

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL-MG**

**BRUNO JOSÉ NASCIMENTO GOMES**

**EFEITOS DA IRRADIAÇÃO COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA (LLLT) EM  
NEUTRÓFILOS MADUROS CULTIVADOS *EX VIVO* E *IN VITRO* NA INFECÇÃO  
EXPERIMENTAL POR *Paracoccidioides brasiliensis*.**

**Alfenas/MG**

**2021**

**BRUNO JOSÉ NASCIMENTO GOMES**

**EFEITOS DA IRRADIAÇÃO COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA (LLLT) EM  
NEUTRÓFILOS MADUROS CULTIVADOS *EX VIVO* E *IN VITRO* NA INFECÇÃO  
EXPERIMENTAL POR *Paracoccidioides brasiliensis***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: interação Patógeno Hospedeiro.

Orientador: Profa. Dra. Eva Burger

**Alfenas/MG**

**2021**

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

G633e Gomes, Bruno José Nascimento.  
Efeitos da irradiação com laser de baixa potência (III) em neutrófilos maduros cultivados *ex vivo* e *in vitro* na infecção experimental por *Paracoccidioides brasiliensis*. / Bruno José Nascimento Gomes. – Alfenas/MG, 2021.  
108f. : il. --  
Orientadora: Eva Burger.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, 2021.  
Bibliografia.

1. Paracoccidioidomicose. 2. Lasers. 3. Neutrófilos. 4. Paracoccidioides.  
I. Burger, Eva. II. Título.

CDD-616.079

Ficha Catalográfica elaborada por Fátima dos Reis Goiatá  
Bibliotecária-Documentalista CRB/6-425

**BRUNO JOSÉ NASCIMENTO GOMES**

**EFEITOS DA IRRADIAÇÃO COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA (LLLT) EM  
NEUTRÓFILOS MADUROS CULTIVADOS *EX VIVO* E *IN VITRO* NA INFECÇÃO  
EXPERIMENTAL POR *Paracoccidioides brasiliensis***

A Banca examinadora abaixo-assinada, aprova a  
Dissertação apresentada como parte dos requisitos  
para obtenção do título de Mestre em Ciências  
Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas.  
Área de concentração: Interação Patógeno  
Hospedeiro.

Aprovada em: 08 de outubro de 2021

Profa. Dra. Eva Burger

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG

Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini

Instituição: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP (Araraquara)

Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG.



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Felipe Leomil Coelho, Professor do Magistério Superior**, em 08/10/2021, às 16:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eva Burger, Professor do Magistério Superior**, em 08/10/2021, às 16:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Jose Soares Mendes Giannini, Usuário Externo**, em 08/10/2021, às 16:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0610082** e o código CRC **D57DF03C**.

*Aos meus pais Rosane e Luiz, a minha irmã Mariana e avó Irene e meu marido Elias por me apoiarem de maneira incondicional durante esta caminhada. A minha tia Violeta e todas as mais de 590.000 mil vítimas (até a presente data) da pandemia de COVID-19 provocada pelo vírus SARS*

*CoV-2.*

*Dedico*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a minha família, principalmente aos meus pais Rosane e Luiz, por apoiarem minha escolha e pelos anos de dedicação, amor proporcionados e ainda por me ensinarem o verdadeiro sentido da palavra educação;

Agradeço ao meu marido Elias pelo amor, companheirismo e apoio durante esse período;

Agradeço a equipe do laboratório de Imunopatologias das micoses, especialmente Lauana, Nayara, Vítor e Julianne, pela convivência e companheirismo;

Agradeço a todos os professores que passara por minha vida pelo conhecimento proporcionado e pela oportunidade de aprimoramento pessoal e profissional. Especialmente a Professora Eva Burger pelas orientações;

Agradeço aos membros da banca examinadora;

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro fornecido via bolsa - Processo 309917;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*Por que deveríamos subsidiar a curiosidade intelectual?*  
(Ronald Reagan, discurso de campanha eleitoral, 1980)

*Nada é mais digno de nosso patrocínio que o fomento da ciência e da literatura. O conhecimento é, em todo e qualquer país, a base mais segura da felicidade pública.*  
(George Washington, discurso no Congresso, 8 de janeiro de 1790)

## RESUMO

A paracoccidiodomicose (PCM) é uma grave doença granulomatosa sistêmica, endêmica da região latino-americana, causada por fungos termodimórficos do complexo *Paracoccidioides brasiliensis* e *P. lutzii*. A imunidade protetora é mediada por macrófagos e citocinas produzidas por linfócitos Th1 e Th17. A PCM é caracterizada pelo infiltrado inflamatório de polimorfonucleares neutrófilos (PMNs), que combatem os fungos via produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e citocinas pró-inflamatórias. Já foi relatado que a estimulação dos PMNs com LASER de baixa potência (LLLT) aumentou a capacidade fungicida dessas células contra *Candida albicans* e *P. brasiliensis*. No entanto, ainda não está estabelecido onde e como a LLLT atua. Dentro deste contexto foram avaliadas a geração de espécies oxidantes totais e peróxido de hidrogênio, atividade da enzima catalase, produção de citocinas, geração de proteínas e capacidade fungicida de PMN maduros, oriundos dos exsudatos de bolsa de ar subcutânea de camundongos infectados com a cepa virulenta Pb18 de *P. brasiliensis* e cultivados *ex vivo* e *in vitro*. Os PMNs tratados com LLLT apresentaram maior viabilidade celular, produção de espécies oxidantes totais, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, atividade de catalase e produção de proteínas; assim como, aumento da expressão citocinas pró-inflamatórias e diminuição das anti-inflamatórias. Os PMNs irradiados também apresentaram aumento na capacidade fungicida. Os resultados sugerem que a LLLT pode aumentar o metabolismo dos PMN, tornando essas células mais competentes em sua atividade antifúngica, assim como modular a expressão de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias.

Palavras-chave: Paracoccidiodomicose. “LASER”. Neutrófilos. *Paracoccidioides brasiliensis*.

## ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a severe systemic granulomatous disease, endemic to the Latin American region, caused by thermomorphogenic fungi of the *Paracoccidioides brasiliensis* complex and *P. lutzii*. Protective immunity is mediated by macrophages and cytokines produced by Th1 and Th17 lymphocytes. PCM is characterized by the inflammatory infiltrate of polymorphonuclear neutrophils (PMNs), which fights fungi via production of reactive oxygen species (ROS) and pro-inflammatory cytokines. It has been reported that the stimulation of PMNs with low potency LASER (LLLT) increased the fungicidal capacity of these cells against *Candida albicans* and *P. brasiliensis*. However, it is not yet established where and how LLLT operates. Within context were evaluated, the generation of total oxidizing species and hydrogen peroxide, catalase enzyme activity, cytokine production, protein generation and fungicidal capacity of mature PMNs from subcutaneous air pouch exudates from mice infected with the virulent strain Pb18 of *P. brasiliensis* and cultivated *ex vivo* and *in vitro*. PMNs treated with LLLT dissipate greater cell viability, production of total oxidizing species, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, catalase activity and protein production; as well as an increase in the expression of pro-inflammatory cytokines and a decrease in anti-inflammatory ones. Irradiated PMNs also increase the fungicide's capacity. The results obtained suggest that LLLT can increase PMN metabolism, making these cells more competent in their antifungal activity, as well as modulating the expression of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines.

Keywords: Paracoccidioidomycosis. "LASER". Neutrophils. *Paracoccidioides brasiliensis*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação filogenética do gênero <i>Paracoccidioides</i> baseada em sequências parciais do gene gp43.....	13
Figura 2 - Fagocitose e produção de EROs via NADPH oxidase por neutrófilos.....	27
Figura 3 - Imunopatologia da PCM. ....	34
Figura 4 - Onda eletromagnética. Fisicamente a luz é um tipo de onda eletromagnética.....	42
Figura 6 - Espectro da Radiação Eletromagnética. ....	43
Figura 5 - Comprimento de onda, correspondente à distância entre duas cristas de uma onda eletromagnética. ....	43
Figura 7 - Emissão Espontânea.....	44
Figura 8 - Componentes básicos de um LASER. ....	45
Figura 9 - Tipos de interação do LASER com os tecidos. ....	46
Figura 10 - Mecanismos celulares de LLLT. ....	49
Figura 11 - Experimentos <i>ex vivo</i> . ....	59
Figura 12 - Experimento <i>in vitro</i> . ....	60
Figura 13 - Experimentos de padronização. ....	62
Figura 14 - Aspecto interno da infecção pela cepa Pb18 de <i>P. brasiliensis</i> ....	63
Figura 15 - Efeito de LLLT sobre o número absoluto de células.....	65
Figura 16 - Efeito de LLLT na produção de espécies reativos de oxigênio de PMNs. ....	67
Figura 17 - Efeito de LLLT sobre a produção de peróxido de hidrogênio de PMNs.....	68
Figura 18 - Efeitos de LLLT sobre a produção da enzima catalase (CAT) por PMNs. ....	70
Figura 19 - Efeito de LLLT na produção de Óxido Nítrico por PMNs ....	71
Figura 20 – Produção de Proteínas. ....	72
Figura 21 - Efeito de LLLT sobre a produção de citocinas por PMNs.....	73
Figura 22 - Efeito de LLLT sobre a produção de citocinas por PMNs.....	73
Figura 23 - Efeito de LLLT sobre o número de células fúngicas viáveis. ....	73
Figura 24 - Efeito de LLLT na atividade antifúngica de PMNs.....	73
Figura 25 - Mecanismo de ação proposto de LLLT sobre os neutrófilos. ....	73

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>11</b>
1.1	ETIOLOGIA.....	11
1.2	ASPECTOS ECOLÓGICOS.....	14
1.3	EPIDEMIOLOGIA.....	15
1.4	INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO E PATOGÊNESE.....	16
<b>1.4.1</b>	<b>Adesão.....</b>	<b>17</b>
<b>1.4.2</b>	<b>Invasão celular.....</b>	<b>19</b>
<b>1.4.3</b>	<b>Apoptose.....</b>	<b>20</b>
<b>1.5</b>	<b>MODELO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>20</b>
<b>1.6</b>	<b>ASPECTOS IMUNOLÓGICOS.....</b>	<b>21</b>
<b>1.6.1</b>	<b>Imunidade inata.....</b>	<b>22</b>
16.1.1	Padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs).....	22
1.6.1.2	Receptores Reconhedores de Padrões (PRRs).....	22
1.6.1.3	Neutrófilos.....	23
<i>1.6.1.3.1</i>	<i>Fagocitose.....</i>	<i>24</i>
1.6.1.4	Células Natural Killer.....	28
1.6.1.5	Macrófagos.....	28
<b>1.6.2</b>	<b>Interface entre Imunidade Inata e Adaptativa.....</b>	<b>29</b>
1.6.2.1	Células Epiteliais.....	29
1.6.2.2	Células Dendríticas.....	30
1.6.2.3	Macrófagos.....	31
<b>1.6.3</b>	<b>Imunidade Adaptativa.....</b>	<b>31</b>
1.6.3.1	Linfócitos B.....	31
1.6.3.2	Linfócitos T.....	32
1.7	MECANISMOS DE ESCAPE.....	35
1.8	TRATAMENTO.....	36
<b>1.8.1</b>	<b>Derivados das sulfonamidas.....</b>	<b>37</b>
<b>1.8.2</b>	<b>Azóis.....</b>	<b>38</b>
<b>1.8.3</b>	<b>Terbinafina.....</b>	<b>39</b>
<b>1.8.4</b>	<b>Anfotericina B.....</b>	<b>39</b>
<b>1.8.5</b>	<b>Anfotericina Lipossomal.....</b>	<b>40</b>
<b>2</b>	<b>TERAPIA LASER DE BAIXA POTÊNCIA / FOTOBIMODULAÇÃO (LLLT).....</b>	<b>40</b>
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>50</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>51</b>
4.1	OBJETIVOS GERAIS.....	51
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	51
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>52</b>
5.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	52
5.2	ANIMAIS.....	52
5.3	ISOLADO DE <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .....	52
5.4	PREPARAÇÃO DE SUSPENSÕES DE <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> PARA INFECÇÃO DOS CAMUNDONGOS.....	52
5.5	INDUÇÃO DE BOLSA AR SUBCUTÂNEA.....	53
5.6	IRRADIAÇÃO DE NEUTRÓFILOS COM LASER NOS EXPERIMENTOS <i>EX VIVO</i> E <i>IN VITRO</i> .....	53
5.7	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	53

5.8	OBTENÇÃO DE CÉLULAS DE BOLSA DE AR SUBCUTÂNEA.....	54
5.9	CULTIVO DE CÉLULAS DE BOLSA DE AR SUBCUTÂNEA...	54
5.10	QUANTIFICAÇÃO DE <i>P. brasiliensis</i> VIÁVEIS.....	55
5.11	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE DESIDROGENASES MITOCONDRIAIS PELO MÉTODO MTT.....	56
5.12	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	56
5.13	ENSAIO DE QUIMIOLUMINESCÊNCIA.....	56
5.14	QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	56
5.15	QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DA ENZIMA CATALASE (CAT).....	57
5.16	DOSAGEM DOS NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO (NO).....	57
5.17	QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS.....	58
5.18	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIFÚNGICA DE PMNS CONTRA <i>P. brasiliensis</i> .....	58
5.19	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	58
5.20	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	59
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
6.1	PADRONIZAÇÃO DA IRRADIAÇÃO DE LLLT <i>IN VITRO</i> .....	61
6.2	VIABILIDADE CELULAR DOS PMNS.....	63
6.3	PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs).....	66
6.4	DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	67
6.5	NÍVEIS DA ENZIMA CATALASE (CAT).....	69
6.6	PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO).....	70
6.7	PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS.....	71
6.8	PRODUÇÃO DE CITOCINAS.....	73
6.9	QUANTIFICAÇÃO DE <i>P. brasiliensis</i> VIÁVEIS.....	77
6.10	CAPACIDADE ANTIFÚNGICA DE PMNS CONTRA <i>P. brasiliensis</i> .....	79
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>81</b>
<b>8</b>	<b>MECANISMO PROPOSTO.....</b>	<b>83</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>84</b>

# 1 REFERENCIAL TEÓRICO

## 1.1 ETIOLOGIA

A paracoccidioidomicose (PCM) caracteriza-se como uma doença granulomatosa causada por fungos termodimórficos, pertencente ao gênero *Paracoccidioides* (SANTOS JUNIOR *et al.*, 2020). É uma doença endêmica da América Latina, com grande prevalência em países da América do Sul, como Brasil, Venezuela, Colômbia e Argentina (MARTINEZ, 2015). A enfermidade foi descrita pela primeira vez em 1908 por Adolfo Lutz, que isolou o agente etiológico de lesões orais oriundas de seus pacientes (LUTZ, 1908).

Taxonomicamente os agentes etiológicos da PCM são pertencentes ao reino *Fungi*, filo *Eumycota*, subdivisão *Deutromycotina*, classe *Eurotiomycetes*, ordem *Onygenales*, família *Ajellomycetaceas*, gênero *Paracoccidioides*, o qual é constituído de duas espécies *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii* (BURGER, 2021). A espécie *Paracoccidioides brasiliensis* abriga um complexo de pelo menos quatro espécies crípticas (S1, PS2, PS3 e PS4, Figura 1) (BOCCA *et al.*, 2013).

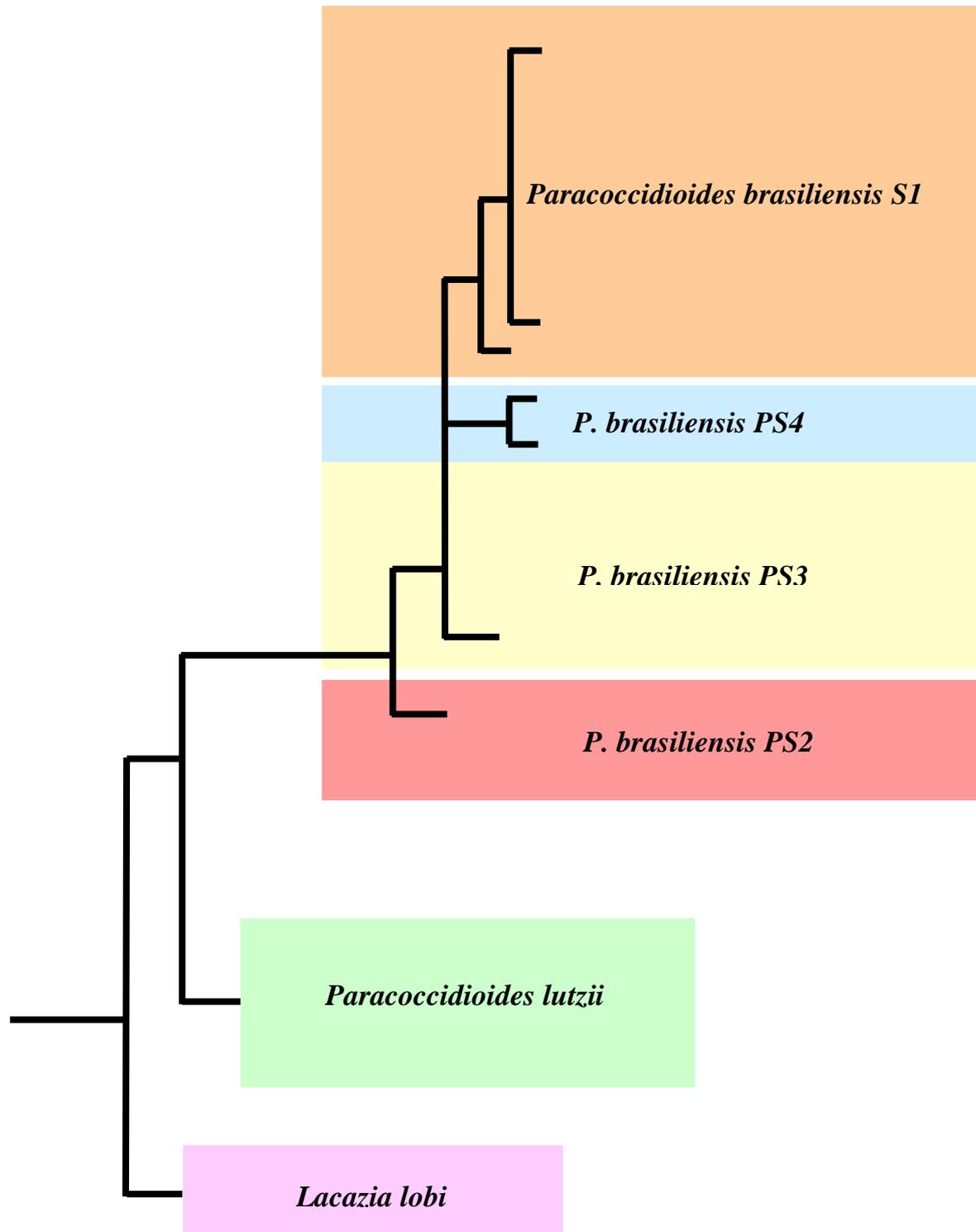
*P. brasiliensis* foi considerada uma espécie única desde sua descoberta, entretanto análises morfológicas e moleculares sustentaram a necessidade da divisão de *P. brasiliensis* em duas espécies (DE MELO TEIXEIRA *et al.*, 2014; TEIXEIRA *et al.*, 2009). Atualmente a PCM possui como agentes etiológicos fungos pertencentes ao gênero *Paracoccidioides*: Complexo *P. brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii* (DO AMARAL *et al.*, 2019). Após a análises de DNA mitocondrial, morfologia dos conídios e leveduras de 65 isolados de *P. brasiliensis*, foi proposta uma nova classificação taxonômica para o complexo *P. brasiliensis* englobando os grupos genéticos *P. brasiliensis* (S1), *P. americana* (PS2), *P. restrepiensis* (PS3), *P. venezuelensis* (PS4), sugerindo que eles sejam considerados como espécies distintas (TURISSINI *et al.*, 2017) 2017).

*P. brasiliensis* S1 representa uma população monofilética e recombinante amplamente distribuída na América do Sul sendo associada com a maioria dos casos de PCM detectados atualmente (TEIXEIRA *et al.*, 2014). Já PS2 é encontrada somente no Brasil e Venezuela, e PS3 foi isolada de humanos e animais pertencentes à família *Dasypodidae* em regiões endêmicas da Colômbia (MATUTE *et al.*, 2006). A PS4 compõe uma população monofilética de isolados clínicos da Venezuela (SALGADO-SALAZAR *et al.*, 2010; THEODORO *et al.*, 2012). *P. lutzii* compreende uma população monofilética e recombinante encontrada nas regiões centro

oeste, sudeste e norte do Brasil, assim como no Equador (DE MELO TEIXEIRA *et al.*, 2014; THEODORO *et al.*, 2012).

Os fungos do gênero *Paracoccidioides* são termodimórficos, podendo ser cultivados como micélios a 25 °C e em sua conformação leveduriforme a 37 °C. A forma micelial caracteriza-se inicialmente por colônias esbranquiçadas, que ganham aspecto aveludado e coloração acastanhada com o passar do tempo. Microscopicamente as estruturas leveduriformes variam em tamanho e forma, passando da conformação oval, esférica até elíptica, e com paredes birrefringentes. Nota-se a presença de células mães, variando de 20 a 30µm de diâmetro, capazes de produzirem de 10 a 12 células filhas, com 2 a 10µm, formando a conformação característica de *leme de navio*. Já quando a célula mãe se encontra unida com duas células filhas, nomeia-se essa conformação de *Mickey-mouse* (MENDES *et al.*, 2017).

Figura 1- Representação filogenética do gênero *Paracoccidioides* baseada em sequências parciais do gene gp43.



Fonte: Adaptado de Bocca *et al.* (2013).

## 1.2 ASPECTOS ECOLÓGICOS

A despeito dos importantes avanços no conhecimento da biologia dos agentes etiológicos da PCM, pouco ainda se sabe sobre aspectos ecológicos da biologia desses fungos (MENDES *et al.*, 2017). Animais pertencentes à família *Dasypodidae*, popularmente conhecidos como tatus, desempenham um papel importante como hospedeiros de *P. brasiliensis* e na identificação de áreas endêmicas para PCM, dado que o fungo é frequentemente isolado em diversas espécies de tatus, com destaque para *Dasyopus novemcinctus* e *Cabassous centralis* (BAGAGLI *et al.*, 2003; CORREDOR *et al.*, 2005). O ambiente representado pelas tocas dos tatus e seus arredores, associados com fatores bióticos e abióticos, podem contribuir para o desenvolvimento da fase sapróbica do fungo na natureza (TERÇARIOLI *et al.*, 2007). *P. lutzii* ainda não foi isolado de tecidos de tatus, entretanto essa espécie, assim como *P. brasiliensis*, foram molecularmente detectados em amostras de solo e aerossóis obtidas de habitats de tatus (ARANTES *et al.*, 2016).

*P. brasiliensis*, *P. lutzii* e outros fungos da ordem *Onygenales*, como *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* e *Coccidioides immitis* coevoluiram com hospedeiros animais a milhares de anos, se adaptando a dois nichos ecológicos distintos: ambientes ricos em matéria orgânica e tecidos vivos de hospedeiros animais (BAGAGLI *et al.*, 2006, 2008). Essa coevolução com hospedeiros animais pode ter induzido alterações genéticas nesses patógenos, levando a uma maior adaptação a um estilo de vida biotrófico e significativa redução das suas formas sapróbicas, sendo relativamente transitórias e ocorrem sob condições ambientais específicas, como áreas abaixo da superfície do solo, tocas e outros habitats similares (BAGAGLI *et al.*, 2008).

Diversas condições climáticas estão associadas a uma maior incidência de casos de PCM, tais como, precipitação, umidade absoluta e relativa do ar, capacidade de armazenamento de água do solo e Índice de Oscilação Sul -*Southern Oscillation Index* (SOI)- (La Niña e El Niño). A ocorrência de El Niño Oscilação Sul (ENSO) predispõem a um maior índice pluviométrico, gerando um maior estoque de água no solo, assim como uma elevação da umidade relativa do ar (BARROZO *et al.*, 2010, 2009).

Algumas evidências sugerem que *P. brasiliensis* cresce preferencialmente entre 2 e 20 cm abaixo da superfície do solo, uma condição que protege de competidores, abundantes nas camadas mais superficiais (BARROZO *et al.*, 2009). A atividade agrícola humana tende a remover as camadas mais superficiais do solo, expondo a forma filamentosa do fungo, que em

condições de umidade do ar elevada podem ser aerossolizadas, gerando uma maior probabilidade de transmissão (MENDES *et al.*, 2017)

### 1.3 EPIDEMIOLOGIA

Cerca de 80% de todos os casos de PCM ocorrem em território brasileiro e os 20% restantes encontram-se distribuídos em países da América do Sul, principalmente na Colômbia, Venezuela, Argentina e Equador (BRUMMER *et al.*, 1993; MARTINEZ, 2017). No período de 1996 a 2006 foram registrados um total de 168 mortes pela doença no Brasil (PRADO *et al.*, 2009). Baseado na taxa de letalidade de 3% a 5% dessa doença, o número de casos de paracoccidiodomicose no Brasil é estimado entre 3360 a 5600 por ano (MARTINEZ, 2017).

A incidência anual da PCM em São Paulo é de 0,96, 0,90 no Rio de Janeiro e em Santa Maria (Rio Grande do Sul) para cada 100.000 habitantes (MARTINEZ, 2015). Na região Norte do Brasil, no estado de Rondônia, a incidência média da doença foi de 9,4/100.000 habitantes por ano. No período de 1970 a 1999, na Colômbia registrou-se a incidência de 0,5 a 2,2 casos/100.000 habitantes por ano (CALLE *et al.*, 2001). Na Argentina a média de número de casos anuais foi de 110,0; 25,9 na Venezuela, 15,1 no Ecuador, 5,0 no Paraguai, 3,3 no Peru, 3,1 no México e 1,1 no Uruguai (BURSTEIN ALVA, 2002; LÓPEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2014; MARTINEZ, 2017).

Um total de 1.853 mortes por PCM foram registradas no Brasil entre 1986 e 2006, representando 51% do total do número de mortes por infecções fúngicas (PRADO *et al.*, 2009). Durante o período de 1980 a 1995, a média anual do índice de mortalidade por milhão de habitantes foi de 2,0 na região Nordeste, 2,59 na região Sul, e de 2002 a 2004 foi de 0,20 no Nordeste e 2,10 no Centro-oeste (BITTENCOURT; DE OLIVEIRA; COUTINHO, 2005; COUTINHO *et al.*, 2002; PRADO *et al.*, 2009).

Fatores como resposta imune do hospedeiro, genética, características demográficas, condições e estilo de vida influenciam na progressão da PCM (MARTINEZ, 2017). Em relação ao gênero sabemos que mulheres, apesar de serem infectadas tanto quanto homens, são menos propensas a desenvolverem a doença (RESTREPO *et al.*, 1968). Tal fato pode ser atribuído aos elevados níveis de estrógenos circulantes, capazes de inibir a transição do conídio para levedura e modular a resposta imune celular contra patógenos fúngicos (SHANKAR *et al.*, 2011). A grande proporção de homens exercendo atividade agrícolas em áreas endêmicas também explica a predominância da doença em indivíduos do sexo masculino (BITTENCOURT; DE OLIVEIRA; COUTINHO, 2005).

A doença pode ser observada em ampla variedade de faixas etárias, variando de crianças de dois anos até idosos, entretanto a maioria dos acometidos apresenta idade entre 30 e 60 anos (MATOS *et al.*, 2012). O background genético de indivíduos e populações vivendo em diferentes áreas endêmicas pode estar relacionado com a progressão e a forma clínica da doença, como mostram os estudos de De Messias *et al.* (1991) e Matos *et al.*, (2012). Pacientes de PCM apresentam elevadas proporções de antígenos HLA-A9 e HLA-B13 e C4B\*-Q0 de classe III do Complexo Maior de Histocompatibilidade associados a forma crônica da patologia (DE MESSIAS *et al.*, 1991). Indivíduos com a forma crônica multifocal apresentam maior frequência do genótipo IL12RB1 641AA, responsável pela codificação da citocina IL-1 (CARVALHO *et al.*, 2016).

A maioria de pacientes acometidos pela PCM, em áreas endêmicas, relata contato recente com ambiente rural, que seja devido a sua profissão ou local de residência (MARTINEZ, 2015). A paracoccidiodomicose é pode ser considerada uma doença ocupacional de fazendeiros e outras profissões que são expostas a aerossóis oriundos de solo contaminado (BITTENCOURT; DE OLIVEIRA; COUTINHO, 2005). Trabalhar em plantações de café e tabaco está associado com maior risco de adquirir a PCM (BELLISSIMO-RODRIGUES; MACHADO; MARTINEZ, 2011).

Neoplasias, tuberculose, Doença de Chagas, leishmaniose, leptospirose, estrogiloidíase (BELLISSIMO-RODRIGUES; MACHADO; MARTINEZ, 2011) e COVID-19 (de MACEDO *et al.*, 2020) podem ser mais frequentes em indivíduos acometidos pela PCM, ocorrendo antes, depois ou simultaneamente com a micose. Em áreas endêmicas do Brasil, cerca de 1,5% dos pacientes de AIDS apresentam a forma oportunista da doença, geralmente com lesões disseminadas (LORO MOREJÓN; MACHADO; MARTINEZ, 2009; PANIAGO *et al.*, 2005).

#### 1.4 INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO E PATOGÊNESE

A interação hospedeiro fungo é um evento complexo em que o hospedeiro está sob pressão para desenvolver resistência enquanto o parasita luta para evadir e adaptar-se à resposta imune do hospedeiro (SIRONI *et al.*, 2015).

Os pulmões constituem-se na principal porta de entrada de *Paracoccidioides* sp. no corpo de seus hospedeiros (MARTINEZ, 2017). Os esporos atingem os bronquíolos terminais e os alvéolos, promovendo um quadro de pneumonite (polo parenquimal da PCM) e se espalham via linfática para os linfonodos paratraqueais e parabronquial (polo linfoide da PCM), onde tem início a reação granulomatosa (SEVERO *et al.*, 1979a). As alterações do polo linfoide com as

do polo parênquimal, constituem complexo primário da PCM, similar a tuberculose (GÓES *et al.*, 2014).

A resposta imune do hospedeiro determina a progressão da interação entre parasita e hospedeiro, quando essa resposta é satisfatória, o organismo bloqueia a infecção ao nível do complexo primário, onde o paciente apresenta apenas infecção, detectável via reação intradérmica positiva a paracoccidiodina (MENDES *et al.*, 2017). Dependendo do equilíbrio entre hospedeiro, parasita e ambiente, o fungo pode permanecer latente por anos, entretanto qualquer desequilíbrio entre esses fatores pode resultar em reativação do foco latente (MOREIRA, 2008).

Ocasionalmente, os fungos contidos no complexo primário podem se disseminar via corrente sanguínea e/ou linfática, atingindo outros órgãos, causando a forma juvenil ou aguda (SEVERO *et al.*, 1979b). Já em outros indivíduos o complexo primário apresenta fungos viáveis, denominados lesões quiescentes, que podem evoluir para a forma crônica da doença muitos anos após a infecção (FRANCO, 1987).

#### 1.4.1 Adesão

O epitélio respiratório representa o sítio primário de contato entre os fungos e o hospedeiro (MENDES *et al.*, 2017). Nesse local o patógeno utiliza mecanismos, como a adesão às células do hospedeiro, para evitar o seu aprisionamento e eliminação pelo muco produzido pelas células ciliadas do epitélio do trato respiratório (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015a). Portanto, um processo de adesão efetivo contribui para uma maior velocidade de invasão da célula hospedeira, permitindo a evasão da resposta imune, o estabelecimento da infecção e o surgimento das manifestações clínicas características da PCM (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015b; SINGER-VERMES *et al.*, 1993). *P. brasiliensis* também consegue formar biofilmes *in vitro*, fato que promove a proteção do patógeno contra a ação de alguns medicamentos e do sistema imunológico do hospedeiro (SARDI *et al.*, 2015).

*Paracoccidioides* spp. reconhece várias moléculas constituintes da matriz extracelular (MEC) do hospedeiro (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015a). A MEC pulmonar é composta por colágeno, fibras de elastina, glicosaminoglicanos (GAGS), proteoglicanos (PG), fibronectina, laminina, sulfato de heparana, entactina/nidogênio, hialuronato, sulfato de condroitina, e colágenos dos subtipos I, III, IV e V, assim como trombospondina, tenascina X e tenascina-C (BALESTRINI; NIKLASON, 2015). Tais compostos atuam como substrato para a fixação de microrganismos colonizadores (CHAGNOT *et al.*, 2012). *P. brasiliensis* pode se aderir mais a

fibronectina quando comparado a *P. lutzii*, que apresenta maior afinidade pelos colágenos do tipo I e IV (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015b).

Os agentes etiológicos da PCM conseguem sintetizar várias moléculas, conhecidas como adesinas de superfície, envolvidas, direta ou indiretamente, na interação com o hospedeiro e na formação de biofilmes *in vitro* (HERNÁNDEZ *et al.*, 2010; SARDI *et al.*, 2015). Diversas adesinas de *Paracoccidioides spp.* apresentam um papel multifuncional, participando em vias metabólicas, da composição da parede celular dos fungos e também na mediação do processo de adesão desses fungos (KARKOWSKA-KULETA; KOZIK, 2014). Estas adesinas, com outras moléculas importantes para o metabolismo fúngico, podem ser transportadas por vesículas extracelulares (VALLEJO *et al.*, 2011). Essas estruturas podem interferir na expressão gênica dos fungos e de seus hospedeiros, modulando a interação patógeno-hospedeiro, dado que foi encontrado RNA no interior de vesículas secretadas por *Paracoccidioides spp.* (VALLEJO *et al.*, 2012).

A gp43 foi a primeira adesina de *P. brasiliensis* descrita, e ela se liga a laminina e fibronectina da MEC (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015a). Outra adesina encontrada em *Paracoccidioides spp.* é a PbHAD32, uma hidrolase com 32 kDa, isoladas de extratos da parede celular das formas miceliais e leveduriforme, essa proteína pode se ligar a laminina, fibronectina e fibrinogênio atuando na fase inicial do processo de adesão de *Paracoccidioides spp.* (HERNÁNDEZ *et al.*, 2012). Uma proteína de 30 KDa, denominada Pb14-3-3 localizada na parede celular de *P. brasiliensis*, também atua como adesina se ligando a laminina da MEC de células epiteliais pulmonares (ANDREOTTI *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2015)

Um estudo conduzido por Donofrio *et al.*, 2009 identificou em *P. brasiliensis* uma adesina ligadora de fibronectina, de 54 kDa, denominada PbEno, que atua como enzima glicolítica e se liga a laminina, colágenos tipo I e IV, plasminogênio e fibrinogênio (MARCOS *et al.*, 2012). Tirosinafosfato isomerase (TPI) é uma enzima glicolítica, localizada no citoplasma e na parede celular da fase leveduriforme de *P. brasiliensis* capaz de atuar como adesina (DA FONSECA *et al.*, 2001). Outra importante adesina encontrada na parede de *Paracoccidioides spp.* é a PbMLS, capaz de se ligar a fibronectina e colágeno dos tipos I e IV. Essa adesina é capaz de atuar com outras moléculas de adesão como a enolase e TPI aumentando a capacidade de adesão do patógeno às células do hospedeiro.

Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é uma importante proteína da via glicolítica, que também pode atuar como fator de virulência para alguns patógenos, incluindo fungos (KARKOWSKA-KULETA; KOZIK, 2014). Em *P. brasiliensis*, GAPDH tem sua expressão aumentada durante a transição de micélio para levedura e foi encontrada na parede

de vesículas extracelulares (BARBOSA *et al.*, 2004; 2006; LONGO *et al.*, 2014). Essa adesina pode se ligar a componentes da MEC do hospedeiro como a laminina, fibronectina e colágeno do tipo I (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015a). Outra proteína envolvida na adesão celular e invasão tecidual é a frutose 1,6 bifosfato aldose (ALD) que interage com o plasminogênio (CHAVES *et al.*, 2015).

