

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL-MG

ANA CAROLINA SILVÉRIO CERQUEIRA MENDES

**EFEITO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA *IN VIVO* NA ATIVAÇÃO DE
NEUTRÓFILOS NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE EXPERIMENTAL MURINA**

Alfenas/MG

2014

ANA CAROLINA SILVÉRIO CERQUEIRA MENDES

**EFEITO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA *IN VIVO* NA ATIVAÇÃO DE
NEUTRÓFILOS NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE EXPERIMENTAL MURINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alfenas para obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde. Área de concentração: Doenças infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Profa. Dra. Eva Burger
Co-orientador: Prof. Dr. Jorge Kleber Chavasco.

Alfenas/MG

2014

Mendes, Ana Carolina Silvério Cerqueira.

Efeitos do laser de baixa potência *in vivo* na ativação de neutrófilos na paracoccidiodomicose experimental murina / Ana Carolina Silvério Cerqueira Mendes, Alfenas, MG - 2014.

84 f. -

Orientadora: Eva Burger.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

Bibliografia.

1. Neutrófilos. 2. Fungicidas. 3. Paracoccidoides brasiliensis. 4. Lasers.
I. Burger, Eva. II. Título.

CDD: 616.9

ANA CAROLINA SILVÉRIO CERQUEIRA MENDES

EFEITO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA EM NEUTRÓFILOS NA
PARACOCCIDIOIDOMICOSE EXPERIMENTAL MURINA

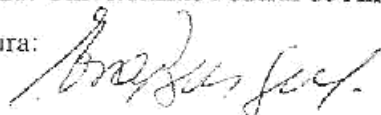
A banca examinadora abaixo assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Doenças infecciosas e parasitárias.

Aprovada em: 05/09/2014

Prof^o: Eva Burger

Instituição: Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG

Assinatura:



Prof^o: Maria Heloisa de Souza Lima Blotta

Instituição: Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

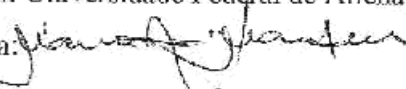
Assinatura:



Prof^o: Marcos José Marques

Instituição: Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG

Assinatura:



Dedico este trabalho a Deus, pelo conforto nos momentos de dificuldade, à minha família pelo apoio e amor incondicional, à memória do meu irmão, aos meus professores por todo conhecimento transmitido e aos meus amigos por fazerem essa jornada mais doce e alegre.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

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

Ao Prof. e amigo Dr. Kléber Chavasco, co-orientador e responsável pela minha Iniciação Científica na Microbiologia, e que muito contribuiu para meu crescimento como pessoa e como profissional.

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

Agradeço aos meus pais e irmã, pelo amparo, auxílio e amor incondicional em todos os momentos da minha vida.

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

À grande amiga Giulia Bani, pela contribuição na execução deste projeto e pela amizade nesses meses de convivência.

Ao Prof. Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias, pelo auxílio no aprendizado das técnicas laboratoriais e ensinamentos para a vida toda.

Ao Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho e ao Prof. Dr. Cosme Malaquias pela disponibilidade quanto à utilização do Laboratório de Vacinas desta Instituição.

À Profa. Máisa Brigagão pela disponibilidade para o uso do Laboratório de Bioquímica desta Instituição, bem como pelo auxílio no aprendizado de técnicas laboratoriais.

Ao professor Dr. Felipe Fornias Sperandio por todos os ensinamentos e auxílios na execução desta tese.

Ao professor Dr. Eric Batista Ferreira pelo auxílio nas análises estatísticas apresentadas neste trabalho.

Antecipo meus agradecimentos por sua participação na minha banca para obtenção do título tão sonhado.

À banca de qualificação pela contribuição que a mim foi dada.

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

Á Déborah Braga Resende, Mauro Ale, Taciana Maria Cortello de Almeida, Joyce Nery e Gêrsika Bitencourt Santos, discentes e ex-discentes desta Universidade, e que contribuíram de muitas maneiras para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Biotério desta Instituição, em especial ao João Francisco Vítório Rodrigues e a Isaura Maria Vitor de Souza, pelo suporte e disponibilidade quanto ao uso das dependências do mesmo.

As companheiras de república e aos amigos de Alfenas pelas risadas e bons momentos.

Ao CNPQ por ter possibilitado e financiado esta pesquisa.

“A imaginação deveria dar asas aos nossos pensamentos, mas nós sempre precisamos de uma prova experimental decisiva, e no momento de refletir, interpretar nossas observações e concluir, a imaginação deve ser verificada e documentada pelos resultados do experimento.”

(LOUIS PASTEUR)

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 Paracoccidioidomicose. O tratamento desta doença inclui o uso de antifúngicos que, além do prolongado tempo de administração, podem ter diversos efeitos colaterais, sendo necessário pesquisa de tratamentos mais eficientes ou adjuvantes. A laserterapia de baixa potência (LLLT) vem sendo utilizada como tratamento adjuvante para muitas enfermidades, e já foi demonstrado seu efeito modulador em células imunes. Neste trabalho avaliamos os efeitos da LLLT ($\lambda = 780$ nm e 50 mW) aplicadas *in vivo* e em dias alternado em dois pontos das patas traseiras de camundongos Swiss inoculados pela via “air pouch” subcutânea com *P. brasiliensis* cepa 18 (Pb18) ou com Zymosan. Grupos de animais que não sofreram irradiação foram utilizados como controle. Após 10 dias da infecção nós obtivemos uma população de PMN altamente pura, que posteriormente foram mantidos em cultura na presença de Pb18 para ensaios de produção de proteínas, avaliação da atividade mitocondrial, produção de metabólitos do oxigênio e quantificação de fungos viáveis por ensaios de UFC. Os resultados mostraram que os PMN de animais que sofreram irradiação, independente do estímulo *in vivo* para sua obtenção, apresentaram maior produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), atividade mitocondrial elevada e maior atividade fungicida. Com relação à produção de proteínas, os PMN de animais que não sofreram irradiação *in vivo* apresentaram crescimento constante na produção, enquanto que nos PMN de animais que sofreram irradiação essa produção diminuiu com o tempo de incubação. Podemos concluir que a LLLT rende aos PMN maior atividade metabólica, o que resulta em maior atividade fungicida contra o Pb18, provavelmente devido à maior produção de ERO independente do estímulo utilizado para sua obtenção.

Palavras chave: Neutrófilos. Atividade fungicida. *P. brasiliensis*

ABSTRACT

Innate immunity is an important component of host defense against by fungi, and into this context macrophages and neutrophils (PMN) play a central role in paracoccidioidomycosis. The treatment of this disease includes the use of antifungals that, which in addition to the prolonged administration time needed may have many side effects, so research for more efficient drugs or adjuvant treatments is needed. Low level laser therapy (LLLT) has been used as adjuvant treatment for many ailments, and its modulating effect on immune cells has already been demonstrated. In this work, we evaluated the effects of LLLT ($\lambda= 780$ nm e 50 mW) applied “in vivo” in alternate days at two points of hind paws of Swiss mice inoculated in the subcutaneous air pouch with the virulent *P. brasiliensis* Pb18 isolated or with Zymosan. Unirradiated animals were used as controls. After 10 days of infection we obtained a highly pure population of PMN, which subsequently were maintained in culture in presence of Pb18 for trials to protein production, evaluation of mitochondrial activity, production of reactive oxygen species (ROS) and quantification of viable fungi. The results showed that PMN from irradiated animals, regardless of the “in vivo” stimulus for their obtention, presented higher production of ROS, elevated mitochondrial activity and increased fungicidal capacity. Regarding the production of proteins, PMN from unirradiated animals showed increased production, while the treated group decreased gradually this production with the time of incubation. We conclude that LLLT renders PMN more active metabolically, resulting in higher fungicidal activity against Pb18, probably due to increased production of ROS, independently of the stimulus used to obtain it.

Key words: Neutrophils. Fungicidal activity. *P. brasiliensis*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> cepa 18 visto em sua forma leveduriforme parasitária.....	19
Figura 2-	Estufa utilizada para cultivo de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	36
Figura 3-	Obtenção do fator de crescimento.....	41
Figura 4-	Aspecto externo de uma bolsa “air pouch” subcutânea de camundongo Swiss sacrificado após 10 dias de infecção com Pb18.....	47
Figura 5-	Aspecto interno de bolsa “air pouch” subcutânea de camundongo Swiss sacrificado após 10 dias de inoculação com salina.....	47
Figura 6-	Aspecto interno de bolsa “air pouch” subcutânea de camundongo Swiss sacrificado após 10 dias de infecção com Pb18.....	48
Figura 7-	Aspecto interno de bolsa “air pouch” subcutânea de camundongo Swiss sacrificado após 10 dias de inoculação com Zymosan.....	49
Figura 8-	Viabilidade dos PMN reexpostos ao <i>P. brasiliensis</i> na proporção de 25PMN:1Pb18.....	50
Figura 9-	Viabilidade dos PMN após primeiro contato com <i>P. brasiliensis</i> na proporção de 25PMN:1Pb18.....	51
Figura 10-	Cinética da produção de proteínas por PMN reexpostos ao <i>P. brasiliensis</i> na proporção de 25PMN:1Pb18 nos tempos de incubação de 2, 6 e 18 horas.....	53
Figura 11-	Produção de proteínas por PMN após primeiro contato com <i>P. brasiliensis</i>	

	na proporção de 25PMN:1Pb18 nos tempos de incubação de 2, 6 e 18 horas.....	54
Figura 12-	Quantificação dos produtos da atividade mitocondrial de PMN co-cultivados com <i>P. brasiliensis</i> na proporção de 1PMN:5Pb18 e no tempo de incubação de 6 horas.....	56
Figura 13-	Quantificação dos metabólitos do oxigênio emitidos por PMN co-cultivados com <i>P. brasiliensis</i> na proporção de 25PMN:1Pb18.....	57
Figura 14-	UFC contadas após 15 dias da semeadura de 100µL da suspensão de Pb18 na concentração de 2×10^4 cél/mL nos diferentes tipos de meios de cultura.....	59
Figura 15-	UFC contadas após 15 dias da semeadura de 100µL da suspensão de Pb18 na concentração de 5×10^4 cél/mL nos diferentes tipos de meios de cultura.....	60
Figura 16-	UFC contadas após 15 dias da semeadura de 100µL da suspensão de Pb18 na concentração de 10×10^4 cél/mL nos diferentes tipos de meios de cultura.....	61
Figura 17-	Efeito do co-cultivo de PMN obtidos após estímulo “air pouch” subcutâneo (com Pb18 ou Zymosan) com células leveduriformes da cepa virulenta de <i>P. brasiliensis</i> 18 na proporção de 25PMN:1Pb18 e no tempo de incubação de 2 horas.....	63
Figura 18-	Efeito do co-cultivo de PMN obtidos após estímulo “air pouch” subcutâneo (com Pb18 ou Zymosan) com células leveduriformes da cepa virulenta de <i>P. brasiliensis</i> 18 na proporção de 25PMN:1Pb18 e no tempo de incubação de 2 horas.....	64

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1-	Ilustração da placa de 12 poços utilizada para co-cultivo de PMN com Pb18.....	39
Esquema 2-	Delineamento experimental dos materiais e métodos.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

AmB	Anfotericina B
ATP	Adenosina trifosfato
BCA	Ácido bicinconínico
BHI	Ágar infusão cérebro e coração
cél/mL	Células leveduriforme viáveis/mililitro
CO ₂	Gás carbônico
Cu	Cobre
ELISA	Ensaio imunoenzimático ligado à enzima
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FC	Fator de crescimento
FN	Meio de cultura de Fava Netto
G	Força gravitacional
GM-CSF	Fator estimulador de crescimento de colônias de granulócitos macrófagos
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	Laser de baixa potência
LPS	Lipopolissacarídeos
mL	Mililitros
MPO	Mieloperoxidase
mW	Miliwatt
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
nm	Nanômetro
NETs	Armadilhas extracelulares de neutrófilos
NK	Células natural killer
NO	Óxido nítrico
PAMPS	Padrões moleculares associados a patógenos
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PCM	Paracoccidioidomicose

PMA	Acetato miristato de forbol
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
λ	Lambda (comprimento de onda)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (Pb) E PARACOCCIDIOIDOMICOSE (PCM).....	19
1.2	PARACOCCIDIOIDOMICOSE EXPERIMENTAL.....	21
1.3	RESPOSTA IMUNE CONTRA O <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	22
1.4	BIOLOGIA DE NEUTRÓFILOS.....	27
1.5	EMPREGO DE LASER INFRAVERMELHO DE BAIXA POTÊNCIA.....	30
2	JUSTIFICATIVA.....	33
3	OBJETIVOS.....	34
3.1	OBJETIVO GERAL.....	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
4	MATERIAL E MÉTODO.....	35
4.1	ANIMAIS.....	35
4.2	FUNGOS E SEUS DERIVADOS.....	35
4.2.1	Manutenção do isolado de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb18.....	35
4.2.2	Zymosan.....	36
4.2.3	Preparação de suspensões de Pb18 ou Zymosan para infecção ou inoculação dos animais via “air pouch” subcutânea.....	36
4.2.4	Preparação de suspensões fúngicas para co-cultivo com neutrófilos de bolsa subcutânea.....	37
4.3	INFECÇÃO OU INOCULAÇÃO DOS CAMUNDONGOS VIA “AIR POUCH” SUBCUTÂNEA.....	37
4.4	OBTENÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS DE BOLSA SUBCUTÂNEA.....	37
4.5	CO-CULTIVO DE PMN DE BOLSA SUBCUTÂNEA COM Pb18.....	38
4.6	QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS FÚNGICAS VIÁVEIS - CONTAGEM DE UFC.....	39
4.6.1	Padronização do método mais eficiente para quantificação de UFC.....	40
4.6.1.1	Preparação de suspensões fúngicas para padronização do meio mais eficiente para posterior uso na quantificação de UFC.....	40
4.6.1.2	Preparação de placas para padronização do meio de cultura mais eficiente	

	para posterior uso na quantificação de UFC.....	40
4.6.1.3	Semeadura de Pb18 nos meios de cultura por espalhamento para contagem de UFC.....	41
4.6.2	Contagem de UFC.....	42
4.7	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE METABÓLICA DOS PMN USANDO O MÉTODO DO ÁCIDO BICINCONÍNICO (BCA).....	42
4.8	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL PELO MÉTODO DO MTT.....	42
4.9	QUANTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS DO OXIGÊNIO PELO MÉTODO DO LUMINOL.....	43
4.10	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	43
4.11	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	44
5	RESULTADOS.....	46
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA BOLSA SUBCUTÂNEA OBTIDA APÓS INFECÇÃO COM Pb18 OU INOCULAÇÃO COM ZYMOSAN OU SALINA.....	46
5.2	VIABILIDADE DOS PMN DE BOLSA SUBCUTÂNEA APÓS OS DIFERENTES TEMPOS EM CULTURA COM COM A CEPA VIRULENTA DE <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	49
5.2.1	Viabilidade dos PMN de bolsa subcutânea obtidos após infecção com Pb18 nos diferentes tempos em cultura com a cepa virulenta de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>.....	50
5.2.2	Viabilidade dos PMN de bolsa subcutânea obtidos após inoculação com Zymosan nos diferentes tempos em cultura com a cepa virulenta de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>.....	51
5.3	AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS POR PMN DE BOLSA SUBCUTÂNEA EM CULTURA COM A CEPA VIRULENTA DE <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	51
5.3.1	Avaliação da cinética da produção de proteínas por PMN obtidos após infecção com Pb18 em cultura com a cepa virulenta de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>.....	51
5.3.2	Avaliação da cinética da produção de proteínas por PMN obtidos após	52

	inoculação com Zymosan em cultura com a cepa virulenta de	
5.4	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>.....	53
	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL DE PMN OBTIDOS APÓS INFECÇÃO COM Pb18 OU INOCULAÇÃO COM ZYMOSAN EM CULTURA COM A CEPA VIRULENTE DE <i>Paracoccidioides</i>	
5.5	<i>brasiliensis</i>.....	55
	QUANTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS DO OXIGÊNIO EMITIDOS POR PMN OBTIDOS APÓS INFECÇÃO COM Pb18 OU INOCULAÇÃO COM ZYMOSAN EM CULTURA COM A CEPA VIRULENTE DE	
5.6	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>.....	56
	AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE PLAQUEAMENTO PARA	
5.7	CONTAGEM DE UFC.....	58
	CAPACIDADE FUNGICIDA DE PMN OBTIDOS APÓS INFECÇÃO COM Pb18 OU INOCULAÇÃO COM ZYMOSAN EM CULTURA COM	
5.7.1	A CEPA VIRULENTE DE <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>.....	62
	Avaliação da capacidade fungicida de PMN obtidos após infecção com Pb18 ou inoculação com Zymosan em cultura com cepa virulenta de	
5.7.2	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> após 7 dias de contagem de UFC.....	62
	Avaliação da capacidade fungicida de PMN obtidos após infecção com Pb18 ou inoculação com Zymosan em cultura com a cepa virulenta de	
6	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> após 12 dias de contagem de UFC.....	63
7	DISCUSSÃO.....	66
	CONCLUSÕES.....	71
	REFERÊNCIAS.....	73

1 INTRODUÇÃO

Este capítulo introduzirá o leitor no tema apresentado neste trabalho.

