. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v.361, n.27, p.2679-2681. 2009

Sandoval MBT, Sotto MN, de Brito T. Antigen distribution in mucocutaneous biopsies of human paracoccidioidomycosis. **Int J Surg Pathol.**, Rockville, v. 3, p. 181–188. 1996

Sardi JCO, et al. In vitro *Paracoccidioides brasiliensis* biofilm and gene expression of adhesins and hydrolytic enzymes. **Virulence**, Boca Raton, v.6, n.6, p.642-651. 2015

Chairatana, P; Nolan, EM. Human α -Defensin 6: A Small Peptide That Self-Assembles and Protects the Host by **Entangling Microbes**, Cambridge. 2017

Shikanai-Yasuda MA, et al. Consenso em Paracoccidioidomicose. **Rev Soc Bras Med Trop.**, São Paulo, v. 39, p. 297-310. 2006

Singer-Vermes LM, et al. Evaluation of pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. **J Med Vet Mycology.**, Oxford, v. 27, n. 2, p. 71-82. 1989

Silva JF, et al. Influence of the *Paracoccidioides brasiliensis* 14-3-3 and gp43 proteins on the induction of apoptosis in A549 epithelial cells. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.110, n.4, p.476-484. 2015

Smith PK, et al. Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. **Anal Biochem.**, London, v. 150, p. 76-86. 1985

Soares AM, et al. Modulatory effect of prostaglandins on human monocyte activation for killing of high- and low-virulence strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Immunology**, New Jersey, v. 102, p. 480-485. 2001

Sperandio FF, et al. Resistance to *P. brasiliensis* experimental infection of inbred mice is associated with an efficient neutrophil mobilization and activation by mediators of inflammation. **Mediators of inflammation**, San Francisco v. 2015. 2015

Sun, D et al. Real-time imaging of interactions of neutrophils with *Cryptococcus neoformans* demonstrates a crucial role of complement C5a-C5aR signaling. **Infection and immunity**, Washington, v.84, n.1, p.216-229. 2016

Szabó T, Kadish JL, Czop JK. Biochemical properties of the ligand-binding 20-Kda subunit of the β -glucan receptors on human mononuclear phagocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, San Francisco, v. 270, n. 5, p. 2145-2151. 1995

Tadakuma T. Possible application of the laser in immunobiology. **Keio J Med.**, Tokyo, v. 42, p. 180-182. 1993

Tamayo D, et al. *Paracoccidioides* spp. catalases and their role in antioxidant defense against host defense responses. **Fungal Genetics and Biology**, Amsterdã, v.100, p 22-32. 2017

Tavares MR. Efeito do laser terapêutico na cicatrização tendinosa: estudo experimental em ratos. [dissertação]. Ribeirão Preto(SP):Universidade de São Paulo. 2002

Tavian EG, et al. Interleukin-15 increases *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human neutrophils. **Cytokine**, Amsterdã, v. 41, p. 48-53. 2008

Tavian EG, et al. Interleukin-15 increases *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human neutrophils. **Cytokine**, Amsterdã, v. 41, p.48–53. 2008

Teixeira MM, et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Molecular phylogenetics and evolution**, Amsterdã, v. 52, n. 2, p. 273-283. 2009

Thompson-Snipes L, et al. Interleukin 10: a novel stimulatory factor mast cells and their progenitors. **J Exp Med.**, New York, v. 173, p. 507-510. 1991

Toledo MS, et al. Mannose-binding lectin complemente pathways plays a key role in complemente activation by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mol Ommunol.**, Amsterdã, v. 48, p. 26-36. 2010

Torres I, et al. Inhibition of Pb GP43 Expression May Suggest that gp43 is a Virulence Factor in *Paracoccidioides brasiliensis*. **PloS one**, San Francisco, v.8, n.7, p.e68434. 2013

Uchida, K et al. GM-CSF autoantibodies and neutrophil dysfunction in pulmonary alveolar proteinosis. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v.356, n.6, p.567-579. 2007

Vetvicka VN M. Beta Glucans—Mechanisms of Action. Sharjah, UAE: Bentham **Science Publishers**, New York, 2014

Vieira SAL. Efeito do laser de baixa potência na cicatrização da feridas cutâneas experimentais. [dissertação]. Franca:Universidade de Franca, Franca. 2006

Viviani MA, et al. New approaches to antifungal chemotherapy. **Med Mycol.**, Oxford, v. 36, n. 1, p. 194-206. 1998

Vorobjeva, N et al. Mitochondrial reactive oxygen species are involved in chemoattractant-induced oxidative burst and degranulation of human neutrophils in vitro. **European Journal of Cell Biology**. 2017

Wanke B, Aidé MA. Curso de Atualização. Micoses. Paracoccidioidomicose. **J Bras Pneumol.**, Brasília, v. 35, n. 9, p. 1245-1249. 2009

Wozniak, KL. et al. Role of IL-17A on resolution of pulmonary *C. neoformans* infection. **PLoS One.**, San Francisco, v.6, n.2, p.e17204. 2011

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

Yarzabal LA, et al. Identification and purification of the specific antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* responsible for immunoelectrophoretic band E. **Sabouraudia**, Oxford, v. 15, p. 79-85. 1977