Em ensaios realizados por de OLIVEIRA *et al.*, 2015b, sobre a expressão de genes para diferentes adesinas (14-3-3, ENO, gp43, MLS, GAPDH e TPI) em camundongos infectados com *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, ficou evidenciado que *P. brasiliensis* expressa um maior nível de adesinas do que *P. lutzii*. Adicionalmente, o estudo conclui que a virulência das espécies está relacionada com suas capacidades de adesão sendo *P. brasiliensis* mais virulento do que *P. lutzii*. A adesão de *Paracoccidioides spp.* às células do hospedeiro é mediada por adesinas presentes na superfície fúngica, constituindo-se em passo fundamental para a instalação dos quadros característicos da PCM, ressaltando o papel dessas moléculas como fator de virulência de *Paracoccidioides spp.* (SANTOS *et al.*, 2020).

#### 1.4.2 Invasão celular

Para muitos patógenos, a invasão da célula do hospedeiro é crucial para o início e manutenção da infecção, e muitos desses agentes possuem um ou mais mecanismos para induzir sua própria captação pelas células do hospedeiro (MENDES-GIANNINI *et al.*, 2008). Sinais extracelulares estimulam o rearranjo do citoesqueleto no ponto de contato com o microrganismo, resultando na endocitose, fazendo com que as células se comportam como fagócitos não profissionais (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015a).

O processo de invasão por *Paracoccidioides spp.* afeta a estrutura do citoesqueleto das células epiteliais pulmonares e queratinócitos, interferindo com os aspectos morfológicos da actina, tubulina e citoqueratina. As vias de sinalização que controlam as alterações morfológicas in *P. brasiliensis*, assim como os sinais celulares relacionados à interação com as células do hospedeiro são pouco compreendidos (SOARES MENDES-GIANNINI *et al.*, 2004).

Adesinas como a gp43 e Pb14-3-3 participam do processo de invasão da célula hospedeira. Gp43 pode estar relacionada com o processo de degradação da citoqueratina acarretando perda das características filamentosas, facilitando a invasão do hospedeiro. Já a adesina Pb14-3-3 pode causar modificações estruturais nas células do hospedeiro influenciando na polimerização da citoqueratina e filamento de actina (MENDES-GIANNINI *et al.*, 2004). Outras proteínas, pertencentes à família Rho-GTPase (MENINO *et al.*, 2012), que atuam regulando a dinâmica

da organização do citoesqueleto e o fluxo de membrana em processos fisiológicos como proliferação, motilidade e crescimento, podem estar envolvidas na invasão das células do hospedeiro por *Paracoccidioides spp* (ALMEIDA *et al.*, 2009; JANNUZZI *et al.*, 2015; SINHA; YANG, 2008).

### 1.4.3 Apoptose

A apoptose é um processo de morte celular controlada, sem o derramamento de conteúdo no ambiente circundante e sem indução de resposta inflamatória (D'ARCY, 2019). A capacidade de prevenir ou evitar a apoptose é um passo crucial para a instalação de um processo infeccioso (De OLIVEIRA *et al.*, 2015a). Apoptose pode ser observada como uma resposta a uma variedade de infecções e pode ser mediada por uma variedade de determinantes de virulência codificados por patógenos (WEINRAUCH; ZYCHLINSKY, 1999).

*P. brasiliensis* é capaz de induzir apoptose de fagócitos, por tanto capaz de sobreviver no interior das células epiteliais (CACERE *et al.*, 2002). O fungo induz apoptose de macrófagos através da expressão de caspase-2, 3 e 8, mas também induz a expressão de genes que codificam proteínas inibitórias da morte celular programada, como as inibidoras de caspase-8 e Fas-L (MENDES-GIANNINI *et al.*, 2008).

O fungo também é capaz de modular a apoptose de células epiteliais pela expressão de moléculas como as Bcl-2, Bak, e caspase-3, propiciando assim, a sobrevivência e disseminação pelo organismo do hospedeiro (DEL VECCHIO *et al.*, 2009). Silva *et al.* (2015), mostrou que as adesinas 14-3-3 e gp43 também possuem forte influência no processo de apoptose.

## 1.5 MODELO EXPERIMENTAL

Modelos animais são ferramentas e recursos fundamentais para o estudo de processos biológicos básicos, toxicologia, patogênese de doenças e novas terapias (MEYERHOLZ *et al.*, 2020). O uso de modelos animais em estudos de anatomia e fisiologia humana é datado do século VI Antes da Era Comum (AEC), e vem contribuindo até a atualidade para o desenvolvimento da pesquisa biomédica. Entretanto, a translação dos modelos animais para humanos é altamente imprevisível, levantando questionamentos acerca da validade clínica e aplicações, e questões éticas (ROBINSON *et al.*, 2019).

O uso de animais é fundamental para a compreensão da interação entre fungos e hospedeiros, sendo importante considerar a espécie do modelo animal, linhagem, idade, sexo e via de

infecção. Os primeiros estudos em PCM utilizaram cobaia (porquinho-da-índia) (DE BRITO; NETTO, 1963), hamsters (IABUKI; MONTENEGRO, 1979) e coelhos (BELITARDO *et al.*, 2014), entretanto, a maioria dessas espécies só desenvolviam a doença muito tempo após a infecção, e em alguns casos, somente em condições especiais, como em acomodações com baixas temperaturas (KERR; DA COSTA; ALENCAR, 1982).

Com o passar dos anos, o modelo murino foi considerado o padrão ouro para o estudo da PCM *in vivo* (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015b). Calich *et al.* (1985) e De Oliveira *et al.* (2015) apontam que os camundongos foram classificados conforme a sua suscetibilidade à infecção por *Paracoccidioides* spp. Camundongos da linhagem A/Sn são considerados muito resistentes, C3h/He resistentes, C3H/HeB, C57B1/10, CBA, BALB/c resistência intermediária e B10.A, B10D2/oSn e B10D2/nSn são mais suscetíveis a infecção pelos fungos.

Após desafio com *P. brasiliensis* animais resistentes desenvolvem uma resposta imunológica caracterizada pela presença de macrófagos e ativação de PMNS e baixos títulos de anticorpos e altos níveis de IFN- $\gamma$ , e baixas concentrações de citocinas do tipo Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10). Já nos camundongos suscetíveis nota-se baixas concentrações de IFN- $\gamma$  e elevados níveis de citocinas do tipo 2 como IL-5 e IL-10 (KASHINO *et al.*, 2000). Adicionalmente, Calich & Kashino (1998) demonstraram que os linfócitos de animais suscetíveis produzem menos IL-5 e IL-2, sendo a primeira produzida em picos, enquanto que nos animais resistentes há uma maior geração de IL-5.

Já em relação aos fungos, Singer-Vermes *et al.* (1989) descreveram sete isolados (Pb265, IVICPb267, Pb192, IVICPb9, PbSN, Pb2052 e Pb18) quanto a sua patogenicidade e imunogenicidade, classificando-os em isolados de baixa, média e alta virulência. Nessa classificação o isolado Pb265 apresentou baixa virulência e Pb18 alta. Quando camundongos suscetíveis B10 foram infectados com o isolado Pb18 notou-se a presença de lesões disseminadas, atingindo fígado, baço, pulmões, linfonodos e coração, já os animais inoculados com Pb265 apresentaram somente comprometimento de linfonodos.

## 1.6 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS

O surgimento da doença está relacionado com alterações na interação entre patógeno, ambiente e hospedeiro (FORTES *et al.*, 2011). A síntese de antígenos pelo patógeno, como a proteína de 43 KDa gp43, estimula uma resposta imunológica complexa e multifatorial no hospedeiro (BENARD, 2008). A interação entre as moléculas de superfície dos fungos com receptores presentes na membrana e no citosol de células fagocitárias do sistema imunológico

e também nas células epiteliais do trato respiratório hospedeiro promove a ativação do que denominamos didaticamente a imunidade inata e adaptativa (ROMANI, 2011) (Figura 3).

### 1.6.1 Imunidade inata

#### 1.6.1.1 Padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs)

A composição da parede celular dos fungos se modifica conforme a morfologia, fase do crescimento e habitat desses agentes, e corresponde a maior fonte de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) sendo reconhecidos pelos receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) das células de seus hospedeiros (LATGÉ, 2010). Os três principais componentes da parede celular fúngica, encontrados em todos os fungos de importância médica, são:  $\beta$ -glucanos ( $\beta$ -(1,3) e  $\beta$ -(1,6)), polímeros de glicose; quitina, um polímero de N-acetilglucosamina, e mananas / manoproteínas, compostos por centenas de cadeias de moléculas de manose ligadas a proteínas fúngicas via ligação N- ou O- (ROMANI, 2011).

De acordo com Puccia *et al.*, (2011) a parede celular da fase leveduriforme dos fungos pertencentes ao gênero *Paracoccidioides* é composta por uma camada externa de  $\alpha$ -(1,3) glucanos (eventualmente associados com resíduos de glicose  $\alpha$ -(1,4)) em maiores quantidades do que  $\beta$ -(1,3) glucanos, que se encontram dispostos na camada mais interna subsequente, associados a cadeias laterais de  $\beta$ -(1,6) glucanos. Fibras internas de quitina são responsáveis pela manutenção do formato arredondado e galactomanas compõem a camada fibrilar externa, juntamente com as moléculas da melanina. Vesículas extracelulares (Evs) conteúdo monohexosil-ceramida transportam componentes para o meio externo a membrana celular, incluindo várias proteínas intracelulares.

#### 1.6.1.2 Receptores reconhecedores de padrões (PRRs)

Um patógeno interage inicialmente com receptores invariáveis (PRRs) encontrados principalmente nas células da resposta imune inata, mas que também estão presentes nos linfócitos, células características de resposta imune adaptativa (BURGER, 2021). Os receptores do tipo Toll-like (TLRs) foram os primeiros PRRs (POLTORAK *et al.*, 1998), e TLR-2 e TLR-4 participam no reconhecimento de PAMPs de diversos patógenos fúngicos como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus neoformans* (NETEA *et al.*, 2004).

Foi demonstrado que *Paracoccidioides* é capaz de interagir com os TLRs do tipo 1, 2,4 e 9 (BURGER, 2021). A ativação de TLR-2, TLR-4 e TLR-9 durante a infecção por *P. brasiliensis* provoca efeitos deletérios e benéficos na resposta imunológica contra os fungos. TLR-4 é utilizado para a entrada dos fungos em neutrófilos humanos sem que estes sejam eliminados (ACORCI-VALÉRIO *et al.*, 2010). Detectou-se um aumento da expressão do gene responsável pela produção IL-2, em camundongos suscetíveis infectados por *Paracoccidioides*, indicando um papel deletério desse tipo de PRRs (LOURES *et al.*, 2009). O TLR-9 apresentou um papel protetor na fase inicial da infecção por *P. brasiliensis*, camundongos TLR9<sup>-/-</sup> apresentam maior taxa de mortalidade nas primeiras 48 horas pós infecção do que os animais selvagens (MENINO *et al.*, 2013).

Dectina-1 é um PRR pertencente à família das lectinas do tipo-C, encontrado na superfície da membrana celular de neutrófilos, macrófagos e outras células do sistema imunológico que se liga especificamente a  $\beta$ -(1,3) glucanos da parede celular fúngica (ERWIG; GOW, 2016). Esses PRRs são fundamentais para a indução da resposta imune inata contra fungos, estimulando a fagocitose e produção de citocinas pró-inflamatórias (BURGER, 2021).

Dectina-1 é capaz de reconhecer *Paracoccidioides*, em associação ou isoladamente com TLRs (BONFIM; MAMONI; LIMA BLOTTA, 2009; LOURES *et al.*, 2014). Esse processo desencadeia uma série de eventos, alguns relacionados com a fase de ativação da resposta imunológica como a produção ou aumento da produção de citocinas como IL-12, IL-10, PGE2 e LTB4 em neutrófilos humanos (BALDERRAMAS *et al.*, 2014). Já outros eventos estão relacionados a fase efetora da resposta imune, e são mediados pela liberação de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-12, IL-17 e IL-10 (ROMAGNOLO *et al.*, 2018).

### 1.6.1.3 Neutrófilos

Os neutrófilos, também conhecidos como polimorfonucleares (PMNs), correspondem aos leucócitos mais abundantes no sangue humano. São produzidos na medula óssea, cerca de 10<sup>11</sup> células por dia, e sob condições de homeostase, entram na circulação, migram para os tecidos, onde exercem suas funções, e são finalmente eliminados pelos macrófagos, tudo no lapso de um dia (ROSALES, 2018). Essas células desempenham uma potente atividade antimicrobiana, através da fagocitose, desgranulação, produção de armadilhas extracelulares (NETs) e movimentação do tipo “swarming” (IRIMIA, 2020; LÄMMERMANN, 2016, LEY *et al.*, 2018; SILVESTRE-ROIG *et al.*, 2019)

O surgimento de uma resposta imune protetora contra fungos incluindo *Paracoccidioides*, é mediada por PMNs que desempenham um papel importante através da eliminação direta do fungo pela interação com outros tipos celulares modulando a resposta imune adquirida que virá em seguida (BURGER, 2021). Uma das principais características da PCM é a notável presença de neutrófilos nas lesões, mesmo nos estágios mais avançados da doença, indicando que esses fagócitos desempenham um papel central na imunidade. PINA *et al.* (2006) encontraram um aumento na carga fúngica na fase inicial da PCM após a depleção de neutrófilos.

Além de gerarem uma resposta protetora na fase inicial da infecção por *Paracoccidioides*, os PMNs produzem grandes quantidades de prostaglandina E2 e leucotrienos, minimizando a capacidade de dano celular causado por monócitos (FORTES *et al.*, 2011). Entretanto, em modelos *in vitro* de infecção por *P. brasiliensis*, essas células produzem altos níveis de IL-8, favorecendo a propagação e sobrevivência dos fungos no interior dos PMNs (ACORCI *et al.*, 2009).

Na infecção por *Paracoccidioides* spp., os PMNs desempenham um papel fundamental nos estágios iniciais da infecção (MELONI-BRUNERI *et al.*, 1996), conferindo resistência ao hospedeiro e contribuindo para o desenvolvimento de uma resposta imune mais eficaz (RESTREPO *et al.*, 1992). Essas células estão presentes nos estágios iniciais da infecção por *Paracoccidioides* em humanos e camundongos, produzindo uma resposta inflamatória no local da infecção, caracterizada pela produção de citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF e IL-15 e aumento da produção de EROS (PUERTA-ARIAS *et al.*, 2016), permitindo uma maior atividade fungicida contra o *P. brasiliensis* (RODRIGUES *et al.*, 2007).

Neutrófilos de camundongos de linhagem suscetível à infecção por *P. brasiliensis* apresentam certo grau de deficiência na eliminação do agente etiológico, produzindo menor quantidade de EROS e tendo sua capacidade fungicida diminuída quando comparada com a das células de camundongos da linhagem resistente (MELONI-BRUNERI *et al.*, 1996). Apesar do fato de os neutrófilos de indivíduos acometidos pela PCM desenvolverem certo grau de deficiência em relação a sua capacidade de debelar o fungo (DIAS *et al.*, 2008), estudos demonstram a importância dessas células na PCM experimental, visto que houve uma carga fúngica mais elevada após a depleção de neutrófilos (PINA, 2006).

#### **1.6.1.3.1. Fagocitose**

Neutrófilos, que juntamente com os macrófagos compõem o grupo dos fagócitos profissionais, são dotados com a capacidade única de fagocitar e eliminar patógenos e debris

celulares (LEE; HARRISON; GRINSTEIN, 2003). A fagocitose é um processo ativo, mediado por receptores, onde a célula internaliza uma partícula ou organismo alvo (NORDENFELT; TAPPER, 2011). Os PMNs são equipados com receptores especializados que reconhecem seus alvos, iniciando uma variedade de mecanismos degradativos que culminam na morte e eliminação de partículas fagocitadas (ALLEN, 2003; MAYADAS; CULLERE; LOWELL, 2014). Os PMNs podem engolfar tanto elementos opsonizados, quanto não opsonizados, sendo os receptores Fc $\gamma$ Rs, lectina tipo-C e os do subgrupo das integrinas  $\beta$ 2 os principais responsáveis pelo reconhecimento de opsoninas por essas células (ALLEN, 2003; ALLEN; ADEREM, 1996).

Auxiliados pelos rearranjos do citoesqueleto os neutrófilos estendem suas membranas citoplasmáticas em volta de seus alvos, iniciando um processo que eventualmente cria um vacúolo ligado a membrana denominado vacúolo fagocítico (NORDENFELT; TAPPER, 2011). O vacúolo fagocitário não possui capacidade microbicida, sendo necessário um processo de maturação, no qual ocorre a aquisição de maquinaria celular necessária para eliminação dos microrganismos e partículas internalizadas (LEE; HARRISON; GRINSTEIN, 2003). Durante o processo de maturação ocorre a fusão de grânulos pré-formados no citoplasma de neutrófilos com vacúolo fagocitário, originando o fagossomo. Esses grânulos pré-formados contêm enzimas hidrolíticas e subunidades de NADPH oxidase (NOX) que darão início aos mecanismos de “*killing*” dos microrganismos e partículas fagocitadas (MAYADAS; CULLERE; LOWELL, 2014).

A fusão das subunidades da enzima NADPH oxidase com a membrana do fagossomo inicia o processo de eliminação dos componentes fagocitados por meio da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Figura 2). A montagem de uma molécula de NADPH oxidase funcional requer a translocação induzível dos componentes da enzima (KUIJPERS; LUTTER, 2012). As subunidades, gp91<sup>phox</sup> (também conhecida como subunidade  $\beta$ ) e p22<sup>phox</sup> (subunidade  $\alpha$ ), são proteínas integrais de membrana que juntas formam uma subunidade heterodimérica denominada flavocitocromo b<sub>558</sub> (cyt b<sub>558</sub>) (PANDAY *et al.*, 2015). Na ausência de estímulos, as subunidades regulatórias multidomínios, p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> e p67<sup>phox</sup>, formam um complexo localizado no citoplasma. Sob estímulo, p47<sup>phox</sup> sofre fosforilação, e o complexo inteiro é deslocado para a membrana onde se associa com cyt b<sub>558</sub>, para formar a oxidase ativa (TOUYZ *et al.*, 2002). A ativação do complexo estimula a transferência de elétrons do substrato para o oxigênio através de um grupo prostético composto por flavina e heme. A ativação do complexo requer duas proteínas de ligação a guanina-nucleotídeo, de baixo peso molecular, denominadas Rac2 e Rap1A (DIEBOLD; BOKOCH, 2001; GRIZOT *et al.*, 2001). Rac2 encontra-se

localizada no citoplasma formando um complexo dimérico com Rho-GDI (inibidor da dissociação de guanina nucleotídeo), enquanto Rap1A é uma proteína de membrana. (GRIZOT *et al.*, 2001; TAKAHASHI *et al.*, 2013). Quando ocorre ativação, Rac2 liga-se a guanosina trifosfato (GTP) sendo direcionada para membrana juntamente com p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> e p67<sup>phox</sup> (DUSI; DONINI; ROSSI, 1996; HEYWORTH *et al.*, 1993).

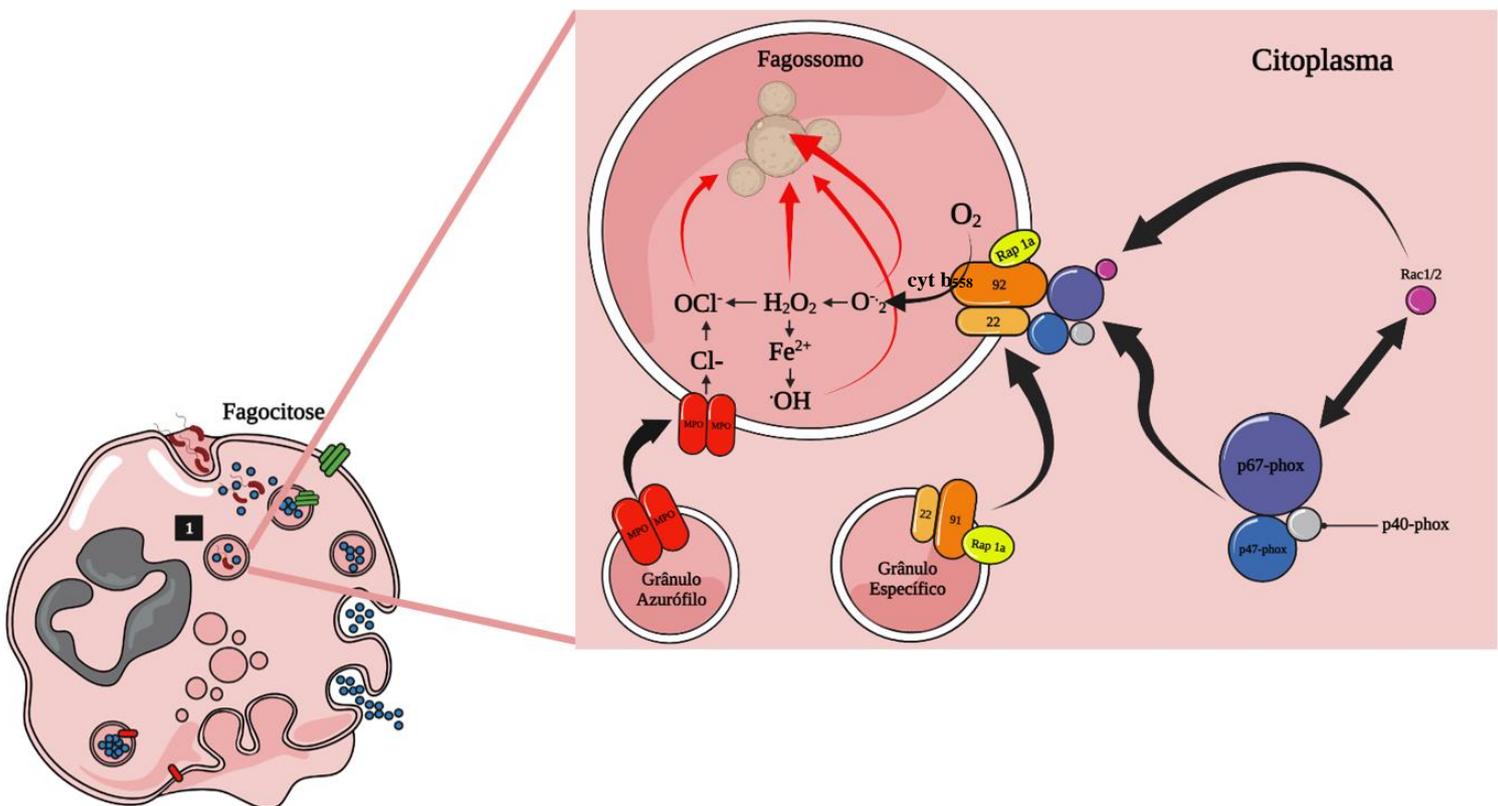
Durante a fagocitose, a membrana citoplasmática é internalizada, transformando-se na parede interior do vacúolo fagocítico. Subsequentemente, o O<sub>2</sub> é lançado no interior dessa vesícula através do complexo enzimático, e convertido em EROs que originarão uma mistura tóxica de compostos oxidantes. (FLANNAGAN; COSÍO; GRINSTEIN, 2009). A oxidase ativa transfere elétrons de NADPH citosólico para o oxigênio molecular, liberando O<sub>2</sub><sup>•</sup> no lúmen do fagossomo (QUINN; GAUSS, 2004). No interior do fagossomo, O<sub>2</sub><sup>•</sup> pode dismutar peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) gerando radical hidroxila (HO•) e oxigênio singlete (MINAKAMI; SUMIMOTO, 2006). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> também pode ser convertido pela mieloperoxidase em ácido hipocloroso e cloraminas (SHEPHERD, 1986). Coletivamente, essas moléculas derivadas do oxigênio altamente reativas, destroem microrganismos contidos no interior do fagossomo. NADPH oxidase também pode estar indiretamente envolvida na ativação de enzimas proteolíticas, através da alteração da composição iônica do fagossomo (REEVES *et al.*, 2002, 2003).

A produção de EROs não é restrita somente aos fagócitos, outras células como osteoclastos, neurônios, cardiomiócitos, fibroblastos e hepatócitos também produzem compostos oxidantes, porém em menores quantidades do que os fagócitos (PANDAY *et al.*, 2015). A geração de EROs mediada pela atividade de NADPH oxidase é crucial para a eliminação de patógenos fúngicos e bacterianos pelos neutrófilos (GAZENDAM *et al.*, 2016). Quando um dos componentes citosólicos (p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> e p67<sup>phox</sup>) ou de membrana (gp91<sup>phox</sup> e p22<sup>bhox</sup>; flavocitocromo b<sub>558</sub>) do complexo NADPH oxidase é não funcional ou está ausente ocorre uma falha na produção de EROs aumentando a susceptibilidade a infecções causadas por bactérias e fungos, essa condição caracteriza uma imunodeficiência primária denominada Doença Granulomatosa Crônica (CGD) (CAVENER, 1987; SONG *et al.*, 2011).

Sabe-se que pacientes de PCM apresentam deficiências relacionadas à capacidade fagocitária de neutrófilos (GOIHMAN-YAHR *et al.*, 1980; KURITA *et al.*, 1999). Esses trabalhos propõem que os neutrófilos desses pacientes são menos efetivos do que aqueles de indivíduos saudáveis, sugerindo que *Paracoccidioides* exerça algum efeito desativador nesta população celular. Anteriormente, MELONI-BRUNERI *et al.* (1996) encontraram em experimentos *ex vivo* que PMNs de camundongos resistentes a PCM eram mais eficientes

eliminar *Paracoccidioides* do que aqueles dos animais suscetíveis, que produziam menos EROs e maiores contagens de unidades formadoras de colônias (CFU).

Figura 2 - Fagocitose e produção de EROs via NADPH oxidase por neutrófilos.



Fonte: Adaptado de Roos *et al.* (2003).

Legenda: A montagem de uma molécula de NADPH oxidase funcional requer a translocação induzível dos componentes da enzima. As subunidades, **gp91<sup>phox</sup>** e **p22<sup>phox</sup>**, são proteínas integrais de membrana que juntas formam uma subunidade heterodimérica denominada flavocitocromo b<sub>558</sub> (cyt b<sub>558</sub>). Na ausência de estímulos, as subunidades regulatórias multidomínios, **p40<sup>phox</sup>**, **p47<sup>phox</sup>** e **p67<sup>phox</sup>**, formam um complexo localizado no citoplasma. Sob estímulo, p47<sup>phox</sup> sofre fosforilação, e o complexo inteiro é deslocado para a membrana onde se associa com **cyt b<sub>558</sub>**, para formar a oxidase ativa. A ativação do complexo requer duas proteínas de ligação a guanina-nucleotídeo, de baixo peso molecular, denominadas **Rac2** e **Rap1A**. **Rac2** encontra-se localizada no citoplasma formando um complexo dimérico com Rho-GDI, enquanto Rap1A é uma proteína de membrana. Quando ocorre ativação, **Rac2** liga-se a guanosina trifosfato (GTP) e é direcionada para membrana juntamente com **p40<sup>phox</sup>**, **p47<sup>phox</sup>** e **p67<sup>phox</sup>** dando início a explosão respiratória para combater o agente fagocitado.

#### 1.6.1.4 Células Natural Killer

Outra população celular da imunidade inata relacionada a defesa contra *Paracoccidioides* são as células Natural Killers (NK). As NK são células citotóxicas da resposta imune inata e apesar de seus mecanismos de reconhecimento se diferenciarem, seus mecanismos líticos são notavelmente similares àqueles empregados pelos linfócitos T citotóxicos da imunidade adaptativa (BURGER, 2021).

As células NK participam da resposta imune contra leveduras de *Paracoccidioides* promovendo a eliminação direta do fungo ou de células infectadas. Longhi e colaboradores (2012) demonstraram que as NK de pacientes com PCM produzem uma granulosina, um possível mediador do efeito citotóxico, capaz de eliminar as leveduras de *Paracoccidioides* de uma maneira dose dependente. Adicionalmente, esse estudo demonstrou que as NK produziram citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ), exibindo o efeito imunomodulatório dessa população celular.

#### 1.6.1.5 Macrófagos

Monócitos são membros do sistema mononuclear fagocitário, uma família de células mieloides que compreende células dendríticas (DCs), monócitos e macrófagos. Eles se originam de precursores hematológicos na medula óssea e ganham a corrente sanguínea, de onde se espalham por todo corpo (JAKUBZICK; *et al.*, 2017).

Acreditava-se que os monócitos ao migrarem para os tecidos se diferenciavam em macrófagos residentes. Entretanto, novos estudos indicam que esses macrófagos residentes se desenvolvem durante a embriogênese (HOPKINSON-WOOLLEY *et al.*, 1994). Esses macrófagos originam-se de precursores no saco vitelínico e do fígado fetal, migrando para diferentes órgãos (GINHOUX; JUNG, 2014). Uma vez nos tecidos, esses macrófagos residentes, mantêm sua população estável através da auto-renovação. Esses achados levantaram questões sobre as funções dos monócitos que são encontrados nos tecidos e sangue (JAKUBZICK; *et al.*, 2017).

Após o extravasamento no tecido infectado ou linfonodos, além de se transformarem em macrófagos, que irão fagocitar microrganismos e debris celulares, os monócitos podem se maturar em células dendríticas produtoras de TNF e iNOS (TIP-DCs), importantes para o controle e resolução de infecções microbiana (HOHL *et al.*, 2009; SHI; PAMER, 2011); essas células também podem atua na imunidade adaptativa como células apresentadoras de antígenos

(JAKUBZICK; *et al.*, 2017). Monócitos humanos ou macrófagos derivados de monócitos fagocitam de forma eficiente *Paracoccidioides*, porém são incapazes de controlar a multiplicação dos fungos (MOSCARDI-BACCHI; BRUMMER; STEVENS, 1994).

Macrófagos compõem um dos primeiros mecanismos de defesa contra a infecção por *P. brasiliensis*; assim a PCM é considerada uma doença granulomatosa clássica (PARENTE-ROCHA *et al.*, 2015). Está bem estabelecido que *Paracoccidioides* fagocitados por macrófagos podem se multiplicar no interior dessas células, exceto quando essas são ativadas por citocinas (BRUMMER *et al.*, 1989). O bloqueio funcional dessa população celular promove um aumento da severidade da PCM em camundongos resistentes e suscetíveis à doença (KASHINO *et al.*, 1995).

## 1.6.2 Interface entre Imunidade Inata e Adaptativa

### 1.6.2.1 Células Epiteliais

As células epiteliais não atuam apenas como barreiras físicas contra invasores, mas também produzem citocinas em resposta aos mais variados estímulos (PAUL; ZHU, 2010; ROMANI, 2011; ZAPH *et al.*, 2007). Essas células não são apresentadoras de antígenos profissionais, porém expressam PRRs (ROMANI, 2011), que permitem a detecção e resposta contra os mais variados estímulos. Esses estímulos ativam vias de sinalização que irão reforçar a integridade de barreira, alertar células vizinhas, promover o recrutamento de células do sistema imunológico e reparar danos (LARSEN; *et al.* 2020).

Recentemente um trabalho de Swidergall *et al.* (2018) identificou em células epiteliais o receptor EphA2, que se comporta como um PRR reconhecendo C-glucanos e mediando a imunidade protetora durante a candidíase oral. EphA2 é um membro da família dos receptores de tirosina quinase Eph (Receptores hepatocelulares produtores de eritropoietina), amplamente encontrados em células epiteliais (LINDBERG & HUNTER, 1990). Esses receptores exercem muitas funções fisiológicas nas células, incluindo a regulação da migração celular, sobrevivência e proliferação, mediação de endocitose e ativação celular (PITULESCU; ADAMS, 2010).

A ligação de *C. albicans* a EphA2 induz a ativação da via de sinalização Stat3, que estimula a expressão de moléculas inflamatórias como CCL20, CCL13 e S100A8,  $\beta$ -defensina 2 humanas, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-8. Citocinas, como IL-1 $\beta$  e IL-8, são importantes para a eliminação

de fungos e desempenham papel fundamental no recrutamento de neutrófilos e monócitos no local da infecção (DAMBUZA; BROWN, 2018).

Leveduras de *P. brasiliensis* secretam proteases que interagem com receptores presentes em células epiteliais estimulando a produção de citocinas (DE OLIVEIRA *et al.*, 2017). Receptores ativados por proteases (PARs) são expressos em diversos tipos celulares e fazem parte da família de receptores acoplados à proteína G (PAR-1, PAR-2 e PAR-4), que podem ser ativados por proteases secretadas por diversos patógenos (ADAMS *et al.*, 2011). Em trabalho realizado por De Oliveira *et al.* (2017), evidenciou-se que a interação entre *P. brasiliensis* e células epiteliais pulmonares da linhagem A549 é mediada por produtos secretados pelo fungo, os quais se ligam a PAR-1 e PAR-2 estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8.

#### 1.6.2.2 Células Dendríticas

As células dendríticas (DCs) são leucócitos sentinelas que desempenham papel fundamental na iniciação e regulação da imunidade inata e adaptativa (CABEZA-CABRERIZO *et al.*, 2021). DCs são consideradas as células apresentadoras de antígenos (APCs) mais eficientes (BANCHEREAU *et al.*, 2000; PATENTE *et al.*, 2019).

Essas células podem ser divididas em DCs residentes em tecidos linfoides e DCs migratórias não linfoides. Ambas representam populações celulares heterogêneas com diferentes subtipos que se diferenciam por marcadores fenotípicos e perfil genético (PATENTE *et al.*, 2019). No sangue, as DCs constituem uma população celular rara que pode ser amplamente dividida em dois subtipos: DCs plasmocitoides (pDC) e DCs convencionais/clássicas (cDC), essas últimas ainda podem ser separadas em cDC1 e cDC2 (O'KEEFFE; MOK; RADFORD, 2015).

As DCs determinam o destino dos linfócitos TCD4+, estimulando a diferenciação dos linfócitos naive em vários subtipos: células T regulatórias (Treg) ou T helper/auxiliares (Th1, Th2 e Th17). Esse processo de diferenciação é complexo, altamente dependente da interação com DCs e das citocinas presentes no ambiente. DCs produzem TGF- $\beta$ , IL-12, IL-4, TGF- $\beta$ +IL-6, que respectivamente estimulam a diferenciação dos linfócitos T em Treg, Th1, Th2 e Th17 (PATENTE *et al.*, 2019).

As subpopulações de DCs exercem um papel crucial na imunidade contra *Paracoccidioides*. DCs preparadas com P10, um componente derivado do antígeno gp43, estimulam uma resposta Th1, reduzindo a carga fúngica pulmonar de camundongos (SILVA *et al.*, 2017). Jannuzzi *et al.*, (2018) identificaram que a via de sinalização Notch é fundamental para a maturação e

ativação de DCs infectadas com a cepa virulenta Pb18, contribuindo para ativação da resposta mediada por células T.

### 1.6.2.3 Macrófagos

Macrófagos, além de serem altamente efetivos na fagocitose e destruição de fungos, também podem atuar como APCs, induzindo um perfil de resposta imune adaptativa capaz eliminar esses patógenos (HEUNG, 2020). Em modelo murino de criptococose crônica, monócitos podem se diferenciar em DCs mediando a geração de resposta Th1 que auxilia destruição do fungo (OSTERHOLZER *et al.*, 2009).