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

O *Paracoccidioides brasiliensis*, um fungo assexuado termodimórfico é o agente etiológico da PCM, e 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 conídeos que chegam aos alvéolos pulmonares, e ali se transformam na forma leveduriforme, parasitária. A instalação da doença dependerá do tempo de exposição, da quantidade de conídios inalados e das condições imunológicas do indivíduo (WANKE; AIDÉ, 2009).

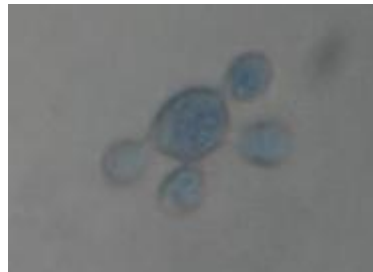


Figura 01- *Paracoccidioides brasiliensis* cepa 18 visto em sua forma leveduriforme parasitária.

Fonte: O Autor.

A paracoccidioidomicose foi descrita pela primeira vez por Adolfo Lutz (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; 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 paracoccidioidomicose doença atinge principalmente trabalhadores rurais adultos, do sexo masculino (RAMOS; 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 miceliar 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. Já 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 (WANKE; AIDÉ, 2009) e o envolvimento pulmonar pode ser extensivo (MARTINEZ, 1997).

A paracoccidiodomicose manifesta-se sob duas formas distintas de doença: a forma aguda ou juvenil e a forma crônica ou adulta (FRANCO et al., 1987). A forma juvenil representa cerca de 3 a 5% dos casos e acomete principalmente crianças e jovens. Caracteriza-se pelo rápido curso e envolvimento do sistema retículo endotelial-baço, fígado, nódulos linfáticos e medula óssea- e resulta na hipertrofia desses órgãos (LONDERO; MELO, 1983). A forma crônica é a mais comum, e progride lentamente, desenvolvendo-se a partir de um foco primário ou por reativação de focos quiescentes já estabelecidos, afetando inicialmente os pulmões (FRANCO et al., 1989). Em 25% dos casos a forma crônica atinge somente os pulmões, porém, na maioria deles, a doença espalha-se para outros órgãos, devido ao período de latência que acompanha essa forma (RESTREPO et al., 1976). As manifestações clínicas da forma crônica são classificadas em polar positiva e polar negativa. A forma polar positiva caracteriza-se pela presença de lesões generalizadas, alto título de anticorpos anti-Pb, imunidade celular enfraquecida e presença de reação inflamatória granulomatosa, contendo muitos fungos viáveis. Na forma polar negativa as lesões são locais, o título de anticorpos anti-Pb é baixo ou ausente, há preservação da imunidade celular e as lesões granulomatosas são compactas e contém poucos fungos viáveis. Ambas as formas estão associadas com extensas sequelas nos órgãos do hospedeiro, devido a uma resposta anormal das células do sistema imune (FRANCO et al., 1994).

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, 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).

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 AmB é considerada o padrão ouro para tratamento da PCM por sua excelente ação fungicida. 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) (CALICH, et al., 1985) permitiu posteriormente o estudo dos mecanismos imunológicos envolvidos no controle da infecção.

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 celular 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. O papel da imunidade humoral ocorre da seguinte forma: os anticorpos específicos anti-Pb fixam-se nos 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 (BIAGIONI et al., 1987). 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.

As células NK (PERACOLI et al., 1995), polimorfonucleares neutrófilos (PMN) (BONFIM et al., 2009), monócitos (SOARES et al., 2001) e macrófagos (MOTA et al., 1985) desempenham um papel central na resposta inata ao Pb (PAGLIARI et al., 2010). Dentro desse contexto, os PMN possuem um importante papel no início da infecção, conferindo resistência ao hospedeiro e contribuindo para o desenvolvimento de resposta imune efetiva contra o Pb. 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 (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 número de PMN e diminuição da presença de células Treg nas lesões (LOURES et al., 2009).

O Pb é reconhecido pelos receptores TLR2 e TLR4, o que desencadeia a produção de citocinas pró-inflamatórias via molécula adaptadora MyD88. 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. 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; GORDON, 2001). 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).

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). O *Pb*, possui em sua parede celular um repertório de carboidratos composto por resíduos de manose. Esses resíduos são potenciais candidatos à ativação da via das lectinas do sistema complemento. Esse sistema é composto pelas vias clássica, alternativa e das lectinas. Cada uma delas é iniciada por ativadores distintos, mas acabam por convergir para um ponto em comum da cascata, culminando na formação de um poro proteico lítico para patógenos (TOLEDO et al., 2010). No trabalho de

Calich et al. (1979) foi demonstrado que em cultura o Pb é mal fagocitado por macrófagos, no entanto a presença de anticorpos aumenta substancialmente a 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*.

O isolado Pb265 (menos virulento) foi reconhecido preferencialmente por TLR2 e dectina-1, com produção balanceada de TNF- α e IL-10, desencadeando uma resposta imunológica mais controlada e menos danosa para o hospedeiro. Já o isolado Pb18 (mais virulento) induziu somente a produção de TNF- α em humanos (BONFIM et al., 2009). Em um modelo experimental, Loures et al. (2010) demonstraram que após infecção intratraqueal de 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. Em pacientes, 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).

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 induzida 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 (JOVANOVIĆ 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 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 produção relativamente alta de IL-5 e IL-10 (KASHINO et al., 2000). Linfócitos de camundongos resistentes produzem IL-12, IFN- γ , IL-10, IL-4 e IL-5 em resposta ao fungo. Em contraste, linfócitos de camundongos susceptíveis secretam baixos níveis de IFN- γ e IL-2. Animais resistentes produzem IL-5 tardiamente, enquanto camundongos susceptíveis produzem picos de IL-5 (CALICH; KASHINO, 1998). 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 et al., 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; 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 de IL-12p40, mas não de IL-12p70 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 recentemente descrita (MAMONI, 2009) 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).

Como já dito, apesar dos mecanismos da imunidade adquirida serem fundamentais para a proteção contra o Pb, os neutrófilos possuem um papel fundamental, sendo atraídos por quimiocinas produzidas por macrófagos alveolares, sendo as primeiras células a chegar no sítio inflamatório (KEER et al., 1988). Os neutrófilos têm um papel fundamental no controle da multiplicação de bactérias patogênicas como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* (CONLAN, 1977), fungos como *Candida albicans* (FULURIA et al., 1966) e o *P. brasiliensis* (MELONI-BRUNERI et al., 1996). 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 (RESTREPO et al., 1992).

1.4 BIOLOGIA DE NEUTRÓFILOS

Na medula óssea estão presentes as células totipotentes, que se diferenciam em células precursoras de todo o sistema imune, incluindo os mieloblastos, precursores dos neutrófilos. Durante o período de maturação dos neutrófilos ocorrem as seguintes fases: mieloblasto, promielócito, mielócito neutrófilo, metamielócito neutrófilo e assim chega à forma de

neutrófilo maduro. O neutrófilo maduro 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. Os precursores imaturos dos neutrófilos possuem um retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido e um aparelho de Golgi que são utilizados na síntese dos grânulos. Essas organelas diminuem com a maturação da célula, de modo que o neutrófilo maduro possui pouca capacidade de produzir novas proteínas secretórias ou de membrana. Os neutrófilos atingem a plena maturidade na medula óssea, que destina cerca de 60% de sua atividade à sua produção, e ficam ali retidos por um período de cinco dias. Após esse período são liberados e constituem 50% a 70% dos leucócitos circulantes, e possuem um tempo de sobrevivência de aproximadamente seis horas quando não são ativados. Se durante a circulação são levados a um tecido inflamado, os neutrófilos se aderem ao endotélio ativado das vênulas pós- capilares locais e invadem o tecido afetado. Esse processo de migração dos neutrófilos recebe o nome de marginação e é composto de três fases: rolamento, ativação e migração. A fase de rolamento ocorre quando o neutrófilo circulante colide com a parede do vaso, permitindo a ligação das moléculas P-selectina e E-selectina do endotélio a mucinas da superfície do neutrófilo. Essa ligação é considerada forte, porém envolve apenas alguns ligantes, o que dá a impressão que o neutrófilo vai movendo-se ao longo da parede do vaso sob a força da corrente sanguínea. A fase de ativação ocorre quando fatores quimioatraentes secretados por muitos tipos de células em resposta a lesão tecidual são expressos pelo endotélio ou sofrem difusão no sangue a partir do tecido lesado, ligando-se à superfície dos neutrófilos. Após a ligação aos fatores quimioatraentes inicia-se a fase de migração, onde há uma modificação nas configurações de integrinas na superfície dos neutrófilos, permitindo que elas se liguem a glicoproteínas específicas sobre o endotélio. Uma vez fixados, os neutrófilos insinuam-se ativamente entre as células endoteliais, abandonando a vênula e migrando para o tecido (PARSLOW et. al., 2004).

Nos tecidos, esses neutrófilos são capazes de reconhecer padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) por meio de diversos receptores de reconhecimento padrão expressos em sua superfície celular, presentes na membrana do núcleo e localizados no citoplasma. Dentre os receptores de superfície celular destacam-se os TLRs, receptores N-formil-metionina e receptores para manose, nos localizados na membrana do núcleo

destacam-se os TLR3, TLR7 e TLR9 e nos citoplasmáticos destacam-se os NOD-like e RIG (RIGBY et.al., 2012).

Os neutrófilos englobam partículas por endocitose ou fagocitose. No englobamento por endocitose macromoléculas ou partículas submicroscópicas, como os vírus, se ligam a um determinado receptor ou mais. Após a ligação ocorre a polimerização da proteína clatrina na face citoplasmática da membrana, o que resulta em invaginação do receptor e formação de uma depressão coberta. O englobamento por fagocitose ocorre com partículas maiores, como as bactérias. Um número maior de receptores da membrana entra em contato com a superfície da partícula, até que esta seja totalmente internalizada no fagossoma. Muitos tipos de partículas, incluindo a maioria das espécies encapsuladas, não interagem efetivamente com nenhum receptor celular, não podendo ser fagocitada diretamente. Essas partículas são então revestidas por opsoninas, podendo desta forma serem reconhecidas pelos fagócitos. As principais opsoninas são as imunoglobulinas e as derivadas do sistema complemento. Com relação a atividade microbicida, os neutrófilos possuem dois mecanismos principais, os dependentes e os independentes de oxigênio. Quanto ao mecanismo dependente de oxigênio destaca-se a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), que ocorre da seguinte forma: os conteúdos do fagossoma estão sujeitos a poderosos agentes oxidantes gerados por um complexo denominado oxidase NADPH dependente. Esse complexo é organizado a partir de pelo menos cinco subunidades proteicas diferentes, sendo três encontradas no citosol e duas presentes nas membranas de seus grânulos. Durante a degranulação, essas proteínas entram em contato na membrana e organizam-se numa oxidase ativa, que se projeta na luz do fagossoma. Esses sistema transforma oxigênio molecular em oxigênio singlete, altamente reativo, que sofre dismutação espontânea formando H_2O_2 . Na presença de MPO esse peróxido combina-se com o íon cloreto formando ácido hipocloroso. Esse ácido é consumido quase instantaneamente e oxida aminas, tióis, proteínas e ácidos nucleicos. Uma porção do ácido reage para formar cloraminas orgânicas, um agente oxidante menos potente, porém de vida mais longa. Há uma segunda via de formação de ERO, que funciona da seguinte maneira: há formação de óxido nítrico a partir de oxigênio molecular, um gás radical livre e altamente lábil. Quando ativados os neutrófilos expressam uma enzima denominada óxido nítrico oxidase, que gera óxido nítrico a partir do aminoácido arginina e oxigênio molecular. Na presença de outras ERO o óxido nítrico é convertido em peroxinitrito, altamente tóxico para bactérias, leveduras, vírus e outros patógenos (NATHAN, 2006).

Quanto aos mecanismos independentes de oxigênio destacam-se a degranulação e a formação de “armadilhas” extracelulares (NETs- Neutrophil Extracellular Traps). Após a

internalização, 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. As NETs são estruturas compostas principalmente por DNA associado a histonas e pelas proteínas elastina, lactoferrina e gelatinase, presentes no interior dos grânulos azurófilos, específicos e de gelatinase, respectivamente. São formadas por uma variedade de estímulos como a presença de lipopolissacarídeos (LPS), IL-8, vírus e diversos microrganismos. Diversos patógenos desenvolveram estratégias para escapar das NETs, como a expressão de DNases ou modificações na estrutura da parede celular (BRINKMANN et. al., 2004). Os mecanismos que precedem a formação das NETs são desconhecidos. No entanto, existem claras evidências que PMN ativados pelos diferentes patógenos ou por outros estímulos como IL-8, LPS, acetato miristato de forbol (PMA), IFN- γ mais C5a ou GM-CSF mais C5a, resultam na ativação da NADP oxidase e na formação de ERO como o ânion superóxido ou H₂O₂, que são requeridos para sinalizar a indução de um programa de morte celular diferente da apoptose ou necrose, que envolve a elaboração das NETs, que além de envolver e/ou matar microrganismos, aumentam a resposta inflamatória. Propõe-se que as NETs destruam microrganismos não fagocitados pelos PMN. (CAMPOS SOARES, 2003).

1.5 EMPREGO DE LASER INFRAVERMELHO DE BAIXA POTÊNCIA

A palavra LASER pode ser entendida como amplificação da luz por emissão estimulada de radiação. É um tipo específico de radiação eletromagnética e apresenta propriedades bastante específicas. Esta radiação, quando operada em comprimentos de onda visíveis e específicos, possui características não-ionizantes, ou seja, não possui capacidade de ionizar átomos ou causar mutações (TUNÉR; HODE, 1996).

A laserterapia de baixa potência (LLLT) vem sendo utilizado para tratamento de diversos efeitos colaterais causados por quimioterapia ou radioterapia, e também como auxiliador de reparo tecidual. Endre Mestre, em 1966, demonstrou efeitos dessa terapia na cicatrização de feridas em dorso de ratos (MESTER, 1996).

A laserterapia de baixa potência tem sido aplicada em diversas áreas da medicina que necessitam de prevenção de morte celular e tecidual, como no caso de doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer e esclerose múltipla (DE TABOADA et al., 2011) e lesões de medula espinhal (WU et al., 2009). A mucosite oral é um dos efeitos colaterais agudos observados em pacientes que estão sob tratamento com quimioterapia ou radioterapia. A aplicação de LLLT tem sido utilizada como uma alternativa eficaz no combate desta adversidade, e se mostra como um tratamento de baixo custo e não traumático, apresentando excelentes resultados (RAMPINI et al., 2009).

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 (GAVISH et al., 2004), podendo resultar em aumento da produção de ERO (OREN et al., 2001; LAVI et al., 2003), adenosina trifosfato (ATP) e adenosina monofosfato cíclico, processos estes relacionados com a promoção de proliferação celular (CASTANO et al., 2007).

Em processos inflamatórios e em respostas imunológicas, a LLLT tem sido demonstrada como moduladora, normalizando ou reduzindo respostas inflamatórias (BJORDAL et al., 2011), tais como edema e migração de células para o local da inflamação (CORREA et al., 2007; PALLOTA et al., 2012) e tem sido utilizado para o tratamento de linfedema pós-mastectomia. A irradiação com LASER de baixa potência na região da axila auxilia na resolução de linfedema pós-mastectomia por redução da fibrose causadas por intervenção no câncer de mama (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; 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 (MEDRADO et al., 2003), enquanto outros acreditam que esta terapia pode agravá-las (WOODRUFF et al., 2004; VIEGAS et al., 2007), o que poderia resultar em maior ou menor formação de edema. Provavelmente, o tipo de resposta pode ser relacionada com a fase do

processo inflamatório e a formação de edema presente no tecido, quando a irradiação com LASER é realizada. Nesse contexto, a LLLT pode ter um papel na terapia imunobiológica para as doenças do sistema imune e pode ativar e aumentar a reação normal dos componentes do sistema imune (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 diminui a expressão de interleucina pró-inflamatória IL-17, TNF- α e interleucina anti-inflamatória IL-10 em lesões paracoccidiodomicóticas expostas a essa irradiação (NAGIB et al., 2010). Outro trabalho sugere ainda 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 (FERREIRA et al., 2006).

2 JUSTIFICATIVA

Uma resposta imune celular bem estabelecida e mantida muitas vezes possui caráter protetor, por isso a maioria dos indivíduos infectados não apresenta quadro clínico. Porém, quando a PCM doença se estabelece o tratamento é longo, e as drogas utilizadas são geralmente fornecidas pelos ambulatórios, e não possuem custo para os pacientes. Dentro desse contexto, esta doença não é o foco para pesquisa de novos medicamentos por parte das grandes indústrias farmacêuticas. Estudos com pacientes e empregando modelos experimentais demonstraram que a base da imunidade protetora na PCM é uma consistente resposta imune celular, mediada principalmente por macrófagos ativados principalmente por IFN- γ , produzida por linfócitos Th1. O papel dos neutrófilos na fase inicial é também importante, atuando como célula fagocítica e direcionando, juntamente com outras células, a resposta imune adaptativa. Assim, conhecendo-se o modelo de experimentação estabelecido para o estudo da PCM, bem como os aspectos relacionados ao fungo, é de extrema relevância o estudo de vias alternativas para ativar neutrófilos, células de grande importância na proteção contra a infecção, como a que utiliza LLLT, que mostra-se ser eficiente para o tratamento de diversas doenças e possui baixo custo, podendo ser utilizada para o tratamento desta doença como terapia adjuvante.

3 OBJETIVOS

Este capítulo apresenta os objetivos deste trabalho.

3.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar o efeito da aplicação de LASER de baixa potência *in vivo* sobre neutrófilos de bolsa subcutânea de camundongos “Swiss” em cultura com *Paracoccidioides brasiliensis* de alta virulência (Pb18).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a) Avaliar o efeito do LASER de baixa potência sobre produção de proteínas totais por neutrófilos de bolsa subcutânea em cultura com Pb18;
- b) Avaliar o efeito do LASER de baixa potência sobre a atividade mitocondrial de neutrófilos de bolsa subcutânea em cultura com Pb18;
- c) Avaliar o efeito do LASER de baixa potência sobre a produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos de bolsa subcutânea em cultura com Pb18;
- d) Avaliar o efeito do LASER de baixa potência sobre a capacidade fungicida de neutrófilos de bolsa subcutânea em cultura com Pb18.

4 MATERIAL E MÉTODO

Este capítulo apresenta os materiais e métodos deste trabalho.

4.1 ANIMAIS

Os animais utilizados nesse projeto são camundongos fêmeas da linhagem Swiss “outbread”, obtidos do Biotério da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL MG). Os animais são criados na UNIFAL-MG, mantidos em salas com controle de temperatura, alimentados com comida esterilizada e água destilada à vontade. Todos os protocolos do experimento foram submetidos à aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da UNIFAL- MG e aprovado com o número do protocolo 443/2012..

4.2 FUNGOS E SEUS DERIVADOS

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

4.2.1 Manutenção do isolado de *Paracoccidioides brasiliensis* Pb18

O isolado de *Paracoccidioides brasiliensis* Pb18 empregado nesse projeto foi cedido pelo Dr. Zoilo Pires de Camargo, da Universidade Federal de São Paulo, e está sendo mantido no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da UNIFAL-MG. O Pb18 é cultivado em meio de cultura semi-sólido de Fava Netto (FAVA NETTO, 1955) a 35⁰C e sofre repique rotineiramente a cada 7 dias.



Figura 2- Estufa utilizada para cultivo de *Paracoccidioides brasiliensis*.

Notas: À esquerda, imagem externa da estufa. À direita, imagem interna da estufa.

Fonte: O autor.

4.2.2 Zymosan

O polissacarídeo derivado da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, contendo o componente β -D-glucana é conhecido pelo nome de Zymosan 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 Pb18 ou Zymosan para infecção ou inoculação dos animais via “air pouch” subcutânea

As células fúngicas ou derivados foram lavadas com solução salina estéril a 0,9% e centrifugadas (Eppendorf Centrifuge 5810R) a 1300 G por três vezes, e uma suspensão com concentração de 50×10^6 células leveduriformes viáveis/ml (cél/mL) baseadas na contagem em hemocitrômetro, foi preparada. A viabilidade das células de Pb18 foi determinada pela coloração empregando o corante *Janus Green B* (BERLINER; RECA, 1966). Para o Zymosan, não foi quantificada a viabilidade celular, uma vez que essa substância é um polissacarídeo.

4.2.4 Preparação de suspensões fúngicas para co-cultivo com neutrófilos de bolsa subcutânea

As células de Pb foram lavadas com solução salina estéril a 0,9%, centrifugadas a 1300 G por três vezes, e ressuspendidas em meio RPMI-1640 (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma). A concentração desta suspensão foi ajustada para 4×10^4 cél/mL, de modo que os cultivos fossem realizados na proporção de 25 fagócitos para 1 levedura viável (determinada como ideal neste ensaio) (BRUNERI, 1995), uma vez que a concentração dos PMN (conforme descrito a seguir) foi ajustada para 10^6 cél/mL. A contagem das células foi feita em hemocitrômetro e a viabilidade determinada pela coloração vital empregando o corante de *Janus Green B*.

4.3 INFECÇÃO OU INOCULAÇÃO DOS CAMUNDONGOS VIA “AIR POUCH” SUBCUTÂNEA

Com a idade de 6 semanas e peso de aproximadamente 25g, os animais foram infectados com Pb18 ou inoculados com Zymosan ou salina pela técnica de “air pouch” subcutânea, conforme proposto por Bruneri et al., 1996. A infecção é caracterizada por uma bolsa de ar produzida na região dorsal de camundongos por injeção subcutânea de 2 mL de ar seguida de injeção de 0,1 mL da suspensão de Pb18, Zymosan ou salina previamente preparadas.

Os animais foram divididos em seis grupos experimentais, a saber, grupo 1: animais irradiados infectados com Pb18, grupo 2: animais não irradiados infectados com Pb18, grupo 3: animais irradiados inoculados com Zymosan, grupo 4: animais não irradiados inoculados com Zymosan, grupo 5: animais irradiados inoculados com salina e grupo 6: animais não irradiados infectados com salina. Os animais dos grupos 1, 3 e 5 sofreram irradiação em dois pontos de cada pata traseira com laser infravermelho (Twin flex – MMO) a 35,5 J/cm³ em um módulo de frequência contínua com comprimento de onda equivalente a 780 nm e com potência de 50 mW. Em cada ponto a irradiação tinha uma duração de 30 segundos e o seu objetivo foi o de atingir a medula óssea, local onde ocorre o processo de formação das células sanguíneas incluindo os neutrófilos, localizada no osso fêmur. As irradiações foram feitas em

dias alternados, e os animais sofreram a primeira irradiação no dia da infecção e a última no dia da coleta. Os animais inoculados com salina não apresentaram neutrófilos no local da infecção após 10 dias.

Cada grupo descrito acima foi composto por 15 animais em cada experimento e, no momento da coleta das células, cada grupo foi dividido em 5 sub-grupos, de modo que cada um desses recebeu células de 3 animais. Todos os testes realizados foram realizados em cada um dos sub-grupos.

4.4 OBTENÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS DE BOLSA SUBCUTÂNEA

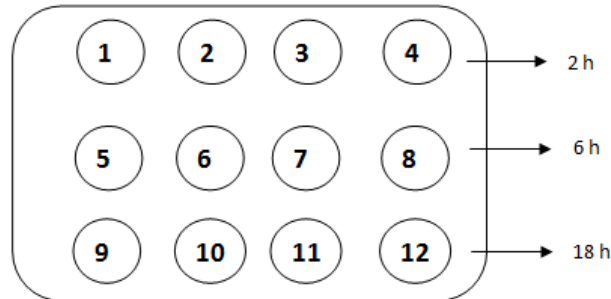
As células foram coletadas 10 dias após a infecção ou inoculação dos camundongos. Os animais foram anestesiados com uma dose de 0,5 mL da solução de cloridrato de cetamina a 10% (Agener União) e cloridrato de xilasina a 2% (nome comercial: Calmium, Agener União) preparadas na proporção de 1:1 (v:v), considerada como excessiva, o que levou os animais a óbito. Após a incisão da pele, com o auxílio de uma pipeta Pauster estéril de vidro, as células de três animais foram coletadas e transferidas para um homogeneizador de vidro estéril, onde foram masseradas. As células foram então transferidas e armazenadas em tubos Falcon contendo RPMI suplemento com 10% de SBF e mantidas refrigeradas. Posteriormente, as células foram lavadas e centrifugadas a 1780 G uma vez, ressuspendidas em volume conhecido de RPMI suplementado com 10% de SFB, quantificadas em hemocítmetro e tiveram a viabilidade analisada com o corante Trypan blue a 0,2%. Análises morfológicas das células coletadas foram realizadas utilizando o corante azul violeta, e foi observado uma população celular composta por aproximadamente 95% de PMN. A suspensão de PMN teve sua concentração ajustada para 10^6 cél/mL.

4.5 CO-CULTIVO DE PMN BOLSA SUBCUTÂNEA COM Pb18

Foram preparadas suspensões fúngicas na concentração de 4×10^4 cél/mL para co-cultivo com células com predominância de PMN, que a partir de agora serão denominados

somente PMN, que tiveram sua concentração ajustada para 10^6 cél/mL. Os PMN foram cultivados com Pb18 em placas de 12 poços, como esquematizado abaixo:

Placa de cultivo para PMN e Pb 18:



PMN	1 mL	1 mL	1 mL	-
Pb18	-	1 mL	1 mL	1 mL
RPMI	1 mL	-	-	1 mL

Esquema 1- Ilustração da placa de 12 poços utilizada para co-cultivo de PMN com Pb18.

Fonte: O autor.

Os poços 1, 5 e 9 receberam 1 mL da suspensão de PMN acrescidos de 1 mL de RPMI suplementado com 10% de SFB. Os poços 2, 3, 6, 7, 10 e 11 receberam 1 mL da suspensão de PMN e 1 mL da suspensão de Pb18. Os poços 4, 8 e 12 receberam 1 mL da suspensão de Pb18 acrescido de 1 mL de RPMI suplementado com 10% de SFB. Todos os poços receberam 2 mL no volume final.

As placas foram incubadas em estufa a 5% de CO_2 (VWR S/P by Sheldon MFG, INC) e a $37^\circ C$ nos tempos 2, 6 e 18 horas para PMN. Após os tempos de incubação descritos, as células foram centrifugadas a 1780 G e os sedimentos (compostos por células) tiveram sua viabilidade avaliada por coloração com Trypan Blue 0,2% quando se tratava de fagócitos e *Janus Green B vital dye* para viabilidade de Pb. Os sedimentos foram semeados em placas para contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) e também armazenados para determinação da concentração de proteínas totais.

4.6 QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS FÚNGICAS VIÁVEIS PARA CONTAGEM DE UFC

Seguem as informações relacionadas a quantificação de UFC.

4.6.1 Padronização do método mais eficiente para quantificação de UFC

Seguem as informações relacionadas a padronização dos métodos utilizados para quantificação de UFC.

4.6.1.1 Preparação de suspensões fúngicas para padronização do meio mais eficiente para posterior uso na quantificação de UFC

As células de Pb18 foram lavadas com solução salina estéril a 0,9% e centrifugadas a 1300 G por três vezes, e suspensões fúngicas com concentrações de 10^5 , 5×10^4 , 2×10^4 , 10^4 e 10^3 cél/mL baseadas na contagem em hemocitrômetro foram preparadas. A viabilidade das células foi determinada pela coloração vital de *Janus Green B vital*.

4.6.1.2 Preparação de placas para padronização do meio de cultura mais eficiente para posterior uso na quantificação de UFC

Foram preparados meios de cultura para análise da eficiência do plaqueamento, visto que um meio micológico padrão apresenta uma baixa eficiência para o crescimento do Pb. Diversos modelos foram empregados por pesquisadores na tentativa de aumentar essa eficiência, como a adição de um fator de crescimento (FC) produzido pelo próprio fungo nas placas (CASTANEDA et al, 1988; SINGER-VERMES et al, 1992; KURITA et al, 1993). Durante a execução deste trabalho criamos um método eficiente de produção de FC. Esse método consistiu na semeadura de Pb18 em meio Fava Netto (FN) semi-sólido e, após 4 dias de crescimento em estufa à 35° C, caldos de FN foram adicionados aos frascos por cima da colônia em crescimento (cerca de 35 mL). Os Erlenmeyer onde o Pb18 estava crescendo foram colocados em incubadora shaker (Marconi MA- 420) a 35° C com uma frequência de

115 rpm. Após uma semana no shaker, o caldo, já com um aspecto mais turvo, foi filtrado em membrana filtrante de 0,45 μm , obtendo-se desta forma o fator de crescimento. Após a obtenção deste, o mesmo foi adicionado aos seguintes meios com ágar na concentração de 30% (v:v) para ambos os ágaros:

- 1) Fava Netto + 4% SFB + 30% FC
- 2) Fava Netto + 10% SFB + 30% FC
- 3) BHI + 1% de glicose + 4% SFB + 30% FC
- 4) BHI+ 1% de glicose + 10% SFB+ 30% FC



Figura 3: Obtenção do fator de crescimento.

Notas: À esquerda, semeadura de Pb18 em Erlenmeyers. À direita, Pb18 crescendo nos Erlenmeyers em estufa.

Fonte: O autor.

4.6.1.3 Semeadura de Pb18 nos meios de cultura por espalhamento para contagem de UFC

Cem microlitros das suspensões celulares de Pb18 nas concentrações descritas acima foram semeadas nos diferentes meios e homogeneizadas com auxílio da alça de Drigalski. Esse experimento foi realizado em triplicata para cada um dos meios descritos acima. O crescimento das colônias foi acompanhado por um período de 15 dias, e foram destacadas as colônias que haviam crescido utilizando um marcador pincel. Foi definido que o meio mais eficiente para o crescimento do Pb18 foi o que continham ágar BHI suplementado com 1% de glicose, 30% de FC de 10% de SFB, que passou então a ser empregada nas análises referentes ao potencial fungicida de neutrófilos.

4.6.2 Contagem de UFC

Após a escolha da placa de BHI suplementada com 1% de glicose, 30% de FC de 10% de SFB como a mais eficiente para o crescimento do Pb18, os sedimentos obtidos como descrito no item 4.5 foram semeados em triplicata em placas contendo este meio. O crescimento das placas foi observado por um período de 12 dias, utilizando um pincel para destacar as colônias que haviam crescido.

4.7 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 proteína. 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 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).