No modelo experimental de PCM, macrófagos obtidos de camundongos resistentes a infecção por *Paracoccidioides* expressam, de forma constante moléculas de MHC de classe II, enquanto os macrófagos de camundongos suscetíveis expressam essas moléculas de forma transitória (BURGER, 2021). Esse fenômeno é mediado pelas citocinas IL-4 e INF- $\gamma$ , a primeira induz a expressão transitória de MHC-II e a segunda a expressão sustentada, demonstrando que o padrão de produção de citocinas influencia na eficácia da apresentação de antígenos para as células T auxiliares. Onde IL-4 está relacionada com ativação do perfil Th2, predominante em animais suscetíveis, e INF- $\gamma$  com o perfil Th1, prevalente em camundongos resistentes (PERON *et al.*, 2020).

## 1.6.3 Imunidade Adaptativa

Na PCM a resposta imune adaptativa é dominada pelos linfócitos T e B, que promovem reconhecimento específico de antígenos (BURGER, 2021). Em camundongos atímicos infectados com *Paracoccidioides*, incapazes de prover um ambiente favorável para a maturação de linfócitos T, o curso da doença é mais severo, culminando em alta mortalidade quando comparados com animais eutímicos também infectados (BURGER *et al.*, 1996). O mesmo fenômeno foi observado em animais que tiveram os linfócitos B depletados (TRISTÃO *et al.*, 2013).

### 1.6.3.1 Linfócitos B

Os linfócitos B são células secretoras de anticorpos produzidos na medula óssea. O papel dos anticorpos durante as doenças infecciosas é controverso. Alguns estudos consideram que a

imunidade humoral é fundamental para a neutralização de toxinas e possuem um papel protetor contra a maioria das bactérias, vírus, parasitas e fungos conhecidos, como *Candida sp.* e *Cryptococcus neoformans* (HALL *et al.*, 2003; KAGAYA; *et al.*, 1981). No entanto, existem evidências sugerindo que essas moléculas também podem desempenhar um papel deletério em algumas infecções.

A produção de altos níveis de anticorpos contra *P. brasiliensis* é geralmente associada com a forma severa da PCM em seres humanos (DE ALMEIDA *et al.*, 1998). Linfócitos B da subclasse B-1, estão associados com a progressão da PCM experimental, acarretando aumento da mortalidade de camundongos infectados pelo fungo (POPI *et al.*, 2008).

Por outro lado, um estudo utilizando anticorpos monoclonais contra a glicoproteína antigênica gp43, apontou uma redução na carga fúngica e diminuição inflamação pulmonar via transferência passiva (BUISSA-FILHO *et al.*, 2008). O emprego de anticorpos policlonais por Bueno *et al.*, (2016) mostrou efeito opsonizante *in vitro* em leveduras de *P. brasiliensis*, com conseqüente aumento de fagocitose, redução de carga fúngica e formação de granulomas bem organizados.

Tristão e colaboradores (2013) mostraram que camundongos knock-out para células B são mais suscetíveis do que os selvagens, apresentando maior contagem de fungos nos pulmões e lesões granulomatosas mais extensas. Já a proteção contra *P. lutzii* foi atingida através do uso de anticorpos, que estimularam o aumento da capacidade fagocítica de macrófagos e reduziram a carga pulmonar fúngica quando comparados com animais não tratados (THOMAZ *et al.*, 2014).

### 1.6.3.2 Linfócitos T

A participação das subpopulações de células T, auxiliares e citotóxicas na PCM foi estudada em pacientes e no modelo animal. A doença apresenta diversas formas clínicas cujas manifestações estão mais relacionadas ao perfil da resposta imunológica do hospedeiro do que a virulência dos fungos.

Na forma severa da doença, caracterizada pelo comprometimento de múltiplos órgãos e rápida evolução para o óbito, nota-se a perda gradual da imunidade celular específica e elevados títulos de anticorpos. Nessa apresentação clínica nota-se um predomínio da subpopulação de linfócitos TCD4+ auxiliares do tipo Th2 e Th9, que produzem citocinas como IL-4, IL-5 (Th2) e IL-9 e IL-21 (Th9) fundamentais para a proliferação de linfócitos B e diferenciação destas

células em plasmócitos secretores de anticorpos, principalmente IgE e IgG4 (DE CASTRO *et al.*, 2013).

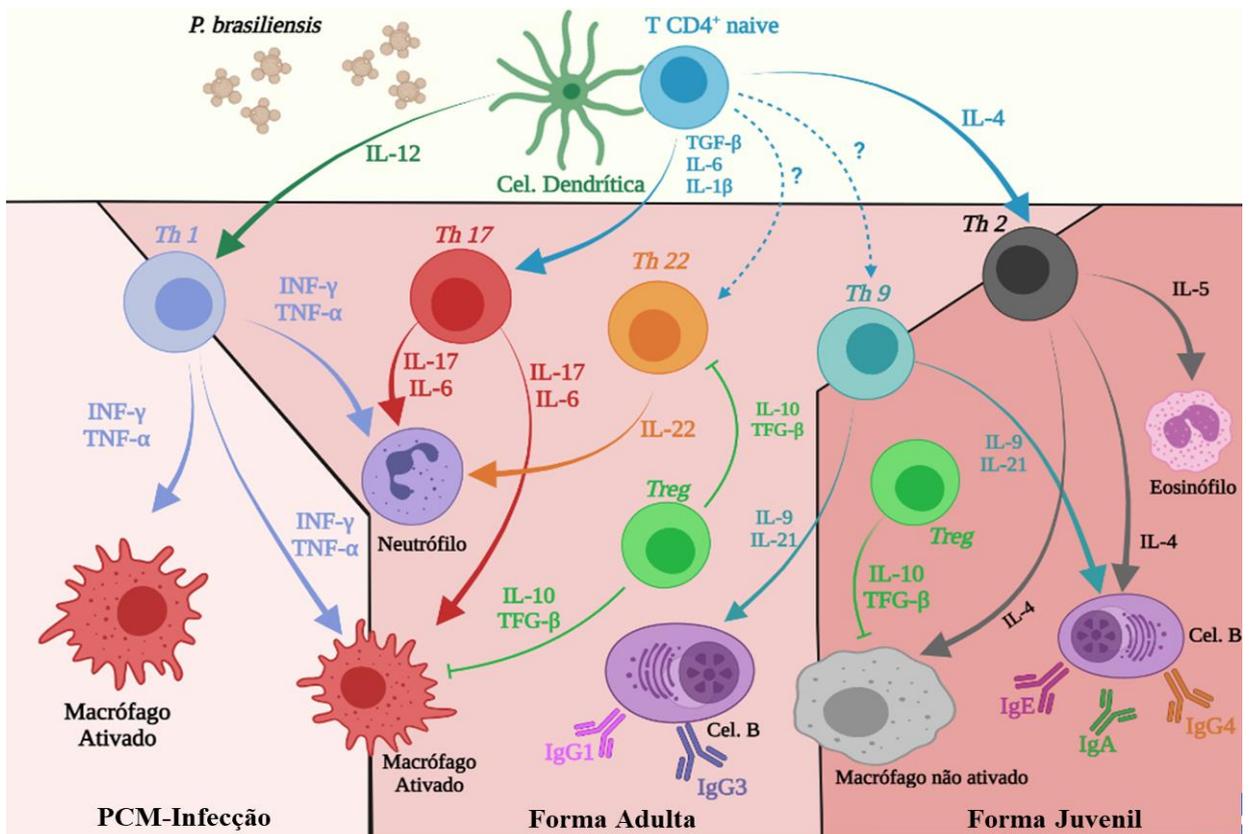
Já na forma leve da doença, onde há poucas lesões localizadas, a resposta imune celular mediada por linfócitos do tipo Th1 e Th17 é predominante e com baixos títulos de anticorpos. (62). A dominância dos perfis Th1 e Th17 está relacionada com um bom prognóstico na PCM em pacientes (DE CASTRO *et al.*, 2013) e no modelo murino (TRISTÃO *et al.*, 2017). Porém, um longo período sob predominância dos perfis Th17, e Th1 pode gerar resposta inflamatória exacerbada, com ativação de neutrófilos, que pode levar a dano tecidual e posterior fibrose (DE CASTRO *et al.*, 2013).

A resposta Th22 desempenha um papel importante na ausência da resposta Th17 e IFN $\gamma$  que são cruciais para a proteção contra infecções fúngicas (PATHAKUMARI; LIANG; LIU, 2020). As células Th22 produzem a citocina IL-22 que atua na proteção local em doenças fúngicas mucocutâneas (DE LUCA *et al.*, 2010) Em pacientes que apresentam a forma adulta/crônica da PCM a perda de função da resposta Th1 pode ser parcialmente compensada pelo desenvolvimento dos perfis Th17 e Th22, responsáveis por uma intensa resposta inflamatória de mucosas rica em neutrófilos (DE CASTRO *et al.*, 2013; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017).

A participação das células TCD8<sup>+</sup> na PCM experimental foi demonstrada por diversos trabalhos. A depleção dessa população celular, realizada por Cano *et al.*, (2000) ocasionou em uma maior carga fúngica e infecção mais severa, tanto em camundongos resistentes quanto nos suscetíveis. Jannuzzi *et al.* (2019) demonstraram que a citotoxicidade dos linfócitos TCD8<sup>+</sup> contra *Paracoccidioides* é mediada por granzimas e perforinas. Loures *et al.* (2014) também comprovam a importância dessa subpopulação de linfócitos na PCM.

As células Treg desempenharam um efeito adverso na PCM experimental, tanto na fase inicial quanto na tardia, estimulando uma infecção mais severa (FELONATO *et al.*, 2012; GALDINO *et al.*, 2018). Em pacientes acometidos pela forma adulta/crônica da doença, as células iTreg controlam a resposta inflamatória, em simultâneo, contribuem para a inibição de macrófagos ativados, fundamentais para o combate de *Paracoccidioides* (DE CASTRO *et al.*, 2013).

Figura 3 - Imunopatologia da PCM.



Fonte: Adaptado de De Castro *et al.* (2013).

Legenda: A **PCM-Infecção** pode ser caracterizada por uma resposta **Th1** predominante, responsável pela ativação de macrófagos que são importantes para a resistência a infecção. A forma Aguda ou **Juvenil**, pelo suscetível da PCM, apresenta resposta humoral predominante com ativação de **Th2** (produzindo IL-4 e IL-5) e **Th9** (produzindo IL-9 e IL-21). IL-4 e IL-9 contribuem para a produção de IgG4 e IgE pelos linfócitos B, já IL-5 estimula produção e ativação de eosinófilos. Além disso, IL-4 promove a inibição da função de macrófagos, levando a suscetibilidade a infecção. A **forma Adulta** ou crônica apresenta uma resposta mista, com predomínio das respostas **Th17** e **Th22**, mas com contribuição de Th1, Th2 e Th9. Nesse grupo a presença de Tregs pode estar relacionada com o controle da resposta inflamatória, e, em simultâneo, contribuir para a inibição da ativação de macrófagos. Essa resposta mista pode contribuir para uma resistência parcial a infecção, mas, ao mesmo tempo pode induzir uma resposta inflamatória exagerada, que pode levar ao dano tecidual e fibrose.

## 1.7 MECANISMOS DE ESCAPE

Fungos termodimórficos, como *Paracoccidioides spp.* são caracterizados por possuírem uma parede celular com estrutura e composição química distinta, que varia conforme a fase morfológica dos fungos. Enquanto a fase micelial apresenta parede celular composta basicamente por  $\beta$ -1,3-glucanos, a fase leveduriforme possui menor quantidade desse polissacarídeo, expressando elevados níveis de  $\alpha$ -1,3-glucanos (SANTOS *et al.*, 2020).

Alterações na composição da parede celular durante a infecção após a mudança morfológica é uma estratégia de sobrevivência usada por fungos dimórficos para evitar reconhecimento pelos PRRs dos fagócitos do hospedeiro. Dectina-1, um PRR presente na superfície dos fagócitos, reconhece  $\beta$ -1,3-glucanos da parede celular fúngica dando início aos processos de fagocitose, explosão respiratória (EROs) e produção de citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-12, e outras citocinas que desempenham papel fundamental na imunidade antifúngica. A alteração de  $\beta$ -1,3-glucanos para  $\alpha$ -1,3-glucanos na fase leveduriforme dificulta o reconhecimento pelo de *Paracoccidioides* pelo sistema imune (DAMBUZA; BROWN, 2015; RAPPLEYE; EISSENBERG; GOLDMAN, 2007; SAN BLAS; VERNET, 1977).

As melaninas são substâncias que possuem papel fundamental na patogênese de várias doenças fúngicas (CORDERO & CASADEVALL, 2017; PACELLI *et al.*, 2017). Esses polímeros são originários de compostos fenólicos e/ou indólicos, negativamente carregados, hidrofóbicos e com alto peso molecular. Em *Paracoccidioides spp.*, a presença da melanina foi caracterizada pela primeira vez por Gómez *et al.* (2001), a produção dessas substâncias está relacionada com a redução da capacidade fagocítica de macrófagos aumentando a resistência fúngica a ação de compostos derivados do oxigênio e óxido nítrico (CAMACHO; NIÑO-VEGA, 2017).

Algumas espécies fúngicas são dotadas da capacidade de produzir vesículas extracelulares (EVs) que se assemelham aos exossomos de mamíferos (DA SILVA *et al.*, 2016). EVs utilizam vias não canônicas de secreção, conseguindo atravessar a parede celular e transportar moléculas que desempenham funções relacionadas à aquisição de nutrientes, defesa celular e modulação da resposta imunológica do hospedeiro.

EVs de fungos do gênero *Paracoccidioides* carregam componentes altamente antigênicos com epítomos  $\alpha$ -galactopiranosil ( $\alpha$ -Gal), semelhantes àqueles encontrados nas mucinas de *Trypanosoma cruzi*, responsáveis pela produção de elevados níveis de anticorpos (VALLEJO *et al.*, 2011). Essas EVs ainda transportam algumas proteínas como superóxido dismutase, peroxirredoxina mitocondrial, tioredoxina, que estão envolvidas na homeostase de EROs,

promovendo a sobrevivência dos fungos no interior das células (VALLEJO *et al.*, 2012). Em um trabalho realizado por da Silva *et al.* (2016) EVs produzidas por *Paracoccidioides brasiliensis* podem modular a resposta imune inata e afetar a interação entre o fungo e hospedeiro.

Uma vez no interior do fagossomo de macrófagos, *Paracoccidioides* inicia uma mudança metabólica para tolerar o ambiente pobre em carbono, ativando a via da pentose fosfato, promovendo um mecanismo defensivo contra grupos sulfidríla e radicais de oxigênio, mantendo a glutatona em seu estado reduzido (RUI *et al.*, 2010). Em resposta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *Paracoccidioides* spp. apresentam uma intensa ativação de enzimas antioxidantes (catalase, citocromo c peroxidase, tiorredoxina, e superóxido dismutase) (DE ARRUDA GROSSKLAUS *et al.*, 2013).

Fungos desse gênero também possuem a capacidade de reduzir os níveis de óxido nítrico (NO) via secreção da adesina gp43, que previne a liberação de NO pelos macrófagos e estimula a produção de IL-10, conseqüentemente reduzindo a expressão de iNOS e sua atividade enzimática (POPI *et al.*, 2002). Esses fungos ainda conseguem produzir isoformas da superóxido dismutase (SOD) para controlar a homeostasia de EROs durante os vários estágios da infecção, promovendo a sobrevivência e virulência do agente (TAMAYO *et al.*, 2016).

Ferro e zinco são micronutrientes essenciais para fungos, participando como cofatores em muitos processos biológicos. Em resposta a privação de ferro *Paracoccidioides* spp., ajustar seu metabolismo para uma via independente de ferro, por meio do aumento da atividade glicolítica, compensando assim, a diminuição das vias aeróbicas (PARENTE *et al.*, 2011). Esses fungos também utilizam hemoglobina do hospedeiro e sideróforos como fonte de ferro (BAILÃO *et al.*, 2014; BAILÃO *et al.*, 2014). Outra forma de captação de ferro por esses fungos é a via da assimilação redutiva do ferro não tradicional (RIA), envolvendo a redução de ferro e homólogos de transportadores regulados por Zinco (Zrt1 e Zrt2), capazes de transportar zinco e ferro para o interior da célula fúngica (LIMA *et al.*, 2015; PARENTE *et al.*, 2013).

*Paracoccidioides* spp. também podem tolerar e superar as condições de estresse causadas pelos baixos níveis de oxigênio. *P. lutzii* produzem homólogos de SrbA, uma proteína de ligação do elemento regulador de esterol (SREBP) e reguladora chave da adaptação à hipóxia de fungos (LIMA *et al.*, 2015).

## 1.8 TRATAMENTO

A terapêutica da PCM requer uso prolongado de medicamentos antifúngicos associado a medidas para a estabilização do paciente, como o tratamento de comorbidades associadas (ex.: tuberculose, HIV) e das deficiências nutricionais. Os pacientes devem ter as funções renal e hepática avaliadas para a garantia a escolha da melhor estratégia terapêutica (COSTA & SILVA, 2014).

O consenso é que existem muitas opções terapêuticas disponíveis, incluindo derivados de sulfas (sulfadiazina, sulfadoxina, sulfametoxipiriazina, contrimazine e trimetoprim-sulfametoxazol), anfotericina B, azóis (cetoconazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol e posaconazol) e terbinafina. A escolha do tratamento deve considerar a severidade da doença (BOCCA *et al.*, 2013).

Geralmente, a duração do tratamento varia de um a dois anos e é frequentemente associado a complicações e recidivas (MENEZES *et al.*, 2006). A definição de cura nessa doença é complexa devido ao fato de muitas pacientes, mesmo após a cura clínica e micológica, manterem altos títulos anticorpos mesmo após longos períodos de terapia (DEL NEGRO *et al.*, 2000). Além disso, o tratamento tende a apresentar uma baixa taxa de adesão como demonstrado por Andrade *et al.* (2019), principalmente nos primeiros 4 meses, período em que há maior taxa de evasão.

### 1.8.1 Derivados das sulfonamidas

Esses compostos são análogos competitivos do ácido paraminobenzóico (PABA), prevenindo a utilização desse composto na síntese de ácido fólico (SHIKANAI-YASUDA, 2015), substância importante para o metabolismo de *Paracoccidioides* spp. (CHAVES *et al.*, 2021). Desde a década de 1940 muitos desses compostos foram utilizados na terapêutica da PCM, sulfadiazina, rapidamente metabolizado e excretado; sulfametoxipirimidazina, excreção lenta; e sulfadoxina de eliminação muito lenta (SHIKANAI-YASUDA, 2015).

O tratamento com compostos de rápida excreção apresentou índice de falha terapêutica de cerca de 4,3% (PEREIRA *et al.*, 2011; TRAD *et al.*, 2006). Resistência fúngica a esses compostos, dose inadequada, baixa taxa de adesão e períodos curtos de tratamento são as principais causas de recidiva da doença, que ocorre cerca de seis meses após a descontinuação do tratamento.

As vantagens das sulfonamidas estão na sua ampla distribuição pelo organismo, atingindo até o sistema nervoso central (SNC), e o baixo custo para o emprego do tratamento. Uma desvantagem é a sua posologia, a qual requer dois ou três comprimidos de 500 mg a cada seis

horas, ou 100 mg/kg/dia, para os compostos de excreção rápida. Efeitos adversos como reações de hipersensibilidade, sintomas gastrointestinais, anemia hemolítica, agranulocitopenia e cistálúria podem ocorrer em 5% dos indivíduos tratados (SHIKANAI-YASUDA, 2015).

### 1.8.2 Azóis

Os azóis são compostos químicos que inibem a biossíntese do ergosterol, um derivado do colesterol constituinte da membrana celular dos fungos (SHAFIEI *et al.*, 2020). Esse esterol é fundamental para o metabolismo desses microrganismos, principalmente no que se refere ao processo de proliferação (HU *et al.*, 2017).

Existem diversas enzimas importantes na via de biossíntese do ergosterol (REŽEN *et al.*, 2004), destacando-se o papel da CYP51 (Lanosterol-14 $\alpha$ -demetilase) pertencente à família Citocromo P450 (DESMOND & GRIBALDO, 2009). No sítio ativo dessa enzima, uma porfirina contendo ferro fornece oxigênio para a primeira reação dependente de oxigênio na biossíntese do ergosterol (KENIYA *et al.*, 2018). O domínio mais conservado dessa enzima é o bolso de ligação ao grupamento heme, local onde os compostos azólicos atuam via interação reversível não competitiva e impedem o acesso de prótons ao sítio ativo (SHAFIEI *et al.*, 2020).

Dentre os azóis empregados no tratamento da PCM destacam-se o cetoconazol, itraconazol, fluconazol e voriconazol (SHIKANAI-YASUDA, 2015). Apesar de ser empregado com sucesso no tratamento de alguns casos de PCM leve e moderada nas doses de 200 a 400 mg/dia (RESTREPO *et al.*, 1983), ele foi substituído pelo itraconazol, devido a sua pobre absorção e efeitos adversos (aumento dos níveis de aminotransferase, ginecomastia, reações de hipersensibilidade cutânea, prurido, náuseas, vômito e anorexia).

O itraconazol é indicado para o tratamento das formas leves e moderada da PCM (BOCCA *et al.*, 2013), demonstrando-se 10 a 100 vezes mais ativo contra os fungos do que o cetoconazol (NARANJO *et al.*, 1990). É considerado droga de escolha para o tratamento da PCM, sendo costumeiramente combinado com sulfametoxazol/trimetoprim (COSTA & SILVA, 2014). A meia vida do medicamento é de 17 a 21 dias, permitindo sua administração uma vez ao dia (SHIKANAI-YASUDA, 2015), com taxas de ligação a proteínas plasmáticas de 99,8%, excessivo metabolismo hepático e baixa permeabilidade a barreira hematoencefálica (ZHANG *et al.*, 2020). Na dose de 100 a 400 mg por dia de 6 a 24 meses, itraconazol foi associado com uma taxa de 91% de melhora clínica (NARANJO *et al.*, 1990). Devido aos efeitos colaterais do composto, recomenda-se a avaliação da função hepática, e quando os níveis das enzimas

triplicam em relação aos valores basais o tratamento deve ser interrompido (SHIKANAI-YASUDA, 2015).

Outro composto azólico utilizado na terapia da PCM é o fluconazol, recomendado quando os níveis séricos das enzimas hepáticas estão elevados, quando há hipersensibilidade a anfotericina B, e em quadros com acometimento do SNC. A administração nas doses de 200 a 400 mg/dia durante seis meses foi relacionada com melhora clínica de 91,8% dos pacientes. O medicamento é capaz de atingir altas concentrações no SNC, com posologia simples e possibilidade de administração oral, porém, é pouco eficaz em casos disseminados de PCM (DIAZ *et al.*, 1992; SHIKANAI-YASUDA, 2015).

Voriconazol também é efetivo para o tratamento de pacientes com as formas leve e moderada da PCM, apresentando eficácia semelhante à do itraconazol (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2007). De forma semelhante, esse medicamento pode ser utilizado em pacientes com acometimento do SNC pela micose, uma vez que possui uma melhor penetração no SNC do que outras drogas (LUTSAR *et al.*, 2003).

### 1.8.3 Terbinafina

A terbinafina é um composto pertencente ao grupo das Alilaminas (BHANDARI, 2018), que inclui a naftinina e o cloridrato de butenafina, substâncias com atividade antifúngica contra diversas espécies de fungos (MC NEELY & SPENCER, 1998; MONK & BROGDEN, 1991; RYDER, 1999). Terbinafina exerce ação antifúngica via inibição não competitiva da enzima esqualeno epoxidase (SE), que utiliza como substrato o escalo, um intermediário inicial da biossíntese do ergosterol (KRISHNAN-NATESAN, 2009).

O fármaco é contraindicado para pacientes com insuficiência hepática ou azotemia (SHIKANAI-YASUDA, 2015). Terbinafina demonstrou atividade contra *P. brasiliensis* em estudos *in vitro* (HAHN *et al.*, 2002) e em pacientes, um caso de PCM com acometimento pulmonar e lesões cutâneas na área do escroto e períneo apresentou cura clínica com o emprego da dose de 250 mg duas vezes ao dia durante seis meses (OLLAGUE *et al.*, 2000).

### 1.8.4 Anfotericina B

A anfotericina B (AmB) pertence à classe dos macrolídeos polienos (CAVASSIN *et al.*, 2021), devido à presença de uma subunidade polienu hidrofóbica, ligada a porção hidrofílica da molécula poliol (CEREGHETTI & CARREIRA, 2006). Esse composto, assim como outros

polienos, se liga ao ergosterol da membrana citoplasmática fúngica, via cadeia hidrofóbica poliênica e cabeça polar da molécula, formando poros que permitem o extravasamento do conteúdo citoplasmático, que resulta eventualmente em apoptose. A formação desses poros na membrana celular permite o efluxo de pequenos íons (potássio e magnésio), macromoléculas e água, perturbando a homeostase do ambiente intracelular. Além disso, AmB pode promover a morte de fungos via extração do ergosterol das camadas lipídicas da membrana celular, e pelo estímulo do acúmulo de EROs no interior da célula (CUDDIHY *et al.*, 2019).

O medicamento possui alta atividade fungicida e fungistática e tem sido usado no tratamento das formas mais severas de PCM desde 1958 (DILLON *et al.*, 1986). A dose inicial varia de 5 – 10 mg, porém, em casos severos, a dose total deve ser aumentada para 1mg/kg/dia (SHIKANAI-YASUDA, 2015). Em pacientes com envolvimento linfático, pulmonar e cutâneo a dose 2,0 a 3,0 g/dia (30 mg/kg) promoveu cura clínica e sorológica (CAMPOS *et al.*, 1984).

AmB é um composto com toxicidade elevada, incluindo sintomas de toxicidade aguda com náusea, vômito, calafrios, febre, hipertensão/hipotensão e hipóxia. A rápida infusão intravenosa (IV) pode levar a hipercalemia, com potencial para o desenvolvimento de arritmia cardíaca fatal. A administração IV do fármaco também foi relacionada a ocorrência de neurotoxicidade com surgimento de quadros de hipertermia, hipotensão, confusão, delírio, depressão, obnubilação, comportamento psicótico, tremores, convulsões, visão turva, perda de audição, quadriparesia flácida, com degeneração da mielina no plexo braquial, mutismo acinético e leucoencefalopatia cerebral difusa (LANIADO-LABORÍN & CABRALES-VARGAS, 2009).

A toxicidade crônica de AmB está relacionada principalmente a efeitos nefrotóxicos, que ocorrem em decorrência da vasoconstrição das arteríolas renais após o uso do medicamento. Os sinais clínicos da nefrotoxicidade incluem insuficiência renal, hipocalemia, acidose metabólica, devido à acidose tubular renal, e poliúria pela diabetes insipidus nefrogênica (BAGNIS; DERAY, 2002). Outros efeitos tóxicos causados pela terapia com AmB é a anemia, resultante da supressão da eritropoiese (HOEPRICH, 1992), hiperbilirubinemia (OLIN *et al.*, 2006), hipomagnesemia (BARTON *et al.*, 1984) e cardiomiopatia dilatada (DANAHER *et al.*, 2004).

### **1.8.5. Anfotericina B Lipossomal**

Visando diminuir a toxicidade inerente de AmB novas formulações a base de lipídeos foram desenvolvidas. A anfotericina lipossomal (LAmB) é constituída de pequenas vesículas

unilamelares, de 60 – 80  $\mu\text{m}$ , compostas de fosfatidilcolina de soja hidrogenada e esteraroil fosfatidilglicerol, estabilizados por colesterol e combinados com AmB (GROLL *et al.*, 2019).

A incorporação de AmB a lipossomos promove uma melhor distribuição tecidual, assim como maior índice de sucesso terapêutico, juntamente com uma menor toxicidade do composto (SHIKANAI-YASUDA, 2015). AmB ativa o PRR TLR2 através da ligação com balsa lipídicas associadas com CD14 das células mononucleares, resultando em liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, prostaglandina E<sub>2</sub> (ADLER-MOORE *et al.*, 2019). A produção desses mediadores inflamatórios está relacionada com o surgimento de toxicidade durante a infusão do medicamento, principalmente quando há elevação dos níveis séricos de TNF- $\alpha$ , IL-1RA e IL-6 (ARNING *et al.*, 1995).

A incorporação de AmB em lipossomos reduz significativamente a toxicidade relacionada à infusão, ocorrendo uma significativa redução dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1RA e IL-6 em pacientes tratados com LAmB contra os tratados com AmB (ARNING *et al.*, 1995). A redução dos níveis dessas citocinas também reduz o risco de toxicidade renal (LOO *et al.*, 2013). As possíveis razões para a redução da nefrotoxicidade da formulação lipossomal é a distribuição preferencial dos lipossomos em órgãos ricos em células reticuloendotélias, e o tamanho que não permite a filtração glomerular (CHAI *et al.*, 2013).

LAmB mostrou-se eficiente no tratamento da forma grave da PCM, em uma série de caso com 28 pacientes tratados com as doses de 3,35mg/kg/dia a 3,39 mg/kg/dia, todos (100%) atingiram a cura clínica (PEÇANHA *et al.*, 2016). Por outro lado, Dietze *et al.* (1999) realizaram um ensaio no qual três de quatro pacientes com a forma aguda da PCM, tratados com a dose de 3 mg/kg/dia de LAmB por 28 dias, apresentaram melhora clínica inicial, porém com recidiva após seis meses. Posteriormente, o tratamento desses indivíduos com Cotrimoxazol estimulou a melhora clínica em um período de seis a 12 meses (DIETZE *et al.*, 1999).

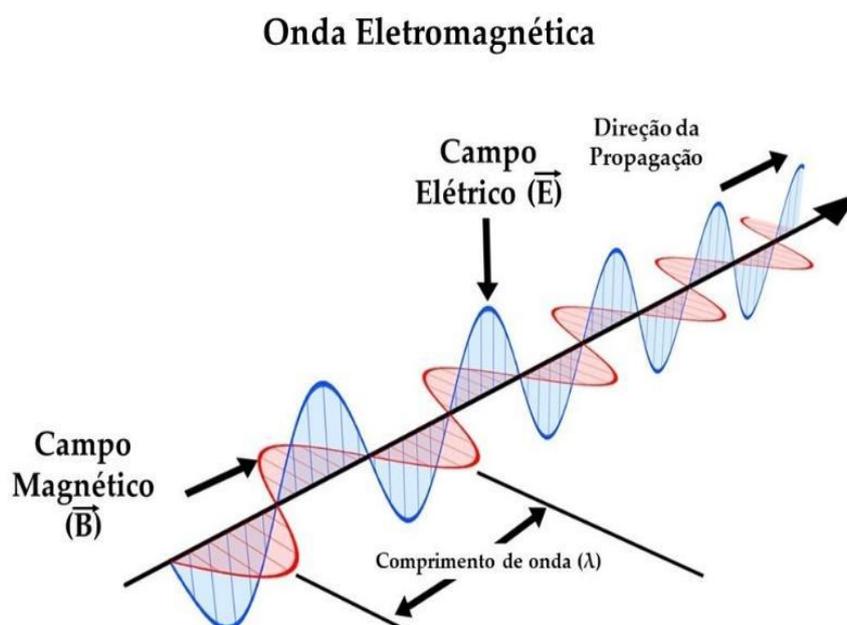
## **2 TERAPIA LASER DE BAIXA POTÊNCIA / FOTOBIMODULAÇÃO (LLLT)**

O termo LASER é um acrônimo para a expressão inglesa “*Light Amplifications by Stimulated Emission of Radiation*” (luz amplificada por emissão estimulada de radiação). Sua invenção surgiu da descoberta de Albert Einstein da emissão estimulada, um terceiro processo de transição de estado de energia, que ele teorizou existir ao lado da absorção e da forma espontânea de emissão proposta por Max Planck (ANDERSEN, 2020).

Em 1900 Planck deduziu que a energia pode ser emitida ou absorvida apenas em pedaços discretos (quantum), essa descoberta inspirou físicos como Albert Einstein, que em 1905 lançou seu artigo sobre o efeito fotoelétrico, propôs que a luz também fornece energia em pedaços, partículas quânticas descritas como fótons (EINSTEIN, 1917; PLANCK, 1900). Mais tarde, Townes, Gennadiyevich e Mikhailovich, na década de 1950, aprimoraram essa teoria sendo laureados com o prêmio Nobel de Física em 1964. A teoria tornou-se realidade em 1960 quando Maimen desenvolveu o primeiro emissor de LASER nos laboratórios da Bell (FRANCK; HENDERSON; ROTHHAUS, 2016).

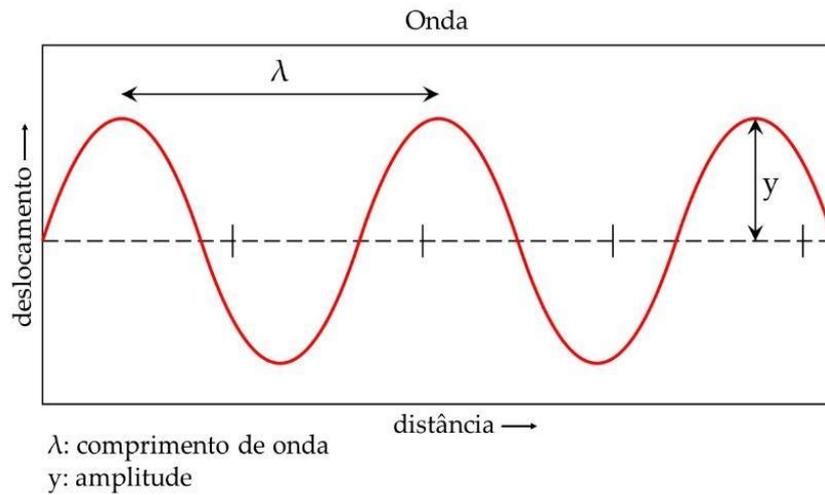
Luz e outras formas de energia eletromagnética (Figura 4) são compostas de partículas elementares conhecidas como fótons (quantum), que viajam na velocidade da luz ( $2,998 \times 10^8$  m/s) no vácuo, movimentando-se em um padrão de onda sinusoidal. O comprimento de onda ( $\lambda$ ) corresponde a distância entre duas cristas sucessivas das ondas eletromagnéticas (Figura 5), variando de muito curtos, raios gama, a muito longos, com as ondas de rádio (Figura 6) (SLINEY, 2016).

Figura 4 - Onda eletromagnética. Fisicamente a luz é um tipo de onda eletromagnética.



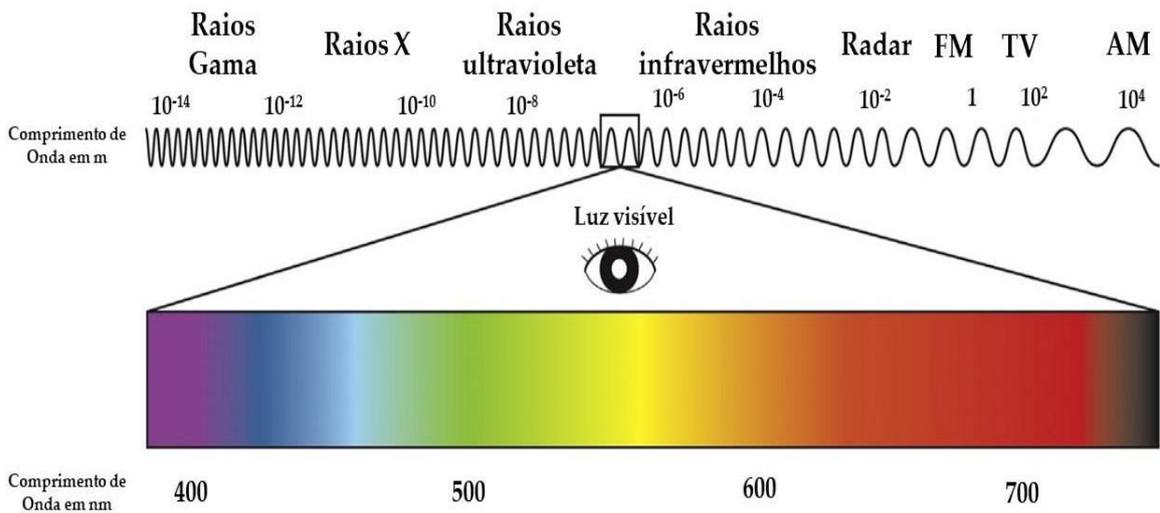
Fonte: Adaptado de Franck *et al.* (2016).

Figura 6 - Comprimento de onda, correspondente à distância entre duas cristas de uma onda eletromagnética.



Fonte: Adaptado de Franck *et al.* (2016)

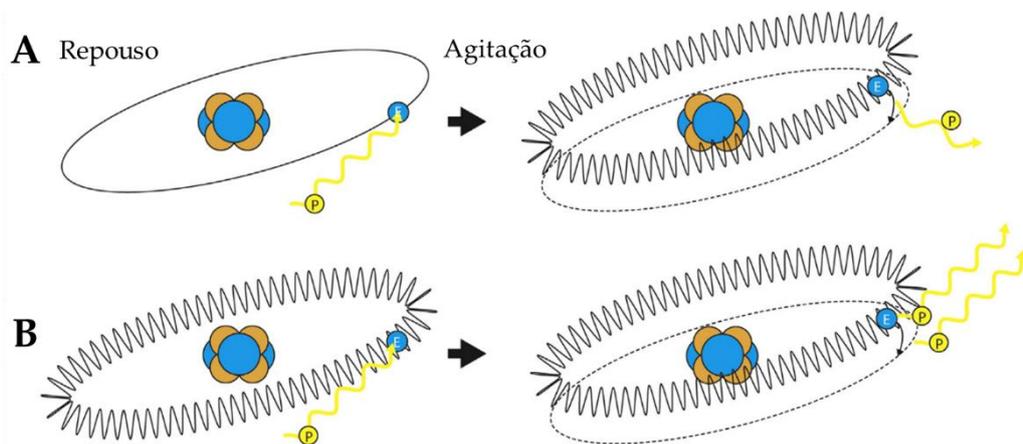
Figura 5 - Espectro da Radiação Eletromagnética.



Fonte: Adaptado de Franck *et al.* (2016).

Na escala atômica os elétrons estão dispostos em orbitais com diferentes quantidades de energia, no seu estado fundamental. Sob um estímulo com uma quantidade adequada de energia os elétrons podem pular para um orbital com maior nível de energia através de um processo chamado absorção. Nesse estado de alta energia, o elétron é considerado excitado, mas também desbalanceado. Para restaurar o equilíbrio, rapidamente, o elétron libera a quantidade de energia absorvida na forma de fóton, ou partícula de luz (SLINEY, 2016). Essa liberação de energia é chamada emissão espontânea (EINSTEIN, 1917), é o fenômeno que fundamenta a física da luz LASER (Figura 7).

Figura 7 - Emissão Espontânea.



Fonte: Adaptado de Franck *et al.* (2016).

Legenda: A: absorção de fótons (P) leva o elétron a um estado de agitação. O elétron excitado é instável, libera um fóton e retorna para o estado de repouso.

B: Um elétron excitado absorve um fóton e libera dois fótons do mesmo comprimento de onda e energia retornando ao repouso.

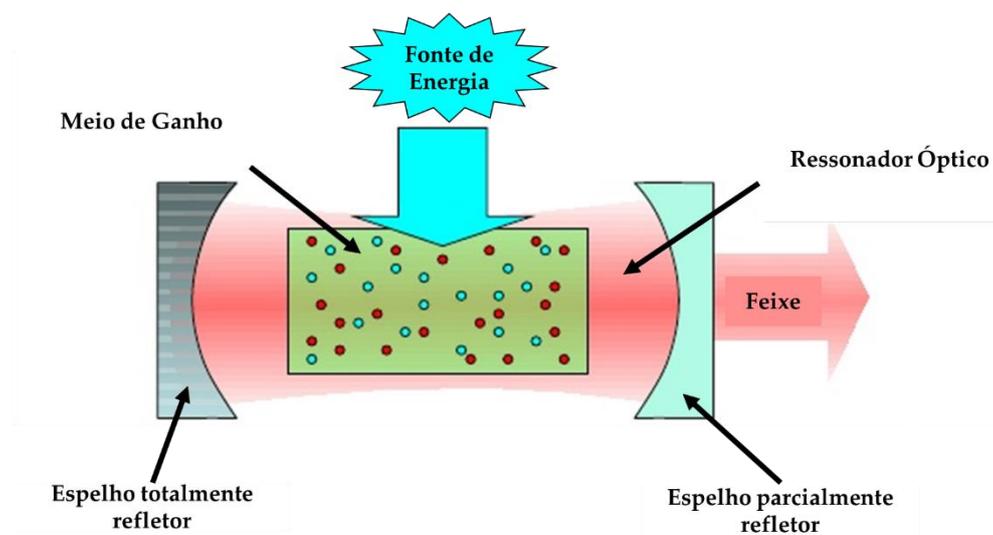
O dispositivo LASER consiste em três componentes básicos: uma fonte de energia ou bomba, um meio de ganho e dois espelhos que formam um ressonador óptico (Figura 8). A bomba fornece energia para o sistema, e pode ser composta por descargas elétricas, lâmpadas flash, luz de outro LASER e até mesmo reações químicas. O tipo de bomba utilizada depende do meio de ganho (DE FELICE, 2010).

Esse meio é o maior fator determinante do comprimento de onda e energia emitida pelo LASER, podendo ser gasoso (argônio, hélio-neônio, e dióxido de carbono) líquido (corantes orgânicos), sólido (rubi, neodímio e érbio) ou semicondutor (arsenato de gálio, arsenato de gálio alumínio e índio gálio alumínio fósforo). O meio de ganho é o local onde ocorre a emissão

espontânea ou induzida de fótons. Inicialmente, os elétrons de um átomo mudam para um orbital correspondente a um nível de excitação, e quando esses elétrons retornam para o orbital estável ocorre a liberação de fótons. Esses fótons se propagam em várias direções dentro do ressonador óptico (FRANCK; HENDERSON; ROTHHAUS, 2016).

O ressonador óptico (cavidade óptica), na sua composição mais simples consiste em dois espelhos em cada extremidade do meio de ganho, um espelho é totalmente refletor e o outro parcialmente refletor (80% da luz é refletida e 20% emitida ao exterior). A luz do meio, produzida por emissão espontânea, é refletida de volta ao meio centenas de vezes amplificando o feixe, os fótons emitidos podem encontrar outro átomo excitado e estimular a emissão de fótons adicionais, gerando um grande fluxo de luz e com alto nível energético. Assim, gera-se luz LASER, luz amplificada por emissão estimulada de radiação (DE FELICE, 2010; FRANCK; HENDERSON; ROTHHAUS, 2016).

Figura 8 - Componentes básicos de um LASER.



Fonte: Adaptado de Franck *et al.* (2016).

Legenda: A fonte de energia estimulará os elétrons do meio de ganho liberando fótons que irão ser refletidos no espelho totalmente refletor e lançado como um feixe colimado através do espelho parcialmente refletor.

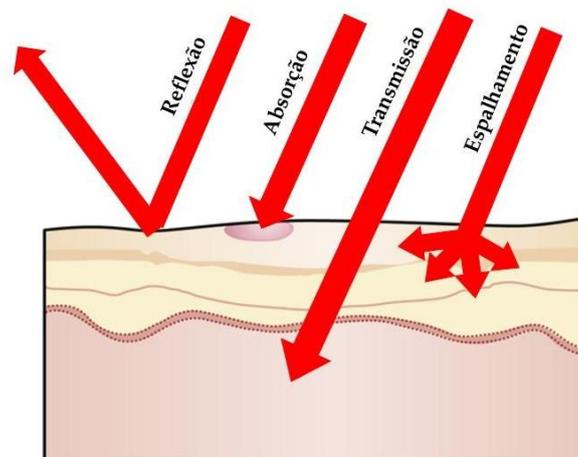
Essa luz possui características próprias que a diferenciam da luz comum (OLIVI; DE MOOR; DIVITO, 2016):

- **Coerência:** o feixe se propaga na mesma direção no tempo e no espaço com a mesma frequência;
- **Colimação:** o feixe é unidirecional, sem divergência do feixe de luz;
- **Monocromaticidade:** cada onda de luz tem exatamente o mesmo comprimento de onda, ou seja, a mesma cor. Diferentemente da luz branca, que compreende sete comprimentos de onda, ou cores diferentes.

Ao atingir um tecido biológico o LASER pode interagir com o mesmo de quatro formas diferentes (Figura 9) (NIEMZ, 2002):

- **Absorção:** a luz é absorvida por componentes do tecido com a água, hemoglobina, melanina. A absorção é o efeito mais desejado e responsável pelo efeito do LASER no tecido;
- **Espalhamento:** uma porção do feixe de luz se espalha pelo tecido perdendo potência;
- **Reflexão:** parte da luz incidida é refletida e perdida;
- **Transmissão:** a luz atravessa toda a espessura do tecido.

Figura 9 - Tipos de interação do LASER com os tecidos.



Fonte: Adaptado de De Felich (2017).

Legenda: Na Reflexão parte da luz irradiada é refletida e perdida, já na Absorção a luz é absorvida pelos componentes do tecido, sendo o efeito mais desejável. A Transmissão faz com que a luz atravessa toda a espessura do tecido. No Espalhamento uma parte do feixe é espalhada pelo tecido e ocorre a perda de potência.

A interação do LASER com os tecidos está relacionada com o comprimento de onda, da densidade da energia (dose ou fluência), da potência (irradiância) utilizada e das propriedades inerentes do tecido alvo (DE FREITAS; HAMBLIN, 2016). Deste modo, a Terapia LASER de Baixa Potência (LLLT) utiliza luz nos comprimentos de onda 600 a 1.000 nm, vermelho a infravermelho, na fluência/densidade de 1-10 J cm<sup>-2</sup>, que consiste na quantidade de energia (J) dividida pela área de incidência (spot) do LASER utilizado ou por cm<sup>2</sup> (J/ cm<sup>2</sup>). A potência empregada varia de 3-500 mW cm<sup>-2</sup> (YUN; KWOK, 2017), e é estabelecida pela divisão da potência do LASER em Watts (W) por centímetros quadrados (W/ cm<sup>2</sup>). Estudos clínicos sugerem que a luz pode estimular células-tronco epiteliais epidérmicas no bulbo do folículo piloso estimulando o crescimento de pelos (AVCI *et al.*, 2014). LLLT também foi empregada no tratamento de feridas, reparo tecidual e como agente anti-inflamatório, apresentando eficácia em modelos animais (CHUNG *et al.*, 2012).

Como os mecanismos de ação de LLLT não são bem compreendidos, a adoção dessa terapia tem sido controversa e seu uso é amplamente empírico. Diversos mecanismos foram propostos (DE FREITAS; HAMBLIN, 2016). Na célula, algumas evidências sugerem que a LLLT atua na mitocôndria (Figura 10) estimulando o aumento da produção de adenosina trifosfato (ATP) (KARU, 1999), modulação de EROs, e a indução de fatores de transcrição (CHEN *et al.*, 2011). Vários fatores de transcrição são regulados por alterações no estado redox celular. Dentre eles destaca-se o fator redox-1 (Ref-1), proteína ativadora dependente-1, fator nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B), p53, fator ativador de transcrição/proteína de ligação ao elemento de resposta a cAMP (ATF/CREB), fator induzível por hipóxia (HIF)-1, e fator semelhante a HIF (CHEN *et al.*, 2011). Esses fatores de transcrição estimulam a síntese de proteínas responsáveis pela proliferação celular e migração, modulação dos níveis de citocinas, produção de fatores de crescimento e migração, e mediadores inflamatórios, e aumento da oxigenação tecidual (KARU; KOLYAKOV, 2005).

Nos níveis mais básicos, LLLT atua por indução de reações fotoquímicas na célula, através de um processo conhecido como bioestimulação ou fotobioestimulação. Quando um fóton é absorvido por um cromóforo na célula tratada, um elétron pode ser excitado e pular de um nível mais baixo de energia para um orbital de maior energia (SUTHERLAND, 2007). Essa energia armazenada pode então ser usada pelas células para execução de diversas tarefas. Existem várias evidências de que cromóforos nas mitocôndrias podem ser estimulados pela LLLT. A irradiação dos tecidos com luz causa um aumento na geração de produtos mitocondriais como ATP, NADPH, proteínas e RNA (PASSARELLA *et al.*, 1984), assim como uma elevação no consumo de oxigênio (CHUNG *et al.*, 2012).

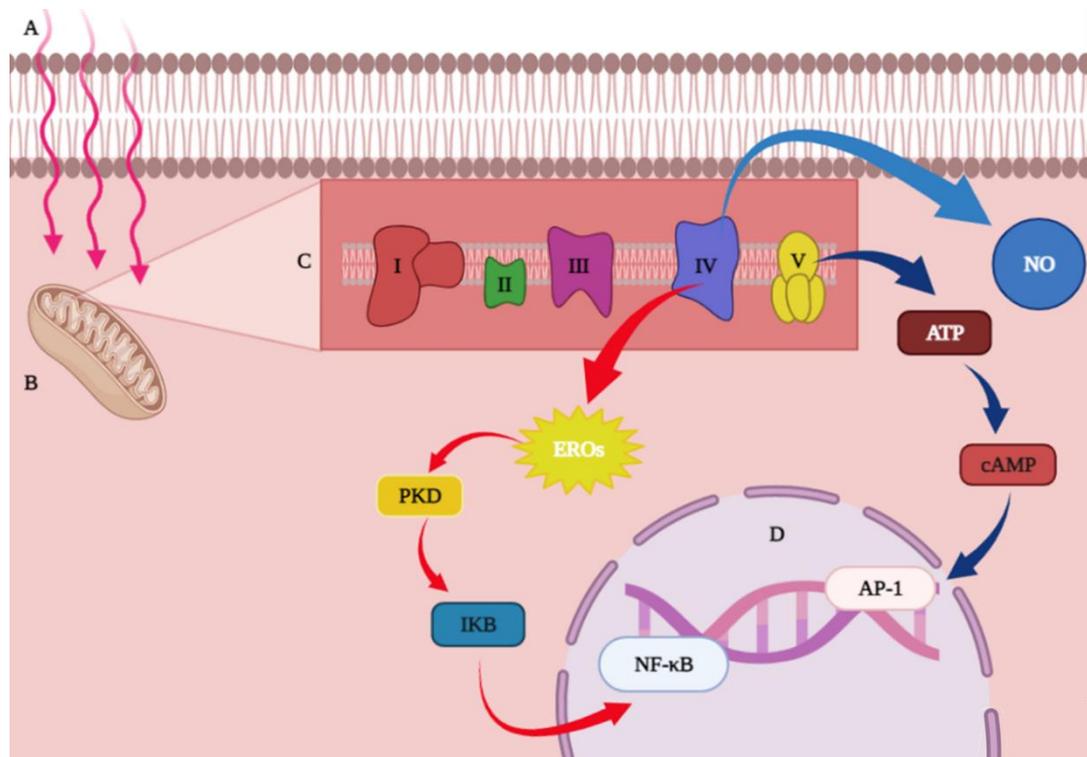
O complexo V, também conhecido como citocromo c oxidase (CCO), é o cromóforo essencial na LLLT (KARU; AFANAS'EVA, 1995). CCO é um grande complexo de proteínas transmembrana, constituído por dois centros de cobre e dois centros ferro-heme, componentes da cadeia transportadora de elétrons (CAPALDI; MALATESTA; DARLEY-USMAR, 1983). Essa cadeia transporta elétrons altamente carregados em energia de carreadores de elétrons através de uma série complexos transmembrana até o acceptor final de elétrons, gerando um gradiente de prótons usado para produção de ATP. Assim, a aplicação de luz influencia diretamente na produção de ATP afetando um dos complexos transmembrana na cadeia. Em particular, a LLLT promove um aumento na produção de ATP e transporte de elétrons (KARU; PYATIBRAT; KALENDU, 1995; PASTORE *et al.*, 1994).

A influência de LLLT na cadeia transportadora de elétrons está além de um simples aumento dos níveis de ATP produzido pela célula. O oxigênio atua como acceptor final de elétrons na cadeia transportadora de elétrons, e é convertido em água nesse processo. Parte do oxigênio que é metabolizada produz espécies reativas de oxigênio (EROs) como subprodutos. EROs são moléculas quimicamente ativas que desempenham um importante papel na sinalização celular, regulando a progressão do ciclo celular, ativando enzimas, ácidos nucleicos e síntese proteica. LLLT estimula a produção de EROs via aumento dos níveis de oxigênio. Por sua vez, EROs ativam fatores de transcrição, que levam a superregulação de genes estimuladores e protetores. Esses genes provavelmente estão relacionados a proliferação celular, migração (DE FREITAS; HAMBLIN, 2016) e produção de citocina e fatores de crescimento, que forma estimulados pela LLLT (WERINGER *et al.*, 1982; ZHANG *et al.*, 2003).

As células do sistema imunológico são fortemente afetadas pela LLLT. Mastócitos, que desempenham um papel crucial no movimento dos leucócitos, e são importantes na inflamação. Comprimentos de onda específicos conseguem estimular a degranulação de mastócitos (BAYAT *et al.*, 2008), que resulta na liberação da citocina pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  (WALSH *et al.*, 1991). Isso leva a um aumento da migração de leucócitos para o tecido inflamado. LLLT também estimula a proliferação, maturação, e motilidade de fibroblasto, e aumento na produção de fatores de crescimento de fibroblastos (FROZANFAR *et al.*, 2013). Linfócitos se tornam ativos e proliferam mais rapidamente, e células epiteliais se tornam mais móveis, permitindo que feridas se fechem mais rapidamente (CHUNG *et al.*, 2012). A habilidade de macrófagos para agir como fagócitos também é melhorada com a LLLT (SONG; ZHOU; CHEN, 2012).

Estudos demonstram que a estimulação *ex vivo* dos polimorfonucleares (PMN) com LLLT conseguiu aumentar a capacidade fungicida de neutrófilos contra *P. brasiliensis*, e o emprego de LLLT tornou estas células metabolicamente mais ativas, com maior atividade mitocondrial, e produção de maiores concentrações de proteínas e de EROS (BURGER *et al.*, 2015). Achados da literatura corroboram a hipótese de que a irradiação com LLLT consiga ativar a via da enzima NADPH oxidase aumentando assim a produção de EROS por essas células (CERDEIRA *et al.*, 2016a). A produção de EROS é considerada um mecanismo chave na destruição da maioria dos patógenos invasores (MANTOVANI *et al.*, 2011).

Figura 10 - Mecanismos celulares de LLLT.



Fonte: Adaptado de Chung *et al.* (2012)

Legenda: A: Absorção de luz próximo ao comprimento infravermelho por cromóforos localizados na mitocôndria, B: mais especificamente o complexo IV (citocromo C oxidase) e V (ATP sintase) da Cadeia Transportadora de Elétrons, C: estimulando a produção de ATP e EROS e NO. Essa resposta citosólica pode induzir alterações transcricionais no núcleo, D: induzidas por fatores de transcrição (ex: NF-κB e AP1).

### 3 JUSTIFICATIVA

A paracoccidioidomicose é uma micose sistêmica com elevada prevalência no Brasil, com cerca de 3360 a 5600 casos por ano (MARTINEZ, 2017), dos quais aproximadamente 168 possuem como desfecho o óbito do paciente (PRADO *et al.*, 2009). Estudos demonstram que os PMNs correspondem ao primeiro tipo celular a chegar no local da infecção fúngica, desempenhando um papel fundamental no controle inicial da multiplicação destes organismos, assim como influenciando a resposta imune adquirida (OTTONELLO *et al.*, 1998). Entretanto, há uma inabilidade intrínseca de PMNs de alguns indivíduos em processar as células do fungo, fato que resulta em uma predisposição mais acentuada para o desenvolvimento da PCM sem apresentar imunodeficiência celular (GOIHMAN-YAHR *et al.*, 1989). O uso de LLLT em neutrófilos imaturos de camundongos infectados por *P. brasiliensis* permite recrutar PMN mais ativos e com maior capacidade fungicida, uma vez que estas células apresentaram maior atividade mitocondrial, e produção de maiores concentrações de proteínas e de EROS (BURGER *et al.*, 2015). No entanto, ainda não está bem estabelecido como a LLLT promove a ativação dos neutrófilos maduros, visto que seus efeitos sobre as formas imaturas destas células foram descritos por Burger e colaboradores (2015). Desta forma, o presente estudo pretende avaliar a produção de EROS totais e específica, atividade mitocondrial, produção de proteínas e citocinas por neutrófilos maduros de camundongos irradiados com LLLT *ex vivo* e *in vitro*. E adicionalmente, ampliar os conhecimentos sobre o efeito da laserterapia, visando incluí-lo como tratamento complementar da paracoccidioidomicose.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o efeito da aplicação de LASER de baixa potência *ex vivo* e *in vitro* sobre neutrófilos maduros oriundos de bolsa subcutânea de camundongos infectados com a cepa de alta virulência Pb18 de *Paracoccidioides brasiliensis*.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do tratamento com LLLT na produção de proteínas por neutrófilos maduros de camundongos obtidos de bolsa subcutânea *in vitro* e *ex vivo*;
- Avaliar o efeito do tratamento com LLLT na atividade mitocondrial de neutrófilos maduros de camundongos obtidos de bolsa subcutânea *in vitro* e *ex vivo*;
- Avaliar o efeito do tratamento com LLLT sobre a produção de citocinas por neutrófilos maduros de camundongos obtidos de bolsa subcutânea *in vitro* e *ex vivo*;
- Avaliar a geração de radicais livres de oxigênio por neutrófilos maduros de camundongos obtidos de bolsa subcutânea *in vitro* e *ex vivo*;
- Avaliar a atividade antifúngica de PMNs estimulados ou não com LLLT.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Esta pesquisa foi submetida a Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas CEUA (UNIFAL – MG) e aprovada sob o número de protocolo 0005/2020. Os procedimentos empregados foram realizados em conformidade com os princípios éticos exigidos na experimentação animal pelo CONCEA e CEUA (UNIFAL-MG), semelhantes aos que vem sendo realizados pelos integrantes do grupo de pesquisa em projetos anteriores aprovados por comissões de ética da USP e da UNIFAL.

### 5.2 ANIMAIS

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

### 5.3 ISOLADO DE *Paracoccidioides brasiliensis*

O isolado de *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18-isolado de alta virulência) foi utilizado neste projeto. Os fungos foram mantidos em sua forma leveduriforme no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da UNIFAL-MG, sendo semeados e cultivados em meio de cultura semissólido FAVA NETTO, 1955 em tubos inclinados, mantidos em estufa a 35°C e foram repicados a cada 7 dias. A virulência foi reativada por meio de infecção e reisolamento do isolado Pb18 em camundongos.

### 5.4 PREPARAÇÃO DE SUSPENSÕES DE *Paracoccidioides brasiliensis* PARA INFECÇÃO DOS CAMUNDONGOS

As células fúngicas foram lavadas com solução salina estéril a 0,9%, centrifugadas a 1300 G por três vezes, e utilizadas para preparar as suspensões para inoculações. A viabilidade das células de Pb18 foi determinada pela coloração empregando o corante Janus Green B (Berliner

e Reça, 1965), em seguida, as suspensões tiveram sua concentração ajustada para  $5 \times 10^6$  células leveduriformes viáveis/ml (cél/mL) para a inoculação em bolsa de ar subcutânea.

### 5.5 INDUÇÃO DE BOLSA AR SUBCUTÂNEA

A técnica empregada consistiu na indução de uma bolsa de ar produzida na região dorsal de camundongos por injeção subcutânea de 2 mL de ar estéril (Meloni-Bruneri *et al.*, 1996). Após formação da bolsa de ar os animais foram inoculados com 0,1 mL da suspensão Pb18 por um período de sete dias.

### 5.6 IRRADIAÇÃO DE NEUTRÓFILOS COM LASER NOS EXPERIMENTOS *EX VIVO* E *IN VITRO*.

Nos experimentos *ex vivo* animais foram irradiados nas bolsas de ar subcutâneas com LASER infravermelho (Twin flex – MMO, São Carlos, SP - Brasil) operando no comprimento de onda de 780nm, por 30 segundos com potência total de 50mW e área do feixe de  $0,04 \text{ cm}^2$ , fornecendo  $12,5 \text{ J/cm}^2$ . As irradiações foram realizadas em dias alternados, as primeiras irradiações ocorreram no dia da infecção e as últimas no sétimo dia, período da realização da coleta de células das bolsas subcutâneas.

Para os experimentos *in vitro* as células coletadas das bolsas ( $1 \times 10^6$ ) foram cocultivadas com Pb18 ( $4 \times 10^4$  células/mL) em placas de seis poços transparentes e irradiadas de modo que a ponta da caneta LASER tocasse perpendicularmente o fundo da placa contendo as células (CERDEIRA *et al.*, 2016). Todas as irradiações foram realizadas em ambiente escuro para evitar interferência da luz convencional na absorção do comprimento de onda da luz LASER pelas células. Além disso, não houve interferência da luz LASER sobre as células dos grupos controle durante a realização dos experimentos, tanto no tratamento *in vitro* quanto no *ex vivo*.

### 5.7 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em grupos experimentais, sendo eles:

<i>Ex vivo</i>
<p><b>Grupo 1:</b> Cultivo de neutrófilos originados de bolsa subcutânea de animais que foram irradiados com LLLT e infectados com Pb18;</p> <p><b>Grupo 2:</b> Cultivo de neutrófilos oriundos bolsa subcutânea de animais que não foram irradiados com LLLT.</p>
<i>In vitro</i>
<p><b>Grupo 3:</b> Cultivo de neutrófilos originário de animais infectados com Pb18 e irradiação com LLLT;</p> <p><b>Grupo 4:</b> Cultivo de neutrófilos de animais infectados com Pb18.</p>

## 5.8 OBTENÇÃO DE CÉLULAS DE BOLSA DE AR SUBCUTÂNEA

As células foram coletadas após sete dias da inoculação dos camundongos. Os animais foram eutanasiados com a associação dos anestésicos d cloridrato de Cetamina a 10% (anestésico dissociativo) e cloridrato de Xilazina a 2% (miorrelaxante de ação central, agonistas de adrenorreceptores alfa-2). A dose de anestésicos administrada foi o triplo da dose utilizada para a indução anestésica de camundongos (Cetamina 450 mg/kg e Xilazina 48mg/kg) como recomendado no item 9.1.2.3 da Resolução Normativa nº 37 Diretriz da prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Após a confirmação do óbito, dada através da análise de sinais como apneia, assistolia, mucosas pálidas e ausência de reflexo corneal, preconizados pela Resolução Normativa nº 37 (CONCEA), realizou-se uma incisão da pele com bisturi e com o auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro estéril, as células foram coletadas e transferidas para um homogeneizador de vidro estéril, onde foram separadas por maceração. De acordo com Meloni & Bruneri 1994 se faz necessária a realização de um pool de células originado das bolsas de ar subcutâneas de três animais diferentes, que corresponde a  $\cong 667$  PMN/animal, visando a obtenção de uma concentração de  $1 \times 10^6$  PMN/mL a qual corresponde a quantidade de células necessárias para realização dos experimentos.

## 5.9 CULTIVO DE CÉLULAS DE BOLSA DE AR SUBCUTÂNEA

As células obtidas para os experimentos *ex vivo* foram transferidas e armazenadas em tubos Falcon contendo um volume conhecido de RPMI suplemento com 10% de soro fetal bovino (SBF) e mantidas refrigeradas. Posteriormente, as células foram quantificadas em

hemocitômetro e a viabilidade foi analisada com o corante Trypan blue 0,2%. Os PMN colhidos a partir de camundongos infectados, tiveram sua concentração ajustada para  $1 \times 10^6$  PMN/mL (2.000 PMN/mL) e foram cultivados em placas de seis ou 12 poços. As placas foram incubadas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> (VWR S/P by Sheldon MFG, INC) a 37° C por 2, 6 e 18 horas. Após os tempos de incubação descritos, as células foram centrifugadas a 1780 x g. Os sedimentos foram semeados em placas para contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) e também armazenados a -20°C para determinação da concentração de proteínas totais e quantificação de EROS total e específicos.

Para a realização do co-cultivo, experimento *in vitro*, PMNs coletados foram centrifugados a 1780 x g e lavados com salina antes de serem suspensos em 15 mL de RPMI. Posteriormente as células foram quantificadas em hemocitômetros e viabilidade foi avaliada através da coloração com Trypan blue. A concentração final foi ajustada para  $1 \times 10^6$  PMN/mL. As células de Pb18 foram lavadas três vezes com solução salina 0,9% e centrifugadas a 1300g e resuspendidas em RPMI enriquecido com 10% de soro fetal bovino (FBS). A concentração da suspensão foi ajustada de modo que a proporção entre Pb18 e PMNs fosse de 1:25. As células fúngicas foram contadas em hemocitômetro e a viabilidade avaliada através de coloração com Janus Green B.

Depois que a concentração de PMNs foi ajustada para  $1 \times 10^6$  PMN/mL, e a suspensão de Pb18 para  $4 \times 10^4$ , 1 mL de cada suspensão foi adicionado a placas de 12 poços que foram incubadas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 2, 6 e 18 horas. Após a incubação, as células foram centrifugadas a 1780 x g e a viabilidade dos pellets de PMNs foi avaliada com Trypan Blue a 0,2%.

#### 5.10 QUANTIFICAÇÃO DE *P. brasiliensis* VIÁVEIS

Após a incubação das placas de cultura de células por 2 horas para PMN, o material oriundo dos dois grupos foi centrifugado a 500 x g por 5 minutos e os sedimentos foram coletados e semeados em placas para contagem de unidades formadoras de colônia (CFU). Estes sedimentos foram semeados em placa de BHI suplementada com 1% de glicose, 30% de fator de crescimento e de 10% de soro fetal bovino por ser mais eficiente para o crescimento do Pb18 (CALICH *et al.*, 1993). Foram semeados 100µL das suspensões celulares de cada um dos grupos, nas placas contendo o meio BHI e homogeneizados com auxílio da alça de Drigalski. Esse experimento foi realizado em triplicata, e o crescimento das colônias foi acompanhado e quantificados por um período de 15 dias.

### 5.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE DESIDROGENASES MITOCONDRIAIS PELO MÉTODO MTT

Em uma placa de ELISA de 96 poços, pipetou-se 180µL da suspensão de PMN na concentração de  $10^6$  cél/mL e 20µL do reagente MTT [3(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio brometo] a 20%. Todas as amostras foram pipetadas em triplicatas. As placas foram mantidas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> e temperatura de 37°C e após 4 horas, todo o sobrenadante foram retirados, deixando apenas o sedimento no fundo, de cada poço, utilizado para a análise. Posteriormente, adicionou-se 200µL de dimetilsulfóxido (DMSO/Vetec) e a leitura da placa foi realizada em leitor de ELISA (ANTHOS ZENITH<sup>®</sup> 200 rt) a 540 nm.

### 5.12 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A quantificação das proteínas dos sedimentos armazenados de ambos os grupos experimentais foi realizada pelo método do ácido bicinconínico (BCA) (Sigma<sup>®</sup>). Estes ensaios foram realizados em triplicata e a leitura das densidades ópticas feitas em espectrofotômetro (ANTHOS ZENITH<sup>®</sup> 200 rt) em comprimento de onda de 560 nm. Os resultados foram expressos em µg de proteína/mL, comparando-se a densidade óptica com uma curva padrão contendo concentrações conhecidas de proteína sérica bovina (BSA).

### 5.13 ENSAIO DE QUIMIOLUMINESCÊNCIA

Para ensaio de quimioluminescência, utilizou-se o substrato aminofital-hidrazida (luminol 97%, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), para avaliar a produção de EROS dos PMNs, possibilitando a quantificação desses derivados do metabolismo do oxigênio através da emissão de luz integrada por segundo (BABIOR, 1984). Destacando-se que o luminol é capaz de mensurar EROs ao nível intracelular e extracelular (CEDEIRA *et al.*, 2016; BURGER *et al.*, 2015). No presente ensaio, as células foram ajustadas para a proporção  $4 \times 10^4$  cél/mL fúngicas e  $10^6$  células PMN/mL. Foi pipetado em uma cubeta 135µL da suspensão de PMN e 30µL de luminol. A leitura foi realizada em luminômetro (Promega- Glomax 20/20 Luminometer<sup>®</sup>) e a intensidade da quimioluminescência foi aferida durante 30 minutos.

### 5.14 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

A liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi medida através do ensaio de oxidação de vermelho de fenol dependente de peroxidase de rábano descrito por (PICK; MIZEL, 1981). O experimento foi realizado em microplaca de 96 poços. A solução de vermelho de fenol foi preparada com PBS gelado contendo dextrose 5,5 mM, vermelho de fenol 0,56 mM e 8,5 U/mL de peroxidase de rábano tipo II. As células foram suspensas em solução fresca de vermelho de fenol e incubadas por 1 h a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO<sub>2</sub>-95%. A reação foi interrompida com 10 µl de NaOH 1M. A absorbância a foi medida em leitor de microplaca (ANTHOS ZENITH<sup>®</sup> 200 rt) e a conversão da absorbância em µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi deduzida de uma curva padrão obtida com concentrações conhecidas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 a 40 µM), conforme descrito por (PICK; KEISARI, 1980).

#### 5.15 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DA ENZIMA CATALASE (CAT)

A atividade da enzima CAT foi determinada utilizando a metodologia proposta por Aebi (1984), que mede a decomposição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto a 240 nm. Frações dos sedimentos oriundos do cultivo dos PNMs (35 µg de proteínas) foram incubadas em PBS pH 7,0. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM foi adicionada dando início a reação e absorbância foi monitorada durante um minuto. O cálculo da cinética da decomposição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi feito utilizando-se do coeficiente de extinção molar a 240 nm (43,6 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). Os resultados foram expressos em U/mg de proteína, sendo U correspondente a atividade enzimática capaz de promover a hidrólise de 1 µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto.

#### 5.16 DOSAGEM DOS NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

As concentrações de óxido nítrico (NO) foram medidas nos sobrenadantes das culturas de células provenientes da infecção por “air pouch”. Foram pipetados 100 µL dos sobrenadantes e 100 µL do reagente Griess em placas de 96 poços (todas as amostras foram feitas em triplicatas) e incubados à temperatura ambiente durante 10 minutos. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Anthos Zenyth 200<sup>®</sup> rt) em comprimento de onda de 540 nm. Os resultados foram expressos em µM, pela conversão dos valores a partir de uma curva padrão realizada com nitrito de sódio nas concentrações de 100 a 78 µM para cada placa. O reagente de Griess foi preparado no momento da utilização, empregando partes iguais da solução de A-sulfanilamida a 1% em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a 2,5% e a solução de B-naftilenodiamina a 0,1% em água destilada.

### 5.17 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS

Os sobrenadantes coletadas foram armazenados à temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ , e utilizados para dosagem de citocinas através de kits de ELISA disponíveis comercialmente para IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, GMCSF, KC, realizados conforme instrução do fabricante (PEPROTECH/ELISA Development Kit/ Manufacturer of Quality Cytokine Products<sup>®</sup>). As concentrações de cada citocina foram determinadas tendo como base a reta de regressão linear contínua obtida com os dados referentes às curvas-padrão.