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

Para o cálculo da concentração proteica total de cada amostra, pipetou-se nos poços $50\mu\text{L}$ da amostra previamente rompida por ultrassom (Ultra Cleaner 1600 A), onde foram mantidos por 1 hora, e $200\mu\text{L}$ do BCA. Todas as amostras foram pipetadas em triplicata e os resultados correspondem as médias dos valores obtidos subtraídos do branco, que neste ensaio foi o RPMI, meio no qual as células foram mantidas.

4.8 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 ELISA de 96 poços, foram pipetados 100µL da suspensão de Pb18 na concentração de 5×10^6 cél/mL e 100µL da suspensão de PMN na concentração de 10^6 cél/mL, na proporção de co-cultivo de 1PMN:5Pb18. Todas as amostras foram pipetadas em triplicata. A placa foi mantida em estufa com 5% de CO₂ e temperatura de 37°C e após 2 horas foi adicionado a cada um dos poços 20µL do reagente MTT a 20%, e a placa foi novamente incubada por 4 horas. Após este período, todo o sobrenadante foi retirado, deixando apenas o pellet no fundo de cada poço que foi formado durante a incubação da placa na estufa. Após esse procedimento, 200µL de DMSO (Vetec) foram pipetados em cada poço e foi realizada a leitura da placa em leitor de ELISA a 540 nm.

4.9 QUANTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS DO OXIGÊNIO PELO MÉTODO DO LUMINOL

A quantificação das ERO pelo método do luminol, se dá através da aplicação de ensaios de quimioluminescência (QL), que visa a quantificação da produção de ERO pelos PMN, sendo conhecido como metabolismo oxidativo ou “burst” oxidativo. Essa captação do ERO ocorre pela determinação da emissão de luz integrada por segundos (BABIOR, 1984).

No ensaio de luminol, as células foram ajustadas para a proporção de co-cultivo de 25PMN:1Pb, assumindo a concentração de 4×10^4 cél/mL e 10^6 células PMN/mL. O luminol foi utilizado como substrato neste ensaio. Foram pipetados em uma cubeta 135µL da suspensão de PMN e 30µL de luminol, e em seguida adicionado 135µL da suspensão de Pb18, que é o estímulo para que os PMN realizem o “burst oxidativo”. A leitura foi realizada em luminômetro (Promega- Glomax 20/20 Luminometer) e a intensidade de QL foi medida durante 30 minutos. Controles positivos e negativos foram utilizados para avaliar a ativação dos PMN. Foi utilizado como controle positivo o PMA, que atua como estímulo químico para PMN, e como controle negativo o DPI, um inibidor específico da NADPH oxidase.

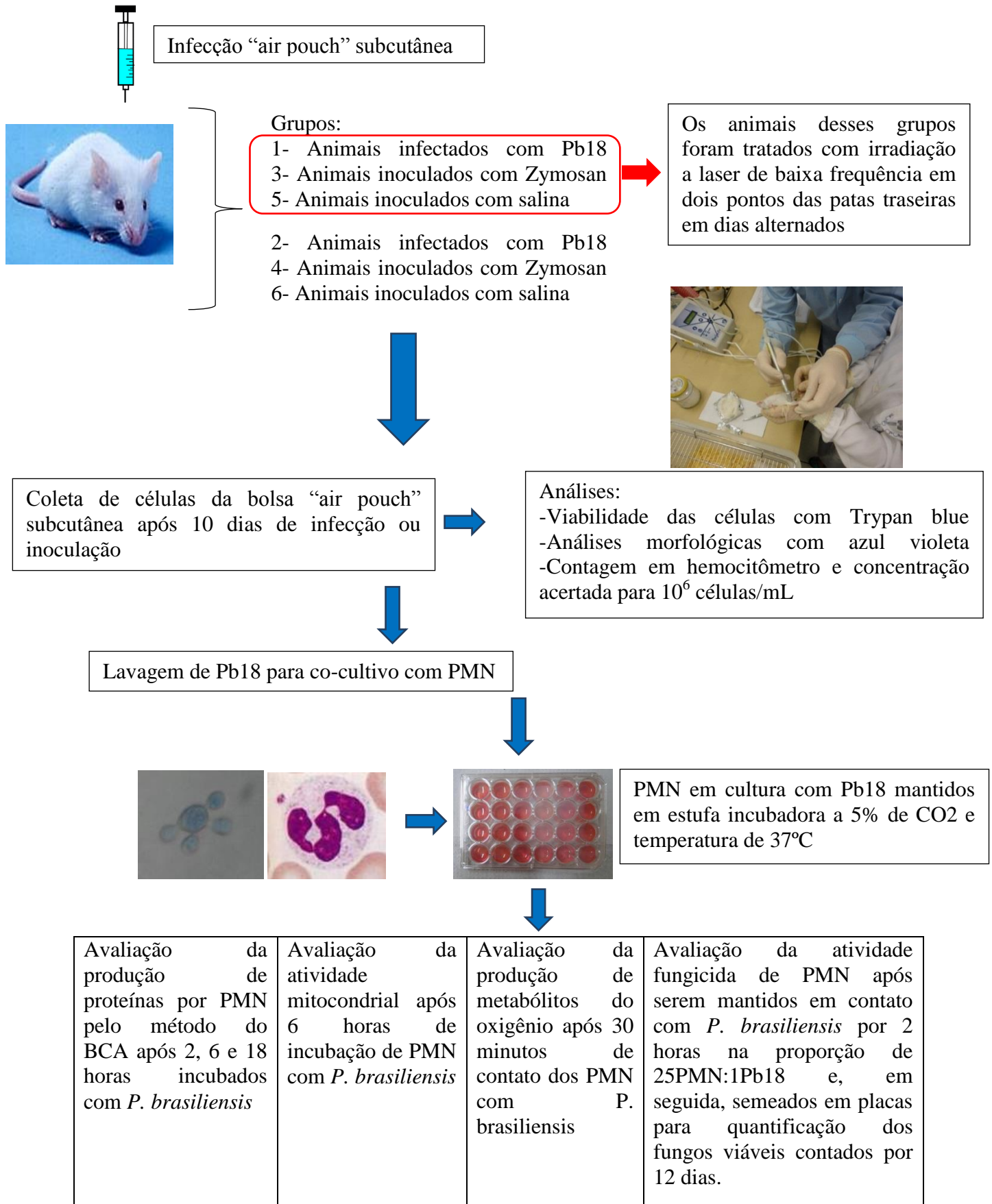
4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados da dosagem de proteínas, atividade mitocondrial, liberação de espécies reativas de oxigênio e UFC foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e todas as amostras foram consideradas normais a 5% de significância, e foram analisadas pelo programa R (R Core Team, 2014). Esse resultado permitiu a comparação entre os grupos experimentais através do teste t de Student, também a 5% de significância, pelo software GraphPad Prism® 4.0. Os gráficos apresentados também foram feitos pelo mesmo software.

Para a padronização do método mais eficiente para quantificação de UFC foi realizada a análise multivariada de Kruskal-Wallis, seguido de um pós-teste de Dunn. O nível mínimo de significância aceita foi de 5% ($p < 0,05$).

4.11 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Suspensão de Pb18 ou Zymosan ou salina



Esquema 2- Delineamento experimental dos materiais e métodos.

Fonte: O autor.

5 RESULTADOS

Este capítulo apresenta os resultados obtidos neste trabalho.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA BOLSA SUBCUTÂNEA OBTIDA APÓS INFECÇÃO COM Pb18 OU INOCULAÇÃO COM ZYMOSAN OU SALINA

As bolsas subcutâneas foram obtidas após 10 dias de inoculação dos animais com 2mL de ar e, em seguida, infecção de Pb18 ou inoculação de Zymosan ou salina. Os PMN utilizados neste trabalho são provenientes destas bolsas subcutâneas obtidas através de infecção com Pb18 ou inoculação com Zymosan, pois não foram detectados por este método PMN no local da inoculação com salina a 0,9%. Esse dado nos mostra que não é o método “air pouch” que induz a migração de células para o local da infecção. Mesmo para os animais inoculados com salina que sofreram irradiação a LASER de baixa potência não foram detectados a presença de PMN, sendo possível afirmar que também não é o LASER que estimula ou não a migração das células, sendo este somente um modulador da atividade das mesmas, uma vez que o grupo mantido sem tratamento também não apresentou células no local onde o estímulo foi injetado.



Figura 4- Aspecto externo de uma bolsa “air pouch” subcutânea de camundongo Swiss sacrificado após 10 dias de infecção com Pb18.

Fonte: O autor.



Figura 5- Aspecto interno de bolsa “air pouch” subcutânea de camundongo Swiss sacrificado após 10 dias de inoculação com salina.

Fonte: O autor.

A bolsa dos animais irradiados obtida após infecção com Pb18 mostrou-se menor com relação a bolsa obtida dos animais não irradiados pelo mesmo agente de infecção. Como podemos observar na figura a seguir, a bolsa dos animais não irradiados se apresenta com

aspecto mais denso, com maior quantidade de pus, o que reflete o número de células por ela apresentado, sendo maior neste grupo no que no grupo dos animais não irradiados (dados obtidos pelo grupo de pesquisa e não apresentados neste trabalho).



A



B

Figura 6- Aspecto interno de bolsa “air pouch” subcutânea de camundongo Swiss sacrificado após 10 dias de infecção com Pb18.

Notas: (A) O animal sofreu irradiação com LASER infravermelho de baixa potência em dois pontos das patas traseiras em dias alternados; (B) O animal foi mantido sem irradiação.

Fonte: O autor.

Para os animais inoculados com Zymosan o padrão da bolsa difere. Neste caso os animais que sofreram irradiação apresentam bolsas mais densas do que a **A** animais mantidos sem o tratamento.

**B**

Figura 7- Aspecto interno de bolsa “air pouch” subcutânea de camundongo Swiss sacrificado após 10 dias de inoculação com Zymosan.

Notas: (A) O animal sofreu irradiação com LASER infravermelho de baixa potência em dois pontos das patas traseiras em dias alternados; (B) O animal foi mantido sem irradiação.

Fonte: O autor.

Com base nos resultados obtidos nota-se que para a inoculação com Zymosan, a bolsa dos animais irradiados se apresenta com aspecto mais denso, com maior quantidade de pus, o que reflete o maior número de células por ela apresentado quando comparadas aos animais que não sofreram irradiação (dados obtidos pelo grupo de pesquisa e não apresentados neste trabalho).

5.2 VIABILIDADE DOS PMN DE BOLSA SUBCUTÂNEA APÓS OS DIFERENTES TEMPOS EM CULTURA COM A CEPA VIRULENTE DE *P. brasiliensis*

A viabilidade dos PMN provenientes da infecção com Pb18 ou da inoculação com Zymosan mostrou-se alta em todos os tempos de incubação, o que demonstra que as metodologias utilizadas neste trabalho foram adequadas para a manutenção destas células, de modo que todos os testes pudessem ser realizados.

5.2.1 Viabilidade dos PMN de bolsa subcutânea obtidos após infecção com Pb18 nos diferentes tempos em cultura com a cepa virulenta de *Paracoccidioides brasiliensis*

A figura a seguir apresenta a viabilidade dos PMN obtidos após infecção com Pb18 nos diferentes tempos de incubação.

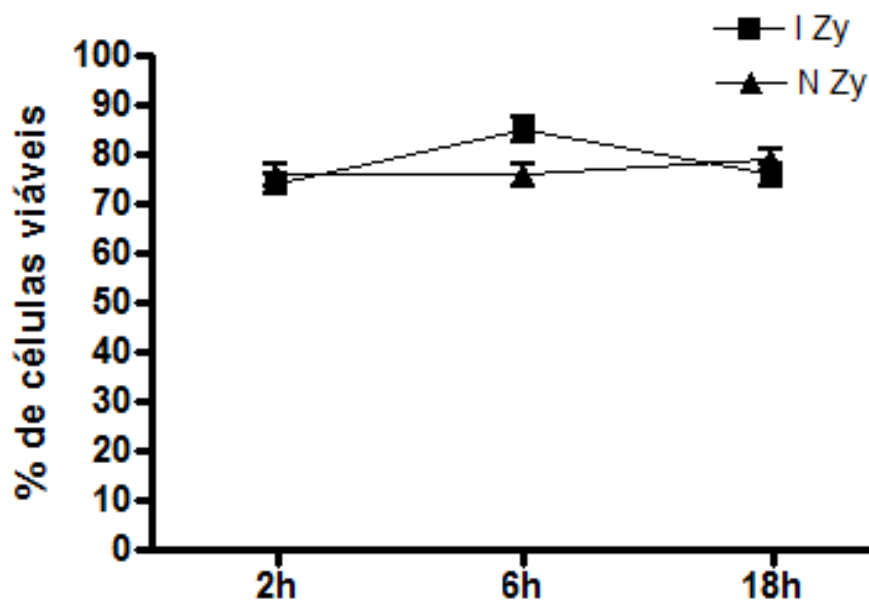


Figura 8- Viabilidade dos PMN reexpostos ao *P. brasiliensis* na proporção de 25PMN:1Pb18.

Nota: Os PMN foram obtidos após infecção com Pb18 via "air pouch" subcutânea de camundongos Swiss irradiados e não irradiados nos tempos de incubação de 2, 6 e 18 horas.

Fonte: O autor.

Analisando a figura 8 podemos perceber que tanto os PMN provenientes de animais que sofreram irradiação quanto o grupo controle possuem uma alta viabilidade para todos os diferentes tempos de incubação, o que possibilitou a realização dos testes com estas células.

5.2.2 Viabilidade dos PMN de bolsa subcutânea obtidos após inoculação com Zymosan nos diferentes tempos em cultura com a cepa virulenta de *P. brasiliensis*

A figura a seguir apresenta a viabilidade dos PMN obtidos após inoculação com Zymosan.

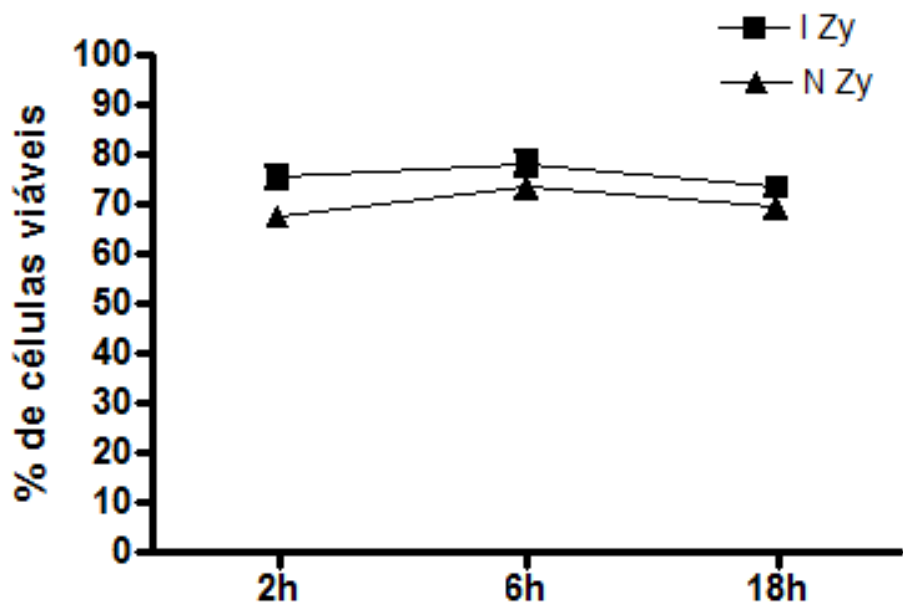


Figura 9- Viabilidade dos PMN após primeiro contato com *P. brasiliensis* na proporção de 25PMN:1Pb18.

Nota: Os PMN foram obtidos após inoculação com Zymosan via "air pouch" subcutânea de camundongos Swiss irradiados e não irradiados nos tempos de incubação de 2, 6 e 18 horas.

Fonte: O autor.

Com base na figura 9 podemos perceber que tanto os PMN provenientes de animais que foram tratados com LASER de baixa intensidade, quanto o grupo controle possuem uma alta viabilidade para todos os diferentes tempos de incubação, o que possibilitou a realização dos testes com estas células.