### 5.18 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE MICROBICIDA DE PMNS CONTRA *P. brasiliensis*

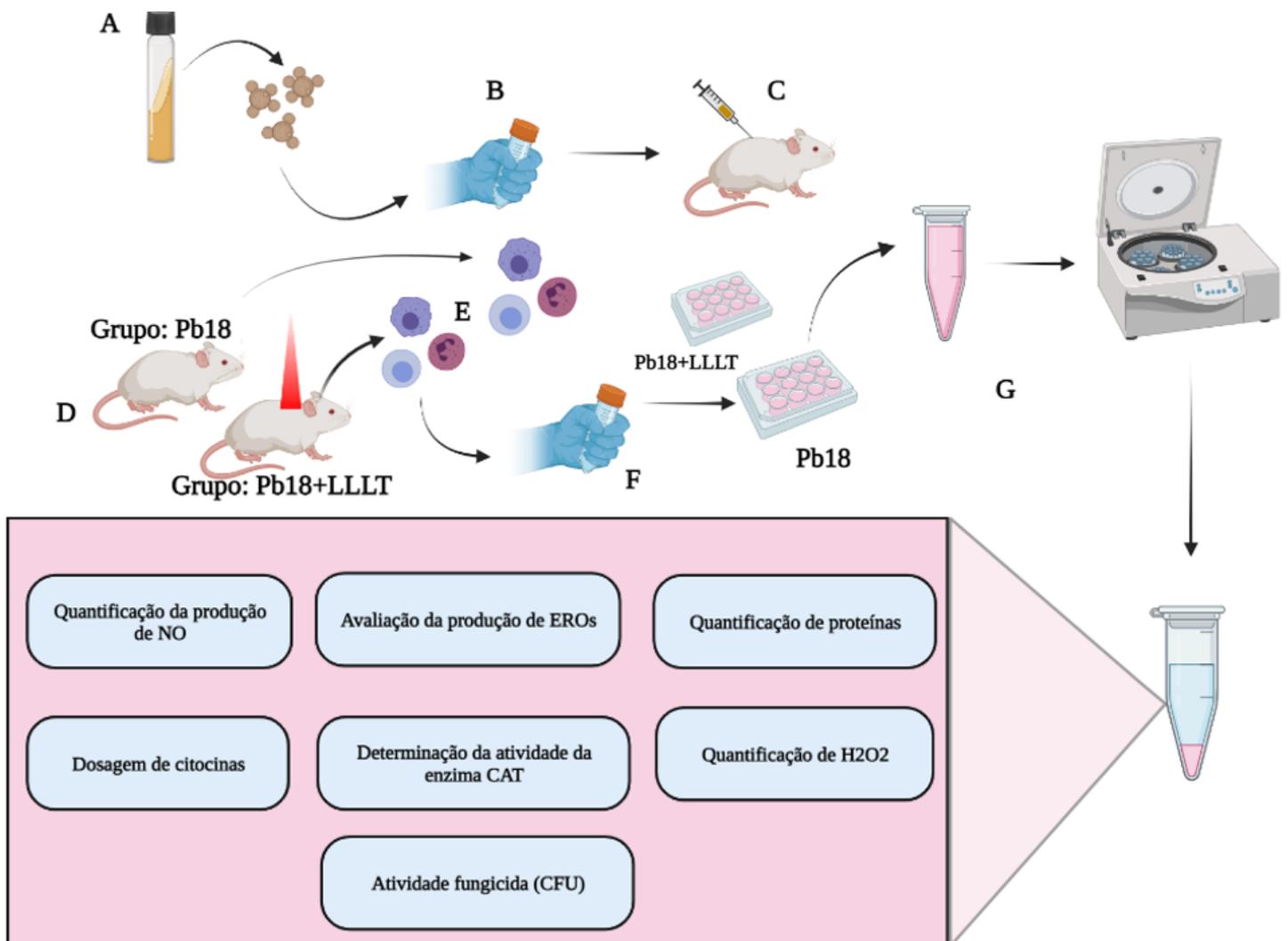
Para avaliação da capacidade de *killing* por PMNs empregou-se a metodologia proposta por Green *et al.* (2007) e Magon *et al.* (2020) e adaptado por Cerdeira *et al.* (2016) com algumas modificações. Essa técnica avalia a capacidade de fagocitose e de destruição de microrganismos per essas células. As suspensões fúngicas na concentração de  $4 \times 10^4/\text{mL}$  não opsonizadas foram incubadas juntamente com os PMNs a  $10^6$  cel/mL a  $37^{\circ}\text{C}$ , por 10, 30 e 90 minutos, juntamente com solução salina balanceada de Hank (HBSS). Após cada período de incubação, tratou-se cada grupo com PBS gelado (pH 7,0), com intuito de cessar a atividade dos neutrófilos, e em seguida as amostras foram submetidas a uma centrifugação diferencial a  $1780 \times g$  por 10 minutos. Os pellets, onde se encontram as leveduras intracelulares, e os sobrenadantes, local das leveduras extracelulares, foram diluídos em  $\text{H}_2\text{O}$  pH 11, para lisar os PMNs. Após sucessivas diluições em  $\text{H}_2\text{O}$  pH 11 ( $10^3$ ,  $10^6$ ,  $10^9$ ), as amostras foram distribuídas sobre placas de Petri contendo meio BHI suplementado com 1% de glicose, 30% de fator de crescimento e de 10% de soro fetal bovino. Por fim, as placas forma incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  e o crescimento das colônias foi quantificado por um período de 15 dias. Os resultados obtidos foram expressos através de gráficos de constante de fagocitose ( $k_p$ ) e de constante de *killing* ( $k_k$ ). uma vez que tanto a fagocitose quanto o *killing* pelos PNMS obedecem a uma cinética de primeira ordem que pode ser calculada através de uma Função W de Lambert (HAMPTON *et al.*, 1994; MAGON *et al.*, 2020), que foi calculada através de tabela disponibilizada por Magon *et al.* (2020) nos materiais suplementares.

### 5.19 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os resultados serão expressos como média e desvio padrão. As análises estatísticas serão realizadas utilizando o teste T, One-way e Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey, através do programa GraphPad Prism<sup>®</sup> considerando 5% de significância ( $p < 0,05$ ). Para os cálculos de  $K_p$  e  $K_k$  foi utilizada uma tabela do Microsoft Excel<sup>®</sup> disponibilizada no material eletrônico suplementar de Magon *et al.* (2020). (disponível em: <[https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-0716-0154-9\\_12](https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-0716-0154-9_12)>).

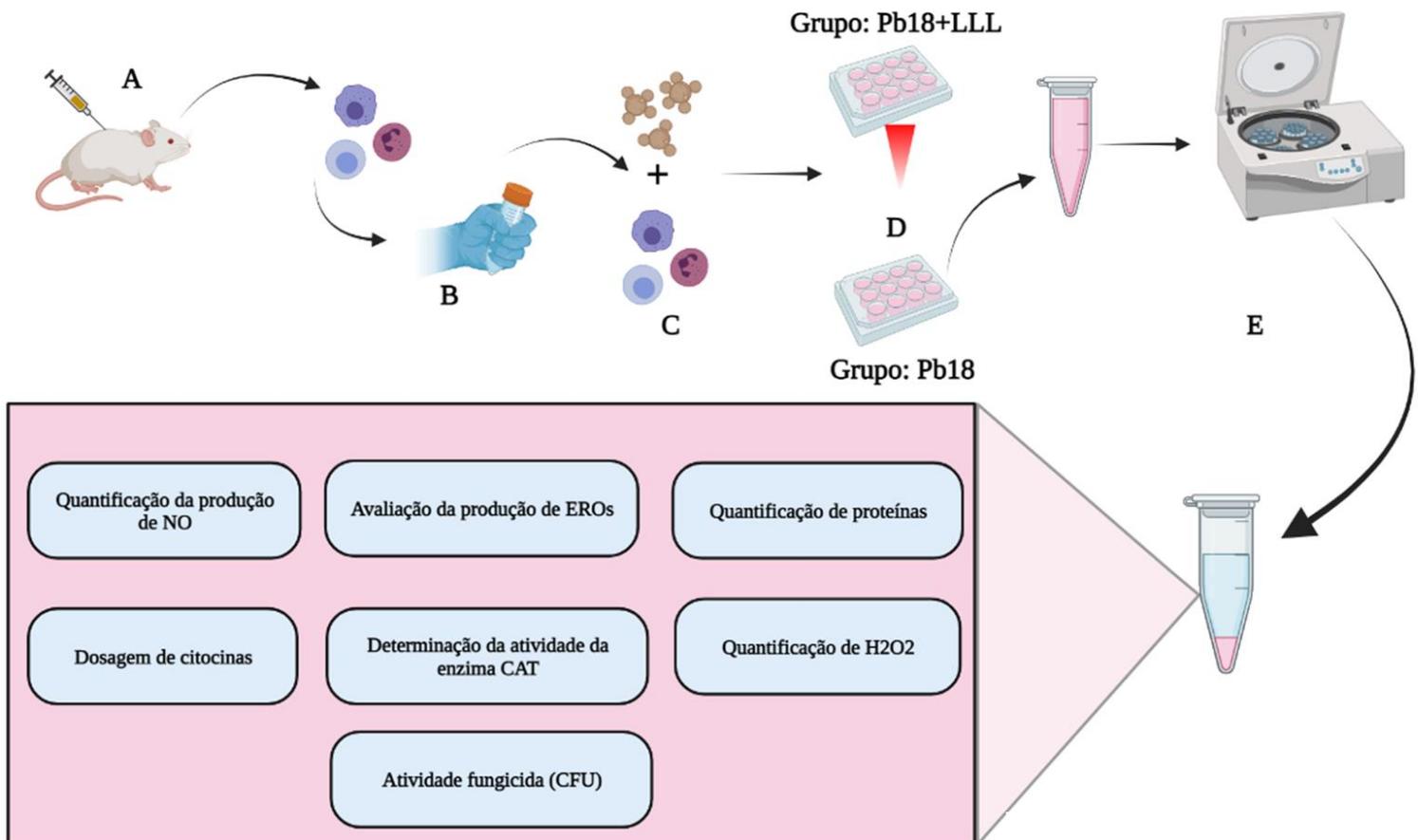
## 5.20 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Figura 11 - Experimentos *ex vivo*.



Fonte: do autor (2021).

Legenda: (A) A forma leveduriforme da cepa virulenta Pb18 foi isolada e em seguida teve sua concentração ajustada para  $5 \times 10^6$  cel./mL (B). A suspensão fúngica foi inoculada nas bolsas de ar subcutâneas formadas na região dorsal dos camundongos (C). Os animais foram separados em dois grupos (D): Pb18: apenas infectados e Pb18+LLLT: infectados e irradiados com LASER em dias alternados, a infecção durou 7 dias. (E) os PMNs de cada grupo foram isolados e tiveram a viabilidade e concentrações ajustadas para  $1 \times 10^6$  cel./mL, em seguida foram cultivados separadamente (F). Os sobrenadantes foram coletados e centrifugados a 1780 g nos tempos de 2, 6 e 18 horas (G). O sobrenadante e pellets obtidos foram utilizados para as análises descritas acima.

Figura 12 - Experimento *in vitro*.

Fonte: do autor (2021)

Fonte: do autor (2021).

Legenda: (A) PMNs oriundos de animais infectados foram isolados e tiveram sua concentração ajustada para  $1 \times 10^6$  cel/mL (B). As células foram cocultivadas juntamente com Pb18 na concentração de  $4 \times 10^4$  cel/mL, obtendo uma proporção fungo: PMNs de 1:25 (C). Os cocultivos foram divididos em dois grupos, grupo Pb18+LLL foi irradiado com LASER por 30 segundos e o grupo Pb18 não recebeu tratamento (D). Sobrenadantes e pellets foram obtidos via centrifugação a 1780g e coletados nos tempos de 2, 6 e 18 horas e posteriormente submetidos as análises descritas acima

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

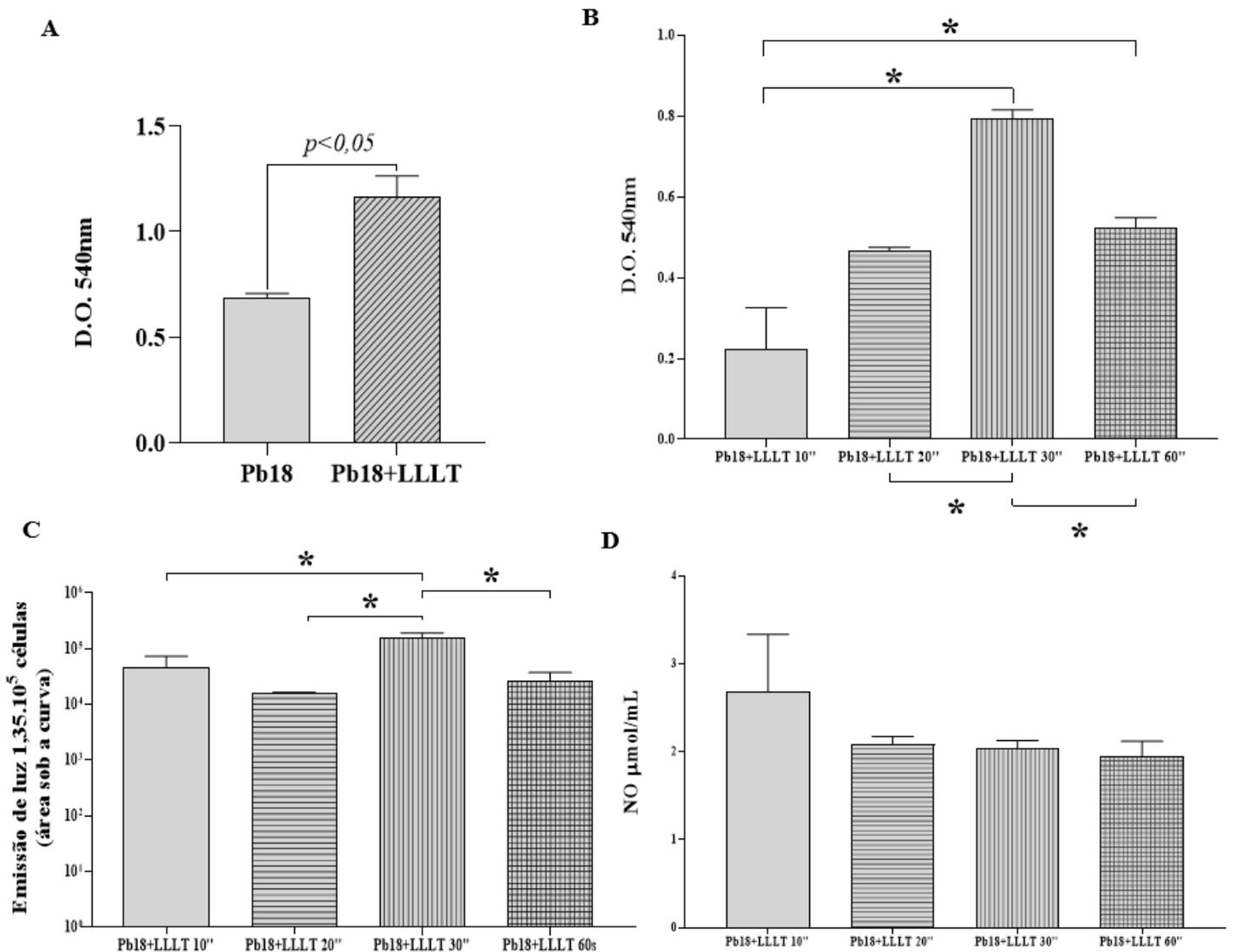
### 6.1 PADRONIZAÇÃO DA IRRADIAÇÃO DE LLLT *IN VITRO*.

Objetivando-se a padronização do tempo de irradiação do LASER nas bolsas de ar subcutânea induzidas nos camundongos infectados com Pb18, foram realizados experimentos para avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, atividade mitocondrial e viabilidade celular em cultivos de PMNs infectados com a cepa virulenta Pb18. Como descrito na literatura LLLT é capaz de estimular a produção de espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico e atividade mitocondrial (CHEN *et al.*, 2011; DE FREITAS & HAMBLIN, 2016).

Nesse contexto, os testes demonstraram que as células irradiadas com LASER apresentaram maior atividade mitocondrial e viabilidade do que os PMNs não tratados, figura 14 A. Em relação ao tempo de irradiação, os melhores resultados foram obtidos quando as células foram irradiadas por 30 segundos, notando-se maiores viabilidade celular e atividade mitocondrial (Figura 13 B), assim como uma produção superior de EROs quando comparado aos demais períodos testados, 10, 20 e 60 segundos (Figura 13 C). Resultados semelhantes foram encontrados em experimentos com camundongos que tiveram a medula óssea femoral estimulada com LLLT na mesma dose e período irradiação utilizada no presente estudo (BURGER *et al.*, 2015). Já em relação à produção de NO, não houve diferença significativa entre os diversos tempos comparados (Figura 13 D).

O aumento da atividade mitocondrial poderia ser explicado pelo mecanismo da sinalização mitocondrial retrógrada, proposto por (KARU, 2008), no qual a absorção de fótons com alta carga energética pela enzima Citocromo C Oxidase (CCO) eleve o potencial de membrana mitocondrial estimulando um aumento na síntese de ATP e alterações nas concentrações de EROs,  $\text{Ca}^{2+}$ , e NO. Ademais, as alterações na estrutura mitocondrial induziriam alterações no potencial redox intracelular, pH e nos níveis de AMP cíclico (cAMP).

Figura 13 - Experimentos de padronização.



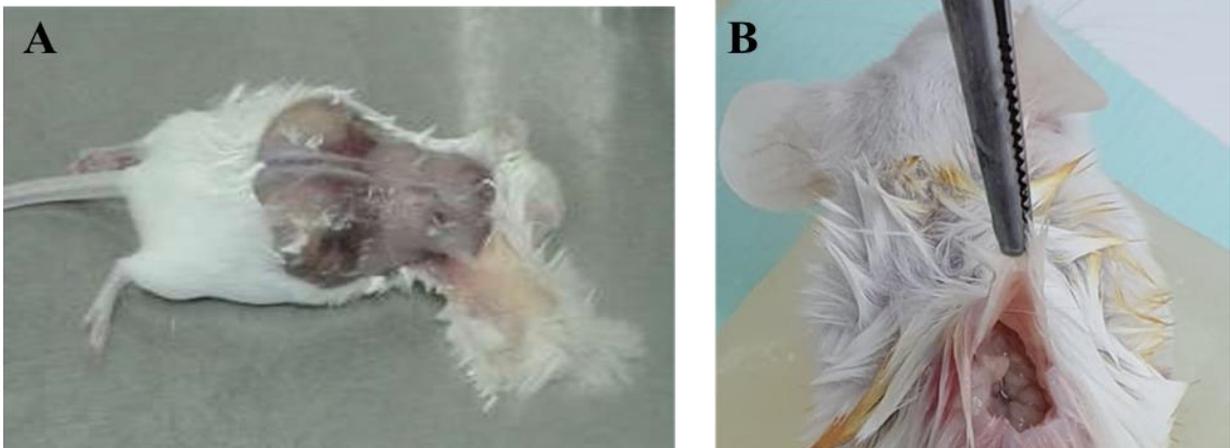
Fonte: do autor (2021).

Legenda: (A) Atividade mitocondrial. (B) Atividade mitocondrial em diferentes tempos de irradiação. (C) Produção de EROs totais em diferentes tempos de irradiação. (D) Produção de óxido nítrico (NO) em diferentes tempos de tratamento com LLLT. Legendas: Pb18: PMNs de animais infectados com a cepa Pb18 não tratado, Pb18+LLLT: PMNs animais infectados com a cepa Pb18 tratados com LLLT. Pb18+LLLT 10'': PMNs de animais infectado com a cepa Pb18 irradiados por 10 segundos. Pb18+LLLT20'': PMNs de animais infectado com a cepa Pb18 irradiados por 20 segundos. Pb18+LLLT30'' PMNs de animais infectado com a cepa Pb18 irradiados por 30 segundos. Pb18+LLLT30'': PMNs de animais infectado com a cepa Pb18 irradiados por 30 segundos. Pb18+LLLT60'': PMNs de animais infectado com a cepa Pb18 irradiados por 60 segundos. Os resultados de cada grupo estão representados como médias  $\pm$  desvio padrão. Diferença estatística entre os grupos (\*)  $p < 0,05$ . Teste T de Student (A) e One way ANOVA, pós teste de Tukey (B, C, D). Os experimentos foram realizados em triplicata.

## 6.2 VIABILIDADE CELULAR DOS PMNS

A figura 14 apresenta o conteúdo das bolsas de ar subcutâneas (“*air pouch*”), em **A** temos um animal que recebeu injeção de solução salina 0,9% estéril, ficando evidente não ocorrência do afluxo celular para o local, já em **B** o camundongo teve a bolsa de ar subcutânea inoculada com a cepa virulenta Pb18 na concentração de  $5 \times 10^6$  fungos/mL, com afluxo de células inflamatórias acentuado. Posto isto, optamos por utilizar como controles camundongos com a bolsa de ar subcutânea inoculada com a cepa Pb18 sem tratamento.

Figura 14 - Aspecto interno da infecção pela cepa Pb18 de *P. brasiliensis*



Fonte: do autor (2021).

Legenda: (A) animal inoculado com solução salina estéril 0,9%. (B) Animal infectado com Pb18 mostrando a formação de “air pouch”.

Os PMNs dos grupos tratados e não tratados com LLLT foram coletados das “*air pouch*” e as contagens do número absoluto e relativo dessas células foram realizadas. Como apresentado na Figura 15 A, os animais dos grupos tratados apresentaram uma maior contagem de PMNs quando comparados aos não tratados ( $p < 0,05$ ). Na contagem diferencial os PMNs foram os tipos celulares predominantes, tanto nos grupos tratados quanto nos grupos não tratados, seguidos de linfócitos e monócitos, respectivamente. Entretanto, quando comparamos os grupos controle com os tratados, nota-se que os animais submetidos a LLLT apresentam mais neutrófilos ( $p < 0,05$ ), linfócitos e monócitos do que os animais não tratados (Figura 17 B).

A maior contagem de células em animais submetidos a LLLT pode ser explicada pelo fato de que a radiação infravermelha atue ao nível mitocondrial estimulando a produção de EROs, que induzem a expressão de diversos fatores de transcrição, como Ref-1, AP-1, NF- $\kappa$ B, p53, ATF/CREB, HIF-1 e HIF-like. Esses fatores de transcrição estimulam a produção de proteínas responsáveis pelo desencadeamento de efeitos relacionados a proliferação e migração celular,

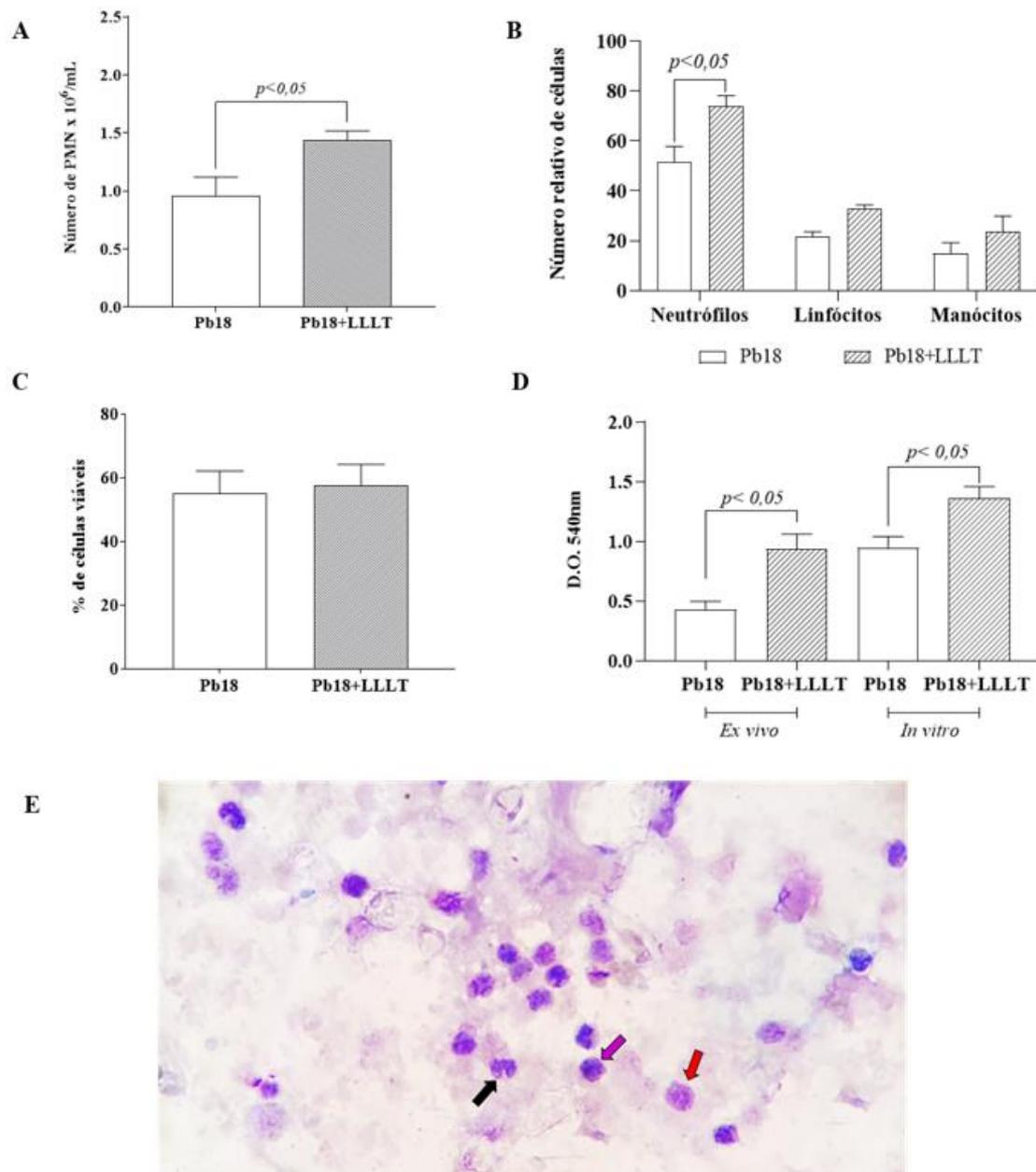
modulação dos níveis de citocinas, fatores de crescimento e mediadores inflamatórios (CHUNG *et al.*, 2012).

Diversos tipos celulares podem ter sua proliferação estimulada pela LLLT. Queratinócitos, apresentam um aumento na proliferação após irradiação com 660 nm, nota-se um aumento da expressão de Ciclina D1 e de proteínas envolvidas no processo de proliferação, como p63, CK10 e CK14 (ESMAEELINEJAD *et al.*, 2014). Células do endotélio vascular estimuladas com comprimento de 830 nm apresentaram maiores taxas de proliferação com quedas nas concentrações de VEGF e TGF- $\beta$  (SZYMANSKA *et al.*, 2013). Fibroblastos e osteoblastos também apresentaram aumentos na taxa de proliferação após LLLT (AMID *et al.*, 2014). LLLT também é capaz de estimular a migração celular, tedinócitos (tipo especial de fibroblastos alongados) tratados com 660 nm apresentam maior expressão de dinamina-2, proteína relacionada a migração deste tipo celular (TSAI *et al.*, 2012). A migração de melanócitos é estimulada por luz nos comprimentos UV, azul e vermelho (ALGHAMDI *et al.*, 2015).

Ademais, os PMNs são os tipos celulares mais abundantes no sangue e as primeiras células recrutadas para os tecidos infectados (CHRISTOFFERSSON & PHILLIPSON, 2018; ROSALES, 2018), fato que também contribui para um maior número desse tipo celular nas amostras oriundas dos animais tratados, uma vez que ambos os grupos foram infectados com Pb18. Na resposta imunológica contra fungos, essas células exercem papel fundamental na eliminação desses agentes (ROMANI, 2011), conferindo resistência ao hospedeiro e contribuindo para o desenvolvimento de uma resposta imune mais eficaz (RESTREPO *et al.*, 1992).

No tocante à porcentagem de células viáveis, não houve diferença significativa quando se compara os animais irradiados com LASER com os não irradiados (Figura 15 C). O que pode estar relacionado a uma menor toxicidade promovida por LLLT na dose e tempo empregado. A atividade mitocondrial foi mais intensa nos grupos tratados, figura 15 D, tanto no modelo *in vitro* quanto no *ex vivo* ( $p < 0,05$ ), fato que pode estar relacionado com o mecanismo de sinalização mitocondrial retrógrado induzido pela LLLT (KARU, 2008).

Figura 15 - Efeito de LLLT sobre o número absoluto de células.



Fonte: do autor (2021).

Legenda: (A), número relativo de células (B), porcentagem de células viáveis (C), atividade mitocondrial (D) e morfologia das células obtidas (E). Seta vermelha: neutrófilo; seta preta: monócito; seta lilás: linfócito. Legenda: *Ex vivo* - Pb18 :PMNs de animais infectados com a cepa Pb18 não tratado, Pb18+LLLT: PMNs animais infectados com a cepa Pb18 tratados com LLLT. *In vitro* - Pb18: PMNs de cocultivos não irradiado. Pb18+LLLT: PMNs de cocultivos irradiados. Os resultados de cada grupo estão representados como médias  $\pm$  desvio padrão. Diferença estatística entre os grupos (\*)

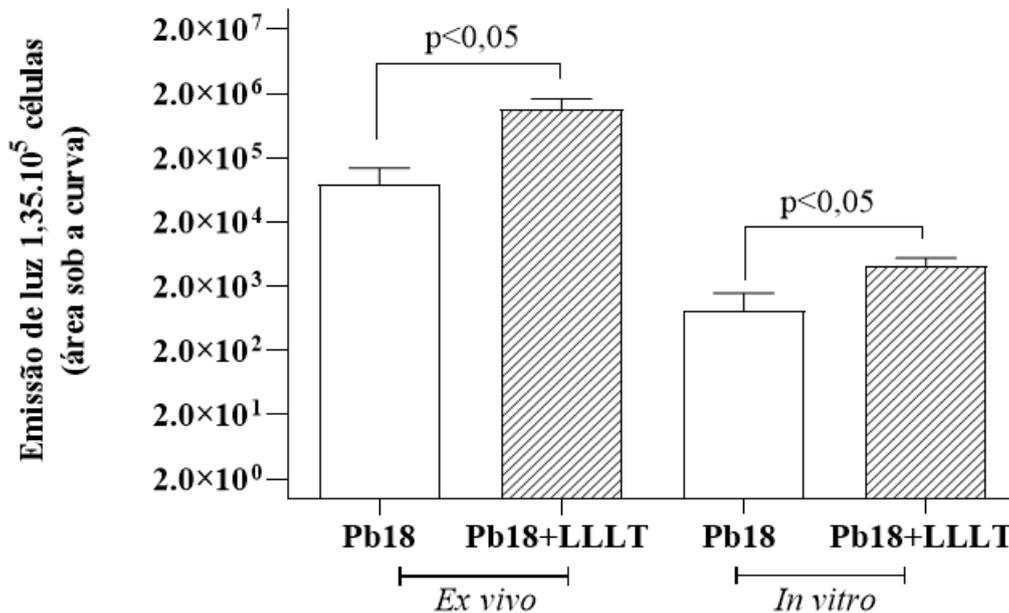
### 6.3 PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs)

Espécies reativas de oxigênio apresentam um papel dual, benéficos em baixas concentrações e prejudiciais quando em níveis elevados (POPA-WAGNER *et al.*, 2013). EROs são produzidos de forma basal no momento em que o metabolismo mitocondrial se encontra em homeostase, entretanto, na ocorrência de alterações no potencial de membrana das mitocôndrias a produção desses metabólitos é aumentada. A absorção de luz pela CCO (Complexo IV) presente na membrana mitocondrial promove alteração no potencial dessa membrana estimulando um aumento na geração de espécies oxidantes (DE FREITAS; HAMBLIN, 2016).

A produção desses radicais livres de oxigênio é fundamental para as células do ramo inato da imunidade, assim como para processos de sinalização celular (DUPRÉ-CROCHET; ERARD; NÜBE, 2013). Nesse contexto, a LLLT surge como uma estratégia terapêutica promissora para a modulação da atividade de células do sistema imunológico (CHEN *et al.*, 2014). Cerdeira *et al.* (2016) demonstraram que LLLT a 660nm conseguiu estimular a produção de EROs por PMNs desafiados com *C. albicans*, já Burger *et al.* (2015) estimularam a medula óssea de camundongos com LLLT a 780nm gerando PMNs com maior capacidade de produção de espécies oxidantes frente a *P. brasiliensis* (cepa Pb18).

De maneira similar aos achados dos autores supracitados, o presente trabalho observou que LLLT a 780nm aplicada sobre as bolsas de ar subcutâneas e diretamente em cultivos de PMNs maduros conseguiu estimular um aumento na produção geral de espécies oxidantes por essas células (figura 16). Entretanto, nos ensaios *in vitro* os níveis desses compostos foram menores que *ex vivo*, o que pode ser explicado por ocasionais distúrbios no potencial de membrana mitocondrial proporcionados pelo cultivo celular. Como apontado por Huang *et al.* (2012), estresse oxidativo pré-existente, assim como citotoxicidade e/ou inibição de do transporte de elétrons, podem ocasionar diminuição do potencial de membrana mitocondrial, e nesse contexto a LLLT poderia levar um aumento do potencial de membrana para níveis normais com produção de espécies oxidantes reduzida. É importante salientar que o estímulo à produção de EROs por LLLT não se restringe apenas a mitocôndria, o tratamento também estimula as vias mediadas por NADPH oxidase (CERDEIRA *et al.*, 2016), fato que pode explicar uma maior produção de derivados do metabolismo de oxigênio nos grupos tratados nos ensaios *in vitro*.

Figura 16 - Efeito de LLLT na produção de espécies reativas de oxigênio de PMNs.



Fonte: do autor (2021)

Legenda: *Ex vivo* - Pb18 :PMNs de animais infectados com a cepa Pb18 não tratado, Pb18+LLLt: PMNs animais infectados com a cepa Pb18 tratados com LLLT. *In vitro* - Pb18: PMNs de cocultivo não irradiado. Pb18+LLLt: PMNs de cocultivo irradiados. Os resultados de cada grupo estão representados como médias  $\pm$  desvio padrão. Diferença estatística entre os grupos (\*)  $p < 0,05$ . Teste T de Student não pareado.

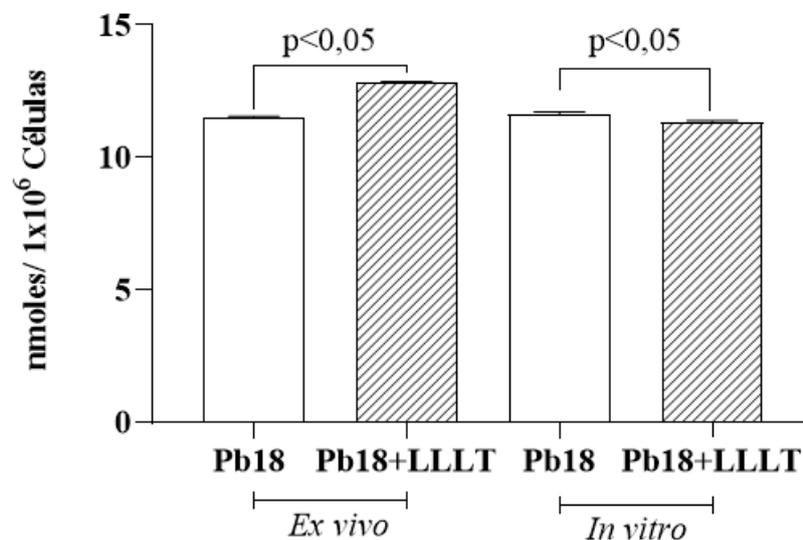
#### 6.4 ETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é um importante radical livre de oxigênio, fundamental no processo de fagocitose das células do sistema imunológico (BAEHNER *et al.*, 1975), assim como para diversas vias de sinalização celular (DUPRÉ-CROCHET; ERARD; NÜBE, 2013). Acredita-se que esse composto juntamente com os hidroperóxidos lipídicos sejam as espécies oxidantes com maior probabilidade de realizar sinalização redox benéficas (FORMAN; *et al.*, 2014).