5.3 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS POR PMN DE BOLSA SUBCUTÂNEA EM CULTURA COM A CEPA VIRULENTE DE *Paracoccidioides brasiliensis*

A produção de proteínas por PMN obtidos após infecção com Pb18 ou inoculação com Zymosan e mantidos em cultura com *P. brasiliensis* nos tempos de 2, 6 e 18 horas foi quantificada.

5.3.1 Avaliação da cinética da produção de proteínas por PMN obtidos após infecção com Pb18 em cultura com a cepa virulenta de *Paracoccidioides brasiliensis*

Para todas as amostras utilizadas para a dosagem de proteínas foi utilizado o mesmo número de células para ruptura e análise da concentração de proteínas, cabendo assim a comparação entre elas. Para todas as amostras obtivemos uma incidência de 80 a 90% de neutrófilos inviáveis, o que confirma que os procedimentos de ruptura foram suficientes. A incidência de fungos rompida foi pequena, o que demonstra que este método não é suficiente para romper a parede celular do fungo, o que também foi confirmado quando dosamos somente amostras deste.

A figura 10 apresenta a cinética na produção de proteínas por PMN co-cultivados com Pb18 provenientes de ambos os grupos (camundongos Swiss irradiados ou não irradiados) após infecção “air pouch” subcutânea desses animais nos tempos de incubação de 2, 6 e 18 horas.

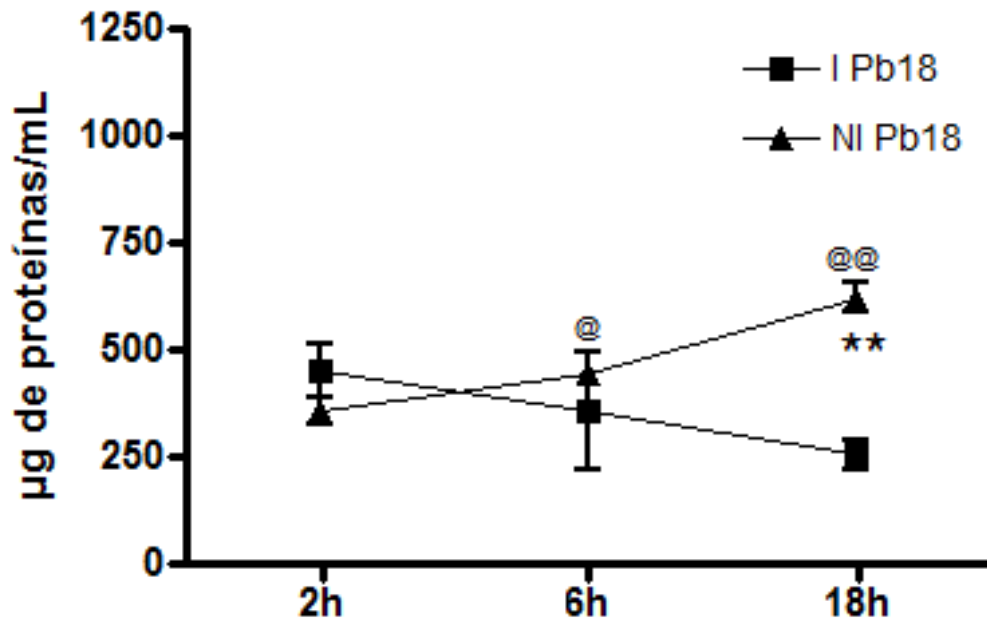


Figura 10- Cinética da produção de proteínas por PMN reexpostos ao *P. brasiliensis* na proporção de 25PMN:1Pb18 nos tempos de incubação de 2, 6 e 18 horas.

Notas: Os PMN foram obtidos de camundongos Swiss infectados com Pb18 via "air pouch" subcutânea que sofreram irradiação ou não. @ $p < 0,05$ - NI Pb18 6h em relação a NI Pb18 2h; @@ $p < 0,01$ - NI Pb18 18h em relação aos grupos NI Pb18 6h e NI Pb18 2h; ** $p < 0,01$ - NI Pb18 18h e I Pb18 18h.

Fonte: O autor.

Primeiramente podemos notar que os PMN obtidos de animais irradiados quando co-cultivados com Pb18 na proporção de 25PMN:1Pb18 apresentam aparentemente maior produção de proteínas no tempo de incubação de 2 horas, com queda nos tempos de 6 e 18 horas, porém essa diferença não foi estatisticamente comprovada. Já os PMN dos animais não irradiados em cultura com Pb18 na mesma proporção apresentam um aumento na produção de proteínas com o passar do tempo de incubação, dado este comprovado por análise estatística. No tempo de incubação de 18 horas, os PMN obtidos de animais não irradiados e co-cultivados com Pb18 na proporção de 25PMN:1Pb18 apresentam uma produção de proteínas significativamente maior do que os PMN obtidos de animais irradiados em cultura com Pb18 na mesma proporção, devido ao fato dos últimos serem mais ativos no momento da coleta, perdendo em seguida esse estado de ativação.

5.3.2 Avaliação da cinética da produção de proteínas por PMN obtidos após inoculação com Zymosan em cultura com a cepa virulenta de *Paracoccidioides brasiliensis*

A figura 11 expressa a produção de proteínas totais produzidas por PMN co-cultivados com Pb18 na proporção de 25PMN:1Pb18 provenientes de inoculação “air pouch” subcutânea de camundongos que sofreram irradiação ou não, no tempo de incubação de 2, 6 e 18 horas.

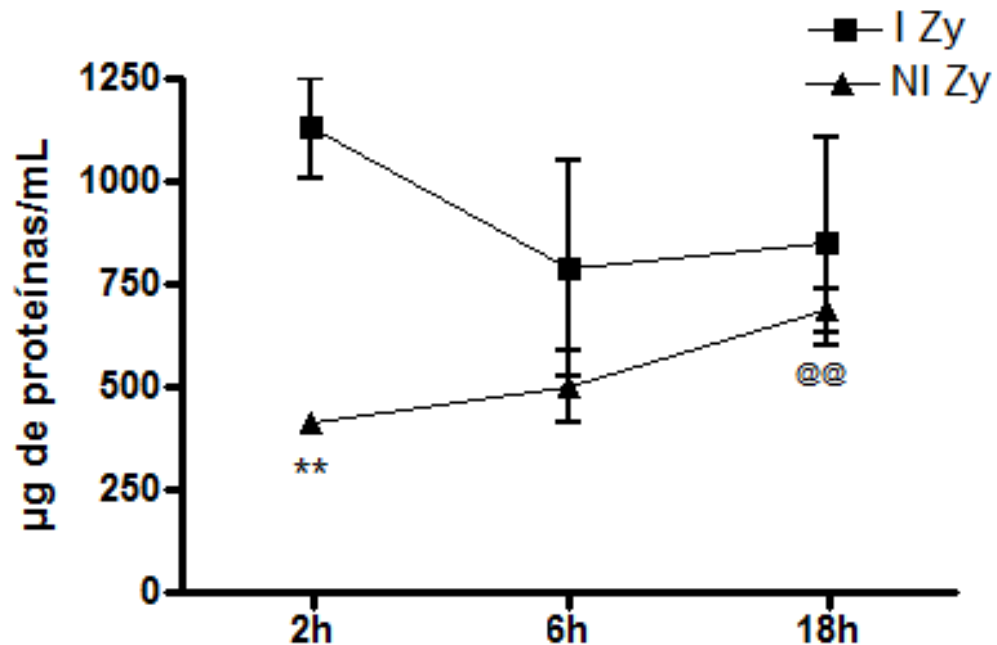


Figura 11- Produção de proteínas por PMN após primeiro contato com *P. brasiliensis* na proporção de 25PMN:1Pb18 nos tempos de incubação de 2, 6 e 18 horas.

Notas: Os PMN foram obtidos de camundongos Swiss inoculados com Zymosan via "air pouch" subcutânea que sofreram irradiação ou não. @@ $p < 0,01$ - NI Zy 18h em relação a NI Zy 2h; ** $p < 0,01$ - I Zy 2h em relação a NI Zy 2h.

Fonte: O autor.

Nos ensaios de cinética da produção de proteínas por PMN obtidos após inoculação com Zymosan foi possível perceber que os PMN provenientes dos animais irradiados e co-cultivados com Pb18 na proporção de 25PMN:1Pb18 possuem uma maior produção de proteínas do que os PMN provenientes do grupo controle em todos os tempos de incubação, porém essa diferença só foi significativa em 2 horas de incubação. Cabe resaltar aqui que os PMN obtidos por inoculação com Zymosan estão sendo expostos pela primeira vez ao Pb, o que demonstra que a irradiação aumenta a atividade de produção de proteínas.

Da mesma forma que a figura anterior, os PMN obtidos de animais irradiados e co-cultivados com Pb18 apresentam aparentemente maior produção de proteínas nos tempos de incubação de 2 horas, com queda nos tempos de 6 e 18 horas, reforçando a idéia de que essas células são mais ativas quando são coletadas e, em seguida perdem esse estado de ativação, porém essa diferença não foi estatisticamente comprovada. Com os PMN obtidos de animais não irradiados e posteriormente colocados em cultura com Pb18 ocorre o contrário. Esses

PMN chegam ao local da infecção com menor estado de ativação, e quando colocados em contato primário com o Pb aumentam gradativamente sua ativação, o que foi demonstrado estatisticamente quando comparados a produção de proteínas por partes dos mesmos nos tempos de incubação de 2 e 18 horas.

Com base nos resultados obtidos pelos ensaios de determinação de proteínas total podemos perceber que a produção de proteínas por parte dos PMN obtidos após inoculação com Zymosan e co-cultivados com Pb18 dos animais irradiados foi estatisticamente maior que de todos os outros grupos experimentais, mostrando o potencial do LASER em ativar neutrófilos quando os mesmos foram colocados em contato pela primeira vez com Pb18.

A produção de proteínas aumentada sugere aumento da atividade da célula, o que pode significar uma apoptose por parte das mesmas, porém nossos dados de viabilidade das células durante os diferentes tempos de co-cultivo mostrou que independente do estímulo para obtenção, os PMN quando em contato pela primeira vez ou reexpostos ao Pb18 mantiveram sua viabilidade alta, mostrando dessa forma que a produção de proteínas relaciona-se com atividade metabólica frente ao fungo.

5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL DE PMN OBTIDOS APÓS INFECÇÃO COM Pb18 OU INOCULAÇÃO COM ZYMOZAN EM CULTURA COM A CEPA VIRULENTA DE *Paracoccidioides brasiliensis*

Os ensaios de MTT são baseados em um sal tetrazolium, o qual é reduzido a cristais de formazam pela ação principalmente da enzima succinato desidrogenase das mitocôndrias.

A figura a seguir expressa a atividade celular de PMN co-cultivados com Pb18 por 6 horas de animais irradiados ou não irradiados na proporção de 1PMN:5Pb18.

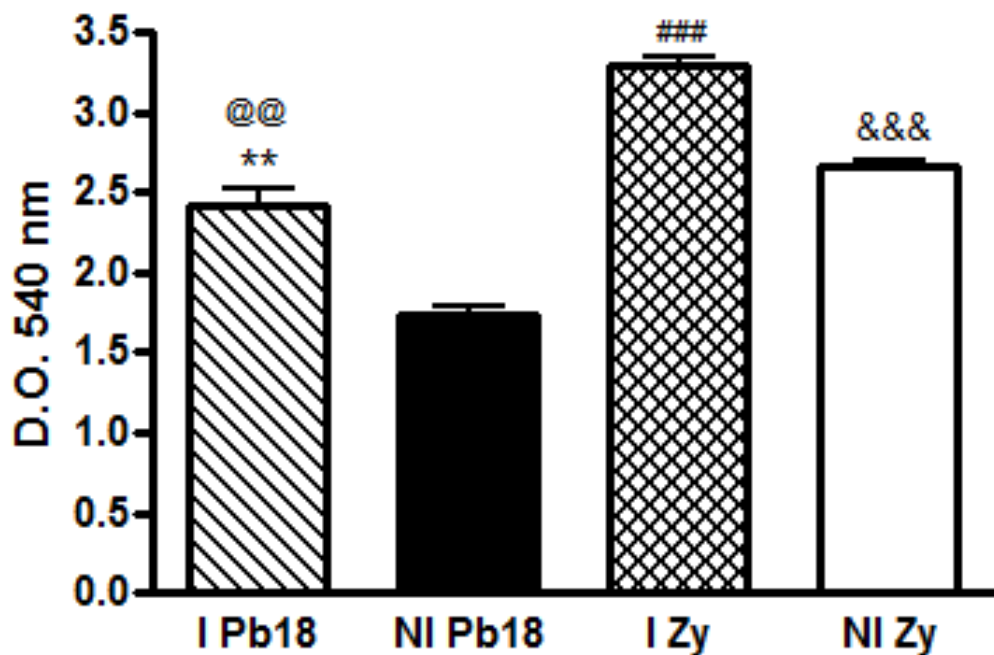


Figura 12: Quantificação dos produtos da atividade mitocondrial de PMN co-cultivados com *P. brasiliensis* na proporção de 1PMN:5Pb18 e no tempo de incubação de 6 horas.

Notas: Grupos: PMN obtidos após estímulo via "air pouch" subcutâneo com Pb18 de camundongos Swiss irradiados (I Pb18) e não irradiados (NI Pb18) ou com Zymosan de camundongos Swiss irradiados (I Zy) e não irradiados (NI Zy) no tempo de incubação de 6 horas. Resultados expressos em absorbância. ** $p < 0,005$ - I Pb18 em relação a NI Pb18; ### $p < 0,001$ - I Zy em relação a NI Zy; &&& $p < 0,001$ - NI Zy em relação a NI Pb18; @@ $p < 0,005$ - I Pb18 em relação a I Zy.

Fonte: O autor.

Podemos concluir que quando os PMN são expostos pela primeira ou segunda vez ao Pb18 na proporção de 1PMN:5Pb18, os PMN obtidos dos animais irradiados possuem uma ativação significativamente maior da succinato desidrogenase mitocondrial quando comparados aos PMN obtidos dos animais não irradiados após 6 horas de incubação. Outro dado que merece destaque é que tanto os PMN que sofreram tratamento com LASER quanto o grupo controle, quando expostos pela primeira vez ao Pb, possuem maior atividade mitocondrial do que os que estão sendo reexpostos ao mesmo, ou seja os PMN obtidos por inoculação Zymosan possuem maior ativação mitocondrial do que os PMN obtidos por infecção com Pb18 quando posteriormente colocados em cultura com o fungo.

5.5 QUANTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS DO OXIGÊNIO EMITIDOS POR PMN OBTIDOS APÓS INFECÇÃO COM Pb18 OU INOCULAÇÃO COM ZYMOSAN EM CULTURA COM A CEPA VIRULENTE DE *Paracoccidioides brasiliensis*

Para os experimentos de liberação de metabólitos do oxigênio foi utilizada a metodologia que utiliza a transformação do luminol em lucigenina na presença de ERO. Em todos os experimentos foram feitas leituras de um controle positivo, PMA e um controle negativo, DPI. Os resultados foram úteis para a validação do teste.

Foram quantificadas a produção de espécies reativas de oxigênio tanto de PMN provenientes de camundongos Swiss irradiados como PMN obtidos de camundongos não irradiados, após co-cultivo com Pb18, na proporção de 25PMN:1Pb18, pelo método do luminol, conforme mostrado na figura abaixo.