Para a realização da dosagem de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizou-se o ensaio colorimétrico proposto por PICK & MIZEL (1981), com algumas modificações. Os resultados obtidos apontam que os PMNs dos grupos submetidos a LLLT, nos ensaios *ex vivo*, apresentaram de forma significativa ( $p < 0,05$ ) maiores concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 17). Os relatos sobre a produção de peróxido de hidrogênio em fagócitos sob estimulação com LLLT são escassos. Todavia, em certos tipos celulares, como subclones de células T, MCF-7 e 70Z/3 pré-célula B, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode induzir a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B. (MANNA *et al.*, 1998; TERAYAMA *et al.*, 2020).

NF- $\kappa$ B consiste em uma família de cinco proteínas ligantes de DNA diferentes. Essas proteínas são reguladores chaves da imunidade inata e adaptativa, estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias, acelerando a proliferação e migração celular e inibindo a apoptose (TANIGUCHI; KARIN, 2018). A elevação dos níveis de peróxido de hidrogênio promovida pela LLLT nos PMNs dos ensaios *ex vivo*, poderia estar relacionada com aumento da expressão de NF- $\kappa$ B, modulando essas células para um perfil pró-inflamatório favorecendo a eliminação do fungo. Este aspecto não foi abordado no presente trabalho, mas sugere uma linha de pesquisa promissora.

Figura 17 - Efeito de LLLT sobre a produção de peróxido de hidrogênio de PMNs.



Fonte: do autor (2021)

Legenda: *Ex vivo* - Pb18 :PMNs de animais infectados com a cepa Pb18 não tratado, Pb18+LLLT: PMNs animais infectados com a cepa Pb18 tratados com LLLT. *In vitro* - Pb18: PMNs de cocultivo não irradiado. Pb18+LLLT: PMNs de cocultivo irradiados. Os resultados de cada grupo estão representados como médias  $\pm$  desvio padrão. Diferença estatística entre os grupos  $p < 0,05$ . Teste T de Student não pareado.

Os resultados dos ensaios *in vitro* (Figura 19) apontam que a produção de peróxido de hidrogênio pelos PMNs não tratados foi maior ( $p < 0,05$ ), fato que pode estar relacionado com maior instabilidade do potencial de membrana mitocondrial nessas amostras. Por outro lado, em ensaios *in vitro* com outros tipos celulares como miócitos estriados, e em comprimento de onda mais elevado (830 nm) LLLT possui efeito antioxidante, estimulando redução dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (MACEDO *et al.*, 2015). Outro fato importante a ser considerado nesse grupo é a alta produção da enzima CAT (Figura 18), que desempenha papel importante para a remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no peroxissomos, atuando com antioxidante (GLORIEUX; CALDERON, 2017).

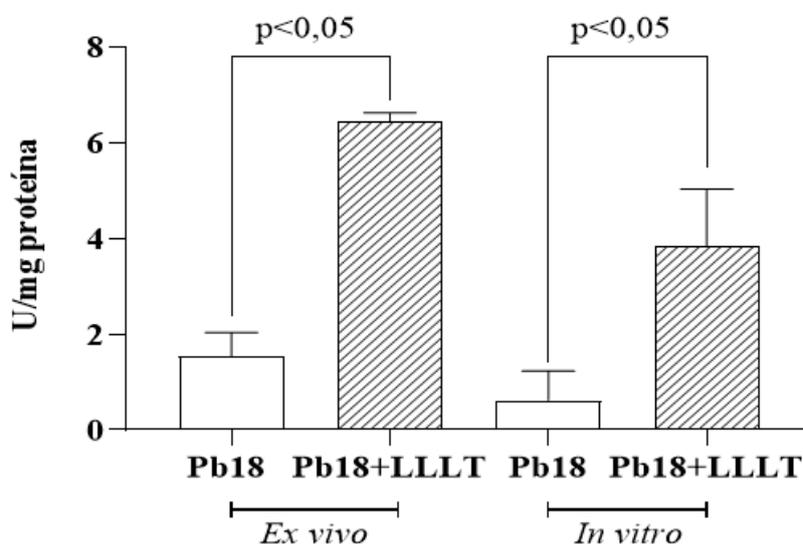
## 6.5 NÍVEIS DA ENZIMA CATALASE (CAT)

A atividade da enzima CAT foi determinada e os resultados expostos nos gráficos da figura 20. Através da análise dos dados obtidos podemos notar que a produção de CAT foi maior nos grupos de PMNs tratados com LLLT, em ambos os ensaios. CAT é uma enzima fundamental no metabolismo de espécies oxidantes, localizando-se principalmente nos peroxissomos do citoplasma celular, e tem como principal função a dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, desempenhando um papel importante na defesa celular contra o dano oxidativo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (GLORIEUX; CALDERON, 2017).

Diante dos resultados expostos nos gráficos da figura 20, uma hipótese foi levantada baseada no fato de que fungos do gênero *Paracoccidioides* produzem isoformas dessa enzima como mecanismo de escape da resposta imunológica e homeostasia de EROs da própria célula fúngica (TAMAYO *et al.*, 2017). Somado ao fato de a própria LLLT ser capaz de induzir a produção de CAT em outros tipos celulares no comprimento de onda de 830 nm (DOS SANTOS *et al.*, 2020).

Deste modo, podemos inferir que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não seja fundamental para eliminação do fungo, e outros derivados do metabolismo de oxigênio, como o ânion superóxido, também possam desempenhar papel importante no processo de fagocitose. Assim como outros mecanismos celulares possam estar envolvidos no *killig* de *Paracoccidioides* mediado por LLLT, uma vez que a contagem de unidades formadoras de colônia (CFU) foi menor nos grupos tratados com LLLT (figura 24). Adicionalmente, alguns autores sugerem que o sistema redox da glutatona juntamente com a atividade de CAT protegem neutrófilos ativados de seus próprios produtos oxidativos, durante um forte processo oxidativo externo (ROOS *et al.*, 1980).

Figura 18 - Efeitos de LLLT sobre a produção da enzima catalase (CAT) por PMNs.



Fonte: do autor (2021).

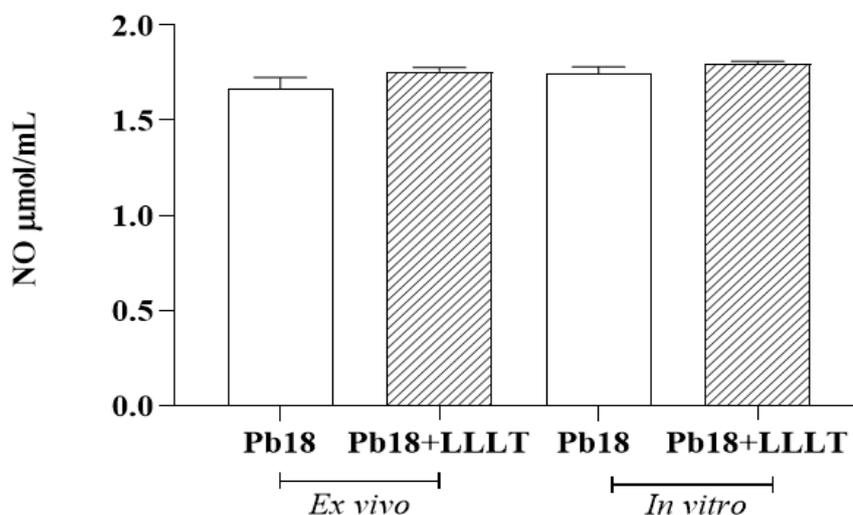
Legenda: *Ex vivo* - Pb18 :PMNs de animais infectados com a cepa Pb18 não tratado, Pb18+LLLT: PMNs animais infectados com a cepa Pb18 tratados com LLLT. *In vitro* - Pb18: PMNs de cocultivo não irradiado. Pb18+LLLT: PMNs de cocultivo irradiados. Os resultados de cada grupo estão representados como médias  $\pm$  desvio padrão. Diferença estatística entre os grupos (\*)  $p < 0,05$ . Teste T de Student não pareado.

## 6.6 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

NO atua como um mensageiro e possui diversas moléculas alvo. NO está envolvido na neurotransmissão, tônus vascular, regulação da transcrição de genes, produção de alterações pós transcricionais em proteínas. Quando combinado com ânion superóxido NO da origem ao potente oxidante peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). Em mamíferos NO é produzido através de três diferentes isoformas da enzima Óxido nítrico sintase (iNOS) (FÖRSTERMANN & SESSA, 2012).

Esse composto possui papel fundamental na resposta imunológica, sendo produzidos principalmente por macrófagos, e em menor quantidade por outros tipos celulares como neutrófilos, eosinófilos, células endoteliais e epiteliais, linfócitos T e fibroblastos. NO é responsável por diversas funções efetoras na resposta imune, promovendo a destruição de microrganismo, inibição de crescimento tumoral, necrose e fibrose, proliferação de linfócitos, produção de anticorpos e regulação da expressão de citocinas (TRIPATHI, 2007).

Figura 19 - Efeito de LLLT na produção de Óxido Nítrico por PMNs



Fonte: do autor (2021)

Legenda: *Ex vivo* - Pb18 :PMNs de animais infectados com a cepa Pb18 não tratado, Pb18+LLLT: PMNs animais infectados com a cepa Pb18 tratados com LLLT. *In vitro* - Pb18: PMNs de cocultivo não irradiado. Pb18+LLLT: PMNs de cocultivo irradiados. Os resultados de cada grupo estão representados como médias  $\pm$  desvio padrão. Teste T de Student não pareado.

Apesar de NO ser frequentemente produzido após estímulos com LLLT (KARU; PYATIBRAT; AFANASYEVA, 2005). No presente estudo não foram encontradas diferenças significativas na produção desse composto entre os PMNs tratados e não tratados, tanto no ensaio *in vitro* quanto no *ex vivo*, como demonstrado nos gráficos da figura 19. Provavelmente, tal fato está relacionado a uma baixa presença de macrófagos nas amostras coletadas, dado que essas células constituem a principal fonte desse composto durante as repostas contra microrganismos (PALMIERI *et al.*, 2020).

## 6.7 PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS

A cinética da produção de proteínas totais mostrou que nos experimentos *ex vivo* ocorreu uma maior produção de proteínas pelos PMNs irradiados ( $p < 0,05$ ) em todos os tempos avaliados, após 6 horas ficou evidente uma queda no metabolismo proteico das células irradiadas (Figura 20 A), entretanto mesmo com essa queda os níveis se mantiveram significativamente superiores aos dos PMNs não irradiados.

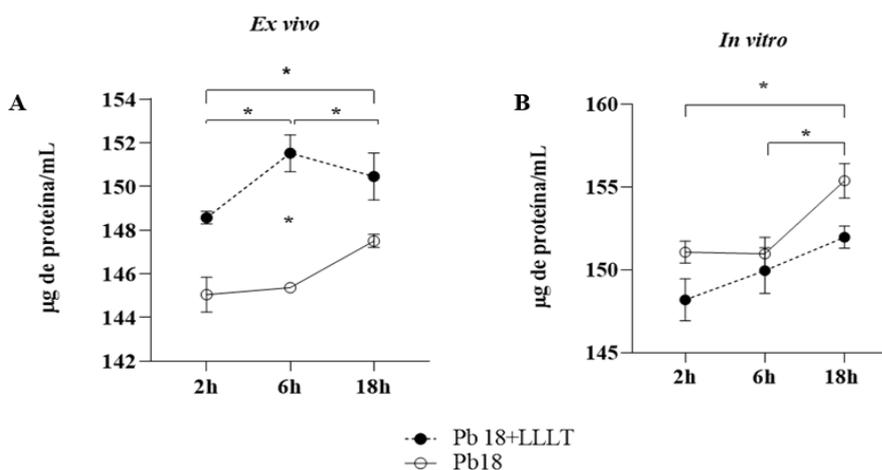
Curiosamente, nos ensaios *in vitro*, a cinética de produção de proteínas se deu de maneira contrária à dos experimentos *ex vivo*. Ocorrendo uma maior produção pelos PMNs não

irradiados do que nos irradiados (Figura 20 B), com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tempos de duas e seis horas, e entre seis e 18 horas. Contudo, os PMNs irradiados nesses ensaios apresentaram uma tendência de aumento dos níveis de proteínas totais.

Diversos autores demonstraram que LLLT conseguiu estimular diversos fatores de transcrição que promovem a síntese de diversos tipos de proteínas importantes para processo como migração e proliferação celular (KARU; & KOLYAKOV, 2005; PASSARELLA *et al.*, 1984; SZEZERBATY *et al.*, 2018). PMNs estimulados com LLLT apresentaram marcada elevação na síntese de proteínas (BURGER *et al.*, 2015), fato que corrobora os resultados encontrados nos nossos experimentos *ex vivo* (figura 20 A).

Os resultados da cinética dos experimentos *in vitro* (figura 20 B), caracterizada pela menor produção de proteínas pelos PMNs irradiados, poderiam ser explicados consumo e/ou ausência ou produção tardia de alguns fatores de transcrição importantes para a síntese proteica. Nota-se que após o tempo de seis horas ocorre um aumento considerável da síntese de proteínas por ambos os grupos, tratados e não tratados com LLLT. Fato que pode indicar a ocorrência de um efeito mais lento dos fatores de transcrição nesse modelo, com tudo a tendência do aumento da produção de proteínas corresponde com dados da literatura (BURGER *et al.*, 2015).

Figura 20 – Produção de Proteínas.



Fonte: do autor (2021).

Legenda: (A) Efeito de LLLT sobre a cinética da produção de proteínas de PMNs no experimento *ex vivo*. (B) Efeito de LLLT sobre a cinética de produção de proteínas de PMNs nos experimentos *in vitro*. Legenda: *Ex vivo* - Pb18 :PMNs de animais infectados com a cepa Pb18 não tratado, Pb18+LLLTT: PMNs animais infectados com a cepa Pb18 tratados com LLLT. *In vitro* - Pb18: PMNs de cocultivo não irradiado. Pb18+LLLTT: PMNs de cocultivo irradiados. Os resultados de cada grupo estão representados como médias  $\pm$  desvio padrão. Diferença estatística entre os grupos (\*)  $p < 0,05$ . Teste Tow Way ANOVA, pós teste de Tukey.

## 6.8 PRODUÇÃO DE CITOCINAS

Os níveis das citocinas fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), interleucina 4 (IL-4), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), interleucina 17 (IL-17) e da quimiocina KC/CXCL<sub>1</sub> foram medidos através da técnica de ELISA. Os resultados obtidos nos ensaios *ex vivo* e *in vitro* foram expressos nos gráficos das figuras 21 e 22.

Os dados encontrados mostram que os níveis de GM-CSF aumentaram nos grupos tratados com LLLT em ambos os experimentos ( $p < 0,05$ ), (figura 21 A e B). Já as concentrações de IL-6 (figura 23 E e F), IL-12 (figura 22 A e B) e IL-17 (figura 22 C e D) foram mais elevadas nas amostras dos ensaios *ex vivo* ( $p < 0,05$ ).

Esses resultados nos mostram que os PMNs tratados com LLLT apresentaram maiores níveis de citocinas pró-inflamatórias. GM-CSF, por exemplo, estimula a produção de neutrófilos e eosinófilos pelo progenitor mieloide na medula óssea, induzindo ativação celular e prolongando a vida útil dessas células (WICKS; ROBERTS, 2016). A IL-6 participa ativamente de mecanismos inflamatórios e imunorregulatórios, induzindo produção de proteínas de fase aguda, maturação de linfócitos B, síntese de imunoglobulinas e proliferação de linfócitos T, induzindo a diferenciação dessas células para um perfil Th17 (KAUR *et al.*, 2020).

Já a IL-12 atua principalmente sobre linfócitos T e células NK, estimulando a diferenciação desses linfócitos para o perfil Th1, promovendo a produção de INF- $\gamma$  e a atividade citotóxica (ZUNDLER; NEURATH, 2015). IL-17 é produzida principalmente por células TCD4<sup>+</sup> do tipo Th17 e células linfoides inatas (ILCs), induzindo a produção de GM-CSF, G-CSF, que estimulam mobilização de neutrófilos e produção de defensinas, contribuindo para a resolução das infecções fúngicas (ROMANI, 2011).

Outro mecanismo que poderia explicar o predomínio de citocinas pró-inflamatórias é a produção de EROS mediada por LLLT. Esses radicais livres de oxigênio podem atuar estimulando a atividade do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, conhecido pelo seu papel pró-inflamatório (HAMBLIN, 2017). Dados da literatura mostram que LLLT conseguiu ativar a via de NF- $\kappa$ B em fibroblastos murinos, através de EROs estimulados por essa terapia (CHEN *et al.*, 2011).

Desta forma, a elevação dos níveis dessas citocinas pode contribuir para tornar os PMNs mais competentes para combater *Paracoccidioides*, uma vez que um perfil pró-inflamatório, mediado principalmente por citocinas Th1 e Th17, é importante para a eliminação de *Paracoccidioides* (DE CASTRO *et al.*, 2013). Por outro lado, a persistência dos estímulos

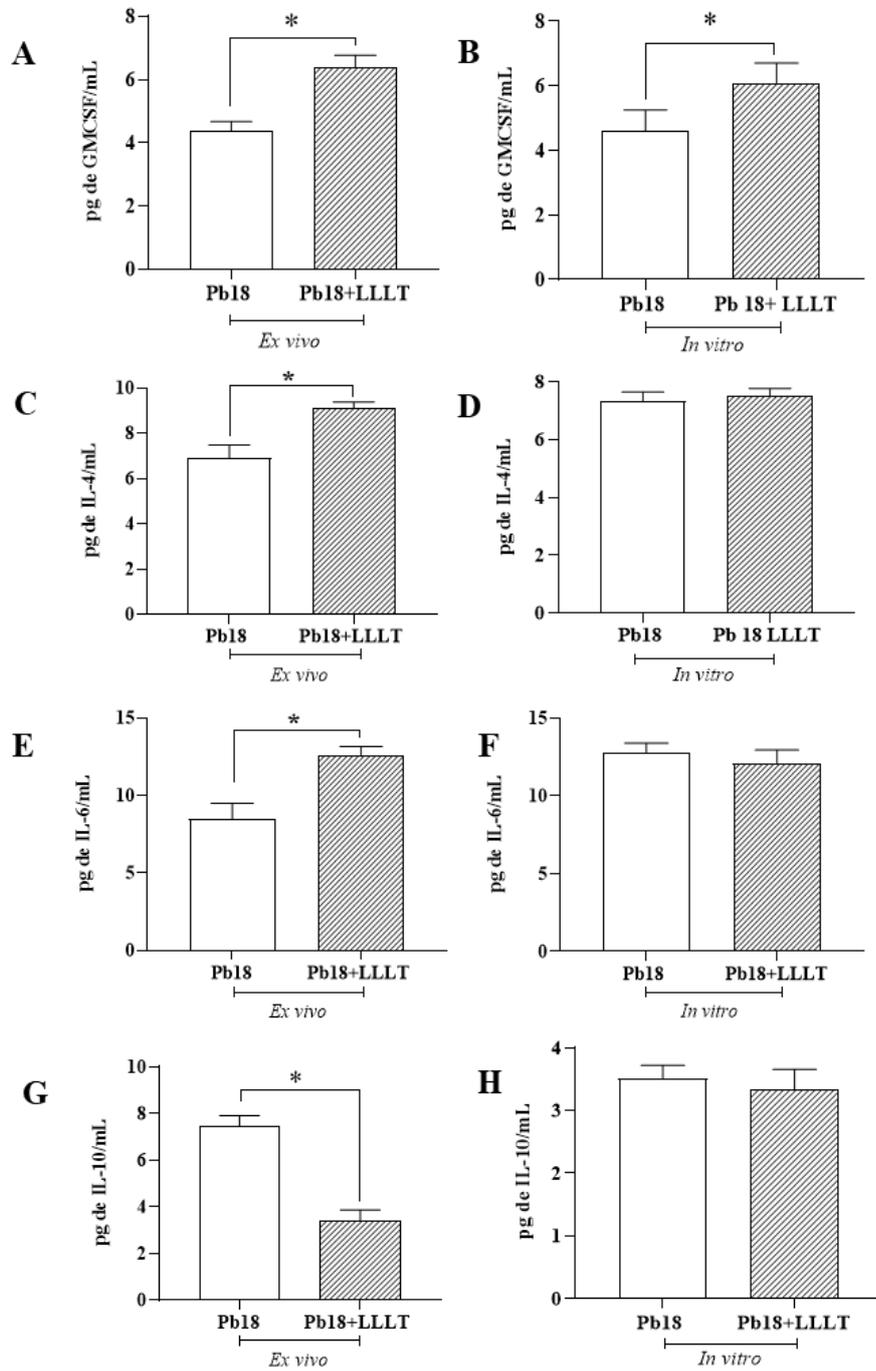
mediados por linfócitos Th1 e Th17 pode gerar uma resposta exacerbada promovendo dano tecidual e consequente perda de função via fibrose (DE CASTRO *et al.*, 2013).

Em relação a IL-4 (figura 21 C) houve uma elevação dos níveis dessa citocina nos experimentos *ex vivo*. Para IL-10 (figura 21 G) notou-se uma diminuição da concentração *ex vivo* ( $p < 0,05$ ) nos grupos irradiados frente aos não irradiados. Já para KC/CXCL<sub>1</sub> (figura 21 E e F), verificou-se uma queda significativa ( $p < 0,05$ ) nas concentrações nos grupos tratados nos dois ensaios.

IL-10 é uma citocina de caráter regulatório, produzida principalmente por macrófagos e células T regulatórias, e possui efeito inibitório sobre IL-12 (OUYANG; O’GARRA, 2019). Enquanto IL-4 é proveniente de células T CD4<sup>+</sup> auxiliares e mastócitos, e atua sobre as células B induzindo a troca de isotipo para IgE, diferenciação de células T para o perfil Th2, ativação alternativa de macrófagos (HEEB; EGHOLM; BOYMAN, 2020). Por fim, KC/CXCL<sub>1</sub> desempenham um papel fundamental no recrutamento e ativação de neutrófilos para a eliminação de microrganismos (SAWANT *et al.*, 2016). Apesar de notarmos uma diminuição dos níveis dessa citocina o recrutamento de PMNs nos grupos tratados com LLLT foi maior do que nos grupos não tratados (Figura 15 B) Provavelmente esse fato decorra do efeito exercido pelos altos níveis de IL-17 (Figura 22 C) nos grupos tratados. Essa citocina é capaz de estimular a produção de GMC-SF e G-CSF relacionadas com a granulopoiese e liberação de PMNs e outros tipos celulares pela medula óssea (ROSALES, 2018).

Menores níveis dessas citocinas, podem estar relacionados a uma resposta benéfica diante da PCM, uma vez que o perfil Th2, mediado por IL-4, é predominante nas formas mais severas da doença (DE CASTRO *et al.*, 2013). Altos níveis de IL-8, isoforma humana de KC/ CXCL<sub>1</sub>, foi relacionado a um favorecimento da proliferação e sobrevivência de *Paracoccidioides* no interior de fagócitos, em decorrência do efeito anti-apoptótico desencadeado por essa citocina (FORTES *et al.*, 2011).

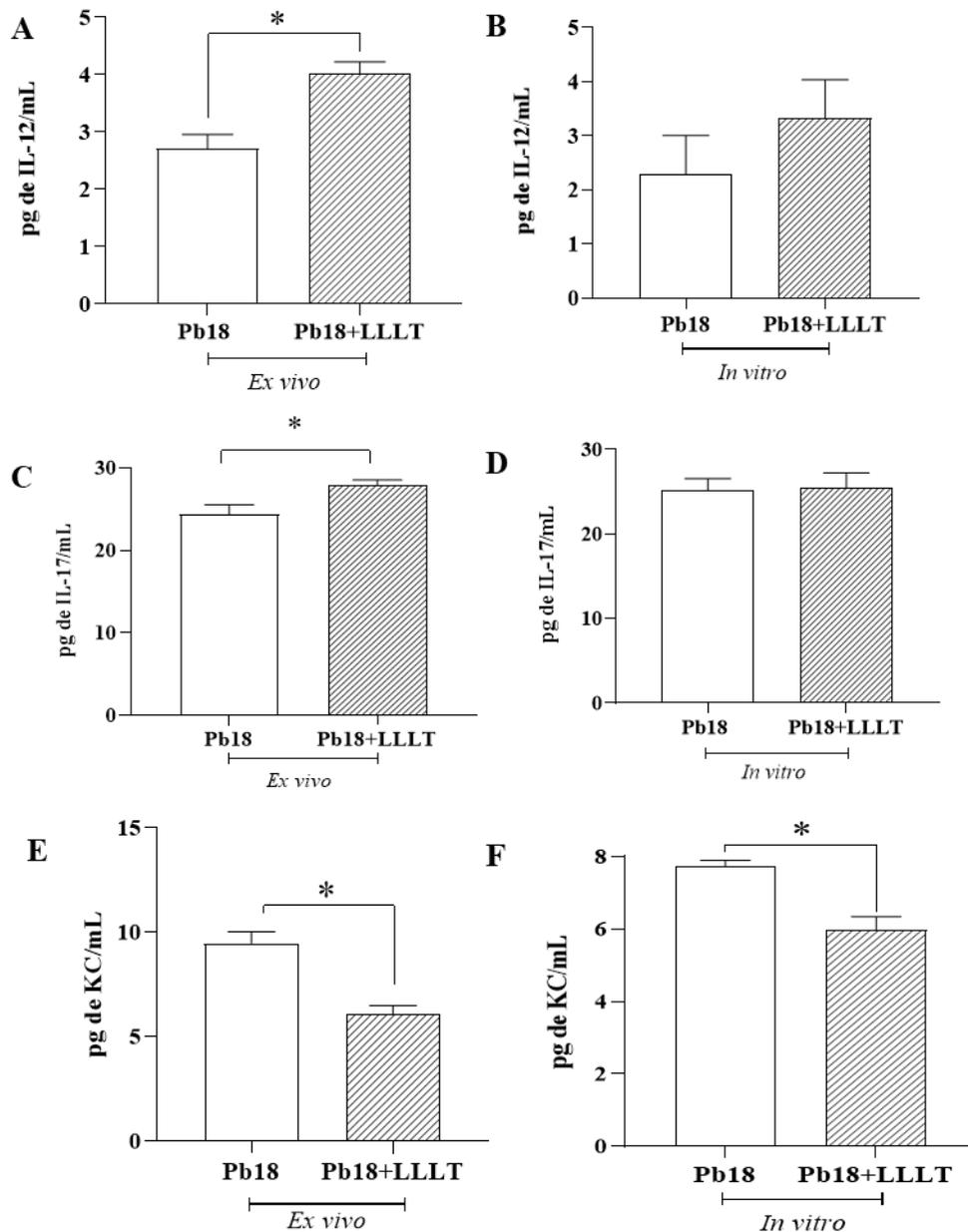
Figura 21 - Efeito de LLLT sobre a produção de citocinas por PMNs.



Fonte: do autor (2021).

Legenda: (A) GM-CSF *ex vivo*, (B) GM-CSF *in vitro*. (C) IL-4 *ex vivo*, (D) IL-4 *in vitro*. (E) IL-6 *ex vivo*, (F) IL-6 *in vitro*. (G) IL-10 *ex vivo*, (H) IL-10 *in vitro*. *Ex vivo* - Pb18 :PMNs de animais infectados com a cepa Pb18 não tratado, Pb18+LLLT: PMNs animais infectados com a cepa Pb18 tratados com LLLT. *In vitro* - Pb18: PMNs de cocultivo não irradiado. Pb18+LLLT: PMNs de cocultivo irradiados. Os resultados de cada grupo estão representados como médias  $\pm$  desvio padrão. Diferença estatística entre os grupos (\*)  $p < 0,05$ . Teste T de Student não pareado.

Figura 22 - Efeito de LLLT sobre a produção de citocinas por PMNs



Fonte: do autor (2021)

Legenda: (A) IL-12 ex vivo, (B) IL-12 in vitro. (C) IL-17 ex vivo, (D) IL-17 in vitro. (E) KC ex vivo, (F) KC in vitro. Ex vivo - Pb18 :PMNs de animais infectados com a cepa Pb18 não tratado, Pb18+LLLT: PMNs animais infectados com a cepa Pb18 tratados com LLLT. In vitro - Pb18: PMNs de cocultivo não irradiado. Pb18+LLLT: PMNs de cocultivo irradiados. Os resultados de cada grupo estão representados como médias  $\pm$  desvio padrão. Diferença estatística entre os grupos (\*)  $p < 0,05$ . Teste T de Student não pareado.

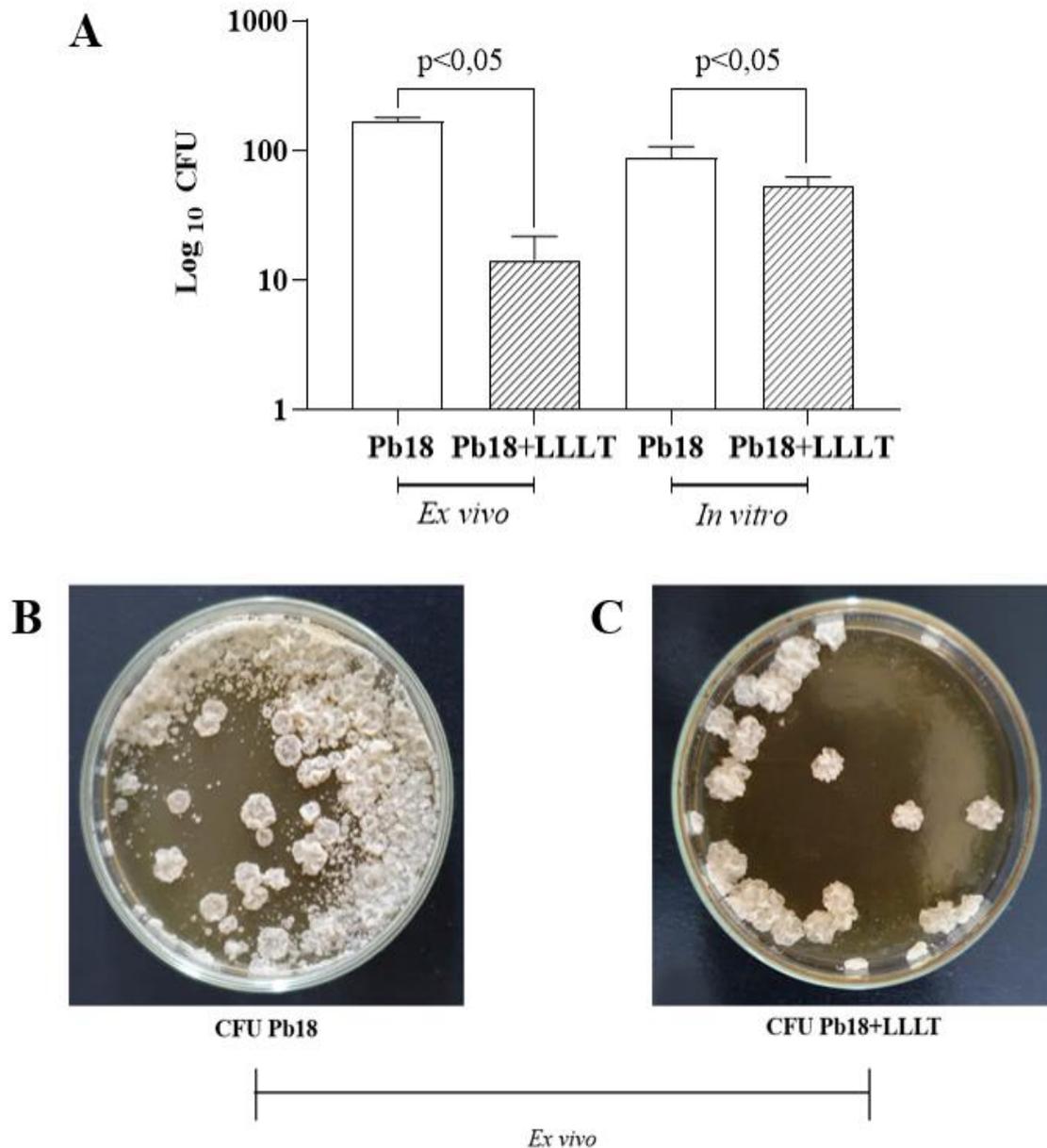
## 6.9 QUANTIFICAÇÃO DE *P. brasiliensis* VIÁVEIS

O tratamento com LLLT foi capaz de induzir uma maior atividade antifúngica dos PMNs, o que foi indiretamente mostrado por um número significativamente menor ( $p < 0,05$ ) de colônias de Pb18 crescendo a partir de material oriundo do cultivo celular avaliado por um período de 15 dias (figura 23).

Os gráficos da (Figura 23 A) mostram que o material coletado dos PMNs irradiados de ambos os ensaios apresentaram menores contagens de unidade formadoras de colônias quando comparados aos PMNs não irradiados. Achados da literatura mostraram que existe uma boa correlação entre a produção de EROs e menores contagens de unidades formadoras de colônia (CFU) em PMN tratados com LLLT (BURGER *et al.*, 2015; CERDEIRA *et al.*, 2016b) corroborando os achados desses experimentos.

Nos experimentos *in vitro* a diminuição da contagem de unidades formadoras de colônia (CFU) em PMNs tratados foi menos marcante do que nos *ex vivo* (figura 23 A e C). Esses achados podem estar relacionados ao fato de o modelo do co-cultivo de PMNs e *Paracoccidioides* empregado nos experimentos *in vitro* conseguirem induzir atividade fungistática e não fungicida. Complementarmente, a indução da atividade fungistática nesse modelo de co-cultivo só é notada após longos períodos de incubação com o fungo, cerca de 70 horas (KURITA *et al.*, 1999). Assim, os resultados mostram que mesmo em condições adversas LLLT pode ter estimulado um aumento na capacidade fungistática de PMNs. Apesar dos resultados promissores para CFU, nenhum dos grupos tratados foi capaz de inibir totalmente o crescimento do fungo.

Figura 23 - Efeito de LLLT sobre o número de células fúngicas viáveis.