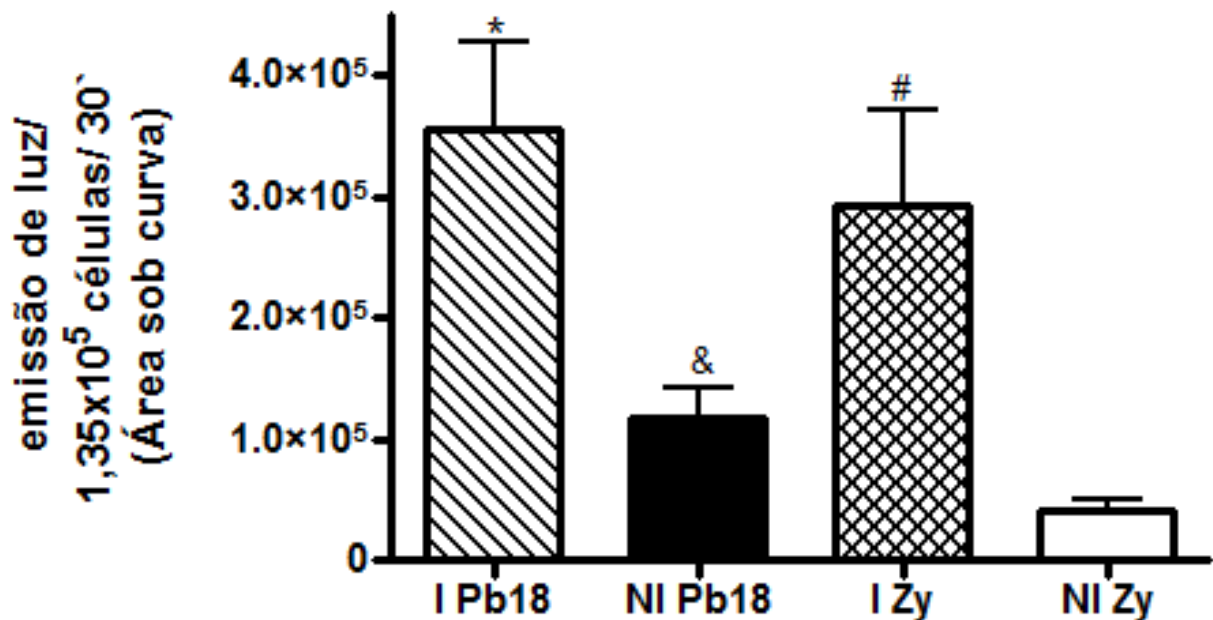


Figura 13- Quantificação dos metabólitos do oxigênio emitidos por PMN co-cultivados com *P. brasiliensis* na proporção de 25PMN:1Pb18.

Notas: Grupos: PMN obtidos após estímulo via "air pouch" subcutâneo com Pb18 de camundongos irradiados (I Pb18) e mantidos sem irradiação (NI Pb18) ou com Zymosan de camundongos irradiados (I Zy) e mantidos sem irradiação (NI Zy) no tempo de incubação de 30 minutos. * $p < 0,05$ - I Pb18 em relação ao grupo NI Pb18; # $p < 0,05$ - I Zy em relação a NI Zy; & $p < 0,05$ - NI Pb18 em relação a NI Zy.

Fonte: O autor.

Nota-se que houve maior produção de ERO pelos PMN obtidos de camundongos Swiss irradiados, independente do modo de obtenção destas células do que pelo grupo controle, quando co-cultivados com Pb18. Outro fato que deve ser considerado é que os neutrófilos que estão sendo reexpostos ao Pb aparentemente produzem mais ERO que os outros grupos, demonstrando mais uma vez que o LASER de baixa potência possui capacidade

de estimular células imunológicas, porém essa diferença só foi significativa comparada aos grupos de PMN não irradiados obtidos por infecção com Pb18 e PMN não irradiados obtidos após inoculação com Zymosan. Podemos observar também que os PMN que foram obtidos por infecção com Pb18 dos animais irradiados já foram ativados “in vivo”, por isso possuem, aparentemente, maior capacidade de gerar ERO do que os PMN obtidos por inoculação com Zymosan deste mesmo grupo, porém esses dados não foram estatisticamente confirmados. Quanto aos PMN obtidos de animais não irradiados, a produção de ERO também é significativamente maior no grupo dos PMN reexpostos ao Pb do que no grupo de PMN em contato com o Pb pela primeira vez, o que confirma a maior capacidade de gerar ERO dos PMN que já estiveram em contato com o Pb. A estimulação *in vitro* de neutrófilos de camundongos resistentes com Pb mostrou que essas células produzem mais espécies reativas de oxigênio do que os camundongos susceptíveis, indicando que durante a infecção os camundongos susceptíveis perdem sua habilidade de produzir oxigênio, importante para a disseminação do fungo (MELONI-BRUNERI et al, 1996).

5.6 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE PLAQUEAMENTO PARA CONTAGEM DE UFC

A contagem de UFC é um processo altamente utilizado quando se deseja quantificar o número de microrganismos viáveis, como por exemplo, em estudos sobre a morte de bactérias ou fungos por mecanismo específicos ou não, bem como em estudos do efeito de agentes terapêuticos. O método se baseia na semeadura em meio de cultura semi-sólido apropriado do microrganismo de interesse e contagem do número de colônias formadas após um período de incubação.

No estudo do *Paracoccidioides brasiliensis* o emprego de um meio micológico padrão apresenta baixa eficiência no plaqueamento, uma vez que este fungo necessita de fatores de crescimento especiais, produzidos por ele próprio, para que se obtenha um crescimento substancial. Dessa forma, diversos autores propuseram metodologias para a obtenção deste fator (CASTANEDA et al, 1988; SINGER-VERMES et al, 1992; KURITA et al, 1993).

Em nosso estudo, testamos meios de cultura Fava Netto e BHI suplementado com 1% de glicose, acrescidos de 4 ou 10% de SFB e 30% de FC e semeamos nesses meios diferentes concentrações de Pb18, conforme descrito anteriormente.

A figura 14 apresenta as médias do número de colônias contadas após 15 dias de

crescimento do Pb18, semeado no volume de 100 μ L da suspensão na concentração de 2x10⁴ cél/mL.

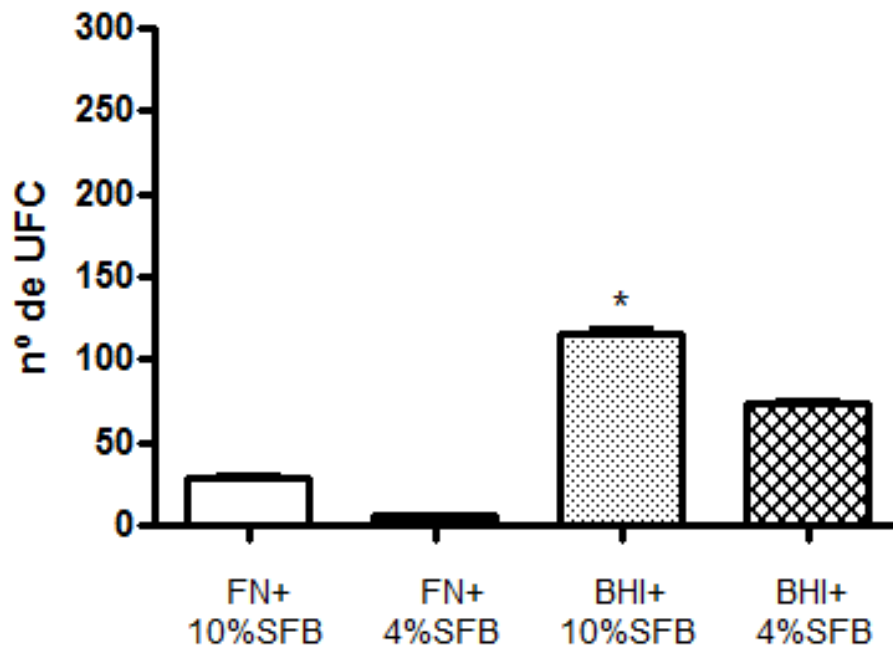


Figura 14- UFC contadas após 15 dias da semeadura de 100 μ L da suspensão de Pb18 na concentração de 2x10⁴ cél/mL nos diferentes tipos de meios de cultura.

Notas: FN: Fava Netto; BHI: ágar BHI enriquecido com 1% de glicose; SFB: soro fetal bovino. Todos os meios foram suplementados com 30% de fator de crescimento. *p<0,05 – BHI + 10%SFB em relação a FN + 4%SFB.

Fonte: O autor.

Os resultados apresentados nos permitem concluir que, para a concentração de 2x10⁴ cél/mL de Pb18, o meio que aparentemente apresentou maior eficiência para o seu crescimento foi o que continha BHI suplementado com 1% de glicose, acrescido de 10% de SFB e 30% de FC. Porém, estatisticamente, esse resultado só foi significativo comparado ao crescimento no meio de FN acrescido de 4% de SFB e 30% de FC.

Analisaremos a seguir a figura 15, que mostra as médias do número de colônias contadas após 15 dias de crescimento do Pb18, semeado no volume de 100 μ L da suspensão na concentração de 5x10⁴ cél/mL.

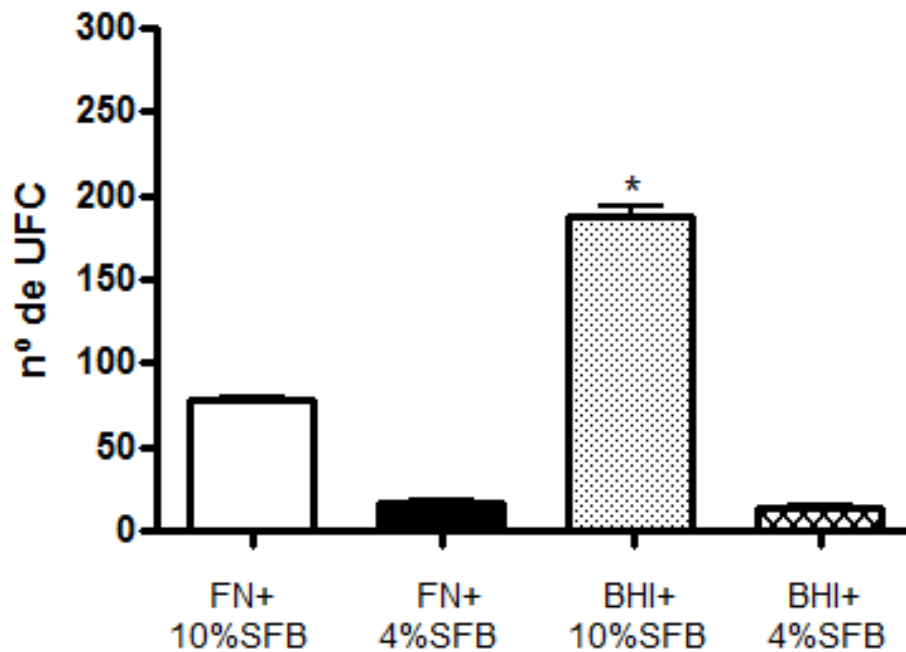


Figura 15- UFC contadas após 15 dias da semeadura de 100µL da suspensão de Pb18 na concentração de 5×10^4 cél/mL nos diferentes tipos de meios de cultura.

Notas: FN: Fava Netto; BHI: ágar BHI enriquecido com 1% de glicose; SFB: soro fetal bovino. Todos os meios foram suplementados com 30% de fator de crescimento.

* $p < 0,05$ – BHI + 10%SFB em relação a BHI + 4%SFB.

Fonte: O autor.

Analisando a figura 15, verificamos que para a concentração de 5×10^4 cél/mL de Pb18, o meio que aparentemente apresenta melhor eficiência no crescimento é o de BHI suplementado com 1% de glicose, acrescido de 10% de SFB e 30% de FC. Porém, estatisticamente, esse resultado só foi significativo comparado ao crescimento no meio de BHI suplementado com 1% de glicose, acrescido de 4% de SFB e 30% de FC.

A figura 16 avalia qual dos meios de cultura apresenta maior eficiência no crescimento das colônias de Pb18, semeado no volume de 100µL da suspensão na concentração de 10×10^4 cél/mL.

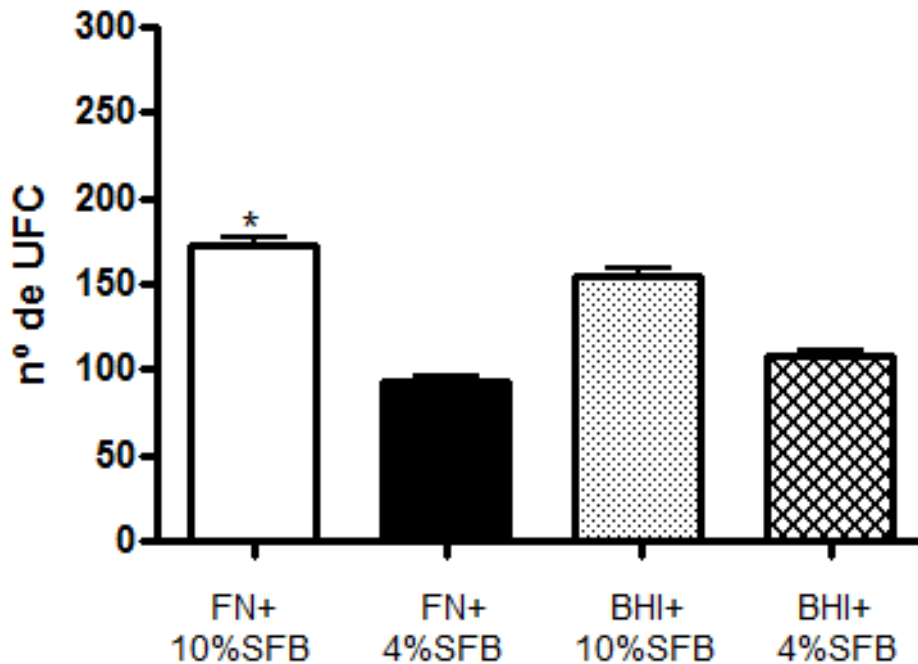


Figura 16- UFC contadas após 15 dias da semeadura de 100 μ L da suspensão de Pb18 na concentração de 10×10^4 cél/mL nos diferentes tipos de meios de cultura.

Notas: FN: Fava Netto; BHI: ágar BHI enriquecido com 1% de glicose; SFB: soro fetal bovino. Todas os meios foram suplementados com 30% de fator de crescimento. * $p < 0,05$ – FN + 10% SFB em relação a FN + 4% SFB.

Fonte: O autor.

Como podemos observar na figura 16 que o meio que apresenta, aparentemente, maior eficiência no crescimento de Pb18 na concentração de 10×10^4 cél/mL é o de FN acrescido de 10% de SFB e 30% de FC. O segundo meio que apresentou, aparentemente, maior eficiência no crescimento foi o que continha BHI suplementado com 1% de glicose, acrescido de 10% de SFB e 30% de FC. Estatisticamente esse resultado só foi significativo quando comparamos o crescimento no meio de FN acrescido de 10% de SFB e 30% de FC em relação ao meio de FN acrescido de 4% de SFB e 30% de FC.

Pela análise das figuras 14 a 16, concluímos que o meio que apresentou maior eficiência para o crescimento de células de Pb18, nas diferentes concentrações, foi o de BHI suplementado com 1% de glicose, acrescido de 10% de SFB e 30% de FC, que passa a ser agora o meio utilizado para todas as contagens de UFC que utilizaremos nos próximos experimentos.

5.7 CAPACIDADE FUNGICIDA DE PMN OBTIDOS APÓS INFECÇÃO COM Pb18 OU INOCULAÇÃO COM ZYMOSAN EM CULTURA COM A CEPA VIRULENTA DE *Paracoccidioides brasiliensis*

Para os experimentos de contagem de UFC, os PMN obtidos de ambos os grupos foram colocados em cultura com Pb na proporção de 25PMN:1Pb18 e incubados por 2 horas. Após esse período, a cultura foi semeada em placas para contagem das colônias crescidas por um período de 15 dias.

5.7.1 Avaliação da capacidade fungicida de PMN obtidos após infecção com Pb18 ou inoculação com Zymosan em cultura com cepa virulenta de *Paracoccidioides brasiliensis* após 7 dias de contagem de UFC

A figura 17 mostra o número de colônias contadas após 7 dias referentes ao co-cultivo de PMN com Pb18 no tempo de incubação 2 horas. Os PMN foram obtidos de camundongos que sofreram irradiação a LASER de baixa potência e do grupo controle, para ambos os tipos de obtenção de PMN.