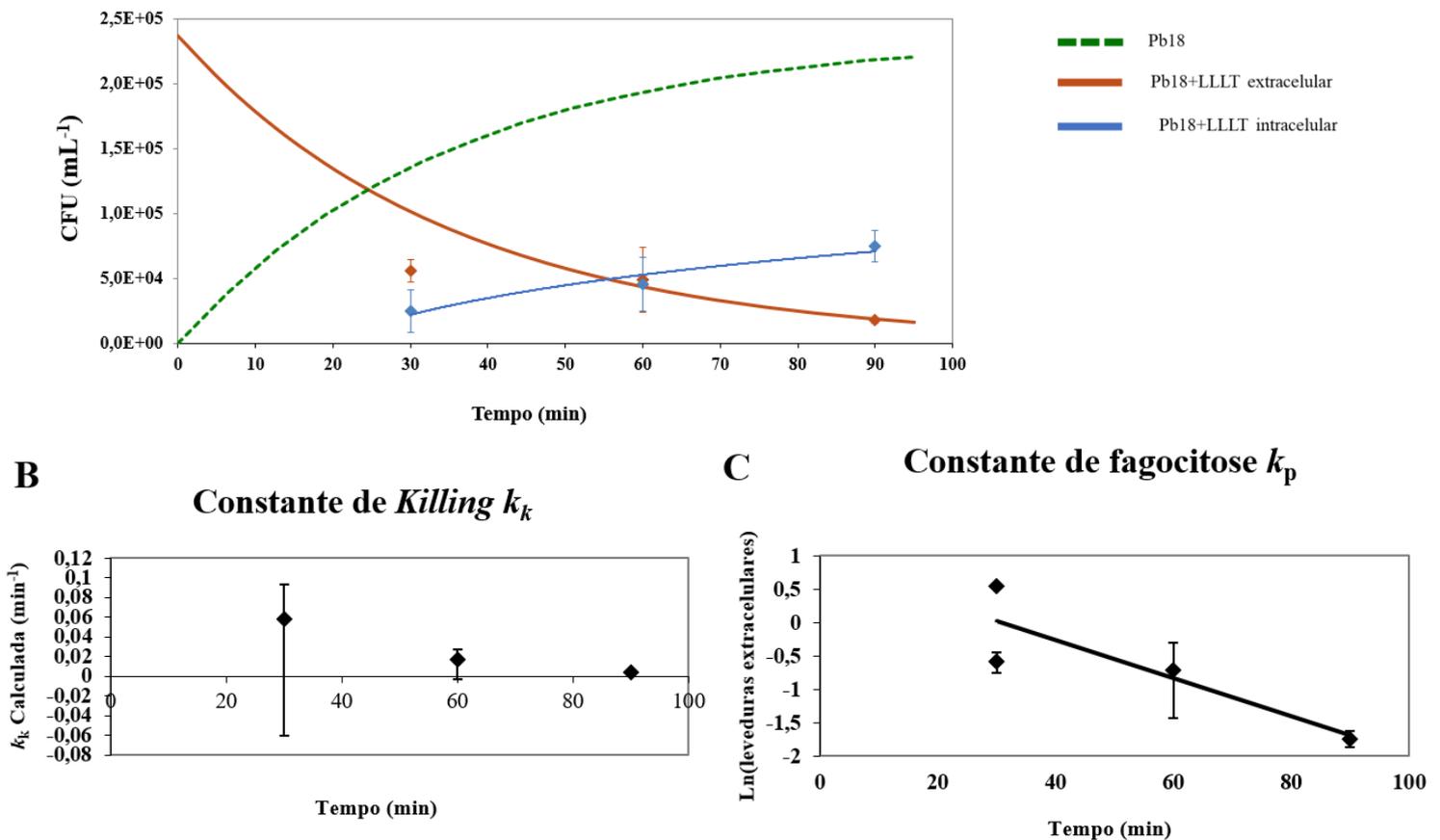
Fonte: do autor (2021)

Legenda:(A) Número de unidades formadoras de colônia, “colony-forming unit” (CFU). (B) Colônias da cepa Pb18 de *P. brasiliensis* que cresceram no grupo de PMNs não tratados com LLLT nos experimentos *ex vivo*. (C) Colônias da cepa Pb18 de *P. brasiliensis* que cresceram no grupo de PMNs tratados com LLLT nos experimentos *ex vivo*. Legenda: *Ex vivo* - Pb18 :PMNs de animais infectados com a cepa Pb18 não tratado, Pb18+LLLT: PMNs animais infectados com a cepa Pb18 tratados com LLLT. *In vitro* - Pb18: PMNs de cocultivo não irradiado. Pb18+LLLT: PMNs de cocultivo irradiados. Os resultados de cada grupo estão representados como médias  $\pm$  desvio padrão. Diferença estatística entre os grupos (\*)  $p < 0,05$ . Teste T de Student não pareado.

## 6.10 CAPACIDADE ANTIFÚNGICA DE PMNS CONTRA *P. brasiliensis*

O gráfico da figura 24 A representa a capacidade antifúngica dos PMNs durante os experimentos *in vitro*. As curvas teóricas dos números de CFU foram geradas através do cálculo da constante de *killing* ( $K_k$ ), que mede a capacidade dos PMNs em promover a morte das leveduras do fungo, e a constante de fagocitose ( $K_p$ ), que afere atividade fagocítica dessas células, pelos períodos de 30, 60 e 90 minutos. Em laranja, a curva que indica o número de leveduras extracelulares, em azul as leveduras intracelulares, e a linha verde tracejada corresponde ao grupo controle, PMNs de camundongos infectados por Pb18, representando a concentração de leveduras intracelulares se o *killing* não ocorresse.

Figura 24 - Efeito de LLLT na atividade antifúngica de PMNs.



Fonte: do autor (2021)

Legenda: (A) Sumário dos resultados dos testes de capacidade de fagocitose e *killing* de PMNs. (B) Gráfico da **Constante de Killing**  $k_k$ , mede a capacidade de eliminação de leveduras pelos PMNs, é um gráfico semi-logarítmico de levedura extracelulares vs. tempo. (C) Gráfico da **Constante de fagocitose**  $k_p$ , afere o índice de leveduras fagocitadas pelos PMNs, o cálculo para cada ponto de tempo é traçado, as barras de erro representam os desvios padrão para leveduras intracelulares. **Legenda:** Linha verde tracejada representa a concentração de leveduras do grupo controle Pb18, que não foi tratado com LLLT. A linha laranja corresponde a concentração de leveduras extracelulares do grupo tratado com LLLT e a linha azul a quantidade de leveduras extracelulares desse grupo.

Os resultados do gráfico da figura 24 A demonstram que com o passar do tempo o número de CFU extracelular diminui (linha laranja) e o número de CFU intracelular aumenta a partir de 60 minutos. Isso ocorre pois,  $k_k$  (figura 24 B) diminui aos 60 minutos (figura 24 C), indicando uma menor capacidade fungicida de PMNs irradiados a partir desse tempo. Curiosamente, a capacidade fagocitária de PMNs apresentou uma tendência de elevação em todos os períodos avaliados (figura 24 C), uma vez que o gráfico indica uma diminuição do número de leveduras ao longo do tempo. Esses achados indicam que os PMNs irradiados prestam uma grande capacidade de fagocitose com a competência de *killing* que decai com o tempo.

Esses dados validam os achados deste trabalho, que mostram a capacidade fungistática e não fungicida de PMNs submetidos a LLLT, dado que ocorreu uma queda nas contagens de CFUs dos grupos tratados e não uma ausência de unidades formadoras de colônia. Informações da literatura mostraram que LLLT foi capaz de estimular atividade fungicida de neutrófilos infectados com fungos patogênicos da espécie *Candida albicans* (CERDEIRA *et al.*, 2016a; SPERANDIO *et al.*, 2015).

Apesar de não promoverem ação fungicida os PMNs irradiados mostraram-se mais competentes na eliminação de Pb18 do que os não tratados, uma vez que apresentaram maior  $K_p$ . Tal fato indica que LLLT pode modular a ação de PMNs e contribuir para o combate de Pb18.

## 7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados encontrados, podemos concluir que:

a)A irradiação com LASER de baixa potência realizada com comprimento de onda a 780 nm, potência de 50nW e energia fornecida de 12 J/cm<sup>2</sup> por 30 segundos gerou PMNs com viabilidade aumentada, comprovada pela contagem celular e atividade mitocondrial;

b)A irradiação com LASER de baixa potência realizada com comprimento de onda a 780 nm, potência de 50nW e energia fornecida de 12 J/cm<sup>2</sup> por 30 segundos estimulou produção de EROs totais;

c)A irradiação com LASER de baixa potência realizada com comprimento de onda a 780 nm, potência de 50nW e energia fornecida de 12 J/cm<sup>2</sup> por 30 segundos gerou um aumento nos níveis de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, importante metabólito do oxigênio para o combate de microrganismos durante o processo de fagocitose de PMNs;

d)A irradiação com LASER de baixa potência realizada com comprimento de onda a 780 nm, potência de 50nW e energia fornecida de 12 J/cm<sup>2</sup> por 30 segundos induziu atividade da enzima antioxidante catalase (CAT);

e)A irradiação com LASER de baixa potência realizada com comprimento de onda a 780 nm, potência de 50nW e energia fornecida de 12 J/cm<sup>2</sup> por 30 segundos estimulou a geração de proteínas totais pelos PMNs, fato que pode estar relacionado ao estímulo provocado por LLLT na síntese de fatores de transcrição;

f)A irradiação com LASER de baixa potência realizada com comprimento de onda a 780 nm, potência de 50nW e energia fornecida de 12 J/cm<sup>2</sup> por 30 segundos modulou a expressão de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias pelos PMNs irradiados. Aproximando a resposta dessas células para um perfil Th1. Como se sabe a resposta imune adquirida protetora na PCM é mediada por citocinas Th1 que ativam macrófagos, nossos resultados foram muito importantes no sentido de direcionar a imunidade adquirida para uma forma protetora eficiente;

g)A irradiação com LASER de baixa potência realizada com comprimento de onda a 780 nm, potência de 50nW e energia fornecida de 12 J/cm<sup>2</sup> por 30 segundos também foi capaz de promover uma diminuição na contagem de CFU;

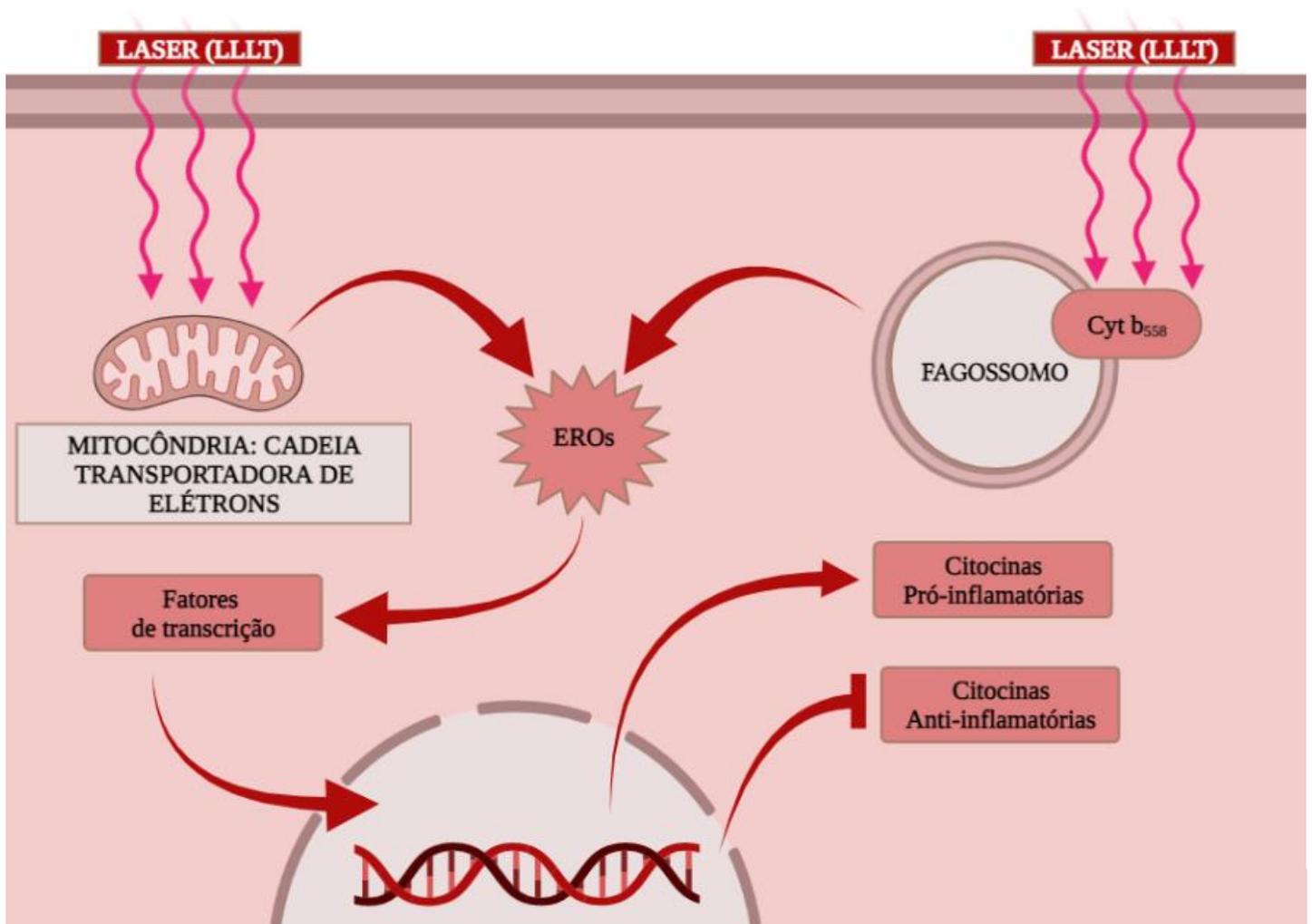
h)A irradiação com LASER de baixa potência realizada com comprimento de onda a 780 nm, potência de 50nW e energia fornecida de 12 J/cm<sup>2</sup> por 30 segundos tornou os PMNs mais aptos a promoverem a fagocitose de Pb18 quando comparado aos PMNs não irradiados.

Desta forma, os resultados sugerem que a LLLT pode aumentar o metabolismo dos PMN, tornando essas células mais competentes em sua atividade fungicida. Complementarmente, a terapia a LASER também foi capaz de modular a expressão de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Os achados supracitados também permitem levantar a hipótese de que a LLLT seja capaz de atuar ao nível do complexo enzimático NADPH oxidase dos PMNs estimulando os grupamentos heme presentes no flavocitocromo b<sub>558</sub>.

## 8 MECANISMO PROPOSTO

A figura 25 apresenta de forma sintética o provável mecanismo pelo qual a LLLT é capaz de estimular os PMNs.

Figura 25 - Mecanismo de ação proposto de LLLT sobre os neutrófilos.



Fonte: do autor (2021)

Legenda: A LLLT pode atuar tanto sobre as vias da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial e no citocromo b<sub>558</sub> do complexo enzimático NADPH oxidase do fagossomo, elevando os níveis de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Esses compostos derivados do oxigênio provavelmente estimulam fatores de transcrição, que atuam nível nuclear estimulando a produção de algumas citocinas pró-inflamatórias e inibindo outras com ação anti-inflamatória.

## REFERÊNCIAS

- ACORCI-VALÉRIO, M. J. *et al.* Role of TLR2 and TLR4 in human neutrophil functions against *paracoccidioides brasiliensis*. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 71, n. 2, p. 99–108, 2010.
- ACORCI, M. J. *et al.* Inhibition of human neutrophil apoptosis by *Paracoccidioides brasiliensis*: Role of interleukin-8. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 69, n. 2, p. 73–79, 2009.
- ADAMS, M. N. *et al.* Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 130, n. 3, p. 248–282, 2011.
- AEBI, H. Catalase in Vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. C, p. 121–126, 1984.
- ANDREOTTI, P. F. *et al.* Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes and Infection**, v. 7, n. 5–6, p. 875–881, 2005.
- ALGHAMDI, K. M. *et al.* A comparative study of the effects of different low-level lasers on the proliferation, viability, and migration of human melanocytes in vitro. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 5, p. 1541–1551, 2015.
- ALLEN, L. A. H. Mechanisms of pathogenesis: Evasion of killing by polymorphonuclear leukocytes. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 14, p. 1329–1335, 2003.
- ALLEN, L. A. H.; ADEREM, A. Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. **Journal of Experimental Medicine**, v. 184, n. 2, p. 627–637, 1996.
- ALMEIDA, A. J. *et al.* Cdc42p controls yeast-cell shape and virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, n. 12, p. 919–926, 2009.
- AMID, R. *et al.* Effect of low level laser therapy on proliferation and differentiation of the cells contributing in bone regeneration. **Journal of Lasers in Medical Sciences**, v. 5, n. 4, p. 163–170, 2014.
- ANDERSEN, G. I. History and Foundations of Laser Physics. n. April, 2020.
- ANDRADE, U. V. *et al.* Adesão ao tratamento de pacientes com paracoccidioidomicose na Região Centro-Oeste do Brasil. v. 45, n. 2, p. 1–6, 2019.
- ARANTES, T. D. *et al.* Environmental Mapping of *Paracoccidioides* spp. in Brazil Reveals New Clues into Genetic Diversity, Biogeography and Wild Host Association. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. 1–18, 2016.
- ARNING, M. *et al.* Infusion-related toxicity of three different amphotericin B formulations and its relation to cytokine plasma levels. **Mycoses**, v. 38, n. 11–12, p. 459–465, 1995.

- AVCI, P. *et al.* Low-level laser (light) therapy (LLLT) for treatment of hair loss. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 46, n. 2, p. 144–151, 2014.
- BABIOR, B. M. The Respiratory Burst of Phagocytic Leucocytes. **J. Clin. Invest.**, v. 73, p. 599–601, 1984.
- BAEHNER, R. L. *et al.* The role of superoxide anion and hydrogen peroxide in phagocytosis associated oxidative metabolic reactions. **Journal of Clinical Investigation**, v. 56, n. 3, p. 571–576, 1975.
- BAGAGLI, E. *et al.* High frequency of paracoccidioides brasiliensis infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): An ecological study. **Medical Mycology**, v. 41, n. 3, p. 217–223, 2003.
- BAGAGLI, E. *et al.* Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 6, n. 5, p. 344–351, 2006.
- BAGAGLI, E. *et al.* *Paracoccidioides brasiliensis*: Phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4–5, p. 197–207, 2008.
- BAGNIS, C. I.; DERAY, G. Amphotericin B Nephrotoxicity. **Journal, Saudi Nephrotoxicity, Amphotericin B**, v. 13, n. 4, p. 481–491, 2002.
- BAILÃO, E. F. L. C. *et al.* Hemoglobin Uptake by *Paracoccidioides* spp. Is Receptor-Mediated. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 5, 2014.
- BALDERRAMAS, H. A. *et al.* Human neutrophils produce IL-12, IL-10, PGE2 and LTB4 in response to *Paracoccidioides brasiliensis*. Involvement of TLR2, mannose receptor and dectin-1. **Cytokine**, v. 67, n. 1, p. 36–43, 2014.
- BALESTRINI, J. L.; NIKLASON, L. E. Extracellular Matrix as a Driver for Lung Regeneration. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 43, n. 3, p. 568–576, 2015.
- BANCHEREAU, J. *et al.* Immunobiology of Dendritic Cells. **Annual Review of Immunology**, v. 18, n. 1, p. 767–811, abr. 2000.
- BARBOSA, M. S. *et al.* The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase homologue is differentially regulated in phases of *Paracoccidioides brasiliensis*: Molecular and phylogenetic analysis. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, n. 7, p. 667–675, 2004.
- BARBOSA, M. S. *et al.* Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* Is a Cell Surface Protein Involved in Fungal Adhesion to Extracellular Matrix Proteins and Interaction with Cells. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 1, p. 382–389, jan. 2006.
- BARROZO, L. V. *et al.* First description of a cluster of acute/subacute

- paracoccidioidomycosis cases and its association with a climatic anomaly. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 3, p. 2–5, 2010.
- BARROZO, L. V. *et al.* Climate and acute/subacute paracoccidioidomycosis in a hyperendemic area in Brazil. **International Journal of Epidemiology**, v. 38, n. 6, p. 1642–1649, 2009.
- BARTON, C. H. *et al.* Renal magnesium wasting associated with amphotericin B therapy. **The American Journal of Medicine**, v. 77, n. 3, p. 471–474, 1984.
- BAYAT, M. *et al.* Effects of low-level laser therapy on mast cell number and degranulation in third-degree burns of rats. **Journal of Rehabilitation Research and Development**, v. 45, n. 6, p. 931–938, 2008.
- BELITARDO, D. R. *et al.* Paracoccidioides brasiliensis infection in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Mycoses**, v. 57, n. 4, p. 222–227, 2014.
- BELLISSIMO-RODRIGUES, F.; MACHADO, A. A.; MARTINEZ, R. Paracoccidioidomycosis epidemiological features of a 1,000-cases series from a hyperendemic area on the southeast of Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 3, p. 546–550, 2011.
- BENARD, G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4–5, p. 209–221, 2008.
- BHANDARI, P. Antifungal Drugs. In: **Pharmacology for Medical Undergraduates**. [s.l.] Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd., 2018. v. 53 Su Pt 1p. 469–469.
- BITTENCOURT, J. I. M.; DE OLIVEIRA, R. M.; COUTINHO, Z. F. Paracoccidioidomycosis mortality in the State of Paraná, Brazil, 1980/1998. **Cadernos de saúde pública / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública**, v. 21, n. 6, p. 1856–1864, 2005.
- BOCCA, A. L. *et al.* Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. **Future Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 1177–1191, set. 2013.
- BONFIM, C. V.; MAMONI, R. L.; LIMA BLOTTA, M. H. S. TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by Paracoccidioides brasiliensis. **Medical Mycology**, v. 47, n. 7, p. 722–733, 2009.
- BRUMMER, E. *et al.* Intracellular multiplication of Paracoccidioides brasiliensis in macrophages: Killing and restriction of multiplication by activated macrophages. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 8, p. 2289–2294, 1989.
- BRUMMER, E. *et al.* Paracoccidioidomycosis : an Update. v. 6, n. 2, p. 89–117, 1993.
- BUENO, R. A. *et al.* Antibodies against glycolipids enhance antifungal activity of

macrophages and reduce fungal burden after infection with *Paracoccidioides brasiliensis*.

**Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. FEB, p. 1–10, 2016.

BUISSA-FILHO, R. *et al.* The monoclonal antibody against the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* mediates immune protection in infected BALB/c mice challenged intratracheally with the fungus. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 7, p. 3321–3328, 2008.

BURGER, E. *et al.* *Paracoccidioides brasiliensis* infection in nude mice: Studies with isolates differing in virulence and definition of their T cell-dependent and T cell-independent components. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, n. 4, p. 391–398, 1996.

BURGER, E. *et al.* Low-level Laser Therapy to the Mouse Femur Enhances the Fungicidal Response of Neutrophils against *Paracoccidioides brasiliensis*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, p. e0003541, 12 fev. 2015.

BURGER, E. *Paracoccidioidomycosis* protective immunity. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, p. 1–26, 2021.

BURSTEIN ALVA, Z. Aspectos clínicos de la Blastomicosis sudamericana (Paracoccidioidomycosis) en el Perú. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica**, v. 19, n. 1, p. 43–47, 2002.

CABEZA-CABRERIZO, M. *et al.* Dendritic Cells Revisited. **Annual Review of Immunology**, v. 39, n. 1, p. 131–166, 26 abr. 2021.

CACERE, C. R. *et al.* The role of apoptosis in the antigen-specific T cell hyporesponsiveness of paracoccidioidomycosis patients. **Clinical Immunology**, v. 105, n. 2, p. 215–222, 2002.

CALICH, V. L. G.; COPPI VAZ, C. A.; BURGER, E. PMN chemotactic factor produced by glass-adherent cells in the acute inflammation caused by *Paracoccidioides brasiliensis*. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 66, n. 1, p. 57–65, 1985.

CALICH, V. L. G. *et al.* Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among the dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 94, n. 1, p. 75–79, 28 jun. 1993.

- CALICH, V. L. G.; KASHINO, S. S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 5, p. 615–623, 1998.
- CALLE, D. *et al.* Paracoccidioidomycosis in Columbia: An ecological study. **Epidemiology and Infection**, v. 126, n. 2, p. 309–315, 2001.
- CAMACHO, E.; NIÑO-VEGA, G. A. Paracoccidioides Spp.: Virulence Factors and Immune-Evasion Strategies. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, 2017.
- CAMPOS, E. P. DE *et al.* Aspectos clínicos e sorológicos de 47 pacientes com paracoccidioidomicose tratados pela anfotericina B. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 26, n. 4, p. 212–215, ago. 1984.
- CANO, L. E. *et al.* Depletion of CD8+ T cells in vivo impairs host defense of mice resistant and susceptible to pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 1, p. 352–359, 2000.
- CAPALDI, R. .; MALATESTA, F.; DARLEY-USMAR, V. . S T R U C T U R E O F C Y T O C H R O M E c O X I D A S E. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 726, p. 135–148, 1983.
- CARVALHO, F. M. C. *et al.* Polymorphisms on IFNG, IL12B and IL12RB1 genes and paracoccidioidomycosis in the Brazilian population. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 43, p. 245–251, 2016.
- CAVASSIN, F. B. *et al.* Sixty years of Amphotericin B: An Overview of the Main Antifungal Agent Used to Treat Invasive Fungal Infections. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 10, n. 1, p. 115–147, 2021.
- CAVENER, D. R. Chronic granulomatous disease. **Nature**, v. 325, n. 6099, p. 21, jan. 1987.
- CERDEIRA, C. D. *et al.* Low-level laser therapy stimulates the oxidative burst in human neutrophils and increases their fungicidal capacity. **Journal of Biophotonics**, v. 9, n. 11–12, p. 1180–1188, 2016a.
- CERDEIRA, C. D. *et al.* Low-level laser therapy stimulates the oxidative burst in human neutrophils and increases their fungicidal capacity. **Journal of Biophotonics**, v. 9, n. 11–12, p. 1180–1188, dez. 2016b.
- CEREGHETTI, D. M.; CARREIRA, E. M. Amphotericin B: 50 Years of Chemistry and Biochemistry. **Synthesis**, n. 6, p. 0914–0942, 2006.
- CHAGNOT, C. *et al.* Bacterial adhesion to animal tissues: Protein determinants for recognition of extracellular matrix components. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 11, p. 1687–1696, 2012.

- CHAI, L. Y. A. *et al.* An elevated pro-inflammatory cytokine response is linked to development of amphotericin B-induced nephrotoxicity. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 7, p. 1655–1659, 2013.
- CHAVES, A. F. A. *et al.* Updates in paracoccidioides biology and genetic advances in fungus manipulation. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, p. 1–28, 2021.
- CHAVES, E. G. A. *et al.* Analysis of Paracoccidioides secreted proteins reveals fructose 1,6-bisphosphate aldolase as a plasminogen-binding protein. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 1–14, 2015.
- CHEN, A. C. H. *et al.* Low-Level laser therapy activates NF- $\kappa$ B via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. 1–8, 2011.
- CHEN, C.-H. *et al.* Effects of Low-Level Laser Therapy on M1-Related Cytokine Expression in Monocytes via Histone Modification. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 1–13, 2014.
- CHRISTOFFERSSON, G.; PHILLIPSON, M. The neutrophil: one cell on many missions or many cells with different agendas? **Cell and Tissue Research**, v. 371, n. 3, p. 415–423, 2018.
- CHUNG, H. *et al.* The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 40, n. 2, p. 516–533, 2 fev. 2012.
- CORDERO, R. J. B.; CASADEVALL, A. Functions of fungal melanin beyond virulence. **Fungal Biology Reviews**, v. 31, n. 2, p. 99–112, mar. 2017.
- CORREDOR, G. G. *et al.* The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): A new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. **Medical Mycology**, v. 43, n. 3, p. 275–280, 2005.
- COUTINHO, Z. F. *et al.* Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil ( 1980-1995 ) Mortalidade por paracoccidioidomicose no Brasil ( 1980-1995 ). **Caderno Saúde Pública**, v. 18, n. 5, p. 1441–1454, 2002.
- CUDDIHY, G. *et al.* The development of oral amphotericin b to treat systemic fungal and parasitic infections: Has the myth been finally realized? **Pharmaceutics**, v. 11, n. 3, 2019.
- D'ARCY, M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell Biology International**, v. 43, n. 6, p. 582–592, 2019.
- DA COSTA, M. M.; MARQUES DA SILVA, S. H. Epidemiology, Clinical, and Therapeutic Aspects of Paracoccidioidomycosis. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 1, n. 2, p. 138–144, 2014.
- DA FONSECA, C. A. *et al.* Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes and Infection**, v. 3, n. 7, p. 535–542, 2001.
- DA MOTA MENEZES, V.; SOARES, B. G.; FONTES, C. J. F. Drugs for treating

- paracoccidioidomycosis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 2006.
- DA SILVA, T. A. *et al.* Extracellular vesicles from *Paracoccidioides brasiliensis* induced M1 polarization in vitro. **Scientific Reports**, v. 6, n. October, p. 1–10, 2016.
- DAMBUZA, I. M.; BROWN, G. D. C-type lectins in immunity: Recent developments. **Current Opinion in Immunology**, v. 32, p. 21–27, 2015.
- DAMBUZA, I. M.; BROWN, G. D. Sensing fungi at the oral epithelium. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 4–5, 18 jan. 2018.
- DANAHER, P. J. *et al.* Reversible dilated cardiomyopathy related to amphotericin B therapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 115–117, 2004.
- DE ALMEIDA, S. R. *et al.* Pattern of immune response to GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* in susceptible and resistant mice is influenced by antigen-presenting cells. **Cellular Immunology**, v. 190, n. 1, p. 68–76, 1998.
- DE ARRUDA GROSSKLAUS, D. *et al.* Response to oxidative stress in *Paracoccidioides* yeast cells as determined by proteomic analysis. **Microbes and Infection**, v. 15, n. 5, p. 347–364, 2013.
- DE BRITO, T.; NETTO, F. Disseminated Experimental South American Blastomycosis of the Guinea Pig; **Pathobiology**, v. 26, n. 1, p. 29–43, 1963.
- DE CASTRO, L. F. *et al.* Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. **Journal of Infection**, v. 67, n. 5, p. 470–485, 2013.
- DE FÁTIMA DA SILVA, J. *et al.* Influence of the paracoccidioides brasiliensis 14-3-3 and gp43 proteins on the induction of apoptosis in a549 epithelial cells. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 476–484, 2015.
- DE FELICE, E. Shedding light: Laser physics and mechanism of action. **Phlebology**, v. 25, n. 1, p. 11–28, 2010.
- DE FREITAS, L. F.; HAMBLIN, M. R. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. **IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics**, v. 22, n. 3, p. 348–364, 2016.
- DE LUCA, A. *et al.* IL-22 defines a novel immune pathway of antifungal resistance. **Mucosal Immunology**, v. 3, n. 4, p. 361–373, 2010.
- DE MACEDO, P. M. *et al.* COVID-19 and acute juvenile paracoccidioidomycosis coinfection. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 8, p. e0008559, 10 ago. 2020.
- DE MELO TEIXEIRA, M. *et al.* *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: Biological and clinical implications. **Medical Mycology**, v. 52, n. 1, p. 19–28, 2014.

- DE MESSIAS, I. J. T. *et al.* Association of major histocompatibility complex class III complement components C2, BF, and C4 with Brazilian paracoccidioidomycosis. **Complement and Inflammation**, v. 8, n. 5–6, p. 288–293, 1991.
- DE OLIVEIRA, H. C. *et al.* Importance of adhesins in virulence of *Paracoccidioides* spp. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. MAR, p. 1–14, 2015a.
- DE OLIVEIRA, H. C. *et al.* Paracoccidioides-host interaction: An overview on recent advances in the paracoccidioidomycosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. NOV, p. 1–20, 2015b.
- DE OLIVEIRA, P. *et al.* Paracoccidioides brasiliensis induces cytokine secretion in epithelial cells in a protease-activated receptor-dependent (PAR) manner. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 206, n. 2, p. 149–156, 2017.
- DEL NEGRO, G. M. B. *et al.* Evaluation of tests for antibody response in the follow-up of patients with acute and chronic forms of paracoccidioidomycosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 37–46, 2000.
- DEL VECCHIO, A. *et al.* Induction of apoptosis in A549 pulmonary cells by two *Paracoccidioides brasiliensis* samples. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 5, p. 749–754, 2009.
- DESMOND, E.; GRIBALDO, S. Phylogenomics of Sterol Synthesis: Insights into the Origin, Evolution, and Diversity of a Key Eukaryotic Feature. **Genome Biology and Evolution**, v. 1, p. 364–381, 2009.
- DIAS, M. F. R. G. *et al.* Human neutrophils susceptibility to *Paracoccidioides brasiliensis*: An ultrastructural and cytochemical assay. **Medical Mycology**, v. 46, n. 3, p. 241–249, 2008.
- DIAZ, M. *et al.* A pan-american 5-year study of fluconazole therapy for deep mycoses in the immunocompetent host. **Clinical Infectious Diseases**, v. 14, n. Suppl 1, p. S68–S76, 1992.
- DIEBOLD, B. A.; BOKOCH, G. M. Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase. **Nature Immunology**, v. 2, n. 3, p. 211–215, 2001.
- DIETZE, R. *et al.* Failure of amphotericin B colloidal dispersion in the treatment of paracoccidioidomycosis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 5, p. 837–839, 1999.
- DILLON, N. L. *et al.* Delayed results of treatment of paracoccidioidomycosis with amphotericin B plus sulfamides versus amphotericin B alone. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, n. 4, p. 263–266, ago. 1986.
- DO AMARAL, C. C. *et al.* Proteomic analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* complex isolates: Correlation of the levels of differentially expressed proteins with in vivo virulence.

**PLoS ONE**, v. 14, n. 7, p. 1–24, 2019.

DOS SANTOS, S. S. *et al.* Low-level laser therapy prevents muscle oxidative stress in rats subjected to high-intensity resistance exercise in a dose-dependent manner. **Lasers in Medical Science**, v. 35, n. 8, p. 1689–1694, 10 out. 2020.

DUPRÉ-CROCHET, S.; ERARD, M.; NÜBE, O. ROS production in phagocytes: why, when, and where? **Journal of Leukocyte Biology**, v. 94, n. 4, p. 657–670, 2013.

DUSI, S.; DONINI, M.; ROSSI, F. Mechanisms of NADPH oxidase activation: Translocation of p40phox, Rac1 and Rac2 from the cytosol to the membranes in human neutrophils lacking p47phox or p67phox. **Biochemical Journal**, v. 314, n. 2, p. 409–412, 1996.

EINSTEIN, A. The Quantum Theory of Radiation. **Physikalische Zeitschrift**, v. 18, p. 8, 1917.

ERWIG, L. P.; GOW, N. A. R. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 163–176, 2016.

ESMAEELINEJAD, M. *et al.* The effects of low-level laser irradiation on cellular viability and proliferation of human skin fibroblasts cultured in high glucose mediums. **Lasers in Medical Science**, v. 29, n. 1, p. 121–129, 2014.

FELONATO, M. *et al.* Anti-CD25 Treatment Depletes Treg Cells and Decreases Disease Severity in Susceptible and Resistant Mice Infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 2012.

FLANNAGAN, R. S.; COSÍO, G.; GRINSTEIN, S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 355–366, 2009.

FORMAN, H. J.; URSINI, F.; MAIORINO, M. An overview of mechanisms of redox signaling. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 73, n. 1, p. 2–9, ago. 2014.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: Regulation and function. **European Heart Journal**, v. 33, n. 7, p. 829–837, 2012.

FORTES, M. R. P. *et al.* Imunologia da paracoccidioidomicose. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 3, p. 516–524, jun. 2011.

FRANCK, P.; HENDERSON, P. W.; ROTHHAUS, K. O. Basics of Lasers: History, Physics, and Clinical Applications. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 43, n. 3, p. 505–513, 2016.

FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **Medical Mycology**, v. 25, n. 1, p. 5–18, jan. 1987.

FROZANFAR, A. *et al.* The effects of low level laser therapy on the expression of collagen type I gene and proliferation of human gingival fibroblasts (HGF3-PI 53): In vitro study. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 16, n. 10, p. 1071–1074, 2013.