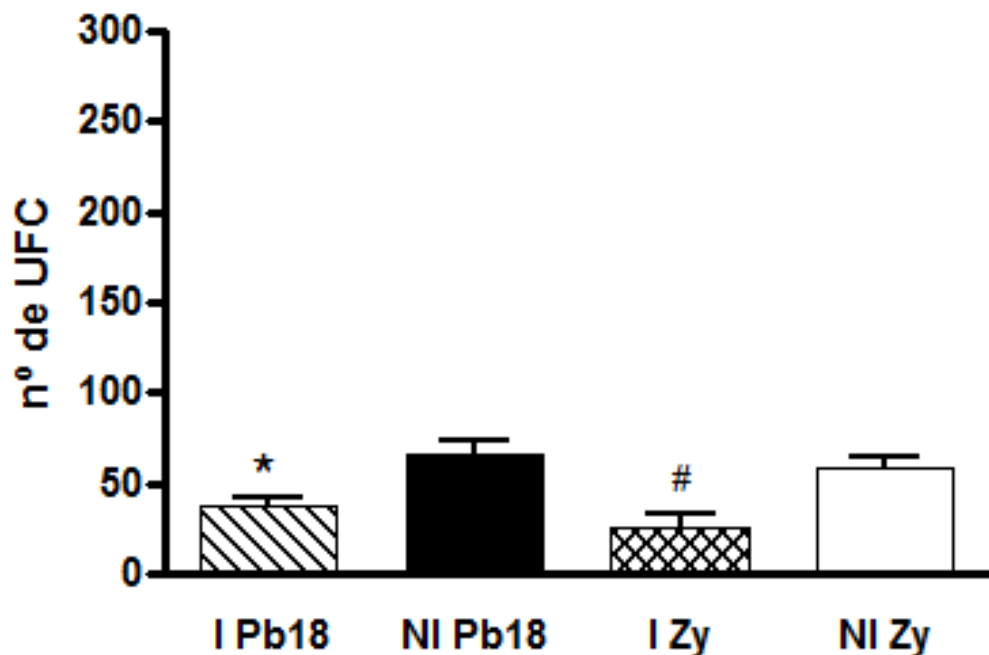


Figura 17- Efeito do co-cultivo de PMN obtidos após estímulo “air pouch” subcutâneo (com Pb18 ou Zymosan) com células leveduriformes da cepa virulenta de *P. brasiliensis* 18 na proporção de 25PMN:1Pb18 e no tempo de incubação de 2 horas.

Notas: Grupos: PMN obtidos após estímulo via "air pouch" subcutâneo com Pb18 de camundongos Swiss irradiados (I Pb18) e não irradiados (NI Pb18) ou com Zymosan de camundongos Swiss irradiados (I Zy) e não irradiados (NI Zy). * $p < 0,05$ - I Pb18 em relação a NI Pb18; # $p < 0,05$ - I Zy em relação a NI Zy.

Fonte: O autor.

A figura 17 mostra que o número de UFC de Pb18 é maior no grupo dos animais que não sofreram irradiação, para ambos os tipos de obtenção de neutrófilos, o que demonstra que a irradiação a LASER de baixa potência torna os PMN mais eficientes na eliminação do Pb18. Cabe ressaltar aqui que para os PMN obtidos da infecção com Pb18, as UFC se referem aos fungos provenientes tanto da infecção como do co-cultivo com o fungo, tanto do grupos dos animais que receberam o tratamento com LLLT quanto no grupos dos mantidos sem o mesmo.

5.7.2 Avaliação da capacidade fungicida de PMN obtidos após infecção com Pb18 ou inoculação com Zymosan em cultura com a cepa virulenta de *Paracoccidioides brasiliensis* após 12 dias de contagem de UFC

A figura 18 mostra o número de colônias contadas após 12 dias referentes ao co-cultivo de PMN com Pb18 no tempo de incubação 2 horas, representando todos os grupos experimentais utilizados neste trabalho.

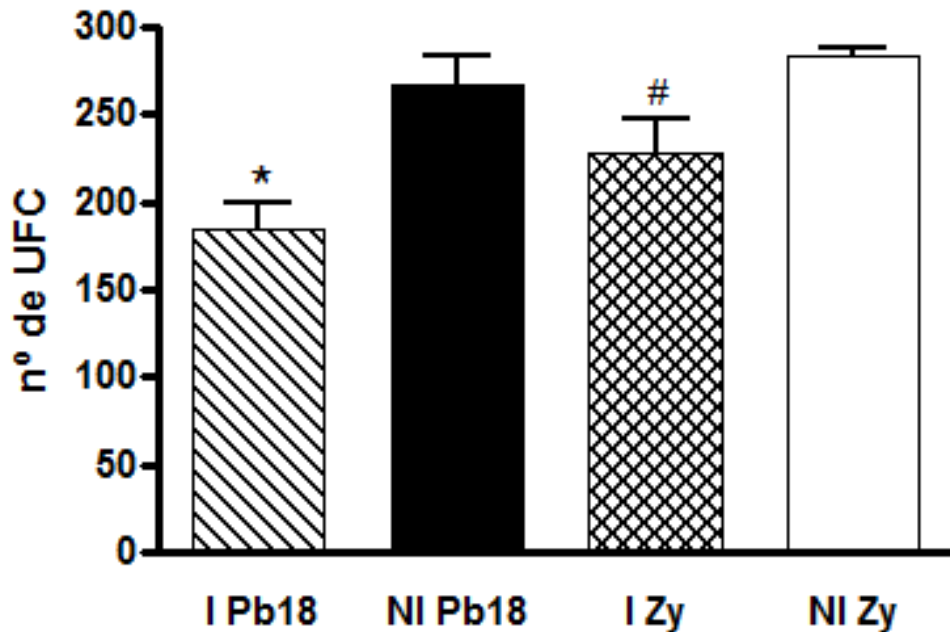


Figura 18- Efeito do co-cultivo de PMN obtidos após estímulo “air pouch” subcutâneo (com Pb18 ou Zymosan) com células leveduriformes da cepa virulenta de *P. brasiliensis* 18 na proporção de 25PMN:1Pb18 e no tempo de incubação de 2 horas.

Notas: Grupos: PMN obtidos após estímulo via "air pouch" subcutâneo com Pb18 de camundongos Swiss irradiados (I Pb18) e não irradiados (NI Pb18) ou com Zymosan de camundongos Swiss irradiados (I Zy) e não irradiados (NI Zy). * $p < 0,05$ - I Pb18 em relação a NI Pb18; # $p < 0,05$ - I Zy em relação a NI Zy.

Fonte: O autor.

A figura 18 mostra que o número de UFC de Pb18 é maior no grupo dos animais que não sofreram irradiação, para ambos os tipos de obtenção de neutrófilos, o que demonstra que a irradiação a LASER de baixa potência torna os PMN mais eficientes na eliminação do Pb18. Cabe ressaltar aqui que para os PMN obtidos da infecção com Pb18, as UFC se referem aos fungos provenientes tanto da infecção como do co-cultivo com Pb18 dos PMN de animais irradiados ou não irradiados.

Através dos resultados obtidos foi possível verificar que a emissão de ERO é elevada quando os neutrófilos são estimulados com o fungo. Estudos já 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 (BABIOR, 2000), o que torna os PMN capazes de

eliminar o Pb.

Comparando os grupos estudados, podemos perceber que a irradiação, tanto para os PMN obtidos por infecção com Pb18 tanto para os obtidos com inoculação com Zymosan, leva a uma maior produção de ERO. Dessa forma percebemos que o LASER de baixa intensidade contribui para uma maior defesa imunitária, levando aos fagócitos expostos a ela a uma maior emissão de radicais superóxido na tentativa de conter o fungo.

6 DISCUSSÃO

A irradiação LASER, quando empregada em comprimentos de ondas visíveis e infravermelhos, é caracterizada como não ionizante, o que a torna incapaz de causar danos ao DNA (LILJENDAHL et al., 2012) e ter ação mutagênica. Porém, estudos demonstram que a LLLT possui a capacidade de interagir com as células irradiadas, induzindo repostas por parte das mesmas, que podem ser moduladas pelo comprimento de onda, potência e parâmetros da irradiação (ALMEIDA-LOPES et al., 2001), bem como do tecido que está sofrendo a irradiação (FRIGO et al., 2009).

Um ponto importante deste trabalho é o local em que o tratamento utilizando LASER de baixa potência é realizado, sendo nas patas traseiras o local onde está localizada a medula óssea, local de geração e maturados neutrófilos (MARY, 1985). Durante a maturação dessas células, diversas proteínas são sintetizadas e ordenadas em diferentes grânulos, incluindo grânulos azurófilos ou primários, secundários ou específicos e terciários. Os grânulos azurófilos contém uma enzima importante para o metabolismo oxidativo, a MPO (FAURSCOU; BORREGAAD, 2003). Os grânulos específicos contém lactoferrinas e são formados após a geração dos grânulos azurófilos e os grânulos de gelatinase contém poucos agentes antimicrobianos. Esses grânulos são indispensáveis para as atividades neutrofílicas durante a inflamação (BORREGAARD et al, 2007). A irradiação aplicadas nesses animais age portanto nos neutrófilos durante sua fase de maturação, exercendo efeitos moduladores nestas células. A irradiação a LASER de baixa intensidade leva a um aumento relevante da atividade das mitocôndrias, em torno de 150% (GAVISH et al., 2004), o que leva à uma consequente geração de ATP e aceleração do metabolismo celular (SILVEIRA et al., 2009), tornando-se importante para a resposta dos neutrófilos frente ao Pb. Outros estudos sugerem que a irradiação com LASER de alta potência leva a uma apoptose celular, que pode ser explicada pelo fato de que esta pode inibir o metabolismo celular. Acredita-se que altas doses de LASER fazem com que muito Ca^{2+} seja liberado, causando hiperatividade da bomba de $Ca^{2+}/ATPase$, o que resulta na liberação das reservas de ATP da célula (FRIEDMANN et al., 1991). Teoricamente, o teste do MTT é correlacionado a atividade celular (quanto mais intensa a cor púrpura maior o número de células viáveis). Entretanto, foi demonstrado que diversos compostos químicos podem mudar a atividade da succinato desidrogenase mitocondrial, aumentando-a ou inibindo-a (DEVILA; STANELY, 2008). Como este ensaio revela a atividade mitocondrial e a LLLT pode ter influencia sobre a mesma, o mais correto

neste caso é concluir que a irradiação a LASER modificou esta atividade, aumentando-a.

As respostas imunes não podem ser entendidas sem compreendermos o papel dos neutrófilos, uma vez que estas células aparecem em todos os cenários de resposta inflamatória, de resposta imune inata a resposta imune adaptativa. Essas células não são somente simples “suicide killers” capazes de proteger contra agentes invasores (APPELBERG, 2007). Além da produção de agentes antimicrobianos, os neutrófilos produzem numerosas citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (MANTOVANI et al., 2011). Estas células podem direcionar a resposta imune adaptativa por comunicar-se com vários tipos celulares, incluindo linfócitos B (PUGA et al., 2012), células dendríticas (BENNOUNA; DENKERS, 2005) e células T (BEAUVILLAIN, 2007). Os neutrófilos podem eliminar patógenos através de diversos mecanismos, incluindo fagocitose, a produção de peptídeos e proteínas antimicrobianas (BORREGAARD, 2010) e a liberação de ERO durante o burst respiratório. O metabolismo oxidativo pode ser induzido por ativação microbiana direta através de PAMPs, como TLR4, TLR2 e TLR9 (TRINCHIERI; SHER, 2007). Camundongos deficientes em MPO apresentam atividade citotóxica reduzida frente a *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans* e outros microorganismos, demonstrando que o metabolismo oxidativo dependente de MPO é importante para a defesa do hospedeiros contra fungos (ARATAMI et al., 2012).

O balanço entre a resposta imune celular e humoral é crítico para o entendimento de doenças infecciosas graves. Este balanço é influenciado por ativação de subpopulações TCD4+, que podem ser caracterizadas pelo tipo de citocinas que produzem. A subpopulação Th1 produz predominantemente IFN- γ IL-2 e TNF- α , enquanto que a população Th2 produz IL-4, IL-5 e IL-13. A resistência ao Pb está associada ao padrão Th1 em pacientes (CASTRO et al., 2013) e em camundongos (CALICH et al., 1998). Novas populações celulares foram descritas, possuindo papel central na resposta imune contra fungos: Th17, Th22 e Th9 (ZHU et al., 2010). Células Th17 estimulam células endoteliais, epiteliais e macrófagos a produzirem citocinas e quimiocinas como IL-1 β , IL-23 e IL-6 e peptídeos antimicrobianos como defensinas, induzindo o acúmulo de neutrófilos, que possuem um papel importante no controle de infecções bacterianas, como na tuberculose (KHADER; COOPER, 2008).

Como já visto anteriormente, os macrófagos alveolares induzem a liberação de quimiocinas que atraem os neutrófilos para o local da inflamação, sendo essas células as primeiras a serem recrutadas (KERR et al., 1988). Os PMN que se encontram na bolsa subcutânea podem ter sido atraídos também por IL-15, produzida por diferentes tipos celulares, incluindo macrófagos, em resposta a infecções microbianas. Esta citocina tem um

papel crucial na ativação de células fagocitárias contra patógenos, e em PMN possui o efeito de estimular sua atividade antifúngica, por um mecanismo dependente do metabolismo oxidativo (TAVIAN et al., 2008). No trabalho de Calich et al. (1985) demonstrou-se que células peritoneais incubadas com o fungo liberam um fator solúvel que induz “in vivo” um fator quimiotático para neutrófilos, o que demonstra que além da participação dos macrófagos em recrutar neutrófilos, há também participação do próprio *P. brasiliensis* em induzir resposta local para que esta célula seja recrutada.

Várias citocinas possuem um papel estimulatório sobre o “burst” respiratório ou atividade citotóxica de neutrófilos e dentre elas podem ser citadas o $\text{IFN-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$ (SHALABY et al., 1985) GM-CSF (BALAZOVICH et al., 1991), IL-8 (BAGGIOLINI et al., 1985), e IL-15 (MUSSO et al., 1998). No estudo de Kurita et al. (2000) foi observado que $\text{IFN-}\gamma$, GM-CSF e IL-1 β possuem um importante papel na defesa do hospedeiro nas fases iniciais de infecção com *P. brasiliensis*, aumentando sua atividade fungicida.

A produção de IL-8 por parte dos neutrófilos pode ser induzida por várias citocinas como $\text{TNF-}\alpha$ (STRIETER et al., 1992), GM-CSF (HACHICHA et al., 1995) e IL-15 (MUSSO et al., 1998). Com relação a IL-10, sua produção por parte dos PMN poderia ser considerada um mecanismo de escape do fungo, no entanto não podemos descartar a atuação desta citocina como um mecanismo de proteção, no sentido de controlar a resposta imune excessiva produzida pelas citocinas ativadoras. A cepa menos virulenta foi reconhecida preferencialmente por TLR2 e dectina-1, com produção balanceada de $\text{TNF-}\alpha$ e IL-10, por outro lado, a cepa mais virulenta induziu somente a produção de $\text{TNF-}\alpha$ (BONFIM et al., 2009).

A laserterapia de baixa potência possui diversas propriedades moduladoras das células do sistema imune, agindo de forma positiva na ativação do metabolismo de neutrófilos por aumento de sua atividade mitocondrial, liberação de ERO e melhoramento de sua capacidade fungicida, não apresentando efeitos nocivos para essas células. Essas células desempenham um papel importante na PCM, por sua excelente ação fungicida, o que torna esse método de ativação de extrema relevância.

Com relação a eficiência de plaqueamento Diversos modelos foram empregados por diferentes pesquisadores na tentativa de aumentar essa eficiência. Uma das mais utilizadas implica na adição de um fator de crescimento (FC) ao meio de cultura. Os fatores de crescimento são um conjunto de substâncias, a maioria de natureza proteica, que juntamente com os hormônios e os neurotransmissores desempenham uma importante função na comunicação intercelular. A função principal dos fatores de crescimento é a o controle

externo do ciclo celular. A função dos fatores de crescimento não é somente a de estimular a proliferação celular mediante a regulação do ciclo celular, iniciando a mitose, mas também a de manter a sobrevivência celular, estimular a migração celular, a diferenciação celular e também a apoptose (disponível em http://www.prospecbio.com/Growth_Factors/; acessado em 20 de abril de 2014).