- GALDINO, N. A. L. *et al.* Depletion of regulatory T cells in ongoing paracoccidioidomycosis rescues protective Th1/Th17 immunity and prevents fatal disease outcome. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–15, 2018.
- GAZENDAM, R. P. *et al.* How neutrophils kill fungi. **Immunological Reviews**, v. 273, n. 1, p. 299–311, 2016.
- GINHOUX, F.; JUNG, S. Monocytes and macrophages: Developmental pathways and tissue homeostasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 6, p. 392–404, 2014.
- GLORIEUX, C.; CALDERON, P. B. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. **Biological Chemistry**, v. 398, n. 10, p. 1095–1108, 26 set. 2017.
- GÓES, A. M. DE *et al.* Paracoccidioidomycosis disease (Lutz-Splendore-Almeida): etiology, epidemiology, and pathogenesis. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 24, n. 1, p. 58–63, 2014.
- GOIHMAN-YAHR, M. *et al.* Defect of In Vitro Digestive Ability of Polymorphonuclear Leukocytes in Paracoccidioidomycosis. **INFECTION AND IMMUNITY**, v. 28, n. 2, p. 557–566, 1980.
- GOIHMAN-YAHR, M. *et al.* Digestion of killed Paracoccidioides brasiliensis by neutrophils. **Mycopathologia**, v. 106, n. 1, p. 53–58, 1989.
- GÓMEZ, B. L. *et al.* Detection of melanin-like pigments in the dimorphic fungal pathogen Paracoccidioides brasiliensis in vitro and during infection. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 9, p. 5760–5767, 2001.
- GREEN, J. N.; WINTERBOURN, C. C.; HAMPTON, M. B. Analysis of Neutrophil Bactericidal Activity. In: **Methods in Molecular Biology**. [s.l: s.n.]. v. 2087p. 319–332.
- GRIZOT, S. *et al.* Crystal structure of the Rac1 - RhoGDI complex involved in NADPH oxidase activation. **Biochemistry**, v. 40, n. 34, p. 10007–10013, 2001.
- GROLL, A. H. *et al.* Clinical Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, Safety and Efficacy of Liposomal Amphotericin B. **Clinical Infectious Diseases**, v. 68, n. Suppl 4, p. S260–S274, 2019.
- HAHN, R. C. *et al.* In vitro comparison of activities of terbinafine and itraconazole against Paracoccidioides brasiliensis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 8, p. 2828–2831, 2002.
- HAKKIM, A. *et al.* Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. **Nature Chemical Biology**, v. 7, n. 2, p. 75–77, 2011.
- HALL, A. E. *et al.* Characterization of a Protective Monoclonal Antibody Recognizing

- Staphylococcus aureus MSCRAMM Protein Clumping Factor A. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 12, p. 6864–6870, 2003.
- HAMBLIN, M. R. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. **AIMS Biophysics**, v. 4, n. 3, p. 337–361, 2017.
- HAMPTON, M. B.; VISSER, M. C. M.; WINTERBOURN, C. C. A single assay for measuring the rates of phagocytosis and bacterial killing by neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 55, n. 2, p. 147–152, 1994.
- HEEB, L. E. M.; EGHOLM, C.; BOYMAN, O. Evolution and function of interleukin-4 receptor signaling in adaptive immunity and neutrophils. **Genes and Immunity**, v. 21, n. 3, p. 143–149, 2020.
- HERNÁNDEZ, O. *et al.* A 32-kilodalton hydrolase plays an important role in *Paracoccidioides brasiliensis* adherence to host cells and influences pathogenicity. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 12, p. 5280–5286, 2010.
- HERNÁNDEZ, O. *et al.* The hydrolase PbHAD32 participates in the adherence of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to epithelial lung cells. **Medical Mycology**, v. 50, n. 5, p. 533–537, 2012.
- HEUNG, L. J. Monocytes and the Host Response to Fungal Pathogens. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. February, p. 1–9, 2020.
- HEYWORTH, P. G. *et al.* Regulation of NADPH oxidase activity by Rac GTPase activating protein(s). **Molecular Biology of the Cell**, v. 4, n. 11, p. 1217–1223, 1993.
- HOEPRICH, P. D. Clinical use of amphotericin b and derivatives: Lore, mystique, and fact. **Clinical Infectious Diseases**, v. 14, p. S114–S119, 1992.
- HOHL, T. M. *et al.* Inflammatory Monocytes Facilitate Adaptive CD4 T Cell Responses during Respiratory Fungal Infection. **Cell Host and Microbe**, v. 6, n. 5, p. 470–481, 2009.
- HOPKINSON-WOOLLEY, J. *et al.* Macrophage recruitment during limb development and wound healing in the embryonic and foetal mouse. **Journal of Cell Science**, v. 107, n. 5, p. 1159–1167, 1994.
- HUANG, Y.-Y. *et al.* Low-level laser therapy (LLLT) reduces oxidative stress in primary cortical neurons in vitro. **Journal of Biophotonics**, v. 6, n. 10, p. n/a-n/a, 27 dez. 2012.
- IABUKI, K.; MONTENEGRO, M. R. EXPERIMENTAL PARACOCIDIOIDOMYCOSIS IN THE SYRIAN HAMSTER: MORPHOLOGY, ULTRASTRUCTURE AND CORRELATION OF LESIONS WITH PRESENCE OF SPECIFIC ANTIGENS AND SERUM LEVELS OF ANTIBODIES. **Mycopathologia**, v. 67, p. 131–141, 1979.
- IRIMIA, D. Neutrophil Swarms Are More Than the Accumulation of Cells. **Microbiology**

- Insights**, v. 13, p. 117863612097827, 10 jan. 2020.
- JAKUBZICK, C. V.; RANDOLPH, G. J.; HENSON, P. M. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 6, p. 349–362, 24 jun. 2017.
- JANNUZZI, G. P. *et al.* ScFv from antibody that mimics gp43 modulates the cellular and humoral immune responses during experimental paracoccidiodomycosis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–15, 2015.
- JANNUZZI, G. P. *et al.* Notch Signaling is Required for Dendritic Cell Maturation and T Cell Expansion in Paracoccidiodomycosis. **Mycopathologia**, v. 183, n. 5, p. 739–749, 18 out. 2018.
- JANNUZZI, G. P. *et al.* TLR3 is a negative regulator of immune responses against *Paracoccidiodomycosis*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. JAN, p. 1–10, 2019.
- JOHNSON, C. M. *et al.* Integrin Cross-Talk Regulates the Human Neutrophil Response to Fungal  $\beta$ -Glucan. **J Immunol**, v. 198, n. 1, p. 318–334, 2018.
- KAGAYA, K.; SHINODA, T.; FUKAZAWA, Y. Murine defense mechanisms against *Candida albicans* infection. **Microbiology and Immunology**, v. 25, n. 8, p. 647–654, 1981.
- KARKOWSKA-KULETA, J.; KOZIK, A. Moonlighting proteins as virulence factors of pathogenic fungi, parasitic protozoa and multicellular parasites. **Molecular Oral Microbiology**, v. 29, n. 6, p. 270–283, 2014.
- KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 49, n. 1, p. 1–17, 1999.
- KARU, T. I. Mitochondrial Signaling in Mammalian Cells Activated by Red and Near-IR Radiation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 84, n. 5, p. 1091–1099, set. 2008.
- KARU, T. I.; AFANAS'eva, N. I. [Cytochrome c oxidase as the primary photoacceptor upon laser exposure of cultured cells to visible and near IR-range light]. **Doklady Akademii nauk**, v. 342, n. 5, p. 693–5, 1995.
- KARU, T. I.; KOLYAKOV, S. F. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 23, n. 4, p. 355–361, 2005.
- KARU, T. I.; PYATIBRAT, L. V.; AFANASYEVA, N. I. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 36, n. 4, p. 307–314, 2005.
- KARU, T.; PYATIBRAT, L.; KALENDO, G. Irradiation with HeNe laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**,

v. 27, n. 3, p. 219–223, 1995.

KASHINO, S. S. *et al.* Effect of macrophage blockade on the resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Mycopathologia**, v. 130, n. 3, p. 131–140, 1995.

KASHINO, S. S. *et al.* Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN- $\gamma$  production. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 20, n. 1, p. 89–97, 2000.

KAUR, S. *et al.* A panoramic review of IL-6: Structure, pathophysiological roles and inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 5, p. 115327, 2020.

KENIYA, M. V. *et al.* Crystal structures of full-length lanosterol 14 $\alpha$ -demethylases of prominent fungal pathogens *Candida albicans* and *Candida glabrata* provide tools for antifungal discovery. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 11, 2018.

KERR, I. B.; DA COSTA, S. C. G.; ALENCAR, A. Experimental paracoccidioidomycosis in immunosuppressed mice. **Immunology Letters**, v. 5, n. 3, p. 151–154, 1982.

KRISHNAN-NATESAN, S. Terbinafine: a pharmacological and clinical review. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 10, n. 16, p. 2723–2733, 30 nov. 2009.

KUIJPERS, T.; LUTTER, R. Inflammation and repeated infections in CGD: Two sides of a coin. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, n. 1, p. 7–15, 2012.

KURITA, N. *et al.* Antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Medical Mycology**, v. 37, n. 4, p. 261–267, 1999.

LANIADO-LABORÍN, R.; CABRALES-VARGAS, M. N. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 4, p. 223–227, 2009.

LARSEN, S. B.; COWLEY, C. J.; FUCHS, E. Epithelial cells: liaisons of immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 62, p. 45–53, fev. 2020.

LEE, W. L.; HARRISON, R. E.; GRINSTEIN, S. Phagocytosis by neutrophils. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 14, p. 1299–1306, 2003.

LIMA, P. DE S. *et al.* Characterization of the *Paracoccidioides* Hypoxia Response Reveals New Insights into Pathogenesis Mechanisms of This Important Human Pathogenic Fungus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 12, p. 1–25, 2015.

LINDBERG, R. A.; HUNTER, T. cDNA cloning and characterization of eck, an epithelial cell receptor protein-tyrosine kinase in the eph/elk family of protein kinases. **Molecular and Cellular Biology**, v. 10, n. 12, p. 6316–6324, 1990.

LONGHI, L. N. A. *et al.* Phenotypic and Functional Characterization of NK Cells in Human Immune Response against the Dimorphic Fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 2, p. 935–945, 2012.

- LONGO, L. V. G. *et al.* Proteome of cell wall-extracts from pathogenic *Paracoccidioides brasiliensis*: Comparison among morphological phases, isolates, and reported fungal extracellular vesicle proteins. **EuPA Open Proteomics**, v. 3, p. 216–228, 2014.
- LOO, A. S.; MUHSIN, S. A.; WALSH, T. J. Toxicokinetic and mechanistic basis for the safety and tolerability of liposomal amphotericin B. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 12, n. 6, p. 881–895, 2013.
- LÓPEZ-MARTÍNEZ, R. *et al.* Paracoccidioidomycosis in Mexico: Clinical and epidemiological data from 93 new cases (1972-2012). **Mycoses**, v. 57, n. 9, p. 525–530, 2014.
- LORO MOREJÓN, K. M.; MACHADO, A. A.; MARTINEZ, R. Paracoccidioidomycosis in patients infected with and not infected with human immunodeficiency virus: A case-control study. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 3, p. 359–366, 2009.
- LOURES, F. V. *et al.* TLR2 Is a Negative Regulator of Th17 Cells and Tissue Pathology in a Pulmonary Model of Fungal Infection. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 2, p. 1279–1290, 2009.
- LOURES, F. V. *et al.* Dectin-1 induces M1 macrophages and prominent expansion of CD8 +IL-17+ cells in pulmonary paracoccidioidomycosis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n. 5, p. 762–773, 2014.
- LUTSAR, I.; ROFFEY, S.; TROKE, P. Voriconazole concentrations in the cerebrospinal fluid and brain tissue of guinea pigs and immunocompromised patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, n. 5, p. 728–732, 2003.
- LUTZ, A. **Uma mycose pseudococcidica localisada na boca e observada no Brazil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycose americanas.** *Bras-Méd*, 1908. Disponível em: <<http://www.anaisdedermatologia.org.br/detalhe-artigo/100643/Uma-Micose-Pseudococcidica-localizada-na-boca-e-observada-no-Brasil---Contribuicao-ao-conhecimento-das-Hifoblastomicoses-americanas%0Ahttp://www.bvsalutz.coc.fiocruz.br/lildbi/docsonline/pi/texto>>
- MACEDO, A. B. *et al.* Low-Level Laser Therapy (LLLT) in dystrophin-deficient muscle cells: Effects on regeneration capacity, inflammation response and oxidative stress. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–14, 2015.
- MAGON, N. J. *et al.* Analysis of Neutrophil Bactericidal Activity. **Methods in Molecular Biology**, v. 2087, p. 149–164, 2020.
- MANNA, S. K. *et al.* Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor- $\kappa$ B and activated protein-1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 21, p. 13245–13254, 1998.

- MANTOVANI, A. *et al.* Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 8, p. 519–531, 2011.
- MARCOS, C. M. *et al.* Surface-expressed enolase contributes to the adhesion of *Paracoccidioides brasiliensis* to host cells. **FEMS Yeast Research**, v. 12, n. 5, p. 557–570, 2012.
- MARTINEZ, R. Epidemiology of paracoccidioidomycosis. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 57, p. 11–20, 2015.
- MARTINEZ, R. New trends in paracoccidioidomycosis epidemiology. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, p. 1–13, 2017.
- MATOS, W. B. DE *et al.* Paracoccidioidomycosis in the state of Maranhão, Brazil: geographical and clinical aspects. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 3, p. 385–389, 2012.
- MATUTE, D. R. *et al.* Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, n. 1, p. 65–73, 2006.
- MC NEELY, W.; SPENCER, C. M. Butenafine. **Drugs**, v. 55, n. 3, p. 405–412, 1998.
- MELONI-BRUNERI, L. H. *et al.* Neutrophil oxidative metabolism and killing of *P. brasiliensis* after air pouch infection of susceptible and resistant mice. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 59, n. 4, p. 526–533, abr. 1996.
- MENDES-GIANNINI, M. J. *et al.* Invasion of epithelial mammalian cells by *Paracoccidioides brasiliensis* leads to cytoskeletal rearrangement and apoptosis of the host cell. **Microbes and Infection**, v. 6, n. 10, p. 882–891, ago. 2004
- MENDES-GIANNINI, M. J. S. *et al.* Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: Recent advances. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4–5, p. 237–248, 2008.
- MENDES, R. P. *et al.* Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. **The Open Microbiology Journal**, v. 11, n. 1, p. 224–282, 31 out. 2017.
- MENINO, J. F. *et al.* Morphological heterogeneity of *Paracoccidioides brasiliensis*: Relevance of the Rho-like GTPase PbCDC42. **Medical Mycology**, v. 50, n. 7, p. 768–774, 2012.
- MENINO, J. F. *et al.* TLR9 Activation Dampens the Early Inflammatory Response to *Paracoccidioides brasiliensis*, Impacting Host Survival. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 7, p. 1–11, 2013.
- MEYERHOLZ, D. K.; BECK, A. P.; SINGH, B. Innovative use of animal models to advance scientific research. **Cell and Tissue Research**, v. 380, n. 2, p. 205–206, 2020.

- MINAKAMI, R.; SUMIMOTO, H. Phagocytosis-coupled activation of the superoxide-producing phagocyte oxidase, a member of the NADPH oxidase (Nox) family. **International Journal of Hematology**, v. 84, n. 3, p. 193–198, 2006.
- MONK, J. P.; BROGDEN, R. N. Naftifine. **Drugs**, v. 42, n. 4, p. 659–672, out. 1991.
- MOREIRA, A. P. V. Paracoccidioidomycose: histórico, etiologia, epidemiologia, patogênese, formas clínicas, diagnóstico laboratorial e antígenos TT - Paracoccidioidomycosis: historical, etiologic agent, epidemiology, pathogenesis, clinical forms, laboratory diagnosis and a. **BEPA, Bol. epidemiol. paul. (Impr.)**, v. 5, n. 51, p. 11–23, 2008.
- MOSCARDI-BACCHI, M.; BRUMMER, E.; STEVENS, D. A. Support of Paracoccidioides brasiliensis multiplication by human monocytes or macrophages: Inhibition by activated phagocytes. **Journal of Medical Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 159–164, 1994.
- NARANJO, M. S. *et al.* Treatment of paracoccidioidomycosis with itraconazole. **Medical Mycology**, v. 28, n. 1, p. 67–76, 1990.
- NAUSEEF, W. M. Neutrophils, from cradle to grave and beyond. **Immunological Reviews**, v. 273, n. 1, p. 5–10, 2016.
- NETEA, M. G. *et al.* Recognition of fungal pathogens by toll-like receptors. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 23, n. 9, p. 672–676, 2004.
- NIEMZ, M. H. **Laser-Tissue Interactions**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2002. v. 53
- NORDENFELT, P.; TAPPER, H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 90, n. 2, p. 271–284, 2011.
- O'KEEFFE, M.; MOK, W. H.; RADFORD, K. J. Human dendritic cell subsets and function in health and disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 22, p. 4309–4325, 5 nov. 2015.
- OLIN, J. L. *et al.* Amphotericin B – Associated Hyperbilirubinemia : Case Report and Review of the Literature. 2006.
- OLIVI, G.; DE MOOR, R.; DIVITO, E. Lasers in endodontics: Scientific background and clinical applications. **Lasers in Endodontics: Scientific Background and Clinical Applications**, p. 1–298, 2016.
- OLLAGUE, J. M. *et al.* Paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis) successfully treated with terbinafine: First case report. **British Journal of Dermatology**, v. 143, n. 1, p. 188–191, 2000.
- OSTERHOLZER, J. J. *et al.* Accumulation of CD11b + Lung Dendritic Cells in Response to Fungal Infection Results from the CCR2-Mediated Recruitment and Differentiation of Ly-6C

- high Monocytes. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 12, p. 8044–8053, 15 dez. 2009.
- OTTONELLO, L. *et al.* Activation of neutrophil respiratory burst by cytokines and chemoattractants. Regulatory role of extracellular matrix glycoproteins. v. 47, p. 345–350, 1998.
- OUYANG, W.; O’GARRA, A. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 871–891, 2019.
- PACELLI, C. *et al.* Melanin is effective in protecting fast and slow growing fungi from various types of ionizing radiation. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 1612–1624, 22 abr. 2017.
- PALMIERI, E. M. *et al.* Nitric oxide orchestrates metabolic rewiring in M1 macrophages by targeting aconitase 2 and pyruvate dehydrogenase. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 2020.
- PANDAY, A. *et al.* NADPH oxidases: An overview from structure to innate immunity-associated pathologies. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 12, n. 1, p. 5–23, 2015.
- PANIAGO, A. M. M. *et al.* Paracoccidioidomycosis in patients with human immunodeficiency virus: Review of 12 cases observed in an endemic region in Brazil. **Journal of Infection**, v. 51, n. 3, p. 248–252, 2005.
- PARENTE-ROCHA, J. A. *et al.* Macrophage interaction with paracoccidioides brasiliensis yeast cells modulates fungal metabolism and generates a response to oxidative stress. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–18, 2015.
- PARENTE, A. F. A. *et al.* Proteomic analysis reveals that iron availability alters the metabolic status of the pathogenic fungus paracoccidioides brasiliensis. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, 2011.
- PARENTE, A. F. A. *et al.* A proteomic view of the response of Paracoccidioides yeast cells to zinc deprivation. **Fungal Biology**, v. 117, n. 6, p. 399–410, 2013.
- PARKER, H. *et al.* Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 92, n. 4, p. 841–849, 2012.
- PASSARELLA, S. *et al.* Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. **FEBS Letters**, v. 175, n. 1, p. 95–99, 1984.
- PASTORE, D. *et al.* Increase in  $\leftarrow\text{H}^+/\text{e}^-$  ratio of the cytochrome c oxidase reaction in mitochondria irradiated with Helium-Neon laser. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 34, n. 4, p. 817–826, 1994.

- PATENTE, T. A. *et al.* Human dendritic cells: Their heterogeneity and clinical application potential in cancer immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. JAN, p. 1–18, 2019.
- PATHAKUMARI, B.; LIANG, G.; LIU, W. Immune defence to invasive fungal infections: A comprehensive review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 130, n. June, p. 110550, 2020.
- PAUL, W. E.; ZHU, J. How are TH2-type immune responses initiated and amplified? **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 4, p. 225–235, abr. 2010.
- PEÇANHA, P. M. *et al.* Amphotericin B lipid complex in the treatment of severe paracoccidioidomycosis: a case series. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 4, p. 428–430, 2016.
- PEREIRA, P. M. R. *et al.* Paracoccidioidomicose sistêmica multifocal: desafio diagnóstico por manifestação cutânea tardia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 1, p. 149–152, fev. 2011.
- PERON, G. *et al.* Paracoccidioides brasiliensis infection increases regulatory T cell counts in female C57BL/6 mice infected via two distinct routes. **Immunobiology**, v. 225, n. 4, p. 151963, 2020.
- PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **Journal of Immunological Methods**, v. 38, n. 1–2, p. 161–170, 1980.
- PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **Journal of Immunological Methods**, v. 46, n. 2, p. 211–226, 1981.
- PINA, A. Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of hosts. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 79, n. 6, p. 1202–1213, 2006.
- PITULESCU, M. E.; ADAMS, R. H. Eph/ephrin molecules - A hub for signaling and endocytosis. **Genes and Development**, v. 24, n. 22, p. 2480–2492, 2010.
- PLANCK, M. On the Theory of the Energy Distributions Law of the Normal Spectrum. **Verhandl. Dtsch. phys. Ges.**, v. 237, n. 1900, p. 1–8, 1900.
- POLTORAK, A. *et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: Mutations in Tlr4 gene. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2085–2088, 1998.
- POPA-WAGNER, A. *et al.* ROS and Brain Diseases: The Good, the Bad, and the Ugly. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, n. Figure 1, p. 1–14, 2013.
- POPI, A. F. *et al.* B-1 cells facilitate Paracoccidioides brasiliensis infection in mice via IL-10 secretion. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 7, p. 817–824, 2008.

- POPI, A. F.; LOPES, J. D.; MARIANO, M. GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. **Cellular Immunology**, v. 218, n. 1–2, p. 87–94, 2002.
- PRADO, M. *et al.* Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 513–521, maio 2009.
- PUCCIA, R. *et al.* The *Paracoccidioides* cell wall: Past and present layers toward understanding interaction with the host. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, n. DEC, p. 1–7, 2011.
- PUERTA-ARIAS, J. D. *et al.* Depletion of neutrophils promotes the resolution of pulmonary inflammation and fibrosis in Mice infected with *paracoccidioides brasiliensis*. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, p. 1–23, 2016.
- QUEIROZ-TELLES, F. *et al.* An open-label comparative pilot study of oral voriconazole and itraconazole for long-term treatment of *paracoccidioidomycosis*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 11, p. 1462–1469, 2007.
- QUINN, M. T.; GAUSS, K. A. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 76, n. 4, p. 760–781, 2004.
- RAPPLEYE, C. A.; EISSENBERG, L. G.; GOLDMAN, W. E. Immune Recognition By the - Glucan Receptor. **Pnas**, v. 2006, p. 1–6, 2007.
- REÁTEGUI, E. *et al.* Microscale arrays for the profiling of start and stop signals coordinating human-neutrophil swarming. **Nature Biomedical Engineering**, v. 1, n. 7, p. 0094, 30 jul. 2017.
- REEVES, E. P. *et al.* Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K<sup>+</sup> flux. **Nature**, v. 416, n. 6878, p. 291–297, 2002.
- REEVES, E. P. *et al.* Reassessment of the microbicidal activity of reactive oxygen species and hypochlorous acid with reference to the phagocytic vacuole of the neutrophil granulocyte. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, n. 8, p. 643–651, 2003.
- RESTREPO, A. *et al.* Distribution of *paracoccidioidin* sensitivity in Colombia. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 17, n. 1, p. 25–37, 1968.
- RESTREPO, Á. *et al.* Treatment of *paracoccidioidomycosis* with ketoconazole: A three-year experience. **The American Journal of Medicine**, v. 74, n. 1, p. 48–52, jan. 1983.
- RESTREPO, S. *et al.* Development of pulmonary fibrosis in mice during infection with *paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Medical Mycology**, v. 30, n. 3, p. 173–184, 1992.

- REŽEN, T. *et al.* New aspects on lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase and cytochrome P450 evolution: Lanosterol/cycloartenol diversification and lateral transfer. **Journal of Molecular Evolution**, v. 59, n. 1, p. 51–58, 2004.
- ROBINSON, N. B. *et al.* The current state of animal models in research: A review. **International Journal of Surgery**, v. 72, p. 9–13, 2019.
- RODRIGUES, D. R. *et al.* Paracoccidioides brasiliensis killing by IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and GM-CSF activated human neutrophils: Role for oxygen metabolites. **Medical Mycology**, v. 45, n. 1, p. 27–33, 2007.
- ROMAGNOLO, A. G. *et al.* Role of Dectin-1 receptor on cytokine production by human monocytes challenged with Paracoccidioides brasiliensis. **Mycoses**, v. 61, n. 4, p. 222–230, abr. 2018.
- ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 4, p. 275–288, 2011.
- ROOS, D. *et al.* Protection of human neutrophils by endogenous catalase. Studies with cells from catalase-deficient individuals. **Journal of Clinical Investigation**, v. 65, n. 6, p. 1515–1522, 1980.
- ROSALES, C. Neutrophil: A cell with many roles in inflammation or several cell types? **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. FEB, p. 1–17, 2018.
- RUI, B. *et al.* A systematic investigation of Escherichia coli central carbon metabolism in response to superoxide stress. **BMC systems biology**, v. 4, p. 122, 2010.
- RYDER, N. S. Activity of terbinafine against serious fungal pathogens. **Mycoses, Supplement**, v. 42, n. 2, p. 115–119, 1999.
- SALGADO-SALAZAR, C. *et al.* The human fungal pathogen Paracoccidioides brasiliensis (Onygenales: Ajellomycetaceae) is a complex of two species: Phylogenetic evidence from five mitochondrial markers. **Cladistics**, v. 26, n. 6, p. 613–624, 2010.
- SAN BLAS, G.; VERNET, D. Induction of the synthesis of cell wall  $\alpha$  1,3 glucan in the yeastlike form of Paracoccidioides brasiliensis strain IVIC Pb9 by fetal calf serum. **Infection and Immunity**, v. 15, n. 3, p. 897–902, 1977.
- SANTOS JUNIOR, S. R. DOS *et al.* Intranasal vaccine using p10 peptide complexed within chitosan polymeric nanoparticles as experimental therapy for paracoccidioidomycosis in murine model. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 3, p. 1–14, 2020.
- SANTOS, L. A. *et al.* Virulence factors of Paracoccidioides brasiliensis as therapeutic targets: a review. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 113, n. 5, p. 593–604, 2020.

- SARDI, J. DE C. O. *et al.* In vitro Paracoccidioides brasiliensis biofilm and gene expression of adhesins and hydrolytic enzymes. **Virulence**, v. 6, n. 6, p. 642–651, 2015.
- SAWANT, K. V. *et al.* Chemokine CXCL1 mediated neutrophil recruitment: Role of glycosaminoglycan interactions. **Scientific Reports**, v. 6, p. 4–11, 2016.
- SEVERO, L. C. *et al.* THE PRIMARY PULMONARY LYMPH NODE COMPLEX IN PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS. **Mycopathologia**, v. 67, p. 115–118, 1979a.
- SEVERO, L. C. *et al.* The primary pulmonary lymph node complex in paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 67, n. 2, p. 115–118, 1979b.
- SHAFIEI, M. *et al.* History of the development of antifungal azoles: A review on structures, SAR, and mechanism of action. **Bioorganic Chemistry**, v. 104, n. August, p. 104240, 2020.
- SHANKAR, J. *et al.* Hormones and the resistance of women to paracoccidioidomycosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 2, p. 296–313, 2011.
- SHEPHERD, V. L. The role of the respiratory burst of phagocytes in host defense. **Seminars in Respiratory Infections**, v. 1, n. 2, p. 99–106, 1986.
- SHI, C.; PAMER, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 11, p. 762–774, 2011.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A. Paracoccidioidomycosis Treatment. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. suppl 19, p. 31–37, 2015.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A. *et al.* Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 715–740, 12 jul. 2017.
- SILVA-BAILÃO, M. G. *et al.* Hydroxamate production as a high affinity iron acquisition mechanism in Paracoccidioides Spp. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 2014.
- SILVA, J. DE F. DA *et al.* Paracoccidioides brasiliensis 30 kDa Adhesin: Identification as a 14-3-3 Protein, Cloning and Subcellular Localization in Infection Models. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 12–19, 2013.
- SILVA, L. B. R. *et al.* Dendritic cells primed with Paracoccidioides brasiliensis peptide P10 Are therapeutic in immunosuppressed mice with paracoccidioidomycosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUN, p. 1–10, 2017.
- SILVESTRE-ROIG, C. *et al.* Neutrophil Diversity in Health and Disease. **Trends in Immunology**, v. 40, n. 7, p. 565–583, 2019.
- SINGER-VERMES, L. M. *et al.* Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven paracoccidioides brasiliensis isolates in susceptible inbred mice. **Medical Mycology**, v. 27, n. 2, p. 71–82, 1989.

- SINGER-VERMES, L. M. *et al.* Experimental murine paracoccidiodomycosis: Relationship among the dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 94, n. 1, p. 75–79, 1993.
- SINHA, S.; YANG, W. Cellular signaling for activation of Rho GTPase Cdc42. **Cellular Signalling**, v. 20, n. 11, p. 1927–1934, 2008.
- SIRONI, M. *et al.* Evolutionary insights into host-pathogen interactions from mammalian sequence data. **Nature Reviews Genetics**, v. 16, n. 4, p. 224–236, 2015.
- SLINEY, D. H. What is light? the visible spectrum and beyond. **Eye (Basingstoke)**, v. 30, n. 2, p. 222–229, 2016.
- SOARES MENDES-GIANNINI, M. J. *et al.* Invasion of epithelial mammalian cells by *Paracoccidioides brasiliensis* leads to cytoskeletal rearrangement and apoptosis of the host cell. **Microbes and Infection**, v. 6, n. 10, p. 882–891, 2004.
- SONG, E. K. *et al.* Chronic granulomatous disease: A review of the infectious and inflammatory complications. **Clinical and Molecular Allergy**, v. 9, p. 1–14, 2011.
- SONG, S.; ZHOU, F.; CHEN, W. R. Low-level laser therapy regulates microglial function through Src-mediated signaling pathways: Implications for neurodegenerative diseases. **Journal of Neuroinflammation**, v. 9, n. 55, p. 1–17, 2012.
- SPERANDIO, F. F. *et al.* Resistance to *P. brasiliensis* Experimental Infection of Inbred Mice Is Associated with an Efficient Neutrophil Mobilization and Activation by Mediators of Inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015.
- SUTHERLAND, J. C. Biological Effects of Polychromatic Light¶. **Photochemistry and Photobiology**, v. 76, n. 2, p. 164–170, 2007.
- SWIDERGALL, M. *et al.* EphA2 is an epithelial cell pattern recognition receptor for fungal  $\beta$ -glucans. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 53–61, 13 jan. 2018.
- SZEZERBATY, S. K. F. *et al.* The effect of low-level laser therapy (660 nm) on the gene expression involved in tissue repair. **Lasers in Medical Science**, v. 33, n. 2, p. 315–321, 2018.
- SZYMANSKA, J. *et al.* Phototherapy with low-level laser influences the proliferation of endothelial cells and vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta secretion. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 64, n. 3, p. 387–91, jun. 2013.
- TAKAHASHI, M. *et al.* Protein kinase a-dependent phosphorylation of Rap1 regulates its membrane localization and cell migration. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 39, p. 27712–27723, 2013.

- TAMAYO, D. *et al.* Identification and Analysis of the Role of Superoxide Dismutases Isoforms in the Pathogenesis of *Paracoccidioides* spp. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1–23, 2016.
- TAMAYO, D. *et al.* *Paracoccidioides* spp. catalases and their role in antioxidant defense against host defense responses. **Fungal Genetics and Biology**, v. 100, n. 3, p. 22–32, mar. 2017.
- TANIGUCHI, K.; KARIN, M. NF- $\kappa$ B, inflammation, immunity and cancer: Coming of age. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 5, p. 309–324, 2018.
- TEIXEIRA, M. M. *et al.* Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 52, n. 2, p. 273–283, 2009.
- TEIXEIRA, M. M. *et al.* *Paracoccidioides* Species Complex: Ecology, Phylogeny, Sexual Reproduction, and Virulence. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 10, p. 4–7, 2014.
- TERAYAMA, A. M. *et al.* Influence of low-level laser therapy on inflammation, collagen fiber maturation, and tertiary dentin deposition in the pulp of bleached teeth. **Clinical Oral Investigations**, v. 24, n. 11, p. 3911–3921, 2020.
- TERÇARIOLI, G. R. *et al.* Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: Growth ability, conidia production and molecular detection. **BMC Microbiology**, v. 7, p. 1–8, 2007.
- THEODORO, R. C. *et al.* Genus *Paracoccidioides*: Species recognition and biogeographic aspects. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.
- THOMAZ, L. *et al.* Monoclonal antibodies to heat shock protein 60 induce a protective immune response against experimental *Paracoccidioides lutzii*. **Microbes and Infection**, v. 16, n. 9, p. 788–795, 2014.
- TOUYZ, R. M. *et al.* Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: Regulation by angiotensin II. **Circulation Research**, v. 90, n. 11, p. 1205–1213, 2002.
- TRAD, H. S. *et al.* Revisão radiológica de 173 casos consecutivos de paracoccidioidomicose. **Radiologia Brasileira**, v. 39, n. 3, p. 175–179, jun. 2006.
- TRIPATHI, P. Nitric oxide and immune response. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 44, n. 5, p. 310–319, 2007.
- TRISTÃO, F. S. M. *et al.* B Cell-Deficient Mice Display Enhanced Susceptibility to *Paracoccidioides brasiliensis* Infection. **Mycopathologia**, v. 176, n. 1–2, p. 1–10, 2013.
- TRISTÃO, F. S. M. *et al.* Th17-inducing cytokines il-6 and il-23 are crucial for granuloma Formation during experimental *Paracoccidioidomycosis*. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n.

AUG, p. 949, 2017.

TSAI, W. C. *et al.* Low-level laser irradiation stimulates tenocyte migration with up-regulation of dynamin II expression. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1–7, 2012.

TURISSINI, D. A. *et al.* Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 106, n. June, p. 9–25, 2017.

VALLEJO, M. C. *et al.* The pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* exports extracellular vesicles containing highly Immunogenic  $\alpha$ -galactosyl epitopes. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 3, p. 343–351, 2011.

VALLEJO, M. C. *et al.* Vesicle and vesicle-free extracellular proteome of *paracoccidioides brasiliensis*: Comparative analysis with other pathogenic fungi. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 3, p. 1676–1685, 2012.

VICENTINI, A. P. *et al.* Laminin-binding epitope on gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* is recognized by a monoclonal antibody raised against *Staphylococcus aureus* laminin receptor. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 35, n. 1, p. 37–43, 1997.

WALSH, L. J. *et al.* Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor  $\alpha$ , which induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 10, p. 4220–4224, 1991.

WALSH, T. J.; LEWIS, R. E.; ADLER-MOORE, J. Pharmacology of Liposomal Amphotericin B: An Introduction to Preclinical and Clinical Advances for Treatment of Life-threatening Invasive Fungal Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 68, n. Suppl 4, p. S241–S243, 2019.

WEINRAUCH, Y.; ZYCHLINSKY, A. The Induction of Apoptosis by Bacterial Pathogens. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 155–187, out. 1999.

WERINGER, E. J. *et al.* Effects of insulin on wound healing in diabetic mice. **Acta Endocrinologica**, v. 99, n. 1, p. 101–108, 1982.

WICKS, I. P.; ROBERTS, A. W. Targeting GM-CSF in inflammatory diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 12, n. 1, p. 37–48, 2016.

YUN, S. H.; KWOK, S. J. J. Light in diagnosis, therapy and surgery. **Nature Biomedical Engineering**, v. 1, n. 1, 2017.

ZAPH, C. *et al.* Epithelial-cell-intrinsic IKK- $\beta$  expression regulates intestinal immune homeostasis. **Nature**, v. 446, n. 7135, p. 552–556, 2007.

ZHANG, S. S. *et al.* A combination of receptor mediated transcytosis and photothermal effect promotes BBB permeability and the treatment of meningitis using itraconazole. **Nanoscale**, v. 12, n. 46, p. 23709–23720, 2020.

ZHANG, Y. *et al.* cDNA microarray analysis of gene expression profiles in human fibroblast cells irradiated with red light. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 120, n. 5, p. 849–857, 2003.

ZUNDLER, S.; NEURATH, M. F. Interleukin-12: Functional activities and implications for disease. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 26, n. 5, p. 559–568, 2015.