No estudo de Singer-Vermes et al. (1992), filtrados de cultura derivados Pb18 atenuado (AT), Pb18 reisolado (R) e Pb192 foram preparados usando meio McVeight-Morton. Foram realizadas inoculações de 5×10^7 unidades de fungos e semeadas em 200 mL do meio de cultura contidos em garrafas de 500 mL, incubados a 36° C e mantidos em “shaker” horizontal por 1, 2 e 4 semanas. Células leveduriformes de Pb18R ou Pb18AT crescendo em Fava Netto semi-sólido foram lavadas com PBS. As unidades de fungo foram contadas em um hemocitômetro, tiveram sua viabilidade avaliada usando Janus Green B. Os FC derivados de Pb18AT, Pb18R e Pb192 foram filtrados e adicionados às placas nas concentrações de 5, 15 e 30% (v:v). As placas foram seladas, incubadas a 36°C e as colônias contadas diariamente por 15 dias. Como resultado obtiveram uma maior eficiência no crescimento nas placas com FC de Pb192, e a influência da concentração do FC não foi evidente quando o filtrado foi adicionado as culturas. Os filtrados de Pb18AT e Pb18R adicionados as placas apresentaram menor eficiência no crescimento do fungo, contudo com o aumento da concentração destes, há também um aumento considerável na eficiência do plaquemano. Em ambos os casos o tempo de permanência dos isolados no “shaker” não alterou a eficiência do plaqueamento quando esses filtrados foram adicionados às placas.

No estudo de Kurita et al. (1993), foram utilizados células de Pb18 e B-1183 na fase leveduriforme inoculadas em ágar BHI suplementado com 1% de glicose e incubadas a 35°C por 5 dias para a produção do FC. As células em crescimento foram lavadas e suspensas em água destilada na densidade de 10% (v:v). As suspensões foram aquecidas a 120° C por 15 minutos e mantidas a temperatura ambiente por 3 dias. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram removidos e mantidos a temperatura ambiente até o momento do uso. Esses sobrenadantes foram adicionados em 5% a diferentes meios de cultura, e demonstrou-se que nos meios em que foram adicionados, juntamente com 4% de soro de cavalo, há um aumento na eficiência do plaqueamento para diversos isolados de *P. brasiliensis*. Dessa forma, fica estabelecido que as substâncias produzidas pelo próprio fungo colaboram para seu crescimento quando acrescida aos meios de cultura das placas.

No estudo de Castaneda et al. (1988), usando meio de cultura ágar BHI ou ágar McVeight-Morton suplementado com 5% de filtrado de cultura de *P. brasiliensis* e 4% de

soro de cavalo, obtiveram uma maior eficiência no plaqueamento para *P. brasiliensis*.

Todas as técnicas possuem grande eficiência, porém, ao desenvolvermos esta metodologia com fase semi-sólida, observamos que conseguimos obter quantidades satisfatórias de FC em um curto prazo de tempo, o que facilita a aplicabilidade da técnica, além de ter um menor custo, por precisar apenas de meios de cultura usualmente utilizados em laboratórios de pesquisa em microbiologia e bioquímica. Vale ressaltar que o crescimento do *P. brasiliensis* é maior em meio semi-sólido do que em meio líquido, o que aumenta a produção de FC pelo fungo, uma vez que os outros autores utilizaram um meio líquido para o seu crescimento.

7 CONCLUSÕES

Pelo método de “air pouch” subcutâneo com infecção por Pb18 ou inoculação com Zymosan conseguimos obter uma população altamente pura de neutrófilos, que posteriormente mantiveram-se viáveis em cultura com o fungo nos tempos de incubação de 2, 6 e 18 horas.

A irradiação com LASER de baixa potência na fase formação e maturação dos neutrófilos apresentou efeito modulador positivo na atividade dessas células, pois independente do estímulo para a sua obtenção, esse tratamento rendeu aos neutrófilos maior atividade mitocondrial, produção aumentada de ERO, bem como maior capacidade fungicida frente a cepa virulenta de *P. brasiliensis*.

A produção de proteínas por PMN em cultura com *P. brasiliensis* obtidos de animais infectados com Pb18 (2º contato com o fungo) ou Zymosan (1º contato com o fungo), e que receberam tratamento com LASER, apresentou-se maior no tempo de 2 horas, com queda nos tempos de 6 e 18 horas, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa. Já os PMN obtidos de animais que foram mantidos sem tratamento, independente do estímulo para sua obtenção, tiveram um aumento significativo na produção de proteínas no decorrer do tempo de incubação com Pb18.

Para os PMN obtidos após infecção com Pb18 e mantidos em cultura com o fungo no tempo de incubação de 18 horas (2º contato), as células que foram coletas de animais que não sofreram tratamento com LASER de baixa potência apresentaram produção de proteínas significativamente maior do que o grupo que recebeu irradiação.

Para os PMN obtidos após inoculação com Zymosan e mantidos em cultura com o fungo no tempo de incubação de 2 horas (1º contato), as células que foram coletas de animais que sofreram tratamento com LASER de baixa potência apresentaram produção de proteínas significativamente maior do que o grupo que não recebeu irradiação.

Com relação a atividade mitocondrial, independente do estímulo pelo qual os PMN foram coletados, as células dos animais que receberam tratamento com LASER tiveram uma atividade significativamente aumentada quando comparada ao grupo controle. Para os PMN obtidos após inoculação com Zymosan que foram expostos pela primeira vez ao Pb18, a atividade foi maior quando comparados aos obtidos após infecção com o fungo (2º contato), independentemente se receberam ou não tratamento.

A produção de ERO por parte dos PMN obtidos de animais que sofreram tratamento com LASER, independente do estímulo para sua obtenção, foi maior que no grupo controle. Os PMN obtidos após estímulo com Pb18, tratados ou não com LASER, tiveram uma maior produção de ERO quando comparados aos PMN que foram expostos pela primeira vez ao fungo.

Para a obtenção do FC, desenvolvemos uma metodologia que consiste no crescimento do Pb18 em meio bifásico, onde obtivemos grandes quantidades do FC após filtração em membrana de micropore. Verificamos que a placa que apresenta-se mais eficiente para o crescimento do isolados de *P. brasiliensis* 18 foi a que continha ágar BHI suplementado com 1% de glicose, e acrescido de 10% de SFB e 30% de FC.

O número de UFC contadas após 7 ou 12 dias foi maior no grupos dos PMN obtidos de animais que não sofreram tratamento com LASER após serem mantidos em cultura com Pb18 por 2 horas, independente do estímulo para a obtenção dessas células.

REFERÊNCIAS

Acorci MJ, et al. Inhibition of human neutrophil apoptosis by *Paracoccidioides brasiliensis*: role of interleukin-8. **Scand J Immunol.** v. 69, p. 73-79. 2009

Acosta-Rodriguez EV, et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. **Nat Immunol.** v. 8, p. 639-646. 2007

Almeida-Lopes L, et al. Comparison of the low power laser therapy effects on culture human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. **Lasers Surg Med.** v. 36, p. 881-887. 2001

Appelberg R. Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. **Trends Microbiol.** v. 15, p. 87-89. 2007

Aratami Y, Miura N, Suzuki K. Role of neutrophil-derived reactive oxygen species in host defense and inflammation. **Med Mycol J.** v. 23, n. 2, p. 123-128. 2012

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

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

Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. **American Journal of Medicine.** v. 109, p. 33-44. 2000

Baggiolini M, Walz A, KunkeL SL. Neutrophil-activating peptide 1 interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. **J Clin Invest.** v. 84, p. 1045-1049. 1985

Balazovich KJ, Almeida HI, Boxer LA. Recombinant human G-CSF and GM-CSF prime human neutrophils for superoxide production through different signal transduction mechanisms. **J Lab Clin Med.** v. 118, p. 576-584. 1991

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

Berliner MD, Reca ME. Vital staining of *Histoplasma capsulatum* with Janus Green B. **Sabouraudia**. 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**. v. 13, p. 248-252. 2001

Bennouna S. & Denkers EY. Microbial antigen triggers rapid mobilization of TNF-alpha to the surface of mouse neutrophils transforming them into inducers of high-level dendritic cell TNF-alpha production. **J Immunol**. v. 174, p. 4845-4851. 2005

Bicalho RN, et al. Oral paracoccidioidomycosis: A retrospective study of 62 Brazilian patients. **Oral Dis**. v. 7, p. 56-60. 2001

Biagioni LMV, Orsi S, Chama LG, Sadatsune T, Franco M. Imunoglobulinas e C₃ no granuloma paracoccidióidico. **Rev Ist Med Trop**. 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**. 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**. 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**. v. 47, n. 7, p. 722-733. 2009

Borregaard N, Sorensen OE & Theilgaard-Monch K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. **Trends Immunol**. v. 28, p. 340-345. 2007

Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. **Immunity**. v. 33, p. 657-670. 2010

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

- Brown GD, Gordon S. A new receptor for β -glucans. **Nature**. v. 413, p. 36-37. 2001
- Calich VL, Vaz CA, Burger E. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Res Immunol**. v. 149, p. 407–417, 499–500. 1998
- Calich VLG, et al. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Braz J Exp Pathol**. 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**. 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**. 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**. v. 12, p. 20-30. 1979
- Calich VLG, Vaz CAC, Burger E. PMN chemotactic factor produced by glass-adherent cells in the acute inflammation caused by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Br J exp Pathol**. v. 66, p. 57-65. 1985
- Calvi SA, et al. Effect of cytokines on the *in vitro* fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. **Microbes Infect**. 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**. 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**. v. 98, p. 1114–1122. 2003
- Castaneda E, et al. A culture medium of *Paracoccidioides brasiliensis* with high plating efficiency, and the effect of siderophores. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**. v. 26, p. 351-358. 1988
- Castano AP, et al. Low-level laser therapy for Zymosan-induced arthritis in rats: Importance of illumination time. **Lasers Surg Med**. v. 39, p. 543-550. 2007

Castro LF, et al. Characterization of the immune response in human Paracoccidioidomycosis. **J Inf.** v. 67, p. 470-485. 2013

Chen Y. & Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nat Rev Immunol.** v. 10, p. 826–837. 2010

Chistoffersson G, et al. VEGF- A recruits proangiogenic MMP-9-delivering neutrophil subset that induces angiogenesis in transplanted hypoxic tissue. **Blood.** v. 120, p. 4653-4662. 2012

Conlan JW. Critical roles of neutrophils in host defense against experimental infections of mice by *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Yersinia enterocolitica*. **Infect. Immun.** v. 65, p. 630–635. 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.** v. 25, p. 245–249. 2007

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

Devila PT, Stanely Mainzen Prince P. (-) Epigallocatechin-gallate (EGCG) prevents mitochondrial damage in isoproterenol- induced cardiac toxicity in albino Wistar rats: a transmission electron microscopic and in vitro study. **Pharmacol Res.** v. 57, p. 351-557. 2008

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

Faurschou M. & Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes Infect.** v. 5, p. 1317–1327. 2003

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

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

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

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

Friedmann H, et al. A possible explanation of laser-induced stimulation and damage of cell cultures. **J Photochem Photobiol B**. v. 11, p. 87-91. 1991

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

Fulurija A, Ashman 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**. 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**. v. 35, p. 369-376. 2004

Gonzales A, et al. Expression of adhesion molecules in lungs of mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Microbes Infect**. 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**. v. 68, n. 5, p. 2546-2552. 2000

Hachicha M, Naccache PH, McColl SR. Inflammatory microcrystal differentially regulate the secretion of macrophage inflammatory protein 1 and interleukin-8 by human neutrophil: A possible mechanism of neutrophil recruitment to sites of inflammation in synovitis. **J Exp Med**. v. 182, p. 2019-2025. 1995

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

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**. v. 160, p. 3513-3521. 1998

Kashino SS, et al. Resistance 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**. v. 20, p. 89-97. 2000

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

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

Khader SA, Cooper AM. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. **Cytokine.** v. 35, n.3-4, p. 207-216. 2008

Kurita NAS, et al. An improved culture medium for detective live yeast phase cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology.** v. 31, p. 201-205. 1993

Kurita N, et al. Effect of cytokines on antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol.** v. 38, p. 177-182. 2000

Lau RWL, Cheing GLY. Managing postmastectomy lymphedema with low-level laser therapy. **Photomed Laser Surg.** 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.** v. 278, p. 40917-40922. 2003

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

Liljendahl TS, Kotova N, Segerback D. Quantification of ultravioleta radiation- induced DNA damage in the urine of Swedish adults and children following exposure to sunlight. **Biomarkers.** v. 17, n. 7, p. 634-641. 2012

Londero AT, Melo IS. Paracoccidioidomycosis in childhood. A critical review. **Mycopathologia.** v. 82, p. 49-55. 1983

Loures FV, et al. TLR2 is a negative regulator of Th17cells and tissue pathology in a pulmonary model of fungal infection. **J Immunol.** v.183, p.1279-1290. 2009

Loures FV, et al. Toll like receptor 4 signaling leads to severe fungal infection associated with enhanced proinflammatory immunity and impaired expansion of regulatory T cells. **Infect Immun.** v. 78, p. 1078–1088. 2010

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

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

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

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

Martinez R. Blastomicose sul-americana (Paracoccidioidomicose). Etiopidemiologia 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.** p. 204-221. 2004

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

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

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

Meloni-Bruneri LH, et al. Neutrophil oxidative metabolism and killing of *P. brasiliensis* after air pouch infection of susceptible and resistance mice. **J Leuk Biol.** v. 59, n. 4, p. 526-533. 1996

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**. v. 32, p. 384-385. 1990

Mendes RP, Negroni R, Arechavala A. Treatment and control of cure. **Paracoccidioidomycosis**. 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**. v. 28, p. 973-980. 2013

Mester E. The use of laser beam in therapy. **Orv Hetil**. 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**. 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**. 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**. v. 24, n. 2, p. 365-368. 1976

Musso T, Calosso L, Zucca M. Interleukin-15 activates proinflammatory and antimicrobial functions in polymorphonuclear cells. **Infect Immun**. v. 66, p. 2640-2647. 1998

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

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

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

Oren DA, et al. Stimulation of reactive oxygen species production by an antidepressant visible light source. **Biol Psychiatry**. 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.** v. 37, p. 565-570. 2010

Pagliari C, Sotto MN. Dendritic cells and pattern of cytokines in paracoccidioidomycosis skin lesions. **Am J Dermatopathol.** 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** 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.** v. 6, p. 1133-1141. 2005

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

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

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

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

R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

Rampini MP, et al. Utilização da terapia com laser de baixa potência para prevenção de mucosite oral: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia.** v. 55, n. 1, p. 59-68. 2009

Ramos ESM, Saraiva Ldo E. Paracoccidioidomycosis. **Dermatol Clin.** 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.** 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.** v. 46, p. 346-53. 1984

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

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

Rigby KM, Frank R DeLeo. Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections. **Sem Immunopathol.** v. 34, p. 237-259. 2012

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

Shalaby MR, et al. Activation of human polymorphonuclear neutrophil function by interferon-gamma and tumor necrosis factor. **J Immunol.** v. 135, p. 2069-2073. 1985

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

Silveira PC, et al. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in muscle healing by low-level laser therapy. **J Photochem Photobiol B.** v. 95, p. 89-92. 2009

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

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

Smith PK, et al. Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. **Anal Biochem.** 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.** v. 102, p. 480-485. 2001

Strieter RM, et al. Cytokines-induced neutrophil derived interleukin-8. **Am J Pathol.** v. 141, p. 397-407. 1992

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.** v. 270, n. 5, p. 2145-2151. 1995

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Wu X, et al. 810 nm Wavelength light: an effective therapy for transected or contused rat spinal cord. **Lasera Surg Med.** v. 41, p. 36-41. 2009

Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations. **Annu Rev Immunol.** v. 28, p. 445-489. 2010